

**Abhängigkeit der Inositol-(1,4,5)-triphosphat-Konzentration von
Prolylendopeptidase – Ein neuer molekularer Mechanismus zur Erklärung
des Einflusses von Prolylendopeptidase-Inhibitoren auf seelische und
neurodegenerative Erkrankungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Ingo Schulz

geb. am: 02.03.1968 in: Annaberg-Buchholz

Gutachter:

1. PD Dr. H.-U. Demuth
2. Prof. Dr. G. Reuter
3. Prof. Dr. M. Hafner

Halle (Saale), den 26.02.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005408

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005408>]

**Meiner Familie,
Anna, Matti und Jana**

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Geräte, Materialien und Methoden	7
2.1 Geräte	7
2.2 Materialien	8
2.2.1 Chemikalien	8
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	12
2.2.3 Humane Zelllinien	12
2.2.4 Plasmid-Vektoren	13
2.2.5 Murine Gewebeproben	14
2.2.6 Humane Seren und Cerebrospinal-Flüssigkeiten	14
2.2.7 Verwendete Oligonukleotide	14
2.2.8 Nomenklatur von Plasmid-Vektoren und gentechnisch veränderten Organismen	15
2.3 Methoden	16
2.3.1 Kultivierungsmethoden	16
2.3.2 Molekularbiologische Methoden	18
2.3.3 Zellbiologische Methoden	22
2.3.4 Biochemische Methoden	25
3 Ergebnisse	31
3.1 Etablierung benötigter Plasmidvektoren, transgener Zelllinien, Inhibitoren und Antikörper	31
3.1.1 Herstellung von Plasmidvektoren	31
3.1.2 Etablierung stabiler transgener Zelllinien	33
3.1.3 Etablierung transgener Zelllinien zur Untersuchung der Adenylat-Cyclase-Kaskade	36
3.1.4 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Anti-PEP Antikörper	38
3.1.5 Hemmung der Aktivität von Prolylendopeptidase	43
3.2 Prolylendopeptidase in humanem und murinem Probenmaterial	46
3.2.1 Prolylendopeptidase in humanen Zelllinien	47
3.2.2 Prolylendopeptidase in extrazellulären Flüssigkeiten	49
3.2.3 Prolylendopeptidase im Rattenhirn	53
3.3 Subzelluläre Lokalisation von PEP in humanen Zelllinien	55
3.3.1 Zellfraktionierung der humanen neuronalen Zelllinien SH-SY5Y und U-343	55
3.3.2 Verteilung des PEP/EGFP-Fusionsproteines in humanen neuronalen Zelllinien	57
3.3.3 Immunzytologische Lokalisation von Prolylendopeptidase in humanen Zelllinien	58
3.4 Einfluß von Prolylendopeptidase auf Morphologie und Vitalität humaner Zelllinien	64
3.4.1 Erhöhung der endogenen Expression von Prolylendopeptidase	64
3.4.2 Verringerung der endogenen Expression von Prolylendopeptidase	66
3.4.3 Hemmung der Aktivität von Prolylendopeptidase	68
3.5 Einfluß von Prolylendopeptidase auf Signalketten in humanen Zelllinien	69
3.5.1 Einfluß der Prolylendopeptidase-Aktivität auf die Adenylat-Cyclase-Kaskade	70
3.5.2 Einfluß von Prolylendopeptidase auf die Phosphoinositidkaskade	72
3.5.3 Einfluß von Prolylendopeptidase auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung	81
3.5.4 Einfluß von Prolylendopeptidase auf die Expression des Transkriptionsfaktors c-fos	85
4 Diskussion	88
5 Zusammenfassung	101
6 Literaturverzeichnis	103
7 Anhang	124

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimersche Erkrankung
Ala	Alanin
Ang I	Angiotensin I
APP	Aminopeptidase P
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
as	anti sense
AVP	Vasopressin
bcl-2	<i>B-cell chronic lymphocytic leukemia gene 2</i>
BK	Bradykinin
-BT	-Benzothiazol
CaMK II	Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase II
cDNA	<i>complementary DNA</i>
-CN	-Cyanopyrrolidid
CRE	<i>cAMP response elements</i>
CREB	<i>cAMP response elements-binding protein</i>
CSF	<i>Liquor cerebrospinalis</i>
Da, kDa	Dalton, Kilo-Dalton
DNA	Desoxyribonukleisäure
DPIV	Dipeptidylpeptidase IV
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAP	<i>fibroblast activation protein</i>
Fmoc-	Fluorenylmethoxycarbonyl-
Gly	Glycin
G-Protein	guanylnukleotidbindendes Protein
HD	Chorea Huntington Erkrankung
IC ₅₀	halb-maximale Hemmkonzentration
IP ₄	Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat
IP ₅	Inositol-1,3,4,5,6-pentaphosphat
IP ₆	Inositol-1,2,3,4,5,6-hexaphosphat
IPP	Inositol-Polyphosphatase
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
LBK	Lewy body Erkrankung
LD ₅₀	lethale Dosis 50
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LH-RH	Luliberin
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MIPP	Multiple Inositol-Polyphosphatase
MPP	Inositol-Monophosphatase
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NPY	Neuropeptid Y
ns	nicht signifikant
NSP	<i>novel serine protease</i>

NT	Neurotensin
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
OT	Oxytocin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	Parkinsonsche Erkrankung
PDI	Protein-Disulfidisomerase
PEP	Prolylendopeptidase
Phe	Phenylalanin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Pro	Prolin
r	Korrelationskoeffizient
rhPEP	rekombinante humane Prolylendopeptidase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase- PCR</i>
SAM	<i>senescence-accelerated mouse</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP	Substanz P
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
U	Units
u/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Übernacht
ÜNK	Übernachtskultur
Xaa	eine der 20 proteinogenen Aminosäuren
Z-	Benzyloxycarbonyl-

Abkürzungen für Chemikalien und Medien siehe unter Kapitel 2.2 Materialien.

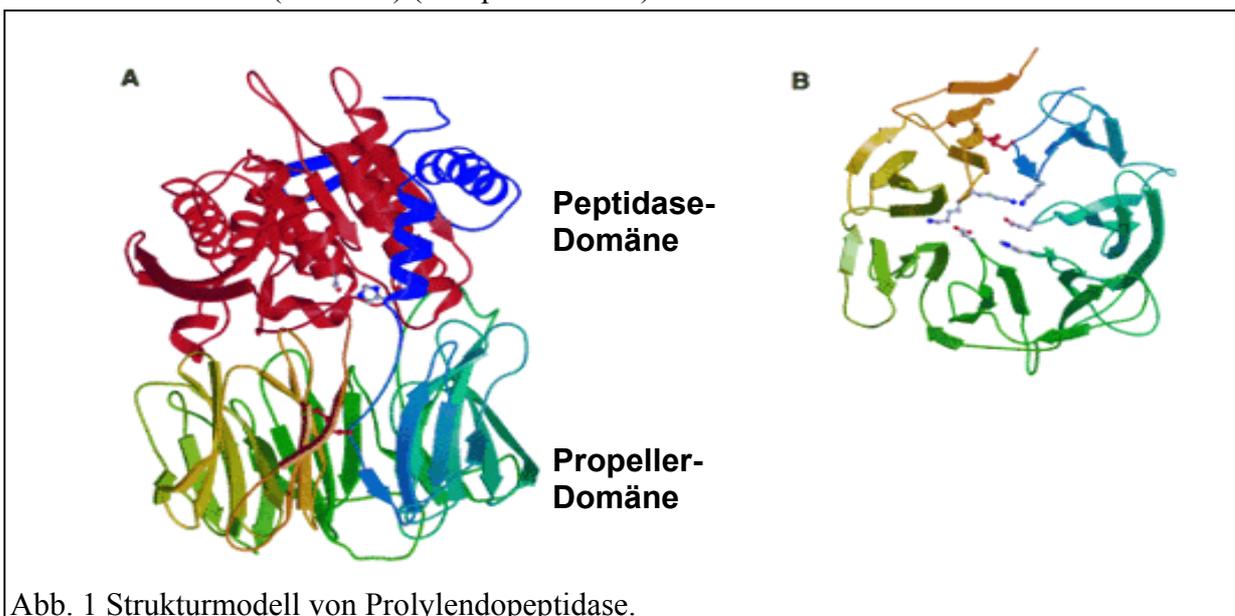
1 Einleitung

Hochspezifische Proteasen sind Enzyme mit regulatorischen Funktionen. Sie stellen wichtige Schaltstellen bei der Signalweiterleitung in physiologischen Prozessen dar. Im Vergleich zu Verdauungsenzymen wie Trypsin oder Chymotrypsin verfügen die hochspezifischen Proteasen über eine hohe Substratspezifität. Es erfolgt kein unspezifischer katabolischer Abbau des Zielproteines, sondern es werden gezielt einzelne Peptidbindungen hydrolysiert. Dieser Vorgang, limitierte Proteolyse genannt, ist ein wichtiges Funktionsprinzip im gesamten Organismenreich, um bioaktive Proteine wie z.B. Proteasen, Zytokine und Neuropeptide zu modulieren, aktivieren oder inaktivieren. Eine wichtige Voraussetzung der limitierten Proteolyse ist die spezifische Erkennungssequenz an Schlüsselstellen der Substrate. Neuropeptide wie Substanz P, Arg-Vasopressin, TRH und NPY haben an Schlüsselstellen ihrer Proteinsequenz die Iminosäure Prolin (Ekman et al. 1996) (Ansorge und Schon 1987). Prolin kommt auf Grund seiner zyklischen Struktur eine Sonderstellung innerhalb der 20 biogenen Aminosäuren zu. Die Iminosäure Prolin limitiert die Rotation um das Peptidrückgrat und führt so zu einer Fixierung der Peptidkette (Yaron und Naider 1993; Crawford et al. 1973). Andererseits kommt es zur Bildung von cis-, als auch trans-Imidbindungen vor dem Prolin (Creighton 1978; Rees et al. 1981). Außerdem besitzt Prolin keine funktionellen Gruppen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bzw. zur Resonanzstabilisierung der Peptidbindung. Dadurch ist Prolin in besonderer Weise an der Ausbildung von α -Helix- bzw. β -Faltblattstrukturen beteiligt. Diese Besonderheiten beeinflussen die Struktur und schützen prolinhaltige bioaktive Peptide vor dem katabolischen Abbau (Yaron 1987; Mentlein 1988).

Prolin-spezifische Proteasen im engeren Sinne sind in der Lage, Peptidbindungen C-terminal vom Prolin zu hydrolysieren. Sie stellen eine eigene Klasse von Serinproteasen dar und werden im Clan SC zusammengefaßt (Rawlings et al. 1991). Im Unterschied zu den Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin ist die im C-terminalen Bereich befindliche katalytische Triade in der Reihenfolge Serin-Histidin-Asparagin angeordnet (Rennex et al. 1991; Polgar 1992). Als post-Prolin-spaltende Endopeptidase wird Prolylendopeptidase innerhalb des Clans SC der Familie S9a zugeordnet. In der aktuellen Literatur wird für PEP eine Beteiligung an psychischen und neurodegenerativen Erkrankungen, sowie an Lern- und Gedächtnisprozessen diskutiert. Die molekularen Mechanismen dafür, einschließlich der endogenen Substrate, sind unaufgeklärt.

1.1 Prolylendopeptidase – Vorkommen, Struktur, Substratspezifität und biologische Relevanz

Prolylendopeptidase (PEP, EC 3.4.21.26) wurde erstmalig 1971 von Walter et. al. aus dem humanen Uterus isoliert und als ein Oxytocin abbauendes Enzym beschrieben. Bis dato wurden homologe Prolylendopeptidasen in einer Vielzahl von Organismengruppen wie Säugern, Pilzen, Insekten und Bakterien beschrieben (Rennex et al. 1991; Diefenthal et al. 1993; Yoshimoto et al. 1997; Ohtsuki et al. 1997). PEP ist in Säugern ubiquitär verteilt (Kato et al. 1980) und konnte z.B. in Muskel-, Nieren-, Hoden-, Lungen- und Gehirngewebsproben nachgewiesen werden (Goossens et al. 1996; Irazusta et al. 2002). Im Gehirn wurden die höchsten Aktivitäten gemessen, speziell in der Großhirnrinde und im Neostriatum (Irazusta et al. 2002; Mentlein et al. 1990; Gallegos et al. 1999). Zur subzellulären Lokalisation existieren in der aktuellen Literatur unterschiedliche Angaben. Auf Grund von Aktivitätsmessungen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurde PEP als zytosolisches (Dresdner et al. 1982), nukleäres (Ishino et al. 1998), synaptosomales (O'Leary et al. 1996) sowie als extrazelluläres Protein (Goossens et al. 1992) beschrieben. Die Aminosäuresequenz deutet allerdings auf eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation. Für die Existenz weiterer alternativ gespleißten mRNA-Varianten gibt es keine Hinweise, weder in der aktuellen Literatur, noch in den verfügbaren cDNA-Datenbanken. Weiterhin können in humanem Genom keine homologen PEP-Proteine identifiziert werden. Humane PEP besteht aus insgesamt 710 Aminosäuren mit einem Gesamtmolekulargewicht von ca. 80 kD (Rennex et al. 1991). In der Röntgenkristallstruktur konnten zwei strukturell bzw. funktionell diskrete Domänen identifiziert werden (Abb. 1A) (Fulop et al. 1998).



A) Frontalansicht des gesamten PEP-Moleküles. B) Aufsicht auf die Propeller-Domäne mit den 7 „Propellerblättern“ und dem in der Mitte befindlichen zentralen Kanal. [Abbildung aus Fülöp et al., 1998]

Der C-Terminus bildet die Domäne mit der katalytischen Triade, welche für die Enzymaktivität verantwortlich ist. Der N-terminale Teil des Proteins bildet eine 7-blättrige β -Propeller-Struktur. Die 7 „Propellerblätter“ formen einen zentralen Kanal, der direkt zum katalytischen Zentrum führt (Abb. 1B). Auf Grund des Kanals und der Anordnung zur katalytischen Domäne wird postuliert, daß die Propeller-Domäne als „ZugangsfILTER“ für Substrate zum katalytischen Zentrum fungiert (Fulop et al. 2000). Die Struktur des Propellers ist im Gegensatz zu anderen Proteinen, wie der β -Untereinheit von G-Proteinen oder der Kollagenase, auf Grund fehlender Wasserstoff- und Disulfidbrückenbindungen nicht starr geschlossen, sondern flexibel. Der dadurch in seinem Durchmesser veränderbare zentrale Kanal könnte somit Substrate nach ihrer Molekülgröße selektieren. Die Funktion der „Propeller-Domäne“ als aufgesetztes Selektionsmodul für die katalytische Aktivität konnte mit Hilfe von gerichteten Mutageneseexperimenten nachgewiesen werden. Der Austausch von Aminosäuren in der Propellerstruktur und der damit induzierten Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen zwischen den „Propellerblättern“ führt zu einer Reduzierung bzw. zum vollständigen Verlust der Aktivität von PEP (Fulop et al. 2000). In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, daß PEP vornehmlich Peptide mit bis zu 30 Aminosäuren hydrolysiert (Camargo et al. 1984; Taylor et al. 1980; Moriyama et al. 1988; Vanhoof et al. 1995; Cunningham und O'Connor 1997). Eine Hydrolyse höhermolekularer Substrate kann aber nicht ausgeschlossen werden. Es ist grundsätzlich möglich, daß lange Peptide ohne bzw. mit leicht aufzufaltender Sekundärstruktur N-terminal durch den zentralen Kanal an die S₁-Position gelangen können. So konnte *in vivo* nachgewiesen werden, daß das 40 kDa große p40-Phox-Protein durch PEP Prolin-spezifisch hydrolysiert wird (Hasebe et al. 2001). Interessant ist, daß dieses Protein eine alternative Spleißvariante darstellt und dadurch eine veränderte Sekundärstruktur hat. Möglicherweise erkennt PEP falsch gefaltene Proteinmoleküle und ist an ihrem spezifischen Abbau beteiligt. Mit Ausnahme des Proteines p40-Phox gibt es keine *in vivo*-Untersuchungen, in denen physiologische Substrate von PEP nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu konnte in einer Vielzahl von *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, daß PEP Neuropeptide Prolin-spezifisch hydrolysiert (Tab. 1).

Tab. 1 Von Prolylendopeptidase inaktivierte Neuropeptide.

Die PEP-vermittelte Hydrolyse der Peptidbindung erfolgt zwischen den hervorgehobenen Aminosäuren.

[Auszug aus Cunningham und O'Connor, 1997]

Neuropeptid	Aminosäuresequenz	Referenz
Angiotensin I (Ang I)	D-R-V-Y-I-H- P-F -H-L	(Moriyama et al. 1988)
Bradykinin (BK)	R-P-P-G-F-S- P-F -R	(Greene et al. 1982)
Substanz P (SP)	R-P-L- P-Q -Q-F-F-G-L-M	(Moriyama et al. 1988)
Neurotensin (NT)	pQ-L-Y-Q-N-L- P-R-R-P-Y -I-L	(Camargo et al. 1984)
Luliberin (LH-RH)	pQ-H-W-S-Y-G-L-R- P-G -NH ₂	(Mendez et al. 1990)
Vasopressin (AVP)	C-Y-F-Q-N-C- P-R -G	(Moriyama et al. 1988)
Oxytocin (OT)	C-Y-I-Q-N-C- P-L -G-NH ₂	(Walter et al. 1971)
Thyroliberin (TRF)	pQ-H- P -NH ₂	(Griffiths et al. 1982)

Im Gegensatz zur Struktur, zum katalytischen Mechanismus und zur Substratspezifität (Tab.1) (Fulop et al. 1998; Polgar et al. 1993; Polgar 1991; Welches et al. 1993) ist die physiologische Funktion von PEP noch weitgehend unklar. Aktuelle Untersuchungen basieren auf spezifische PEP-Inhibitoren, oder dem Nachweis veränderter PEP-Aktivitäten in verschiedenen Krankheitsbildern (Tab. 2). Es konnte gezeigt werden, daß die PEP-Aktivität bei Patienten mit psychischen und neurodegenerativen Erkrankungen (Tab. 2A) gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen erhöht bzw. erniedrigt ist. Die Erniedrigung der Aktivität bei einer Anzahl von Erkrankungen wie AD, PD, HD und LBK weist darauf hin, daß PEP an generellen neurodegenerativen Prozessen beteiligt ist (Mantle et al. 1996). Interessant ist, daß eine erhöhte PEP-Aktivität im Serum durch die Gabe des Stimmungsstabilisators Valproinsäure und des Antidepressivums Fluoxetin auf das ursprüngliche Niveau abgesenkt werden kann (Maes et al. 1995).

Zur Hemmung der hydrolytischen Aktivität von PEP existieren eine Anzahl von spezifischen Inhibitoren (Demuth et al. 1993; Barelli et al. 1999; Goossens et al. 1997) (Tezuka et al. 1999; Aoyagi et al. 1991; Ohmori et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe von spezifischen PEP-Inhibitoren neurodegenerative Erkrankungen, sowie Lern- und Gedächtnisprozesse beeinflusst werden können (Tab. 2B).

Tab. 2 Zusammenhang zwischen Prolylendopeptidase-Aktivität und physiologischen bzw. pathophysiologischen Prozessen (Auswahl).

Tabelle A: Veränderte PEP-Aktivitäten bei psychischen und neurodegenerativen Erkrankungen			
Krankheitsbild	Aktivität	Probenmaterial	Referenz
majore Depression	erniedrigt	humanes Serum	(Maes et al. 1994)
manische Depression	erhöht	humanes Serum	(Maes et al. 1995)
Schizophrenie			
Chorea Huntington	erniedrigt	humanes Gehirngewebe	(Pittaway et al. 1984)
Alzheimersche Erkrankung	erhöht	humanes Gehirngewebe	(Aoyagi et al. 1990)
LBK, AD, PD, HD	erniedrigt	humanes Gehirngewebe	(Mantle et al. 1996)
Tabelle B: Neuroprotektive und neurotrophe Effekte von PEP-Inhibitoren			
Inhibitor	Effekt	Modellorganismus	Referenz
Eurystatin A und B	revertiert Scopolamin-induzierte Amnesie	Ratte	(Kamei et al. 1992)
Y-29794	Reduziert die Bildung von Amyloidplaques im SAM-Modellsystem	Maus	(Kato et al. 1997)
ONO-1603	verzögert die Alters-induzierte Apoptose von Neuronen	Primärkultur neuronaler Zellen der Ratte	(Katsube et al. 1999)
S 17092	verbessert die kognitiven Fähigkeiten bei MPTP-induziertem Parkinsonismus	Langschwanzmakaken oder Javaneraffe	(Schneider et al. 2002)

So konnten z.B. mittels dem Inhibitor ONO-1603 die gleichen neuroprotektiven und neurotrophen Wirkungen erzielt werden, wie mit dem AD-Antidemenzwirkstoff Tetrahydroaminoacridin (THA) (Katsube et al. 1996). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß die γ -Secretase-spezifische Prozessierung von APP und die Bildung von Amyloidplaques durch PEP-Inhibitoren gehemmt bzw. verringert wird (Kato et al. 1997; Shinoda et al. 1997). Hinsichtlich von Lern- und Gedächtnisprozessen können mit Hilfe von PEP-Inhibitoren Gedächtnisstörungen, die z.B. durch Scopolamin oder Elektroschock induziert wurden, teilweise oder vollständig revertiert werden (Yoshimoto et al. 1987; Nanri und Kaneto 1987). Dabei konnte teilweise eine Konzentrationserhöhung von Neuropeptiden wie SP, AVP und LRH in verschiedenen Gehirnregionen von Inhibitor-behandelten Versuchstieren nachgewiesen werden (Shinoda et al. 1999; Miura et al. 1995; Atack et al. 1991; Nakajima et al. 1992). Für den eventuellen Einsatz als „kognitive Verstärker“ werden PEP-Inhibitoren bereits in klinischen Studien der Phase 1 getestet (Morain et al. 2000; Umemura et al. 1999; Umemura et al. 1997).

Allerdings sind die molekularen Mechanismen für den Einfluß von PEP auf die oben erwähnten Prozesse vollständig ungeklärt.

1.2 Aufgabenstellung

Es ist bekannt, daß im Gehirn von Säugern hohe Konzentrationen an PEP vorkommen. Obwohl in einer Anzahl von Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, daß PEP-Inhibitoren neuronale Prozesse beeinflussen, ist die physiologische Funktion von PEP weiterhin unklar. Zum einen sind die verantwortlichen molekularen Mechanismen nicht bekannt. Zum anderen gibt es unterschiedliche Daten zur Lokalisation, die die vorgeschlagene Funktion von PEP als Neuropeptid-abbauende Protease in Frage stellen. Auf Grund dessen sollten in dieser Arbeit die molekularen Mechanismen sowie die exakte Lokalisation von PEP untersucht werden, um neue Hinweise für die physiologische Funktion von PEP zu erhalten.

Die Lokalisation ist von entscheidender Bedeutung für die physiologische Funktion. Daher sollten in humanen neuronalen und glialen Zelllinien sowie im Gehirn der Wanderratte, *Rattus norvegicus*, die exakte subzelluläre bzw. regionale Verteilung von PEP untersucht werden. Im Gegensatz zu allen anderen Untersuchungen sollte die Lokalisation von PEP parallel mit Hilfe von Westernblot-Analysen, der Bestimmung und Charakterisierung von post-Prolyl-spaltenden Aktivitäten und mit Immunfluoreszenzmarkierungen ermittelt werden. Dafür war unter anderem die Etablierung eines neuen monoklonalen Antikörpers für die immunzytologischen Untersuchungen notwendig.

Für eine Beteiligung am Abbau von Neuropeptiden müßte PEP extrazellulär lokalisiert sein. Deshalb sollten extrazelluläre Flüssigkeiten wie humanes Serum, Liquor und Zellkulturüberstand hinsichtlich möglicher post-Prolin-spaltenden Aktivitäten charakterisiert werden.

Um neue Anhaltspunkte für die molekularen Interaktionen von PEP zu erhalten, sollte die Untersuchung des Einflusses von PEP auf die Zellmorphologie und Zellvitalität erfolgen. Dafür sollte zum einen nicht nur die Aktivität mittels spezifischer Inhibitoren gehemmt werden, sondern es sollte auch mit Hilfe von anti-sense-Zelllinien die Expression von PEP reduziert werden. Für die Durchführung dieser Untersuchungen sollten Zelllinien ermittelt werden, die eine hohe Expression und Aktivität an PEP zeigen. Zum anderen sollte untersucht werden, welchen Einfluß eine Erhöhung von PEP hat. Dafür sollten EGFP-Fusionsproteine generiert, und anschließend die ektopische Expression in humanen Zelllinien erfolgen.

Der Abbau von Neuropeptiden bedeutet, daß PEP an der Regulation von Signalkaskaden beteiligt ist (Defea et al. 2000). Die Regulation von Signalkaskaden erfolgt aber auch durch intrazelluläre Signalmoleküle wie die „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) (Berridge 1993; Bhat 1995; Feldkamp et al. 1997). Deshalb sollte der intrazelluläre Einfluß von PEP auf die Adenylat-Cyclase-Kaskade und die Phosphoinositid-Kaskade untersucht werden. Für die Untersuchung der Adenylat-Cyclase-Kaskade war es notwendig, eine transgene humane Zelllinie zu etablieren, in der die Expression des EGFP-Proteines unter der Kontrolle des Enhancer-Elementes *CRE* steht. Für die Untersuchung der Phosphoinositid-Kaskade sollten neben spezifischen PEP-Inhibitoren auch anti-sense-Zelllinien verwendet werden.

2 Geräte, Materialien und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller/Anbieter
Blotting-Apparatur TRANS-BLOT 5D	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
CCD-Kamera Spot RT SLIDER	Visitron Systems, Puchheim
CO ₂ -Inkubator MCO-17AI	Sanyo, Gunma, Japan
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
DNA-Gelelektrophorese GEB1A-UVT	Hybaid AGS, Heidelberg
Dounce-Homogenisator 7ml	WHEATON, Millville, USA
Eismaschine ZBE 30-10	ZIEGRA, Isernhagen
Feinwaage A120S-D1	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100	Zeiss, Jena
FPLC-System	Pharmacia Biotech, Erlangen
Gasbrenner Gasprofi 1	WLD-TEC, Göttingen
Gefriertruhe ECC-2080-5	National Lab, Mölln
Gelelektrophorese-System Mini-Protean II	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Inkubationsschrank B6 FUNCTION line	Hereus, Hanau
Kreischüttler GFL 3005	GFL, Burgwedel
Kryobehälter GT35 und ARPEGE40	AIRLIQUIDE, Marne-la-Vallee, Frankreich
Laserscanning-Mikroskop LSM510	Zeiss, Jena
Magnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach
Mikromörser	Roth, Karlsruhe
Mikroskopkamera MC80DX	Zeiss, Jena
Millipore Modell 8003 (Ultrafiltration)	Amicon, Witten
PCR-Gerät PCR Sprint	Hybaid AGS, Heidelberg
pH-Meter	Multilab, Berlin
Photometer SmartSpec 3000	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Plattenreader HTS 7000 PLUS	Perkin Elmer, Überlingen
Plattenreader SUNRISE	TECAN, Crailsheim
Reinstwasseranlage PURELAB Plus UV	USF SERAL, Ransbach-Baumbach
Schüttelinkubator KS-15/TH-15 und SM-30/TH-30	Bühler, Tübingen
Scintillator TRI-CARB 2100ZR	Packard, Dreieich
Sicherheitswerkbank KR-125 SAFETY	KOJAIR, Vilppula, Finnland
Sonifikator Sonopuls SH70G	BANDELIN, Berlin
Spektralfluorimeter SFM 25	Kontron, Neufahrn
Stromversorgungsgerät POWER-PAC 200 und 300	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Tischzentrifuge Biofuge pico	Hereus, Osterode
Ultrazentrifuge Optima Max	Beckman, Palo Alto, US
UV-System	iNTAS, Göttingen
Vortex 2 Genie	Scientific Industries, Bohemia, US
Wasserbad DC10	HAAKE, Karlsruhe
Wasserbad F25	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Allegra 21R und Avanti J20	Beckman, Palo Alto, US

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, in der Reinheitsstufe „z.A.“ von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Zur Herstellung von wässrigen Lösungen wurde Reinstwasser aus der Anlage PURELAB PLUS UV (Fa. PURELAB) verwendet.

Die Aufzählung der Substanzen erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Kulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller/Anbieter
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco, Augsburg
Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium (D-MEM, 41966029))	Invitrogen, Groningen, NL
Dulbecco`s PBS ohne Kalzium und Magnesium	Invitrogen, Groningen, NL
OPTIMEM 1	Invitrogen, Groningen, NL
RPMI Medium 1640	Invitrogen, Groningen, NL
Trypsin-Lösung mit 0,05% EDTA	Invitrogen, Groningen, NL
PFHM II Medium mit GLUTAMAX II	Invitrogen, Groningen, NL

Bioaktive Substanzen

Produkt	Hersteller/Anbieter
(Arg ⁸)-Vasopressin	Bachem, Heidelberg
Bradykinin	Calbiochem, Bad Soden
Carbachol	Calbiochem, Bad Soden
Forskolin	Calbiochem, Bad Soden
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
(-)-Isoproterenol	Sigma, Deisenhofen
Oxytocin	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Calbiochem, Bad Soden
rATP	Sigma, Deisenhofen
(RS)-3,5 Dihydroxyphenylglycin (DHPG)	Tocris, Bristol, UK
Serotonin	Sigma, Deisenhofen
Somatostatin	Sigma, Deisenhofen
Substanz P	Bachem, Heidelberg

Antibiotika

Produkt	Hersteller/Anbieter
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
G418	Calbiochem, Bad Soden
Gentamycin	Gibco BRL, Neu Isenburg
Kanamycin	Calbiochem, Bad Soden

Substrate und Inhibitoren

Produkt	Hersteller/Anbieter
AMC (7-amino-4-methylcoumarin)	Bachem, Heidelberg
AEBSF	ICN, Eschwege
Bacitracin	Sigma, Deisenhofen
Chymostatin	Sigma, Deisenhofen
Fmoc-AlaPyr-CN	Probiodrug AG, Halle/S.
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Nocotazol	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin A	ICN, Eschwege
Ribonuclease Inhibitor RNasin	Promega, Mannheim
E64 (trans-Epoxy succinyl-leucylamido-[4-guanidino]butan)	ICN, Eschwege
U73122 (1-[6-17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione)	Calbiochem, Bad Soden
Z-Gly-Pro-AMC	Bachem, Heidelberg
Z-Phe-Pro-BT	Probiodrug AG, Halle/S.

Primäre und Sekundäre Antikörper

Produkt	Hersteller/Anbieter
monoklonaler Calnexin-Antikörper	New England BioLab, Frankfurt/M
monoklonaler PDI-Antikörper	StreßGen, Victoria, CAN
monoklonaler Tubulin-Antikörper	Sigma, Deisenhofen
polyklonaler Actin-Antikörper	Sigma, Deisenhofen
polyklonaler c-fos-Antikörper (Ab-2)	oncogene, Darmstadt
polyklonaler PEP-Antikörper	Probiodrug AG, Halle/S.
polyklonaler Tubulin-Antikörper	Sigma, Deisenhofen
Ziege Anti-Kaninchen IgG FITC konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Kaninchen IgG Peroxidase konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Kaninchen IgG Rhodamin Red-X konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgG Peroxidase konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgM Peroxidase konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgG Rhodamin Red-X konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgM Rhodamin Red-X konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgM TRITC konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg

Enzyme

Produkt	Hersteller/Anbieter
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Promega, Mannheim
Alkalische Phosphatase (SAP)	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Boehringer, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
rekombinante humane Prolylendopeptidase	Probiodrug AG, Halle/S.
RNase H	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase	New England BioLab, Frankfurt/M
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

Sonstige Chemikalien

Produkt	Hersteller/Anbieter
DTT (1,4 Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
TEMED (1,2- (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine)	Sigma, Deisenhofen
DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylidol)	Molecular Probes, Leiden, NL
x-Gal (5-Bromo-4-chloro-indoxyl-phosphat)	Bachem, Heidelberg
Acrylamidlösung rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose Qualex Gold	Hybaid-AGS, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
CITIFLUOR	PLANO, Wetzlar
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
Bradford Reagenz	Sigma, Deisenhofen
DNA-Größenstandard Bioladder 100 pb	Hybaid-AGS, Heidelberg
DNA-Größenstandard Bioladder 1 kb	Hybaid-AGS, Heidelberg
DNA-Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
DNA-Oligonukleotidmix	Promega, Mannheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
fura-2 AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Immersol 518F	Zeiss; Oberkochen
IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid)	Roth, Karlsruhe
LipofectAMIN 2000	Gibco BRL, Neu Isenburg
Paraformaldehyd	ICN, Eschwege
Pluronic F-127	Molecular Probes, Leiden, NL
Polyfectin	Biontex, München
Protein-Molekulargewichtsstandard MultiMark	Invitrogen, Groningen, NL
Röntgenfilm-Entwickler	Tetanal, Norderstedt
Röntgenfilm-Fixierer	Tetanal, Norderstedt
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Scintillationsreagenz ULTIMA Gold XR	Packard, Dreieich
TRIzol-Reagenz	Gibco BRL, Neu Isenburg

Sonstige Labor-Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller/Anbieter
Autoradiographiekassette	Heinemann Laborfachhandel, Göttingen
Blutentnahmesystem S-Monovette mit Gerinnungsaktivator	Sarstedt, Nümbrecht
Chromatographiesäule HiTrap IgM	Pharmacia Biotech, Erlangen
Deckgläser 20x20 mm	Roth, Karlsruhe
Filterpipettenspitzen	Hybaid AGS, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturflasche 25 cm ² für Suspensionskultur	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflasche 25 cm ² Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflasche 75 cm ² Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
silikonisierte Mikroreaktionsgefäße 2 ml	SORENSEN, Salt lake City, USA
KODAK KB-Film Ektachrome EliteSelect 400	Nordphoto, Norderstedt
Kryoröhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikroreagenzgefäße 1,5 und 2 ml	Schubert Laborfachhandel, Espenhain
Nitrozellulose PROTRAN BA83	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger 76x26 mm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Schubert Laborfachhandel, Espenhain
PCR-Mikroreagenzgefäße 0,2 und 0,5 ml	Hybaid AGS, Heidelberg
Petrishalen d=3 cm und d=9,4 cm	Schubert Laborfachhandel, Espenhain
Pipettenspitzen 1000 µl	Gilson, über ABIMED, Langenfeld
Pipettenspitzen 200 und 10 µl	Roth, Karlsruhe
PP-Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml, Gamma-sterilisiert	Schubert Laborfachhandel, Espenhain
Röntgenfilm XL-XPosure	Pierce, über perbio Science, Bonn
Scintillationsmeßflasche, 20 ml	Roth, Karlsruhe
Serologische Einmalpipetten 5, 10 und 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Standard Hämozytometer	Superior, Marienfeld
Ultrafiltrationsmembran MWCO 30000 Da	Millipore, Bedford, USA
Zellkultur-Mikrotiterplatte Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturpetrishalen d=6 und D=9,4 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschale 3001	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen Quick-Seal 30 ml	Beckmann, Palo Alto, USA

Komplett-Systeme (Kit`s)

Produkt	Hersteller/Anbieter
CellTiter96 AQueous Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
CytoTox96 Cytotoxicity Assay	Promega, Mannheim
D-myo-IP ₃ -[³ H] Assay	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
JETquick GelExtraktion Spin Kit	Genomed, Oeynhausen
JETquick PCR Purification Kit	Genomed, Oeynhausen
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed, Oeynhausen
PCR-Script Amp bzw. Cam Cloning Kit	Stratagene, Cedar Creek, USA
THERMOSCRIPT™ RT-PCR Kit	Gibco BRL, Neu Isenburg
Ficoll-Paque PLUS“-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SuperSignal West Pico Chemiluminescence	Pierce, über perbio Science, Bonn

2.2.2 *Escherichia coli*-Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende *Escherichia coli*-Stämme benutzt:

Epicurian Coli XL10-Gold Kan ^R	(Fa. Stratagene, La Jolla USA, Kat.-Nr. 200315)
Epicurian Coli XL1-Blue Amp ^R	(Fa. Stratagene, La Jolla USA, Kat.-Nr. 200236)
JM109	(Fa. Promega, Mannheim, Kat.-Nr. L10019)

2.2.3 Humane Zelllinien

Folgende humane Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tab. 3 Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
A-431	Vulvakarzinom	3*
A-549	Lungenkrebs	3*
BeWo	Keimzelltumor	4*
CACO-2	Adenokarzinom des Dickdarms	4*
CAKI-1	Nierenkarzinom	3*
CAKI-2	Nierenkarzinom	3*
COLO-677	Bronchialkarzinom	3*
COLO-699	Bronchiales Adenokarzinom	3*
DV 145	Prostatakarzinom	3*
ECV-304	Nabelschnurkarzinom	3*
Fibro-177	Bindegewebskarzinom	3*
HEK 293	embryonales Nierenkarzinom	3*
MDA-MB-435S	Mammakarzinom	3*
LN-405	Astrocytom	2* (ACC 189)
LNZ-308	Gliom	3*
PC 3	Adenokarzinom der Prostata	3*
RCC 100	Nierenkarzinom	3*
T98-P31	Gliom	3*
T-Zellen,	Primärkultur	5*
SH-SY5Y	Neuroblastom	2* (ACC 209)
U-138-MG	Glioblastom	2* (ACC 291)
U-343	Gliom	1*

1* Institut für Experimentelle Innere Medizin, Otto von Guericke Universität, Magdeburg

2* Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

3* Dr. Riemann, D., Prof. Langner, J., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Medizinische Fakultät, Institut für Medizinische Immunologie

4* PD Dr. habil. Brandsch, M., Abteilung Tier. Zellkultur und Versuchstierhaltung, Bioservice
GmbH der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

5* Dr. Hoffmann, T., Probiodrug AG, Halle/S.

2.2.4 Plasmid-Vektoren

Folgende Plasmid-Vektoren wurden in dieser Arbeit als Klonierungsvektoren bzw. als Expressionsvektoren eingesetzt:

pPCR-Script Amp SK(+) bzw. Cam SK(+)

(Fa. Stratagene, La Jolla USA, Kat.-Nr.: 211188 bzw. 211192)

Beide Vektoren stammen vom Phagemid-Vektor pBluescript II SK(+) ab und sind besonders für die Klonierung von PCR-Fragmenten geeignet. Die beiden Vektoren unterscheiden sich in dem Vorhandensein der Resistenzgene für die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol. Durch β -Komplementierung des *lacZ*-Genes und Verwendung der Restriktionsendonuklease Srf I während der Ligation ist eine effiziente Selektion positiver Klone möglich.

pEGFP-N3

(Fa. Clontech, Heidelberg, Kat.-Nr.: 6080-1)

Der Vektor pEGFP-N3 ist geeignet für die ektopische Expression von EGFP-Fusionsproteinen in Säugerzellen. Die Fusion erfolgt dabei am N-Terminus des EGFP-Proteines. Diese Technik erlaubt es, Lokalisationsstudien in vivo oder in fixierten Zellen durchführen zu können, ohne spezifische Antikörper verwenden zu müssen. Der Vektor besitzt außerdem noch zwei Resistenzgene zur Selektion in Prokaryonten (Kanamycin-Resistenz) und zur Selektion in Säugerzellen (G418-Resistenz).

pIRESneo

(Fa. Clontech, Heidelberg, Kat.-Nr.: 6060-1)

Der pIRESneo Vektor ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen. Er enthält die sogenannte „internal ribosome entry site, IRES“ aus dem Encephalomyocarditis Virus (ECMV). Damit werden von einem bicistronischen mRNA-Molekül (2 offene Leseraster enthaltend) zwei unabhängige Proteine synthetisiert. Auf Grund dieser Tatsache läßt sich die Expression des Resistenzgenes (G418-Resistenz) mit der Expression des zu untersuchenden Genes koppeln. Der Vorteil dieser Kopplung ist die effiziente Selektion von Zell-Klonen, die das gewünschte Protein/RNA-Molekül in ausreichender Menge produzieren, da nur diese Klone gleichzeitig eine ausreichende Resistenz gegenüber dem eingesetzten Antibiotika aufweisen.

pcDNA3.1.+

(Fa. Invitrogen, Groningen, Kat.-Nr.: V790-20)

Der Vektor pcDNA3.1.+ ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen. Die Expression des inserierten Genes läuft konstitutiv unter dem CMV-Promotor ab. Der Vektor besitzt zwei Resistenzgene zur Selektion in Prokaryonten (Kanamycin-Resistenz) und zur Selektion in Säugerzellen (G418-Resistenz).

pCRE-EGFP

(Holloschi, A., Hafner, 2002)

Der Vektor pCRE-EGFP wurde durch Austausch des CMV-Promotorbereiches (pEGFP-N1, Fa. Clontech, Heidelberg, Kat.-Nr.: 6085-1) mit einer 188bp großen CRE-Enhancer/Promotor-Kassette hergestellt. Dadurch ist die Expression des EGFP-Proteines induzierbar. Der Vektor eignet sich für Untersuchungen zur Beeinflussung der Adenylat-Cyclase-Kaskade.

2.2.5 Murine Gewebeproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben aus Rattenhirnen (*Rattus norvegicus ssp. Vistar*, männlich, 7-8 Wochen alt) wurden von Dr. Sokolov, M. (Arbeitsgruppe PD Dr. Balschun, D., Leibnitz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) präpariert, schockgefroren und im eingefrorenen Zustand an Probiodrug AG verschickt.

2.2.6 Humane Seren und Cerebrospinal-Flüssigkeiten

Die humanen Cerebrospinal-Flüssigkeiten stammen von Spendern ohne klinischen Befund und wurden im Liquor-Labor des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg präpariert (Dr. Kornhuber, Fr. Köhler). Dazu wurden die frisch entnommenen Liquor-Proben bei RT für 10 Minuten mit 1000 u/min zentrifugiert und der zellfreie Überstand bei -20°C gelagert.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Seren stammen aus Frischblut-Präparationen von Mitarbeitern der Firma Probiodrug AG.

2.2.7 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und in lyophilisiertem Zustand verschickt (Tab. 4). Zur Herstellung von Stammlösungen wurden die Oligonukleotide in Aqua dest. gelöst. Die Konzentration betrug generell 100 pmol/ μl . Die Arbeitslösungen (20 pmol/ μl) wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit Aqua dest. erhalten. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -80°C , die der Arbeitslösungen bei -20°C .

Tab. 4 Verwendete Oligonukleotide.

Die hinsichtlich der chronologischen Nomenklatur fehlenden hPEP-Oligonukleotide wurden synthetisiert, aber nicht in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz
hActin-1	5`-GGA TCC ATG GAT GAT GAT ATC GCC GC-3`
hActin-3	5`-GAT AGC AAC GTA CAT GGC -3`
EGFP-1	5`-GGA GGT CTA TAT AAG CAG AG-3`
EGFP-2	5`-CCG GTG AAC AGC TCC TCG-3`
EGFP-3	5`-ATA GAA TTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C-3`
pcDNA-1	5`-CTA GAA GGC ACA GTC GAG-3`
pIRES-1	5`-CGA CTC ACT ATA GGG AGA C-3`
T7	5`-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3`
reverse primer	5`-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3`
hPEP-1	5`-CAT ATG CTG TCC TTC CAG TAC C-3`
hPEP-2	5`-GAA TTC CGC TGT CAG GAG GAA GCA CG-3`
hPEP-4	5`-GAA TTC TGG AAT CCA GTC GAC ATT CAG-3`
hPEP-5	5`-CAT ATG GGA ATT GAT GCT TCT GAT TAC-3`
hPEP-9	5`-GAA TCC GCT GGA ATC CAG TCG ACA TTC AG-3`
hPEP-12	5`-ATC TCG AGA CCA TGC TGT CCT TCC AGT ACC-3`
hPEP-21	5`-ATA GCG GCC GCC ATG CTG TCC TTC CAG TAC-3`
hPEP-24	5`-TGG AGG TGC AAA TGG AGG C-3`
hPEP-25	5`-GCC TCC ATT TGC ACC TCC A-3`

2.2.8 Nomenklatur von Plasmid-Vektoren und gentechnisch veränderten Organismen

Die Bezeichnung der hergestellten Vektoren erfolgte mit fortlaufenden Nummern in chronologischer Reihenfolge. Außerdem wurde generell der Zusatz „pIS“ (*plasmid Ingo Schulz*) verwendet. Zur Kennzeichnung der gentechnisch veränderten Organismen wurde dem Namen des Organismus die Bezeichnung des transfizierten Vektors beigelegt. Die Bezeichnung von Klonen, bei denen ein Aminosäure-Austausch vorgenommen wurde, erfolgte nach dem Nomenklaturvorschlag von Wetzel (Wetzel et al. 1988).

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierungsmethoden

2.3.1.1 Anzucht und Stammhaltung von *Escherichia coli*

Alle Arbeiten zur analytischen und präparativen Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurden gemäß den Protokollen von Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989 ausgeführt. Als Nährmedium wurde generell „LB Broth“ eingesetzt. Für feste Nährmedien (Agar-Platten) wurden zusätzlich 15 g Agar pro Liter LB-Broth-Medium zugefügt. Die Autoklavierung der Nährmedien erfolgte bei 121°C für 20 Minuten.

LB-Broth: 1.0% (w/v) Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
0.5% (w/v) Hefeextrakt
0.5% (w/v) NaCl

Für die Selektion von Transformanten wurden die Antibiotika Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml), Chloramphenicol (Stammlösung 34 mg/ml, Endkonzentration 34 µg/ml) und Kanamycin (Stammlösung 50 mg/ml, Endkonzentration 50 µg/ml) verwendet. Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten bei 8°C für ca 4-8 Wochen. Danach erfolgte der Ausstrich auf eine neue Agarplatte. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 5 ml ÜNK in LB-Medium angelegt und dann, mit 15 % Glycerin versetzt, zu je 200 µl bei –70°C eingefroren.

2.3.1.2 Kultivierung und Lagerung humaner Zelllinien

Die Kultivierung der einzelnen Zelllinien erfolgte bei 37°C in CO₂-Inkubatoren (Fa. SANYO, Japan). Die verwendeten Medien und CO₂-Konzentrationen sind in Tab.2 aufgeführt. Zusätzlich wurde jedem Medium 60µg/ml Gentamycin zugesetzt. Zur Kultivierung von adhärennten Zelllinien wurden Gewebekulturflaschen und –schalen mit verschiedenen Abmaßen verwendet (Fa. Greiner, Frickenhausen, Fa. TBB, Schweiz, Fa. Becton Dickenson, USA). Die Ablösung adhärennter Zellkulturen von ihrer Wachstumsunterlage erfolgte durch die Behandlung mit einer 2,5 %igen (m/v) Trypsinlösung (Fa. Life Technologies, Karlsruhe) für 1 min bei RT. Nach dem Absaugen der Trypsinlösung wurden die Zellen mit dem entsprechenden Medium bzw. mit PBS resuspendiert und in neue Kulturgefäße überführt. Die Suspensionskulturen wurden ausschließlich in dafür speziell vorgesehenen Kulturflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen) kultiviert. Für den Mediumwechsel wurden die

Suspensionskulturen bei 600 x g für 10 min (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellett mit neuem Medium resuspendiert.

Zur Langzeitlagerung wurden $0.5-1.0 \times 10^7$ Zellen/ml in FBS mit 10 % (v/v) DMSO schrittweise bis zu -80°C abgekühlt (ca. $3^\circ\text{C}/\text{h}$) und dann in flüssigem Stickstoff endgelagert.

Tab.5 Verwendete Medien und CO_2 -Konzentrationen für die Zellkultivierung.

Zelllinie	Medium	Serum in %(v/v)	CO_2 -Gehalt in %
U-343	D-MEM	10	5
SH-SY5Y	D-MEM	5	10
LN-405	D-MEM	10	10
U-138-MG	Ham`s F10	10	5
LNZ-308	RPMI1640	10	5
T98p31	RPMI1640	10	5
KS-4D4D6	PFHM II Medium mit GLUTAMAX II	10	5

2.3.1.3 Kultivierung humaner T-Lymphozyten

Die isolierten und gewaschenen T-Lymphozyten wurden in D-MEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS kultiviert. Die Anzahl der eingesäten Zellen je 25 cm^2 -Gewebekulturflasche betrug $1,5 \times 10^7$. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte im Rhythmus von 2 Tagen.

2.3.1.4 Kultivierung von Maus-Hybridomazelllinien und Produktion monoklonaler Antikörper

Die Kultivierung von Maus-Hybridomazelllinien erfolgte in RPMI II-Medium (Fa. Gibco BRL) unter Zugabe von 10 % (v/v) FBS im CO_2 -Inkubator (37°C , 5 % CO_2). Die Anzahl der eingesäten Zellen je 25 cm^2 -Suspensionskulturflasche (Fa. Greiner Bio ONE) betrug 1×10^6 . Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte im Rhythmus von 2 Tagen.

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden die Hybridomazellen (1×10^7 Zellen/ml) für 48 Stunden im proteinfreien Medium PFHM II (Fa. Gibco BRL) ohne FBS kultiviert. Nach 48 Stunden wurde das konditionierte Medium gesammelt und bei 4°C gelagert. Die Kulturen wurden halbiert und in frischem serumhaltigem D-MEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS weiter kultiviert, bis wiederum eine Zelldichte von ca. 1×10^7 Zellen/ml erreicht wurde. Dann erfolgte ein erneuter Mediumwechsel (serumfreies PFHM II) für 48 Stunden. Insgesamt wurden vier solcher Medienwechsel durchgeführt. Die gesammelten antikörperhaltigen Kulturüberstände wurden bei 600 x g für 10 min (RT) zentrifugiert und zu je 500 μl -Portionen bei -20°C gelagert.

2.3.2 Molekularbiologische Methoden

2.3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Alle verwendeten Geräte, Materialien und Lösungen wurden ÜN mit 0,01 % (v/v) DEPC (Fa. Roth) behandelt und anschließend 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien wurde TRIzol-Lösung (Fa. Gibco BRL) verwendet. Dabei wurden je Extraktion 1×10^7 Zellen nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die erhaltene Gesamt-RNA wurde in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch in einer 70 µl-Quarzküvette ($A_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$). Außerdem wurde zur Kontrolle die isolierte Gesamt-RNA in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.2.2 RT-PCR

Die Konvertierung von RNA in cDNA (RT-PCR) erfolgte mittels des THERMOSCRIPT™ RT-PCR SYSTEMS (Fa. Gibco BRL). Zur Synthese von cDNA-Pools wurde eine Mischung aus zufällig synthetisierten Hexanukleotid-Primern (Fa. Promega) verwendet. Die Durchführung der cDNA-Synthese erfolgte nach den detaillierten Anweisungen des Herstellers. Nach Beendigung der RT-PCR-Reaktion wurde der gesamte cDNA-Pool zu je 4 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäße portioniert und bei -20°C gelagert.

2.3.2.3 PCR

Die Synthese spezifischer DNA-Fragmente ausgehend von cDNA erfolgte mit Hilfe von PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity (Fa. Gibco BRL) und genspezifischen Primern (Fa. Metabion). Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers. Die eingesetzte Konzentration je Primer betrug 0,4 pmol/µl Reaktionsansatz. Die Syntheszeit richtete sich nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragmentes (500 bp/min). Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Anzahl der Syntheserunden betrug 25.

Die PCR-Reaktion zur Amplifizierung bzw. zur Modifizierung existierender DNA-Konstrukte erfolgte mittels Pfu-DNA Polymerase (Fa. Promega) und genspezifischen Primern (Fa. Metabion). Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug generell 25 µl. Die eingesetzte

Konzentration je Primer betrug 0,4 pmol/ μ l Reaktionsansatz. Die Synthesezeit richtete sich nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragmentes (500 bp/min). Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Anzahl der Syntheserunden betrug 30.

Die PCR-Reaktion zur Kontrolle isolierter E.coli-Klone sowie zur Bestimmung der 5'-3'-Orientierung integrierter DNA-Fragmente in Vektoren wurde mit Hilfe von Taq-DNA Polymerase (Fa. Promega) durchgeführt. Dazu erfolgte die Verwendung von gen- und vektorspezifischen Primern (Fa. Metabion) mit einer Endkonzentration von 0,4 pmol/ μ l Reaktionsansatz. Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers. Für die Untersuchung von E.coli-Klonen wurden diese mittels sterilem Zahnstocher von der Kulturplatte abgenommen und im Reaktionsansatz resuspendiert. Das verwendete Reaktionsvolumen betrug 25 μ l. Die Synthesezeit richtete sich nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragmentes (2500 bp/min). Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Anzahl der Syntheserunden betrug 20.

2.3.2.4 „Overlap“-PCR

Die gerichtete Punkt-Mutagenese von Genen unter Verwendung modifizierter genspezifischer Primer (Fa. Metabion) und Pfu-DNA Polymerase erfolgte mit Hilfe von „Overlap“-PCR. In einer ersten PCR-Reaktion wurde in 2 separaten Synthesen mittels 2 separaten Primerpaaren die Mutation eingefügt. Dabei wurden die Primerpaare so gewählt, daß sich die PCR-Produkte im Bereich der Mutation überlappen. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und anschließend isoliert. Danach erfolgte mit einem Gemisch aus den 2 isolierten Syntheseprodukten (je 50 ng DNA) eine zweite PCR-Reaktion unter Verwendung der 2 nicht modifizierten 5'- und 3'-Primer. Das Volumen der Reaktionsansätze betrug generell 25 μ l. Die eingesetzte Konzentration je Primer betrug 0,4 pmol/ μ l Reaktionsansatz. Die Synthesenzeiten richteten sich nach der Länge der herzustellenden DNA-Fragmente (500 bp/min). Die Annealingtemperaturen wurden in Abhängigkeit der Schmelztemperaturen der Primer gewählt. Die Anzahl der Syntheserunden betrug 30.

2.3.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach erfolgreicher Auftrennung der DNA im Agarosegel wurde das entsprechende Gelstück, das die zu isolierende DNA enthielt, mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA wurde der „Gel Extraction Spin Kit“ (Fa. Genomed) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten analog den Anweisungen des Herstellers.

2.3.2.6 Agarosegel-Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen in Agarosegelen verschiedener Konzentrationen (0.8-2 %) wurde das horizontale DNA/RNA Minigel System GE-B1A (Fa. AGS) verwendet. Dazu wurde die Agarose (Fa. PeQLab) mit TBE-Puffer (45 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0) unter Kochen gelöst und zur Anfärbung von DNA/RNA mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) versetzt. Nach dem Erstarren der Gele wurden die Probenauftragskämme entfernt und die DNA- bzw. RNA-Lösung (ca 5-50 µl) mit Probenpuffer (Fa. Promega) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 7-9 V/cm. Die Auftrennung größerer DNA-Mengen erfolgte mittels präparativer Probenauftragskämme. Die Auswertung und Dokumentation der DNA-Auftrennung im Agarosegel wurde mit Hilfe eines UV-Systems (Fa. Intas) durchgeführt.

2.3.2.7 Ligation von DNA

Für die Ligation von PCR-generierten DNA-Fragmenten wurde der „PCR-Script™ Cloning Kit“ (Fa. Stratagene) eingesetzt. Die Ligation erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren erfolgte unter Verwendung von T4-Ligase (Fa. NewEnglandBiolab). Folgender Reaktionsansatz wurde dafür gewählt:

linearisierte Vektor-DNA	1-4 µl (100-200 ng)
DNA-Fragment	3-13 µl (300-600 ng)
T4 DNA Ligase	1 µl (0.4 U)
10-fach Reaktionspuffer	2 µl (1-fach)
Aqua dest.	auf 20 µl Endvolumen

Die Ligation erfolgte in 4-6 Stunden bei RT. „Blunt end“-Ligationen erfolgten ÜN bei 16°C. Anschließend wurde die Ligase für 10 min bei 65°C Hitze-inaktiviert. Zur Transformation von 200 µl *E.coli*-Zellen wurden 5-10 µl des Reaktionsansatzes eingesetzt.

2.3.2.8 Herstellung von kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Cohen (Cohen et al. 1972). Mit Hilfe von 1ml ÜNK wurden 4 x 100 ml LB-Medien angeimpft und bis zu einer OD_{550nm} von 0.3 – 0.5 kultiviert. Danach wurden die *E.coli*-Kulturen für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und bei 4000 x g (4°C) abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens TFB1-Puffer (30m M K-Acetat, 50 mM

MnCl₂, 100 mM RbCl, pH 5.8) resuspendiert und anschließend auf die Hälfte des Ausgangsvolumens mit TFB1-Puffer aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis erfolgte die Zentrifugation bei 4000 x g (4°C) für 10 min. Die sedimentierten Zellen wurden in 1/25 des Ausgangsvolumens TFB2-Puffer (10 mM MOPS pH 7.0, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl und 15% Glycerol) aufgenommen und für mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurden jeweils 200 µl der kompetenten Zellen direkt benutzt oder portioniert bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte mittels pUC18-Plasmides entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Fa. Stratagen). Die ermittelte Transformationseffizienz lag zwischen 10⁷-10⁸ Transformanten/ µg pUC18-DNA.

2.3.2.9 Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit 5-10 µl Ligierungsansatz gemischt und sequentiell für 40 Minuten auf Eis, 45 Sekunden bei 42°C und abschließend 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium (42°C) wurden die Zellen unter Schütteln (150 u/min) für 1 h bei 37°C kultiviert. Danach erfolgte die Ausplattierung von 100 µl Zellsuspension auf Platten mit dem entsprechenden Selektivmedium (Ampicillin 100 µg/ml bzw. Kanamycin 50 µg/ml) und die Inkubation bei 37°C ÜN. Der Rest der Zellsuspension wurde bei 1000 x g für 2 Minuten abzentrifugiert und bis auf 100 µl der gesamte Überstand verworfen. Die in 100 µl resuspendierten *E.coli*-Zellen wurden anschließend, wie oben beschrieben, ausplattiert und inkubiert.

2.3.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen wurde im analytischen Maßstab (3ml ÜNK) mittels des „JETquick Spin Column Plasmid Miniprep Kit“ (Fa. Genomed) und im präparativen Maßstab (100 ml ÜNK) mittels des „Endo Free Plasmid Midi Kit“ (Fa. QIAGEN) durchgeführt. Dabei erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA nach den detaillierten Protokollen der Hersteller. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch (1 A_{260nm} = 50 µg/ml doppelsträngige DNA).

2.3.2.11 Restriktion von DNA

Die analytische (20 µl Endvolumen) und präparative (50-100 µl Endvolumen) Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den detaillierten Vorschriften der Hersteller. Die DNA-Spaltung wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

2.3.2.12 Dephosphorylierung der 5`-Enden von linearisierter DNA

Zur Verhinderung der Selbstligation wurden die 5`-Enden unikal-linearisierter DNA-Moleküle mit Hilfe von alkalischer Phosphatase „SAP“ (Fa. Promega) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgte analog den Anweisungen des Herstellers. Die alkalische Phosphatase wurde durch Inkubation für 15 Minuten bei 65°C inaktiviert.

2.3.2.13 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Zur Klonierung von DNA-Kassetten (kleine, doppelsträngige DNA-Fragmente) in Plasmid-Vektoren wurden die entsprechenden Oligonukleotide (Fa. Metabion) hybridisiert. Für die Hybridisierung wurden je 25 pmol von jedem Oligonukleotide eingesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes in einem sich langsam abkühlenden Wasserbad (85-40°C). Für die Ligation wurden 2 µl hybridisierte Oligonukleotid-Lösung eingesetzt.

2.3.3 Zellbiologische Methoden

2.3.3.1 Zellzahlbestimmung mittels Hämozytometer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Standard-Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer, Fa. Roth, Karlsruhe). Dafür wurden adhären-wachsende Zellen für 1 Minute mit 2,5%iger (m/v) Trypsinlösung (Fa. Life Technologies, Karlsruhe) behandelt, anschließend unter Zugabe des entsprechenden Mediums oder PBS von ihrer Wachstumsunterlage ab gespült und resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl (je Zell-Probe 2 x 4 Großquadrate) erfolgte eine entsprechende Verdünnung mit Medium bzw. PBS. Dabei entsprachen 100 gezählte Zellen/Großquadrat = 1×10^6 Zellen/ml Suspension.

2.3.3.2 Zytotoxizitätstest

Zur Bestimmung der Toxizität von Inhibitoren auf humane Zellkulturen wurde der „CytoTox96“-Test (Fa. Promega) eingesetzt. Die zu untersuchenden Zelllinien wurden dafür in Mikrotiterplatten eingesät und für 24 Stunden im entsprechenden Medium (Tab.2) kultiviert. Je nach Versuchsaufbau erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren für 24 bis 72 Stunden in serumfreiem Kulturmedium. Anschließend wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers die LDH-Aktivität im Kulturüberstand und im Überstand des Zellextraktes ermittelt. Das prozentuale Verhältnis von extrazellulärer und intrazellulärer

LDH-Aktivität entspricht der Zytotoxizität des eingesetzten Inhibitors. Als Kontrolle wurden unbehandelte und mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt.

2.3.3.3 Proliferationstest

Zur Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren auf die Proliferation humaner Zelllinien wurde der CellTiter96 AQueous Cell Proliferation-Test (Fa. Promega) eingesetzt. Die entsprechenden Zelllinien wurden in Mikrotiterplatten eingesät und für 72 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen im serumhaltigen Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der Proliferation analog den Anweisungen des Herstellers. Als Kontrolle wurden unbehandelte und mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt.

2.3.3.4 Transfektion humaner Zelllinien

Die Transfektion von Expressionsvektoren in humane Zelllinien erfolgte mit den Transfektionslösungen Polyfectin (Fa. Biontex) und LipfectAMIN 2000 (Fa. Gibco BRL) entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Die Transfektion erfolgte für 6 Stunden im Optimum I-Medium. Danach wurden die Zellen in ihrem entsprechenden Medium weiter kultiviert (Tab.5).

2.3.3.5 Isolierung stabiler transgener Zelllinien

Die transfizierten Zelllinien wurden 1 Woche lang mit 600 µg/ml G418 behandelt. Nach einer Woche erfolgte der permanente Zusatz von 400 µg/ml G418 in das Kulturmedium. Die sich entwickelnden G418-resistenten Zellklone wurden mit Hilfe von Klonierungsringsen (Fa. Clontech) und Trypsin (Fa. Invitrogen) oder durch direktes Absaugen mit sterilen 100 µl-Filterpipettenspitzen (Fa. Hybaid AGS) von ihrer Wachstumsunterlage abgelöst und separat in Mikrotiterplatten weiter kultiviert.

2.3.3.6 Kalzium-Messung

Zur Untersuchung der intrazellulären Kalziumfreisetzung erfolgte die Kultivierung humaner Zellen für 24 Stunden in D-MEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS auf kreisrunden Deckgläsern (Fa. Plano). Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in Optimum I-Medium bzw. serumfreiem D-MEM-Medium kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit Kalzium-Meßpuffer (137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂ x 2H₂O; 0,8 mM MgSO₄ x 7H₂O; 20 mM HEPES; 5,6 mM EGTA, pH 7,4) wurden die Zellen mit 1 µM Fura-2 AM und 0,1 %

(v/v) Pluronic (Fa. Molecular Probes) für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach dem erneuten 3 x Waschen mit Kalzium-Puffer wurden die Deckgläser in die Kalzium-Meßkammer (Fa. LaCon) überführt, und die Zellen mit 1ml Kalzium-Meßpuffer überschichtet. Die Ermittlung der Fluoreszenz-Intensitäten bei 350 und 380 nm erfolgte im Abstand von 5 Sekunden mittels Axiovert 100 TV Fluoreszenz-Mikroskop (Fa. Zeiss), ausgestattet mit einem Polychrome II Monochromator (Fa. TILL Photonics) und einer Hamamatsu C4880-80 Videokamera (Fa. Hamamatsu Photonics). Je Versuch wurden 4-8 Zellen gleichzeitig untersucht. Nach Messung der Ausgangs-Fluoreszenzintensität für 50 Sekunden erfolgte die Stimulation der intrazellulären Kalziumfreisetzung durch Absaugen des Meßpuffers und sofortiges Überschichten mit neuem Meßpuffer, in dem die entsprechenden Substanzen gelöst sind. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3-5 Minuten untersucht. Die Kalkulation und Auswertung der aufgenommenen Datensätze erfolgte mit Hilfe des EDV-Programmes Openlab 2.2.5 (Fa. Improvion).

2.3.3.7 CRE-EGFP *in vivo*-Assay

Zur Messung der EGFP-Expression in Abhängigkeit des PKA-Signaltransduktionsweges wurden 1×10^4 U-343-CRE1 Zellen /Kavität in Mikrotiterplatten (Fa. Greiner Bio One, 5 x) eingesät. Die Zellen wurden in D-MEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS für 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte für 24 Stunden die Kultivierung in serumfreiem D-MEM- bzw. Optimem1-Medium. Je nach Versuchsaufbau wurden den Medien zur Inhibierung der PEP 10 µM Fmoc-AlaPyr-CN oder zur Stimulierung der Adenylat-Cyclase 10 µM Forskolin zugefügt. Als Kontrolle erfolgte die Zugabe von 0,05 % (v/v) DMSO. Zur Auswertung wurden die Medien durch PBS ersetzt und mittels HTS Mikroplattenreader (Fa. Perkin Elmer) die relative EGFP-Fluoreszenz bei 485/535nm bestimmt (4-Punkt-Messung). Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des EDV-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) ausgewertet.

2.3.3.8 Isolierung humaner T-Lymphozyten

Humane T-Lymphozyten wurden mit Hilfe des „Ficoll-Paque PLUS“-System's (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) analog den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Gewinnung des dafür benötigten Frischblutes (50 ml) erfolgte mittels Blutentnahmesystem „S-Monovette“ mit Lithium-Heparin (Fa. Sarstedt).

2.3.4 Biochemische Methoden

2.3.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Die Trennung der Proteine erfolgte in 12%igen SDS-Polyacrylamid Gelen mittels Vertikalelektrophorese System Mini Protean II (Fa. BIO-RAD). Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit 2 x Probenpuffer (4 % (m/v) SDS, 120 mM Tris pH 6,8 , 20 % (v/v) Glycerol, 200 mM DTT, 0,1 % (m/v) Bromphenolblau) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA (Sammelgel) und 40 mM (Trenngel) durchgeführt (Elektrodenpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Als Referenz wurde Proteinstandard MultiMark (Fa. Invitrogen) aufgetragen. Die Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel erfolgte durch Färbung mittels Serva Blue (Fa. Serva) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Das entfärbte Gel wurde anschließend zur Dokumentation fotografiert (Fa. Intas).

2.3.4.2 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

("Western blotting", nach Kyhse-Andersen, 1984)

Der Proteintransfer erfolgte mit Hilfe der Blotting Apparatur TRANS BLOT 5D (Fa. BIO-RAD) für 90 min bei 0.8 mA/cm² Membranfläche durch ein diskontinuierliches Puffersystem mit folgendem Schichtaufbau von Anode zur Kathode:

- 5 Lagen Filterpapier G002 (Fa. Schleicher&Schuell) in Puffer 1 (0.3 M Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4)
- 3 Lagen Filterpapier G002 in Puffer 2 (0,025 M Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4)
- Nitrocellulosemembran Protran BA83 (Fa. Schleicher&Schuell), mit Aqua dest. equilibriert
- SDS-Polyacrylamidgel (Trenngel)
- 5 Lagen Filterpapier G002 in Puffer 3 (0,025 M Tris/HCl, 0,04 M ε-Aminocapronsäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4)

Der erfolgreiche Transfer wurde mittels des Proteinstandards MultiMark (Fa. Invitrogen) überprüft.

2.3.4.3 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Die Immundetektion von immobilisierten Proteinen erfolgte nach SDS-PAGE Gelelektrophorese und dem Proteintransfer auf Nitrocellulose. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran erfolgte die Behandlung mit Block-Lösung (3 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % v/v Tween 20 in PBS) für 1 Stunde bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Danach wurde die Membran (5 x 8cm) mit dem in PBS-Puffer (5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % v/v Tween 20 in PBS) verdünnten Primär-Antikörpern ÜN bei 8 °C inkubiert. Dafür wurde die Membran in einer "feuchten Kammer" (Plastikdose mit wassergetränktem Zellstoff ausgelegt) mit 2 ml Antikörperlösung überschichtet. Anschließend wurde 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit 50 ml HRP-konjugiertem sekundärem Antikörper (1:10000) in PBS-Puffer (5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS) erfolgte für 1 Stunde bei RT. Danach wurde die Membran erneut 3 x mit PBS gewaschen. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mittels Immunodetektions-System „SuperSignal West Pico“ (Fa. Pierce) analog den Anweisungen des Herstellers. Die Exponierung der Röntgenfilme (Fa. Pierce) in einer Autoradiographiekassette (Fa. Groß) erfolgte zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten. Die Entwicklung und Fixierung der Röntgenfilme wurde in einer Dunkelkammer per Hand durchgeführt. Zur Unterbrechung zwischen Entwicklung (Fa. Tetanal) und Fixierung (Fa. Tetanal) der Filme wurde ein Wasserbad genutzt. Abschließend wurden die Filme 15 min mit fließendem Wasser gewaschen und dann luftgetrocknet.

2.3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

(nach Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels "Bradford Reagent" (Fa. Sigma) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Messung der Absorption bei 595nm wurde mit Hilfe des Photometers SmartSpec 3000 (Fa. BIO-RAD) durchgeführt. Die als Berechnungsgrundlage für die Proteinkonzentration benötigte Eichkurve wurde mittels vermessener BSA-Verdünnungsreihe vom systeminternen Programm des Photometers SmartSpec 3000 berechnet.

2.3.4.5 Messung der Aktivität von Prolylendopeptidase

Die PEP-Aktivität wurde mit Hilfe des fluorogenen Substrates Z-Gly-Pro-AMC (Fa. Bachem) ermittelt. Die kontinuierliche Messung des Substratumsatzes bei 380/460 nm erfolgte mit Hilfe des Spektralfluorometers SFM 25 (Fa. Kontron Instruments) unter Verwendung des

EDV Programmes "Flucol-4" (Machleidt et al. 1995) Dabei wurde folgender Reaktionsansatz mittels Thermostat (Fa. Julabo) bei 16 bzw. 37 °C temperiert:

-PEP-Meßpuffer (50 mM Hepes pH 7,5; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0)

-1mM DTT

-0.0015 % (v/v) Brij 30

-10 bzw. 20 µM Substrat Z-Gly-Pro-AMC

-0,5 –100 µl zu untersuchende Probe

Gesamtvolumen 2 ml

Die Auswertung der erhaltenen Datensätze erfolgte mit Hilfe des EDV-Programmes "Flukin" (Machleidt et al. 1995).

2.3.4.6 Aufschluß von Gewebeproben

Zur Gewinnung der löslichen Zellfraktion aus dem Gehirn von *Rattus norvegicus* wurden die präparierten und schockgefrorenen Gewebeproben (Sokolov, M.; AG Detlef Balschun; Leibnitz-Institut für Neurobiologie; Magdeburg) mittels Mikromörser (Fa. Roth) homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400 µl eiskaltem PEP-Meßpuffer. Die nochmals homogenisierte Suspension wurde in eisgekühlte 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 14000 u/min. für 5 Minuten (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Zellfraktion) wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die sofortige Bestimmung der Proteinkonzentration und Ermittlung der PEP-Aktivität. Die löslichen Zellfraktionen wurden für weitere Versuche bei -20°C gelagert.

2.3.4.7 Gewinnung von humanem Serum

Zur Gewinnung von humanem Serum wurde Spendern mit Hilfe des Blutabnahmesystems „S-Monovette“ mit Gerinnungsaktivator (Fa. Sarstedt) venöses Frischblut abgenommen. Nach erfolgter Blutgerinnung für 30 Minuten bei 8 °C wurden die Blutproben bei 1500 u/min für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert. Die löslichen Überstände wurden anschließend für die sofortige Bestimmung der Proteinkonzentration und Ermittlung der PEP-Aktivität in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis inkubiert. Das humane Serum wurde zu je 500 µl Portionen für Westernblot-Analysen bei -20°C gelagert.

2.3.4.8 IC₅₀-Bestimmung

Zur Ermittlung des IC₅₀-Wertes wurde nach Erreichen einer konstanten Geschwindigkeit des Substratumsatzes von Z-Gly-Pro-AMC (10 bzw. 20 µM) 0,5 - 4 µl Inhibitor-Lösung zugegeben. Aus der Anfangsgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit nach Inhibitorgabe wurde die prozentuale Restaktivität im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Die Restaktivität wurde gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Berechnung des IC₅₀-Wertes erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) durch nichtlineare Regressionsanalyse.

2.3.4.9 Bestimmung der Inositol-(1,4,5)-triphosphat-Konzentration

Die Ermittlung der Konzentration an Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP₃) in humanen Zelllinien erfolgte mit Hilfe des D-myo-IP₃-[³H] Assay TRK1000 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Der Aufschluß der in Petrischalen (d=6 cm, Fa. Greiner Bio-One) kultivierten Zellen, sowie die Extraktion und Ermittlung von IP₃, erfolgten analog den Anweisungen des Herstellers. Für die gesamte Versuchsdurchführung wurden ausschließlich polylysierte 2ml Reaktionsgefäße (Fa. Sorenson) verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe der Trichlorsäure (TCA)-Fällung entsprechend dem Protokoll des Herstellers aufgeschlossen. Zusätzliche Reinigungsschritte, wie sie der Hersteller in seinem Protokoll erwähnt, waren nicht notwendig, da sich die Qualität der extrahierten Proben in den vorgeschlagenen Kontrollreaktionen als ausreichend erwiesen hat. Die extrahierten Proben wurden vor der IP₃-Messung mindestens 24 Stunden bei -20°C gelagert. Für die Ermittlung des gebundenen Tritium-markierten IP₃ wurde das IP₃/IP₃-Rezeptor-Sediment in 1ml autoklaviertem Reinstwasser gelöst und anschließend 10 ml Scintillations-Lösung ULTIMA Gold XR (Fa. Packard) zugegeben. Die Messung erfolgte unmittelbar, sowie nach 18-24 Stunden. Zur Berechnung der IP₃-Konzentration/1 x 10⁶ Zellen wurde bei jedem Versuch von einer mitgeführten identischen Zellkultur-Petrischale die Zellzahl bestimmt.

2.3.4.10 Immunfluoreszenz-Markierung

Zur Immunfluoreszenz-Markierung erfolgte die Kultivierung humaner Zelllinien für 24 Stunden auf 22x22 mm-Deckgläsern (Fa. Roth). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 Minuten mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen. Bei dem 2. Waschschrift wurden zusätzlich 50 mM Glycin zugesetzt. Die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern erfolgte bei RT für je 1 Stunde. Beide Antikörper wurden in PBS/0,01 % (w/v) Saponin verdünnt. Zum Entfernen von überschüssigen Mengen

an Antikörpern wurden die Zellen 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die mit den immunmarkierten Zellen bewachsenen Deckgläser wurden mittels Citifluor (Fa. Plano) und handelsüblichem Nagellack auf Objektträgern (Fa. Roth) fixiert. Die DNA-Markierung mit DAPI (Fa. Molecular Probes) wurde analog dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.3.4.11 Isolierung monoklonaler Antikörper

Zur Isolierung von monoklonalen Antikörpern aus Kulturüberständen von Hybridomazelllinien wurde die IgM-Säule HiTrap IgM (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Dabei wurde nach den detaillierten Anweisungen des Herstellers vorgegangen.

2.3.4.12 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration von Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe einer Druckzelle (Fa. Amicon) bei 8°C und einem Stickstoffdruck von $p_{N_2} = 1$ bar durchgeführt. Für die Anreicherung von Antikörpern wurde eine Zellulosemembran mit einer Ausschlußgröße von 30000 Da (MWCO 30000, Fa. Millipore) verwendet.

2.3.4.13 Zellaufschluß humaner Zelllinien

Zur Gewinnung der löslichen Zellfraktion erfolgte der Aufschluß mit Hilfe von Frost-Tau-Lyse. Dazu wurden die kultivierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit PEP-Meßpuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1m M DTT) überschichtet. Anschließend erfolgte durch dreimaliges Einfrieren (-70°C) und Auftauen (RT) für je 3 Minuten der Zellaufschluß. Der mittels Zellschaber gesammelte Zellextrakt wurde in eisgekühlte 1.5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 14500 u/min für 5 Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Zellfraktion) wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration und Messung hydrolytischer Aktivitäten in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert. Die Lagerung der löslichen Zellfraktionen erfolgte bei -20°C.

2.3.4.14 Isolierung von Zellkernen

Die Gewinnung einer stark mit Zellkernen angereicherten Fraktion erfolgte mit Hilfe von differentieller Zentrifugation. Dazu wurden kultivierte Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 3 ml eisgekühltem Kernextraktpuffer (10 mM NaCl; 10 mM MES; 5 mM EDTA; 0.01 % BSA; 60 mM β -Glycerophosphat; 5 mM EGTA; 1 mM Na_3VO_4 ; 20 mM NaF; 1 mM Pefablock; 1 μ g/ml Pepstatin A; 5 μ M E64; 1,6 μ g/ml Leupeptin; pH 6.0) überschichtet. Die

mittels Zellschaber von ihrer Wachstumsunterlage gelösten Zellen wurden anschließend in einem auf Eis vorgekühlten Dounce-Homogenisator (Fa. Wheaton) überführt und durch insgesamt 10 Stöße aufgeschlossen. Die Suspension wurde in eisgekühlte 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 600 x g (4°C) für 15 Minuten zentrifugiert. Das mit 200 µl Kernextrakt-puffer gewaschene Sediment wurde in 50 µl Kernextraktions-puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellkerne erfolgte durch Einfrieren der Suspension bei -20°C. Die auf Eis aufgetauten Zellkernextrakte wurden in vorgekühlte 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 u/min für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Zellkernfraktion P1) wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration und Westernblot-Analyse in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.3.4.15 Zell-Fraktionierung

(modifiziert nach M.J. Crumpton, 1974)

Die Fraktionierung humaner Zellen in verschiedenen angereicherte zellkompartiments-spezifische Fraktionen erfolgte mittels differentieller Zentrifugation. Die in 75cm²-Kulturflaschen herangezogenen Zellen wurden zweimal mit 12 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte das Überschichten der Zellen mit 17 ml eiskaltem Kernextraktionspuffer (10mM NaCl; 10 mM MES; 5 mM EDTA; 0.01 % BSA; 60 mM β-Glycerophosphat; 5 mM EGTA; 1 mM Na₃VO₄; 20 mM NaF; 1 mM Pefablock; 1 µg/ml Pepstatin A; 5 µM E64; 1,6 µg/ml Leupeptin; pH 6.0) und das Ablösen von der Wachstumsunterlage mittels Zellschaber. Die Suspension wurde in einem auf Eis vorgekühlten Dounce-Homogenisator (Fa. Millville) überführt und durch insgesamt 10 Stöße aufgeschlossen. Anschließend wurde 1ml Suspension entnommen und auf Eis als „Gesamt-Zellextrakt“ (ZE) gelagert. Die restlichen 16ml Suspension wurden bei 600 x g (4°C) für 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit Kernextrakt-puffer gewaschen und in 1ml Kernextrakt-puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellkerne erfolgte durch einmaliges Einfrieren (-70°C) und Auftauen (RT) für je 3 Minuten. Die lysierten Zellkerne wurden als P1-Zellkernfraktion auf Eis gelagert. Der Überstand der P1-Fraktion wurde bei 20000 x g für 30 Minuten (4°C) zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Sedimentes erfolgte die Resuspension in 1 ml Kernextrakt-puffer und Lagerung als P20-Fraktion auf Eis. Der Überstand der P20-Fraktion wurde bei 100000 x g für 1 Stunde (4°C) ultrazentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment zweimal mit Kernextrakt-puffer gewaschen und in 0,4 ml Kernextrakt-puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte als P100-Fraktion auf Eis. Der Überstand der P100-Fraktion (15,5 ml) stellt die zytosolische S100-Fraktion dar und wurde ebenfalls auf Eis gelagert. Alle auf Eis gelagerten Fraktionen, mit Ausnahme der S100-Fraktion, wurden zum Aufschluß jeweils 3 x 5 Sekunden sonifiziert (Fa. Bandelin). Anschließend erfolgte die sofortige Bestimmung der Proteinkonzentrationen und der PEP-Aktivitäten in den Fraktionen. Die Lagerung der Fraktionen für nachfolgende Westernblot-Analysen erfolgte bei -20°C.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung benötigter Plasmidvektoren, transgener Zelllinien, Inhibitoren und Antikörper

Zur Untersuchung der physiologischen Funktion, sowie der zellulären Lokalisation von PEP, wurden spezielle DNA-Konstrukte, stabile transgene Zelllinien, Antikörper und PEP-Inhibitoren hergestellt bzw. etabliert.

3.1.1 Herstellung von Plasmidvektoren

Zur ektopischen Expression von PEP/EGFP-Fusionsproteinen, sowie zur Transkription von anti-sense-mRNA in humanen neuronalen Zelllinien, wurden mit Hilfe der PCR-Technik verschiedene DNA-Konstrukte hergestellt und in entsprechende Vektorsysteme integriert (siehe Anhang 1). Die Klonierung aller gewonnenen PCR-Produkte erfolgte über den Plasmidvektor pPCR-BlueScript (Fa. Stratagene). Die Nummerierung der fertiggestellten Konstrukte erfolgte in chronologischer Reihenfolge. Die markierten Klone (siehe Anhang 1) wurden zur Subklonierung bzw. zur Transfektion humaner neuronaler Zelllinien eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wird für diese Klone ausschließlich der Konstruktnamen verwendet.

3.1.1.1 Herstellung von anti-sense-Konstrukten für Prolylendopeptidase

Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von PEP sollte mit Hilfe von anti-sense-mRNA die endogene PEP-Expression in humanen neuronalen Zelllinien unterdrückt werden. Für die Herstellung des anti-sense-Konstruktes wurde aus der Zelllinie U-343 „Gesamt-RNA“ isoliert (TRIzol-Reagenz, Fa. Life Technologies). Anschließend erfolgte die reverse Transkription der RNA (5 µg) in cDNA mit Hilfe von DNA-Hexaoligonukleotiden (Fa. Promega) und M-MLV Reversetranskriptase (Fa. Promega). Die Gewinnung des vollständigen ORF's von PEP aus dem hergestellten cDNA-Pool (4 µl) erfolgte unter Verwendung des Expand PCR Systemes (Fa. Roche) und PEP-spezifischer Oligonukleotide (Fa. Metabion, hPEP1 und 2). Ausgehend vom vollständigen ORF wurde durch PCR mit zwei weiteren PEP-spezifischen Oligonukleotiden (hPEP4 und 5) der Bereich der katalytischen Domäne von PEP (AS 442-731) amplifiziert und anschließend in den Vektor pPCR-Sript Cam (Fa. Stratagen) kloniert (pIS-1). Die Subklonierung des DNA-Fragmentes PEP-AS442-731 in die humanen Expressionsvektoren pcDNA (Fa. Invitrogen, pIS-2) und pIRES (Fa. Clontech, pIS-5) erfolgte mit Hilfe von 5'- und 3'-Erkennungssequenzen der EcoRI-

Endonuklease. Anschließend erfolgte die Transformation von pIS-2 und pIS-5 in den *E.coli*-Stamm XL10-Gold (Fa. Stratagen). Als Antibiotika zur Selektion transformierter Bakterienzellen wurde Ampicillin (Fa. Duchefa) verwendet (50 µg/ml). Die Charakterisierung von positiven *E.coli*-Klonen erfolgte mit Hilfe von PCR- und Restriktions-Analysen. Durch DNA-Sequenzierung (Fa. GATC) konnte die richtige Nukleotid-Sequenz bestätigt werden. Zur Transfektion humaner Zelllinien wurden von den Konstrukten pIS-2 und pIS-5 ausreichende Mengen an Plasmid-DNA hergestellt (Plasmid-Midi-Präparationskit, Fa. Qiagen) und in einer Konzentration von 0,5 µg/µl bei -20°C gelagert.

3.1.1.2 Translationelle Fusion von Prolylendopeptidase und EGFP-Protein

In der vorliegenden Arbeit wurde in humanen neuronalen Zelllinien die zelluläre Verteilung von PEP untersucht. Dafür wurde neben der Fluoreszenz-Immunmarkierung die translationelle Fusion des EGFP-Proteins mit PEP genutzt. Ausgehend von dem Vektor-Konstrukt 129 (Diefenthal, Maltagen) wurden mit Hilfe der PCR-Technik und den Oligonukleotiden hPEP9 und 12 neue 5'- und 3'-Erkennungssequenzen an den ORF von PEP angefügt. Die Klonierung des PCR-Produktes (pIS-6) erfolgte in den Plasmidvektor PCR-Script. Zur N-terminalen translationellen Fusion mit EGFP wurde der vollständige ORF von PEP aus pIS-6 über die Erkennungssequenzen der EcoRI- (5'-Ende) und der XhoI-Restriktionsendonuclease (3'-Ende) in den mammalier Expressionsvektor pEGFP-N1 (Fa. Clontech) kloniert. Anschließend wurde das PEP/EGFP-Konstrukt (pIS-7) in den *E. coli*-Stamm JM-109 unter Selektion von Kanamycin (Fa. Duchefa) transformiert. Die Identifikation positiver *E.coli*-Klone wurde mit Hilfe von PCR- und Restriktions-Analysen durchgeführt. Mittels DNA-Sequenzierung erfolgte die Bestätigung der richtigen Nukleotidsequenz des Translationsstartes und der translationellen Fusion. Für die Transfektion humaner Zelllinien wurde eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA hergestellt (Plasmid-Midi-Präparationskit) und in einer Konzentration von 0,5 µg/µl bei -20°C gelagert. Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von PEP sollte in humanen neuronalen Zelllinien zusätzlich rekombinante humane PEP expremiert werden. Für eine bessere Isolierung und Charakterisierung von stabilen transgenen Zelllinien erfolgte die Expression als EGFP-Fusionsprotein mit Hilfe des Plasmidvektors pIRES. Der Vektor pIRES verfügt über kein integriertes EGFP-Gen. Daher erfolgte mit Hilfe der PCR-Technik die Klonierung des gesamten PEP/EGFP-ORF's aus dem Konstrukt pIS-7 (Kap. 3.1.1.2) in den PCRScript-Vektor (pIS-8). Unter Nutzung von 5'- und 3'-NotI-Erkennungssequenzen wurde der PEP/EGFP-ORF in den Expressionsvektor pIRES integriert (pIS-9) und in den *E. coli*-Stamm XL10-Gold transformiert. Anschließend wurden mit Hilfe von PCR- und Restriktionsanalysen positive *E.coli*-Klone identifiziert. Ausgehend von dem Konstrukt pIS-9 erfolgte mit Hilfe der „Overlap-PCR“-Technik die gerichtete Mutagenese von Serin zu Alanin an Position 554 von PEP. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den Vektor PCR-Script

integriert (pIS-10) und in den *E. coli*-Stamm XL10-Gold transformiert. Die Identifizierung positiver Klone erfolgte durch PCR- und Restriktionsanalysen. Mit Hilfe von DNA-Sequenzierung konnte der erfolgreiche Austausch der entsprechenden Nukleotide bestätigt werden. Anschließend erfolgte durch Restriktion mit den Endonukleasen EagI und NotI die Insertion des PEP-S554A/EGFP-Fragmentes in den Expressionsvektor pIRES (Fa. Clontech). Das Konstrukt (pIS-11) wurde in *E. coli* XL10-Gold transformiert. Die Charakterisierung positiver Klone erfolgte durch PCR- und Restriktionsanalysen. Für die Transfektion humaner Zelllinien wurden von den Vektor-Konstrukten pIS-9 und pIS-11 ausreichende Mengen an Plasmid-DNA hergestellt (Plasmid-Midi-Präparationskit) und in einer Konzentration von 0,5 µg/µl bei -20°C gelagert.

3.1.2 Etablierung stabiler transgener Zelllinien

Für physiologische Studien in Abhängigkeit der Aktivität und der Expression von PEP, sowie für Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von PEP, wurden humane neuronale Zelllinien mit verschiedenen Vektor-Konstrukten transfiziert (Tab.6). Die Etablierung stabiler transgener Linien erfolgte durch Zugabe von 400 µm/ml G418 in das Kulturmedium. Die Zellklone wurden mit Hilfe von Klonierungsringen (Fa. Clontech) oder durch direktes Absaugen mit sterilen Filter-Pipettenspitzen isoliert.

Tab. 6 Etablierte stabile transgene humane Zelllinien.

Es wurden verschiedene Expressionskonstrukte mit Hilfe von Lipid-Lösungen (Fa. Biontex, Fa. Invitrogen, Fa. Life Technologies) in humane neuronale Zelllinien analog den Anweisungen der Hersteller transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit G418 (Fa. Calbiochem, 400 µg/ml). Die G418-resistenten Zellklone wurden mit Hilfe von Klonierungsringen (Fa. Clontech) oder durch direktes Absaugen mit sterilen Filter-Pipettenspitzen isoliert.

Zelllinie	Konstrukt	Klon (GVO) ^a	Verwendung	Bemerkung
U-343	pIS-5	U-343-as-x	Untersuchung zur Abhängigkeit physiologischer Parameter und des Phänotyps von der PEP-Aktivität	8 stabile Klone
U-343	pcDNA	U343-pcDNA1	Kontrolle für pcDNA-basierende anti-sense-Linien	1 stabiler Klon
U-343	pIRES	U-343-pIRES	Kontrolle für pIRES-basierende anti-sense-Linien	1 stabiler Klon
U-343	pEGFP	U-343-EGFP1	Kontrolle für PEP/EGFP-Fusionskonstrukte	1 stabiler Klon
U-343	pEGFP-CRE	U-343-CRE-x	cAMP <i>in vivo</i> Assay	14 stabile Klone
SH-SY5Y	pIS-5	SH-SY5Y-as-x	Untersuchung zur Abhängigkeit physiologischer Parameter und des Phänotyps von der PEP-Aktivität	insgesamt 23 kultivierte Klone 15 letal
SH-SY5Y	pEGFP	SH-SY5Y-EGFP1	Kontrolle für PEP/EGFP-Fusionskonstrukte	1 stabiler Klon

^aGVO: Gentechnisch veränderter Organismus

3.1.2.1 Anti-sense-Zelllinien zur Unterdrückung der endogenen PEP-Expression

Zur Unterdrückung der endogenen Expression von PEP wurde die humane neuronale Zelllinie U-343 mit den anti-sense-Konstrukten pIS-2 und pIS-5 transfiziert. Dagegen erfolgte die Transfizierung der humanen neuronalen Zelllinien SH-SY5Y und LN-405 ausschließlich mit dem Konstrukt pIS-5. Die Charakterisierung von G418-resistenten stabilen Zelllinien erfolgte mittels des spezifischen PEP-Substrates Z-Gly-Pro-AMC und Westernblot-Analysen. Die anti-sense-Konstrukte und ihre entsprechenden Ausgangsvektoren (pcDNA3.1, pIRES) wurden mit Hilfe von „POLYFECTIN“-Lösung (Fa. Biontex) entsprechend den Anweisungen des Herstellers transfiziert. Die Klonierung der G418-resistenten (600 µg/ml) anti-sense-Zellklone erfolgte mit Hilfe von Klonierungsringen (Fa. Clontech). Zur Bestimmung der Restaktivität von PEP in den Überständen der Zellextrakte wurden die isolierten Klone durch Frost-Tau-Lyse aufgeschlossen und anschließend unter Verwendung des Substrates Z-Gly-Pro-AMC untersucht. Die Proteinkonzentrationen in den Überständen der Zellextrakte wurden mittels der Bradford-Methode (Bradford-Reagenz, Fa. Sigma) bestimmt. Von den mit pIS-2 transfizierten U-343-Zellen wurden 100 G418-resistente Klone isoliert. Keiner dieser Klone zeigte eine Reduktion der PEP-Aktivität gegenüber der Wildtyp-Zelllinie. Dagegen konnte nach Transfektion mit dem Konstrukt pIS-5 für 7 der 120 isolierten Klone eine Reduktion der Aktivität von PEP nachgewiesen werden (Abb.1). Die ermittelten Restaktivitäten liegen zwischen 84 % (U-343-as110) und 30 % (U-343-as11). Zur Bestätigung der ermittelten Restaktivitäten wurde die Expression von PEP in den isolierten anti-sense-Klonen untersucht. Die Überstände der Zellextrakte wurden im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde rekombinante humane PEP (rhPEP, 80 kD) verwendet. In allen untersuchten Zellklonen konnte PEP nachgewiesen werden, wobei die Intensität der detektierten Bande mit der ermittelten Restaktivität korreliert (Abb. 2 und 3).

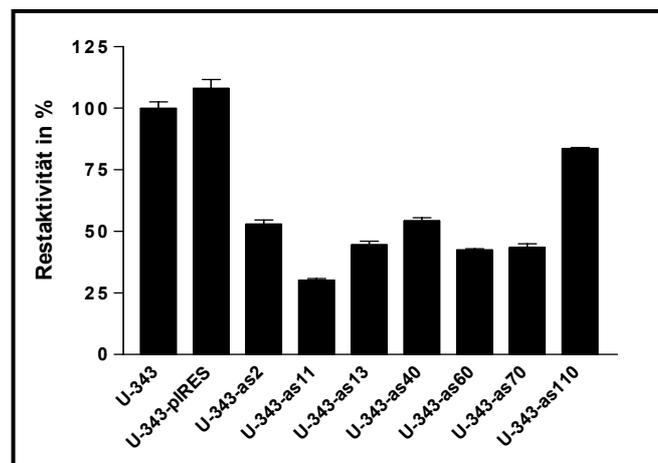


Abb. 2 Restaktivität von Prolylendopeptidase in U-343 anti-sense-Zellklonen.

Die Extraktion der löslichen Proteinfractionen aus den anti-sense-Zellklonen erfolgte durch Frost-Tau-Lyse und anschließender Zentrifugation (14500 u/min, 5 Minuten, 4°C) der Gesamtzellextrakte. Die Aktivität wurde bei 16°C und 10 µM Z-Gly-Pro-AMC ermittelt. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode. Die ermittelte spezifische Aktivität von PEP in U343-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.

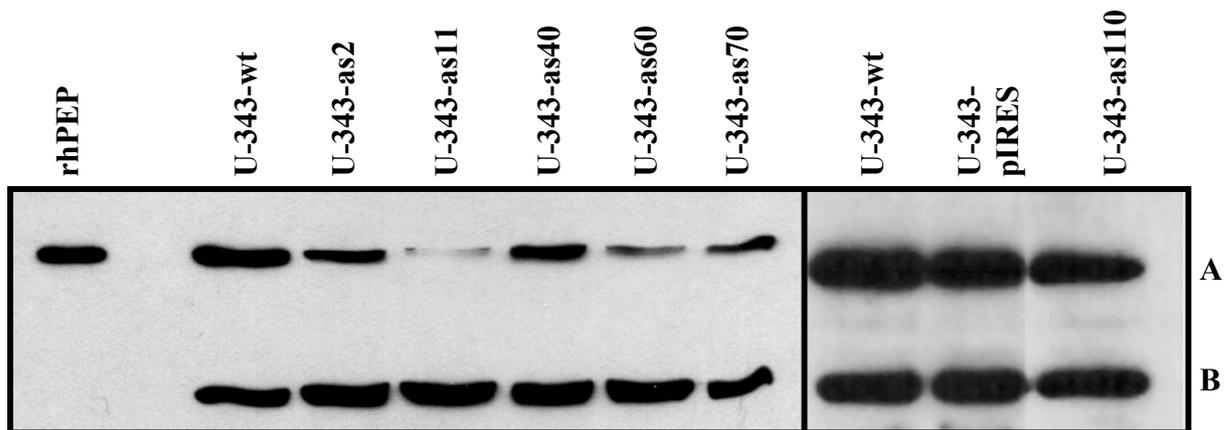


Abb. 3 Westernblot-Analyse der PEP-Expression in U-343-anti-sense-Zelllinien.

Die Überstände der Zellextrakte (U-343, U-343-anti-sense, U343-pIRES) wurden im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (20 µg Protein/Zelllinie). Die immobilisierten Proteinextrakte wurden mit den polyklonalen PEP-Antikörper S449 (A, 1:400) und Anti-Actin (B, 1:1000, Sigma) inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mittels des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) analog den Anweisungen des Herstellers. hrPEP: humane rekombinante Prolylendopeptidase (75ng Protein)

Nach Transfektion der Zelllinie SH-SY5Y mit dem anti-sense-Konstrukt pIS-5 konnten ebenfalls 100 G418-resistente Klone isoliert werden. Insgesamt 10 von diesen 100 Klonen zeigten eine reduzierte PEP-Aktivität (Abb. 4). Vergleichbar mit den anti-sense-Klonen der U-343-Zelllinie liegen die ermittelten Restaktivitäten zwischen 85 % (SH-SY5Y-as22 und as 35) und 48 % (SH-SY5Y-as18). Auf Grund des zu geringen Zellmaterials war es nicht möglich, die Expression von PEP in diesen anti-sense-Klonen zu untersuchen.

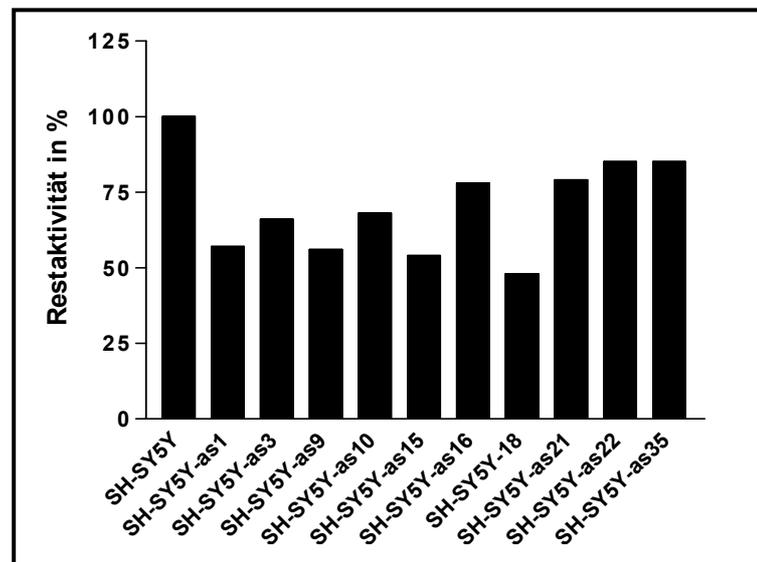


Abb. 4 Restaktivität von Prolylendopeptidase in SH-SY5Y-anti-sense-Zellklonen.

Die Extraktion der löslichen Proteinfractionen aus den anti-sense-Zellklonen erfolgte durch Frost-Tau-Lyse und anschließender Zentrifugation (14500 u/min, 5 Minuten, 4°C) der Gesamtzellextrakte. Die Aktivität wurde bei 16°C und 10 µM Z-Gly-Pro-AMC ermittelt. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode. Die ermittelte spezifische Aktivität von PEP in SH-SY5Y-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.

Trotz mehrfacher Wiederholung der Transfektion war es nicht möglich, von der Zelllinie LN-405 G418-resistente Klone zu gewinnen. Anfänglich wachsende Zellkolonien starben innerhalb von 2-4 Wochen ab. Von den mit pIRES-Vektor transfizierten U-343-Zellen wurde ein G418-resistenter Klon isoliert. Dieser zeigt im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie U-343 keine Veränderung in Expression und Aktivität von PEP.

3.1.3 Etablierung transgener Zelllinien zur Untersuchung der Adenylat-Cyclase-Kaskade

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von PEP auf die Adenylat-Cyclase-Kaskade ermittelt. Dazu wurde in speziell dafür etablierten humanen neuronalen Zellen die EGFP-Expression in Abhängigkeit der PEP-Aktivität untersucht. Die Etablierung erfolgte durch Transfektion von U-343-Zellen mit dem induzierbaren Expressionsvektor pEGFP-CRE (Holloschi, A., Hafner M., 2002) unter Verwendung von „Superfect 2000“ (Fa. Life Technologies). Da das EGFP-Markergen unter der Kontrolle des in cis-liegenden CRE-Enhancer-Elementes steht, ist die EGFP-Expression von der Aktivierung der Adenylat-Cyclase-Kaskade (Abb. 5) abhängig.

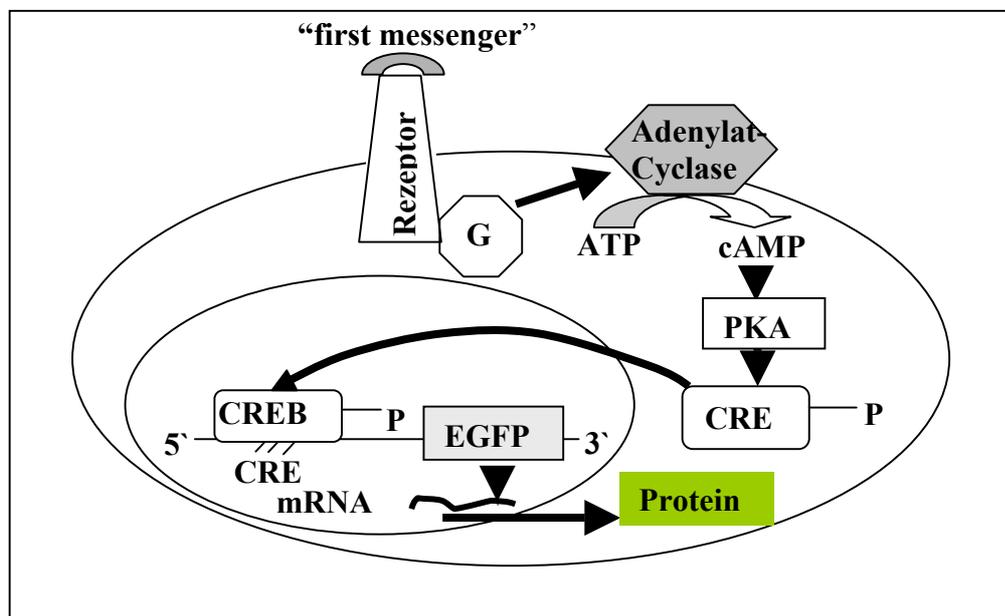


Abb. 5 Vereinfachtes Schema der induzierbaren EGFP-Expression in pEGFP-CRE-transgenen Zelllinien.

Das EGFP-Markergen (EGFP) im Expressionsvektor pEGFP-CRE (Holloschi, A., Hafner, M., 2002) steht unter der Kontrolle des in cis-liegenden CRE-Enhancer-Elementes (CRE). Damit ist in transgenen pEGFP-CRE-Zellen die EGFP-Expression von der Aktivierung oder Deaktivierung der Adenylat-Cyclase-Kaskade abhängig.

Es wurden insgesamt 40 G418-resistente Zellklone (U343-CRE1-1-40) isoliert. Zur Charakterisierung der isolierten Zellklone erfolgte anschließend die Behandlung der Zellen mit 10 μ M Forskolin. Forskolin aktiviert die Adenylat-Cyclase. Nach 24 Stunden Behandlung mit Forskolin erfolgte mit Hilfe des inversen Fluoreszenzmikroskopes Axiovert S100 (Fa. Zeiss) der Vergleich der EGFP-Fluoreszenzintensität zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Von den 40 untersuchten Klonen zeigten 14 eine signifikante Erhöhung der EGFP-Fluoreszenz nach Behandlung mit Forskolin. Von diesen 14 Klonen wurde für die weiteren Untersuchungen der Klon U343-CRE1 ausgewählt. Er zeigt den größten Forskolin-vermittelten Anstieg an relativer Fluoreszenzintensität (2,7fache) gegenüber nichtbehandelten Zellen (Abb. 6). Zur Kontrolle wurden U-343-CRE1-Zellen für 24 Stunden mit 0,5 % (v/v) DMSO behandelt. Es konnte keine Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität festgestellt werden (Abb. 6).

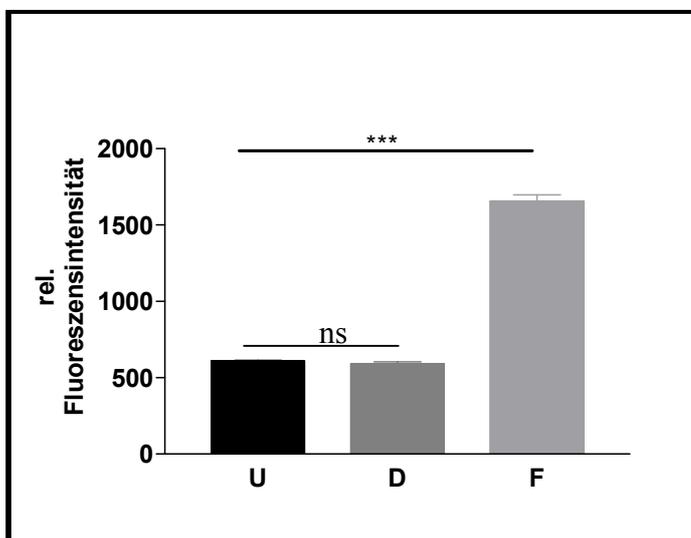


Abb. 6 Einfluß von Forskolin auf die relative EGFP-Fluoreszenzintensität in der Zelllinie U343-CRE1.

U-343-CRE1-Zellen wurden für 24 Stunden in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Serum kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit 0,5 % (v/v) DMSO (D) und 10 μ M Forskolin (F) in serumfreiem DMEM-Medium für weitere 24 Stunden. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt (U). Zur Messung der relativen Fluoreszenzintensität im Plattenreader (Fa. Perkin Elmer) bei Wellenlängen von 485/535 nm wurde das konditionierte DMEM-Medium nach 24 Stunden durch PBS (Fa. Life Technologies) ersetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Graphiksoftware „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software).

Zur weiteren Charakterisierung der neu etablierten Zelllinie U343-CRE1 wurde die Abhängigkeit der EGFP-Expression von der Konzentration an Forskolin und Isoproterenol untersucht (Abb. 7). Isoproterenol aktiviert über β -adrenerge Rezeptoren die Adenylat-Cyclase-Kaskade. Während Isoproterenol in destilliertem Wasser gelöst wurde, mußte Forskolin auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaften in DMSO gelöst werden. Eine Konzentration von mehr als 0,5 % (v/v) DMSO im Kulturmedium führt zu einer signifikanten Reduzierung der PEP-Aktivität (Kap.3.1.5.2). Unter Berücksichtigung der DMSO-

Endkonzentration von nicht mehr als 0,5 % (v/v) im Kulturmedium und der Löslichkeit von Forskolin im wässrigen Medium konnten die Zellen maximal mit 12,5 μM Forskolin behandelt werden. Die Stimulation von U-343-CRE1-Zellen mit 0,1 bis 12,5 μM Forskolin führt zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der EGFP-Fluoreszenz mit einem EC_{50} -Wert von 10 μM (Abb. 7). Ab 250 nM Forskolin kann eine signifikante Erhöhung der EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dagegen führt die Behandlung mit Isoproterenol (1 bis 100 μM) zu keiner Erhöhung der EGFP-Fluoreszenz gegenüber unbehandelten Zellen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die neu-etablierte Zelllinie U343-CRE1 in Abhängigkeit der gewählten Stimuli geeignet ist, Einflüsse verschiedener Substanzen auf die Adenylat-Cyclase-Kaskade zu untersuchen.

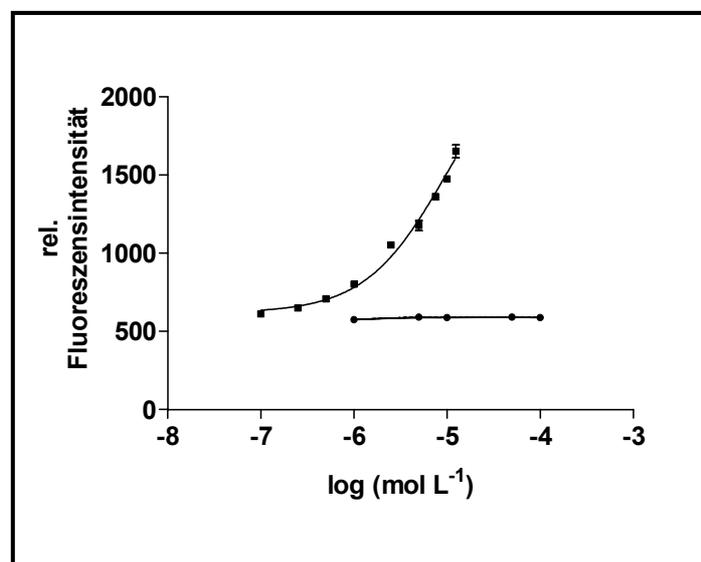


Abb. 7 Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Forskolin auf die relative EGFP-Fluoreszenzintensität in der Zelllinie U343-CRE1.

U-343-CRE1-Zellen wurden für 24 Stunden in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Serum kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Forskolin (■, 0,1-12,5 μM) und Isoproterenol (●, 1 bis 100 μM) in serumfreiem DMEM-Medium für weitere 24 Stunden. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt (0-Werte). Zur Messung der relativen Fluoreszenzintensität im Plattenreader (Fa. Perkin Elmer) bei Wellenlängen von 485/535 nm wurde das konditionierte DMEM-Medium nach 24 Stunden durch PBS (Fa. Life Technologies) ersetzt. Die Auswertung der Daten und die Berechnung des EC_{50} -Wertes erfolgten mit der Graphiksoftware „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software).

3.1.4 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler PEP-Antikörper

Unter Verwendung von immunzytologischen Methoden wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation von PEP in humanen neuronalen Zelllinien untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der polyklonale PEP-Antikörper S449 (Fa. Probiobdrug AG) nicht für die Immunmarkierung von PEP geeignet ist. Daher wurden in Zusammenarbeit mit Fa.

Eurogentec (Belgien) monoklonale Antikörper hergestellt und hinsichtlich ihrer immunzytologischen Verwendbarkeit charakterisiert.

3.1.4.1 Gewinnung und Charakterisierung von Maus-Immunsereen

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern wurden 4 Mäuse zweimal mit je 5mg rekombinanter humaner PEP immunisiert. Im Abstand von 35 und 56 Tagen nach Beginn der Immunisierung wurden Immunsereen abgenommen. Mit Hilfe von ELISA-Analysen (Fa. Eurogentec) wurden die Immunsereen und die Prä-Immunsereen auf ihre Immunreaktivität gegenüber rhPEP getestet. Mit 2 von 4 Immunsereen konnte im indirekten ELISA rhPEP detektiert werden (Tab. 7).

Tab. 7 Bestimmung der PEP-Immunreaktivität verschiedener Maus-Immunsereen mittels indirektem ELISA.

Die Durchführung der Analysen erfolgte bei Fa. Eurogentec (Belgien).

Antigen: 100 ng rekombinante humane PEP-6xHis /Kavität,

Proben: Prä-Immunsereum, Immunsereen 35 und 56 Tage nach Beginn der Immunisierung

Herkunft der Proben: 4 immunisierte Mäuse (BL, TJ, DJ, CJ)

Verdünnung	Prä-Immunsereum				Immunsereum 35 Tage				Immunsereum 56 Tage			
	BL	TJ	DJ	CJ	BL	TJ	DJ	CJ	BL	TJ	DJ	CJ
1:1000	0,062	0,062	0,062	0,066	1,002	0,068	0,056	0,981	0,383	0,418	0,048	2,941
1:2000	0,056	0,057	0,055	0,057	0,771	0,060	0,056	0,606	0,217	0,253	0,059	2,452
1:4000	0,049	0,049	0,047	0,049	0,409	0,051	0,051	0,360	0,173	0,154	0,052	1,766
1:6000	0,054	0,050	0,054	0,055	0,251	0,055	0,055	0,211	0,102	0,105	0,055	1,126
1:12000	0,047	0,060	0,050	0,048	0,122	0,052	0,051	0,141	0,083	0,084	0,052	0,682
1:24000	0,048	0,046	0,050	0,047	0,098	0,051	0,053	0,126	0,067	0,071	0,054	0,415
1:64000	0,045	0,050	0,051	0,049	0,072	0,047	0,047	0,075	0,057	0,059	0,058	0,247
1:128000	0,046	0,046	0,052	0,052	0,065	0,050	0,056	0,055	0,055	0,057	0,052	0,162

Weiterhin erfolgte die Charakterisierung der Immunsereen mittels Westernblot-Analyse und Immunfluoreszenz-Markierung (Fa. Probiadrug AG). In der Westernblot-Analyse reagierten die Immunsereen ebenfalls mit rekombinanter (Abb. 8A) bzw. endogener PEP aus U-343-Zellen (Abb. 8B). Dagegen führte die Verwendung der Immunsereen zur Immunmarkierung von U-343-Zellen zu keinem Erfolg. Die Markierungen waren sehr schwach und diffus über die ganze Zelle verteilt. Auf Grund der positiven Ergebnisse im indirekten ELISA und in der Westernblot-Analyse wurde das Tier mit der Bezeichnung „CJ“ zur Herstellung von Hybridzellen ausgewählt.

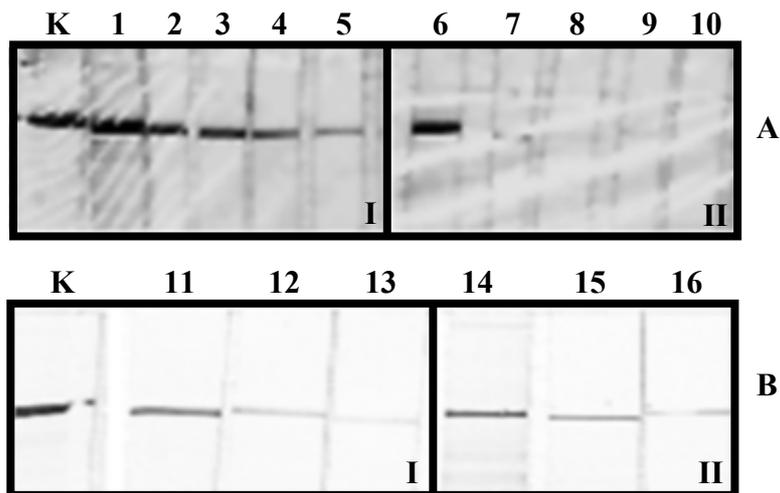


Abb. 8 Westernblot-Analyse zur Bestimmung der PEP-Immunreaktivität von verschiedenen Maus-Immunsereen.

Im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel wurden rekombinante humane PEP (A, 500ng Protein/Streifen) und U-343-Zellextrakt (B, 30 µg Protein/Streifen) aufgetrennt. Die immobilisierten Proteinextrakte wurden mit 2 Maus-Immunsereen (I,II) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der spezifische polyklonale PEP-Antikörper S449 (K, 1:400) verwendet. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) analog den Anweisungen des Herstellers. Verdünnungsstufen: 1,6,14 = 1:100; 2,7,15 = 1:500; 11,16 = 1:1000; 3,8 = 1:2000; 4,9,12 = 1:2500; 5,10,13 = 1:5000

3.1.4.2 Gewinnung und Charakterisierung von Hybridzelllinien

Die Herstellung und Isolierung von Hybridzelllinien erfolgte durch Fa. Eurogentec (Belgien). Die Kulturüberstände der isolierten Hybridzelllinien wurden mittels indirektem ELISA auf ihre Immunreaktivität gegenüber rhPEP getestet (Fa. Eurogentec). Mit den 22 reaktivsten monoklonalen Antikörper-Populationen erfolgte die Markierung von humanen neuronalen U343-Zellen (Tab. 8). Von den 22 getesteten Kulturüberständen konnten 8 identifiziert werden, bei denen das PEP-Verteilungsmuster mit der zellulären Verteilung des PEP/EGFP-Fusionsproteines (siehe Abb. 9 und 24) korreliert. Bei beiden findet man eine stark strukturierte perinukleäre Verteilung von PEP, die zur Plasmamembran hin abnimmt. Außerdem konnte keine Markierung der Zellmembran sowie des Zellkernes beobachtet werden. Die Bestimmung der Isotypen mit Hilfe von Teststreifen (Fa. Dianova) ergab, daß alle 8 Antikörper zum IgM-Subtyp gehören.

Tab. 8 Bestimmung der PEP-Immunreaktivität verschiedener Zellkulturüberstände von Maus-Hybridomazelllinien mittels indirektem ELISA.

Die Durchführung der Analysen erfolgte bei Fa. Eurogentec (Belgien). Antigen: 100 ng rekombinante humane PEP-6xHis /Kavität, Proben: unverdünnte Kulturüberstände von Hybridzelllinien

Hybridzell-Klon	Test 1	Test 2
1D7	1,199	2,141
1E11	1,210	1,699
1F5	0,854	1,991
1G1	0,947	1,450
1G8	1,320	2,766
2A3	1,228	3,012
2B8	1,288	2,771
2B9	0,924	2,363
2H1	1,007	1,407
3B3	0,409	0,792
3B8	1,302	2,665
3C2	1,112	2,143
3D6	1,105	1,431
3H3	0,792	0,690
3H5	1,255	2,231
4D4	1,221	2,607
4D6	0,238	1,647
6A5	0,981	1,352
6A8	1,317	2,711
6F1	1,282	2,672
6F9	0,812	1,703
6G7	0,697	0,965

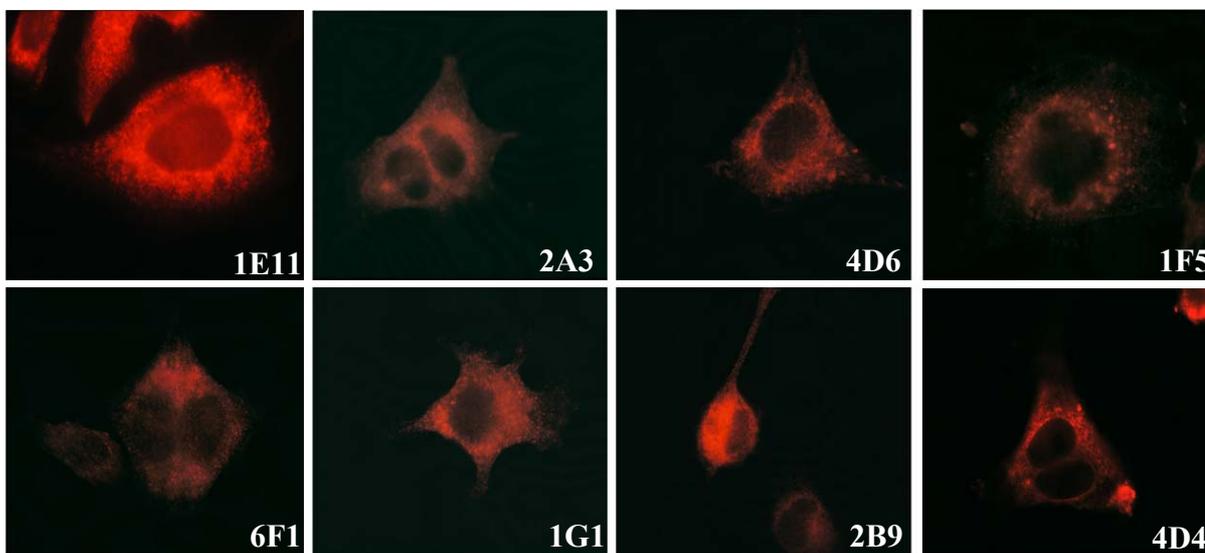


Abb. 9 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Immunmarkierungen der humanen neuronalen Zelllinie U-343 mit Zellkulturüberständen von Maus-Hybridomazelllinien.

Für die Immunmarkierung wurden U-343-Zellen für 24 Stunden auf Deckgläsern kultiviert und anschließend mit 4 % (w/v) PFA in PBS fixiert. Die fixierten Zellen wurden für 2 Stunden bei RT mit unverdünnten Kulturüberständen der Hybridzelllinien inkubiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines inversen Fluoreszenz-Mikroskopes (Axiovert S100, Fa. Zeiss, 200fache Vergrößerung) und einer Mikroskopkamera (MS50, Fa. Zeiss) bestückt mit Negativ-Filmen (Select 400, Kodak), Erklärung siehe Text .

Weiterhin wurden die Zellkulturüberstände hinsichtlich der Verwendbarkeit für Westernblot-Analysen charakterisiert. Dafür wurden rekombinante humane PEP und U-343-Zellextrakt in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Inkubation der immobilisierten Proteinextrakte mit unverdünnten Kulturüberständen. Von den 22 untersuchten Zellkulturüberständen detektierten die Antikörper 2A3 und 4D4 humane rekombinante PEP in der Westernblot-Analyse (Abb. 10). Die Detektion endogener PEP im Überstand von U-343-Zellextrakt war mit keinem der monoklonalen PEP-Antikörper möglich.

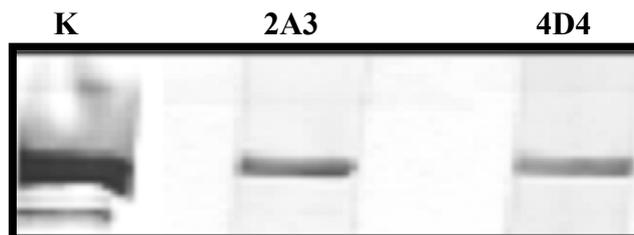


Abb. 10 Westernblot-Analyse zur Bestimmung der PEP-Immunreaktivität von verschiedenen Maus-Hybridoma-Zellkulturüberständen.

In einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel wurde rekombinante humane PEP (500 ng Protein/Streifen) aufgetrennt. Die immobilisierten Proteinextrakte wurden mit unverdünnten Kulturüberständen der Hybridzelllinien inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der PEP-spezifische polyklonale Antikörper S449 (K) verwendet. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

Auf Grund der oben dargestellten Ergebnisse könnten 8 von 22 Hybridzelllinien zur Gewinnung von PEP-spezifischen monoklonalen Antikörpern eingesetzt werden. Alle 8 Antikörper-Populationen, die von den entsprechenden Hybridzelllinien produziert werden, sind für die Immunfluoreszenz-Markierung von PEP geeignet. Für die Gewinnung von spezifischen monoklonalen PEP-Antikörpern wurde die Hybridzelllinie 4D4 ausgewählt. Vor der Gewinnung von Antikörpern wurde die Hybridzelllinie 4D4 nochmals subkloniert (Fa. Eurogentec). Damit wird sichergestellt, daß Hybridzelllinien aus nur einem Klon bestehen und dem entsprechend ausschließlich eine Antikörper-Variante in das Kulturmedium sekretiert wird.

3.1.4.3 Charakterisierung und Produktion des monoklonalen PEP-Antikörpers 4D4D6

Die Subklonierung des Hybridzell-Klones 4D4D6 aus der Hybridzelllinie 4D4, sowie die Isotyp-Bestimmung (IgM Kappa), erfolgte durch Fa. Eurogentec (Belgien). Die Immunreaktivität gegen PEP des gewonnenen Zellkulturüberstandes von 4D4D6 wurde mit

Hilfe eines indirekten ELISA's bestätigt (Fa. Eurogentec). Anschließend erfolgte die immunzytologische Markierung von U-343-Zellen. Auch hier konnte die PEP-Markierung bestätigt werden. Zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers 4D4D6 wurden die humanen neuronalen Zelllinien U343-as60 mit 50 % PEP-Restaktivität und T98p31 mit 30 % Restaktivität gegenüber der U-343-Zelllinie für die Immunmarkierung eingesetzt. Die PEP-Markierung in den einzelnen Zelllinien ist identisch, aber die Intensitäten der Immunmarkierungen von U-343-as60 und T98p31 sind signifikant reduziert gegenüber der Zelllinie U-343 (siehe Abb. 11). Der Versuch, den Antikörper aus dem Zellkulturüberstand mittels HiTrap IgM-Chromatographiesäulen zu isolieren (Fa. PharmaciaAmersham), oder durch Ultrafiltration (Amicon) zu konzentrieren, führte zur signifikanten Verschlechterung der Immunreaktivität des Antikörpers gegenüber PEP. Daher wurden die Kulturüberstände zentrifugiert (600 x g) und in 100 µl Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.



Abb. 11 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Immunmarkierungen humaner Zelllinien mit dem monoklonalen PEP-Antikörper 4D4D6.

Die Zelllinien U-343, U343-as60 und T98p31 wurden für 24 Stunden auf Deckgläsern kultiviert und anschließend mit 4 % (w/v) PFA in PBS fixiert. Die fixierten Zellen wurden für 2 Stunden bei RT mit unverdünntem Kulturüberstand des Hybridzell-Klones 4D4D6 inkubiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines inversen Fluoreszenz-Mikroskopes (Axiovert S100, Fa. Zeiss, 200fache Vergrößerung) und einer Mikroskopkamera (MS50, Fa. Zeiss) bestückt mit Negativ-Filmen (Select 400, Kodak).

3.1.5 Hemmung der Aktivität von Prolylendopeptidase

Zur Untersuchung des Einflusses von PEP auf verschiedene physiologische Prozesse wurden in der vorliegenden Arbeit humane Zelllinien mit dem spezifischen PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyr-CN behandelt. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Inhibitor bezüglich der Hemmung von rhPEP einen IC_{50} -Wert von 70 pM besitzt (Gerhartz, B., Feußner, K., unveröffentlicht). Für die Anwendung des Inhibitors in Zellkulturversuchen wurde die Hemmung der PEP-Aktivität in den Zelllinien U-343 und SH-SY5Y in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Konzentration untersucht. Weiterhin erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung extrazellulärer PEP-Aktivitäten. Zur Charakterisierung dieser Aktivitäten wurden die IC_{50} -Werte der spezifischen PEP-Inhibitoren Fmoc-AlaPyr-CN und

Z-XaaPro-BT ermittelt. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte erfolgte mittels löslichem Überstand des Zellextraktes von U-343-Zellen. Weiterhin wurde der Einfluß von DMSO (Lösungsmittel für die Inhibitoren) und von AEBSF (allgemeiner Serinprotease-Inhibitor) auf die PEP-Aktivität untersucht.

3.1.5.1 Hemmung von Prolylendopeptidase in humanen Zelllinien

Mit Hilfe des Substrates Z-Gly-Pro-AMC wurde die zeit- und konzentrationsabhängige Hemmung von PEP durch Fmoc-AlaPyr-CN in den humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y untersucht. Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit wurden Zellen für 4 Stunden mit 1-10 μ M Inhibitor in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Anschließend wurde die Restaktivität in den Überständen der Zellextrakte bestimmt. Fmoc-AlaPyr-CN führt bereits bei der kleinsten untersuchten Konzentration (1 μ M) zur vollständigen Hemmung der PEP-Aktivität in den untersuchten Zelllinien. Zur Untersuchung der Hemmung von PEP in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurden Zellen für 5 bis 120 Minuten mit 5 μ M Fmoc-AlaPyr-CN behandelt. Bereits nach 5 Minuten Inkubation mit 5 μ M I Fmoc-AlaPyr-CN konnte die vollständige Hemmung der PEP-Aktivität festgestellt werden. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Stabilität des PEP-Inhibitors während der Zellkultivierung. Dafür wurden die Zelllinien U-343 und SH-SY5Y für 48 Stunden mit 5 μ M Fmoc-AlaPyr-CN in serumfreiem und in serumhaltigem (10 % v/v FBS) DMEM-Medium, sowie in Optimum I-Medium (Fa. Life Technologies) kultiviert.

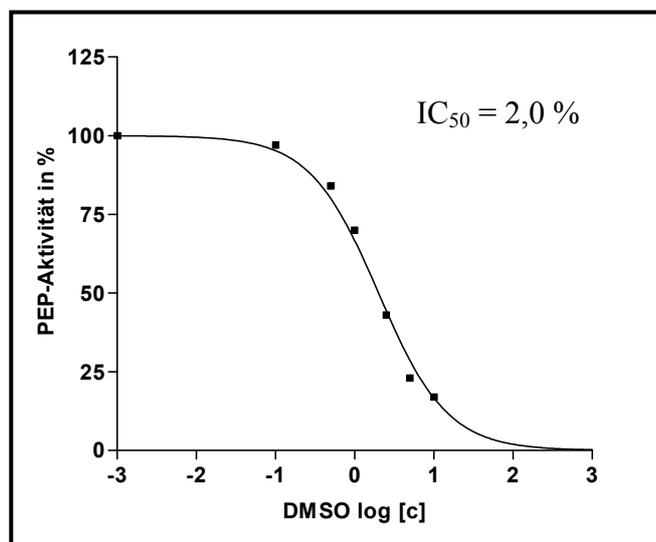


Abb. 12 Abhängigkeit der PEP-Aktivität von der DMSO-Konzentration.

Zur Ermittlung des IC_{50} -Wertes für DMSO erfolgte der Aufschluß von U-343-Zellen mit Hilfe von Frost-Tau-Lyse. Anschließend wurde der Gesamtzellextrakt zentrifugiert (14500 u/min., 5 Minuten bei 4°C). Die Bestimmung der Aktivität im Überstand des Zellextraktes wurde bei 37°C mit 10 μ M Z-Gly-Pro-AMC durchgeführt. Auf Basis der ermittelten Restaktivitäten erfolgte die Berechnung des IC_{50} -Wertes mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software).

Nach 48 Stunden erfolgte die Bestimmung der Restaktivität im löslichen Überstand des Zellextraktes. Es konnte unabhängig vom untersuchten Kulturmedium keine PEP-Aktivität nachgewiesen werden. Damit ist der spezifische PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyrr-CN geeignet, um in Zellkulturversuchen mit einer Einmalgabe von 5 μM die Aktivität von PEP für 48 Stunden vollständig zu hemmen.

Weiterhin wurde der Einfluß von DMSO auf die PEP-Aktivität im löslichen Überstand von U-343-Zellextrakt untersucht. DMSO wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Lösungsmittel für PEP-Inhibitoren verwendet. Der ermittelte IC_{50} -Wert beträgt 2,0 %, dabei wird PEP bereits von 0,5 % DMSO gehemmt (Abb. 12). In den nachfolgenden Untersuchungen wurde nicht mehr als 0,2 % DMSO im Versuchsansatz eingesetzt.

3.1.5.2 IC_{50} -Werte von PEP-spezifischen Inhibitoren

In der vorliegenden Arbeit wurden parallel zu der intrazellulären PEP-Aktivität aus humanen Zellen ebenfalls extrazelluläre PEP-Aktivitäten im Serum bzw. im Liquor untersucht. Die spezifische Inhibierung mit den PEP-Inhibitoren Fmoc-AlaPyrr-CN und Z-XaaPro-BT wurde zur Charakterisierung der extrazellulären und intrazellulären PEP-Aktivitäten verwendet. Dafür wurden die IC_{50} -Werte für die Hemmung der PEP mit den beiden Inhibitoren bestimmt, indem die Restaktivitäten von PEP im Überstand des Zellextraktes von U-343-Zellen in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentrationen ermittelt wurden. Beide Inhibitoren zeigen eine konzentrationsabhängige Hemmung im Bereich von 10 pM bis 100 nM (Abb. 13A und B).

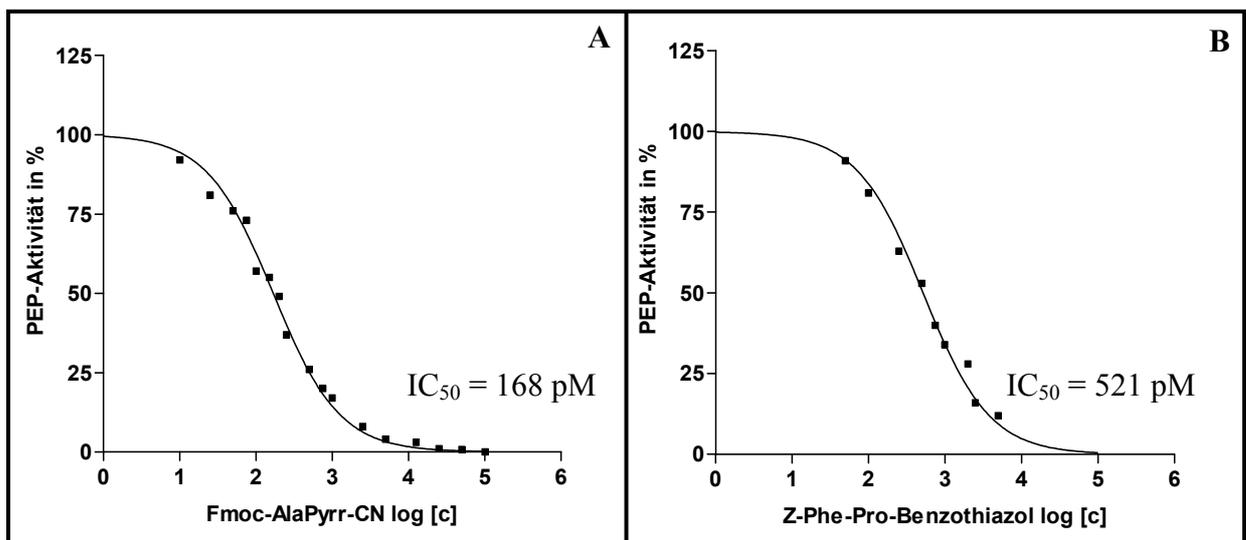


Abb. 13 Abhängigkeit der PEP-Aktivität von verschiedenen Inhibitoren.

Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte für die Inhibitoren 1 (A) und 2 (B) erfolgte der Aufschluß von U-343-Zellen mit Hilfe von Frost-Tau-Lyse. Anschließend wurde der Gesamtzellextrakt zentrifugiert (14500 u/min., 5 Minuten bei 4°C). Die Bestimmung der Aktivität im Überstand des Zellextraktes wurde bei 37°C mit 10 μM Z-Gly-Pro-AMC durchgeführt. Auf Basis der ermittelten Restaktivitäten erfolgte die Berechnung der IC_{50} -Werte mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software).

Dabei ist der IC_{50} -Wert von 168 pM für den PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyr-CN 3,1fach niedriger, als der IC_{50} -Wert für Z-XaaPro-BT mit 521 pM. Der mittels rhPEP ermittelten K_i -Wert ($K_i = 70$ pM, Feußner, K. und Gerhartz, B., unveröffentlicht) und der entsprechende IC_{50} -Wert für Fmoc-AlaPyr-CN differieren um das 2,1fache.

Neben den spezifischen PEP-Inhibitoren wurde der Serinprotease-Inhibitor AEBSF zur Charakterisierung von intrazellulären PEP-Aktivitäten eingesetzt. AEBSF wird in einem Konzentrationsbereich von 0,1 – 1,0 mM vorrangig zur Vermeidung des proteolytischen Abbaues von Proteinen durch Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin, Thrombin und Trypsin eingesetzt. Zur Bestimmung des Einflusses von AEBSF auf die Aktivität von PEP in U343-Zellen wurden die Restaktivitäten in Abhängigkeit der AEBSF-Konzentration ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, daß die intrazelluläre PEP-Aktivität ebenfalls von AEBSF konzentrationsabhängig gehemmt wird (Abb. 14). AEBSF führt ab 2,5 mM (91 %) zu einer signifikanten Hemmung der Aktivität von PEP. Mit der höchsten Konzentration (15 mM) wurde eine 55%ige Hemmung von PEP erzielt.

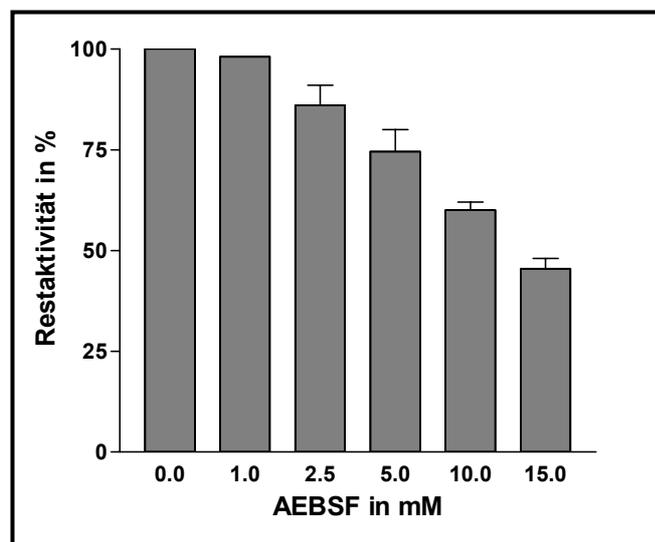


Abb. 14 Abhängigkeit der PEP-Restaktivität von verschiedenen AEBSF-Konzentrationen.

Zur Ermittlung des Einflusses von AEBSF auf die Aktivität von PEP erfolgte der Aufschluß von U-343-Zellen mit Hilfe von Frost-Tau-Lyse. Anschließend wurde der Gesamtzellextrakt zentrifugiert (14500 u/min., 5 Minuten bei 4°C). Die Bestimmung der Aktivität im Überstand des Zellextraktes wurde bei 37°C mit 10 µM Z-Gly-Pro-AMC durchgeführt.

3.2 Prolylendopeptidase in humanem und murinem Probenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Rolle von PEP untersucht. Auf Grund des kausalen Zusammenhanges zwischen Funktion und Lokalisation wurde die zelluläre Verteilung von PEP untersucht. Von besonderem Interesse war vor allem die Verteilung von PEP in neuronalen und glialen Zellen bzw. in neuronalem Gewebe. Dafür wurden in humanen Zelllinien und in ausgewählten Bereichen des Rattenhirnes die Aktivität und Expression von

PEP untersucht. Weiterhin sollte geklärt werden, in wie weit extrazelluläre post-Prolin-spaltende Aktivitäten identisch mit PEP sind. Deshalb erfolgte die Bestimmung und die Charakterisierung von PEP-Aktivitäten im Kulturüberstand humaner Zelllinien, in humanem Serum, sowie in humaner lumbaler Cerebrospinal-Flüssigkeit.

3.2.1 Prolylendopeptidase in humanen Zelllinien

Für den Nachweis von PEP in humanen Zelllinien wurden mit Hilfe des fluorogenen Substrates Z-Gly-Pro-AMC und Westernblot-Analyse die Aktivität und Expression untersucht. Von den 23 verwendeten Zelllinien standen 13 ausschließlich in Form von Kryokulturen zur Verfügung. Alle 6 glialen bzw. neuronalen Zelllinien wurden für die Untersuchungen kultiviert.

3.2.1.1 Prolylendopeptidase-Aktivität in humanen Zelllinien

Der Aufschluß von Zellen erfolgte durch Frost-Tau-Lyse. Anschließend wurden die Aktivität und die Proteinkonzentration in den Überständen der Zellextrakte ermittelt. In allen untersuchten Zelllinien konnte PEP-Aktivität gemessen werden (Tab. 9 und 10).

Tab. 9 Spezifische PEP-Aktivität in kultivierten humanen Zelllinien.

Die Extraktion der löslichen Proteinfractionen aus den kultivierten Zelllinien erfolgte durch Frost/Tau-Lyse und anschließende Zentrifugation (14500 u/min., 5 Minuten, 4°C) der Gesamtzellextrakte. Die Aktivität wurde bei 16°C und 10 µM Z-Gly-Pro-AMC ermittelt. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode.

Zelllinie	Gewebetyp	Spezifische Aktivität in mU/mg Protein ^a
BeWo	Keimzelltumor	1,07 ± 0,07
CACO-2	Adenokarzinom des Dickdarms	0,57 ± 0,08
LN-405	Astrozytom	1,65 ± 0,04
LNZ-308	Gliom	1,43 ± 0,04
SH-SY5Y	Neuroblastom	2,47 ± 0,02
T98p31	Gliom	1,15 ± 0,03
U-138-MG	Glioblastom	0,74 ± 0,05
U-343	Gliom	3,54 ± 0,10
T-m ^b	T-Zellen	2,62 ± 0,03

^an=2, Anzahl der zugrunde liegenden Messungen

^bT-m=T-Zellen, männlicher Spender, 37 Jahre

Die ermittelten spezifischen Aktivitäten in den kultivierten Zelllinien lagen zwischen $3,54 \pm 0,1$ mU/mg Protein (U-343-Zelllinie) und $0,57 \pm 0,08$ mU/mg Protein (CACO-2-Zelllinie). Für die nichtkultivierten Zelllinien (Kryokulturen) wurden spezifische Aktivitäten zwischen $1,96 \pm 0,01$ mU/mg Protein (MDA-MB-434S-Zelllinie) und $40 \mu\text{U} \pm 1 \mu\text{U/mg}$ Protein (RCC-100-Zelllinie) ermittelt. Die ermittelte spezifische Aktivität ist in kultivierten LNZ-308-Zellen ($1,43 \pm 0,04$ mU/mg Protein) 20fach höher als in Zellen aus der Kryokultur ($70 \pm 1 \mu\text{U/mg}$ Protein). Da sich die einzelnen Kryokulturen in Zelldichte, Zellvitalität, Alter und in den Lagerbedingungen wesentlich unterscheiden, kann das für die Zelllinie LNZ-308 erhaltene Ergebnis nicht auf die anderen Kryokulturen übertragen werden.

Tab. 10 Spezifische PEP-Aktivität in nichtkultivierten humanen Zelllinien (Kryokulturen).

Die Extraktion der löslichen Proteinfractionen aus den Kryokulturen erfolgte durch Frost/Tau-Lyse und anschließende Zentrifugation (14500 u/min., 5 Minuten, 4°C) der Gesamtzellextrakte. Die Aktivität wurde bei 16°C und 20 μM Z-Gly-Pro-AMC ermittelt. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode.

Zelllinie	Gewebetyp	Spezifische Aktivität in mU/mg Protein ^a
A-431	Vulvakarzinom	$0,60 \pm 0,03$
A-549	Lungenkarzinom	$0,58 \pm 0,02$
CAKI-1	Nierenkarzinom	$0,24 \pm 0,01$
CAKI-2	Nierenkarzinom	$0,23 \pm 0,01$
COLO-677	Bronchialkarzinom	$0,28 \pm 0,01$
COLO-699	Bronchiales Adenokarzinom	$0,84 \pm 0,01$
DV-145	Prostatakarzinom	$0,40 \pm 0,01$
ECV-304	Nabelschnurkarzinom	$0,79 \pm 0,07$
Fibro-177	Bindegewebskarzinom	$0,08 \pm 0,01$
HEK	Embryonales Nierenkarzinom	$0,55 \pm 0,01$
LNZ-308	Gliom	$0,07 \pm 0,01$
MDA-MB-435S	Mammakarzinom	$1,96 \pm 0,01$
PC-3	Adenokarzinom der Prostata	$0,17 \pm 0,01$
RCC-100	Nierenkarzinom	$0,04 \pm 0,01$

^a n=2, Anzahl der zugrunde liegenden Messungen

3.2.1.2 Expression von Prolylendopeptidase in humanen Zelllinien

Die Überstände der Zellextrakte wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend die Expression von PEP mit Hilfe der Westernblot-Analyse untersucht. Als Positivkontrolle wurde rekombinante humane PEP (rhPEP, 80 kD) verwendet. In allen kultivierten Zelllinien konnte PEP nachgewiesen werden (Abb. 15). Dabei korreliert die Intensität der detektierten Bande mit den entsprechenden ermittelten spezifischen Aktivitäten (Tab. 9, Abb. 15). In den untersuchten Kryokulturen konnte PEP nicht detektiert werden.

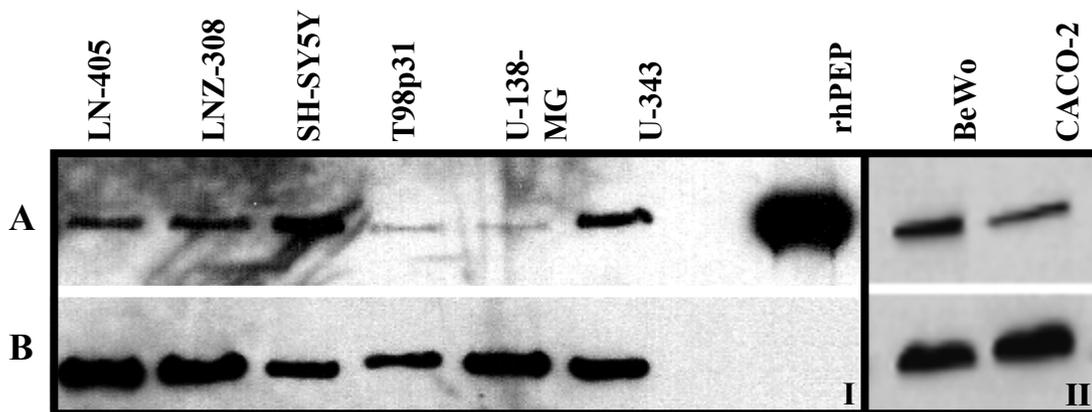


Abb. 15 Westernblot-Analyse der PEP-Expression in kultivierten humanen Zelllinien.

Die Auftrennung der löslichen Proteinfractionen kultivierter neuronaler bzw. glialer (I, 10 µg Protein/Zelllinie) und nichtneuronaler (II, 40 µg Protein/Zelllinie) Zelllinien erfolgte in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die immobilisierten Proteinextrakte wurden mit den polyklonalen Primär-Antikörpern S449 (A, Anti-PEP, 1:400) und Anti-Actin (B, 1:1000, Sigma) inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mittels des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) analog den Anweisungen des Herstellers. hrPEP: humane rekombinante Prolylendopeptidase (75 ng Protein).

3.2.2 Prolylendopeptidase in extrazellulären Flüssigkeiten

Von PEP ist bekannt, daß sie *in vitro* Neuropeptide durch limitierte Proteolyse modifiziert. Unter *in vivo*-Bedingungen müßte PEP dafür extrazellulär lokalisiert sein. Deshalb erfolgte die Untersuchung der Aktivität und Expression von PEP in humanem Serum (n=2), humanem Liquor (n=5) und im löslichen Überstand humaner Zellkulturen (n=2). Die Charakterisierung der extrazellulären Aktivitäten wurde mittels dem Substrat Z-Gly-Pro-AMC, den spezifischen PEP-Inhibitoren Fmoc-AlaPyr-CN und Z-XaaPro-BT sowie mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF durchgeführt.

3.2.2.1 Prolylendopeptidase-Aktivität in humanem Serum und Liquor

Die Seren wurden aus 20 ml Frischblut von einem weiblichen und einem männlichen Spender gewonnen. Die 12 Liquorproben (3 weibliche und 9 männliche Spender ohne auffälligen klinischen Befund hinsichtlich des Untersuchungsprotokolles) wurden vom Liquorlabor des Universitätsklinikums Kröllwitz Halle/S. bezogen. Die Bestimmung der Aktivität von PEP in den zellfreien Überständen erfolgte mit Hilfe des Substrates Z-Gly-Pro-AMC (Tab. 11). In allen untersuchten Serum- und Liquor-Proben konnte PEP-Aktivität nachgewiesen werden. Im Serum der weiblichen Testperson wurde eine Aktivität von $76,95 \pm 3,2$ mU/ml Probe ermittelt und im Serum der männlichen Testperson $57 \pm 1,0$ mU/ml Probe. Ein Nachweis von PEP im Serum mittels Westernblot-Analyse war nicht möglich. In den Liquorproben wurden Substratumsätze (1,31 bis 23,8 mU/ml Probe) an der unteren Nachweisgrenze (1 mU/ml) des benutzen Aktivitätsassays gemessen.

Tab. 11 PEP-Aktivität in humanem Serum und Liquor.

Die Gewinnung der humanen Seren aus Frischblut erfolgte durch Blutgerinnung und anschließende Zentrifugation (1500 u/min., 10 Minuten, 4°C). Die zellfreien Liquorproben wurden im Liquorlabor des Universitätsklinikums Kröllwitz Halle/S. entsprechend dem Standardprotokoll präpariert. Die Aktivität der zellfreien Überstände wurde bei 37°C mit 20 µM Z-Gly-Pro-AMC bestimmt.

Probe ^{a/b}	Alter	Geschlecht	Aktivität mU/ml Probe
S-1	23	weiblich	76,95 ± 3,2 ^c
S-2	38	männlich	57 ± 1,0 ^c
L-138	77	männlich	5,52 ± 0,07 ^c
L-139	64	männlich	14,46 ± 0,48 ^c
L-178	51	männlich	1,57 ^d
L-180	76	weiblich	2,67 ^d
L-182	33	männlich	18,67 ^d
L-183	67	weiblich	8,36 ^d
L-185	72	männlich	1,31 ^d
L-713	62	weiblich	23,8 ^d
L-725	64	männlich	9,6 ^d
L-728	47	weiblich	12,5 ^d
L-729	24	männlich	3,75 ^d
L-730	18	männlich	10,55 ^d

^aS=Serum

^bL=Liquor

^cn=2, Anzahl der zugrunde liegenden Messungen

^dn=1, Anzahl der zugrunde liegenden Messungen

Mit Hilfe des CytoTox96-Assays (Fa. Promega) konnte in den Liquorproben LDH-Aktivität nachgewiesen werden. Der berechnete Korrelationskoeffizient von $r = 0,918$ zeigt, daß zwischen der nachgewiesenen LDH-Aktivität und der ermittelten PEP-Aktivität eine positive Korrelation besteht (Abb. 16). Auf Grund dieser Beziehung kann davon ausgegangen werden, daß die beobachtete extrazelluläre post-Prolin-spaltende Aktivität auf Zellyse basiert. Es war nicht möglich, die Expression von PEP in den untersuchten Liquor-Proben nachzuweisen.

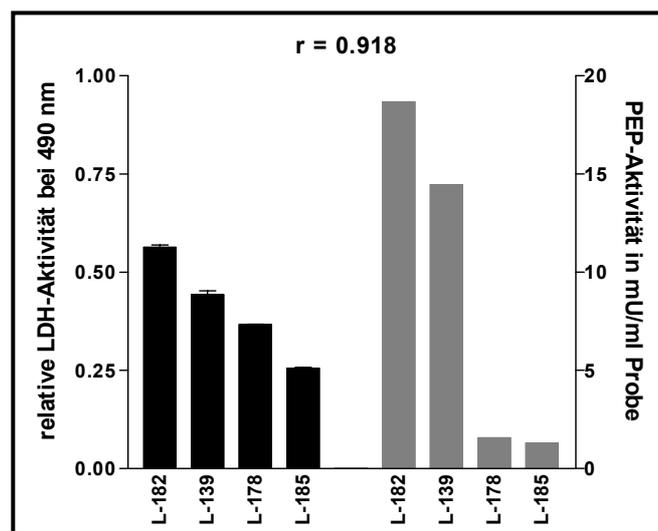


Abb. 16 PEP- und LDH-Aktivität in humanem Liquor.

Die zellfreien Liquorproben wurden im Liquorlabor des Universitätsklinikums Kröllwitz Halle/S entsprechend dem Standardprotokoll präpariert. Die PEP-Aktivität der zellfreien Überstände wurde bei 37°C mit 20 µM Z-Gly-Pro-AMC ermittelt. Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgte mittels CytoTox96-Assay (Fa. Promega).

Anschließend erfolgte die Charakterisierung der extrazellulären PEP-Aktivitäten in humanem Serum und Liquor mit Hilfe spezifischer PEP-Inhibitoren. Dazu wurden die Restaktivitäten in Abhängigkeit von der Konzentration der Inhibitoren Fmoc-AlaPyrr-CN und Z-XaaPro-BT ermittelt. Die PEP-Aktivität in humanem Liquor konnte mit beiden Inhibitoren vollständig gehemmt werden. Dagegen wurden mit beiden Inhibitoren in humanem Serum nur 30 % der gesamten PEP-Aktivität gehemmt. Für den hemmbaren Anteil von 30 % wurden auf Basis der ermittelten Restaktivitäten die IC_{50} -Werte bestimmt (Abb. 17). Im Vergleich zur Hemmung der intrazellulären PEP (Kap. 3.1.5.2) sind die IC_{50} -Werte für Fmoc-AlaPyrr-CN mit einem IC_{50} von 420 μ M und für den Inhibitor Z-XaaPro-BT mit einem IC_{50} von 7 nM um das 2,5- bzw. 13,5fache höher. Es kann davon ausgegangen werden, daß der Inhibitor Z-XaaPro-BT auf Grund seiner Struktur verstärkt mit anderen Molekülen im Serum hydrophobe Wechselwirkungen eingeht, und so die effektive Konzentration verringert wird. Mit Hilfe von rhPEP konnte der Einfluß von humanem Serum auf Z-XaaPro-BT bestätigt werden. Die Hemmung der rhPEP ist unter vergleichbaren Bedingungen im humanem Serum um die Hälfte geringer als im Standard-Meßpuffer. Dies erklärt aber nur zum Teil den 13,5fach höheren IC_{50} -Wert für die Hemmung der extrazellulären Aktivität. Keinen Einfluß hat das humane Serum auf die Fmoc-AlaPyrr-CN vermittelte Hemmung von rhPEP.

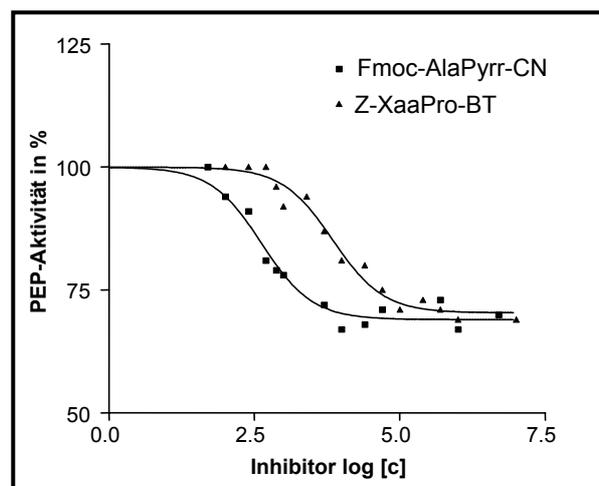


Abb. 17 Abhängigkeit der PEP-Restaktivität von verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen in humanem Serum.

Die Gewinnung der humanen Seren aus Frischblut erfolgte durch Blutgerinnung und anschließende Zentrifugation (1500 u/min., 10 Minuten, 4°C). Die Aktivität im Serum wurde bei 37°C mit 20 μ M Z-Gly-Pro-AMC in Abhängigkeit der spezifischen PEP-Inhibitoren Fmoc-AlaPyrr-CN und Z-XaaPro-BT bestimmt. Auf Basis der ermittelten Restaktivitäten erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) die Bestimmung der IC_{50} -Werte.

Neben den spezifischen PEP-Inhibitoren wurde zur Charakterisierung von extrazellulären PEP-Aktivitäten der unspezifische Serinprotease-Inhibitor AEBSF eingesetzt. AEBSF in einer Konzentration von 10 mM führt zur signifikanten Hemmung der PEP-Aktivitäten im Serum und im Liquor (Abb. 18). Die Restaktivität von 57,5 % im Liquor ist vergleichbar mit

der Restaktivität von 62,5 % für die Hemmung der intrazellulären PEP-Aktivität in U-343-Zellen. Die ermittelte Restaktivität im Serum von 37,5 % ist dagegen deutlich geringer. Damit ist mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF eine effektivere Hemmung der PEP-Aktivität im Serum möglich als mit spezifischen PEP-Inhibitoren Fmoc-AlaPyr-CN und Z-XaaPro-BT (Abb. 18).

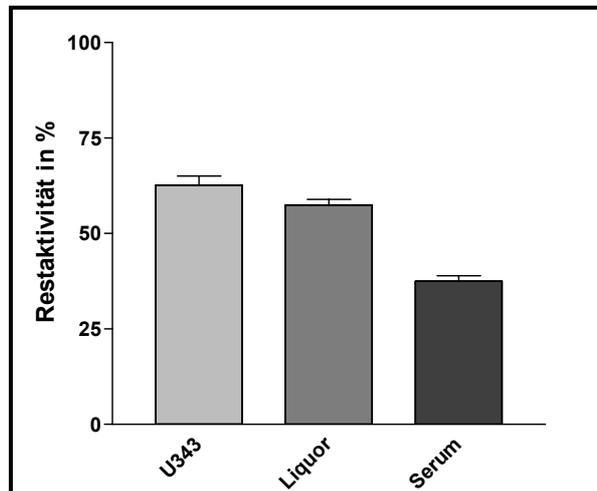


Abb. 18 Abhängigkeit der PEP-Aktivität bzw. der extrazellulären post-Protein-spaltenden Aktivitäten von AEBSF.

Die Gewinnung von humanem Serum, Liquor und löslicher Zellfraktion aus der U343-Zelllinie erfolgte wie beschrieben in Kap. 2.3.4.7, 2.3.4.17, 3.2.2.1. Die Restaktivitäten wurden nach Inkubation mit 10 mM AEBSF (Fa. ICN) für 30 min. bei 37°C mittels dem fluorogenen Substrat Z-Gly-Pro-AMC (20 µM, Fa. Bachem) bestimmt (siehe Kap. 2.3.4.5).

3.2.2.2 Aktivität von Prolylendopeptidase im Kulturüberstand humaner Zelllinien

Die humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y wurden für 24 Stunden bei 37°C in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PEP-Aktivität in den Kulturüberständen sowie in den Überständen der Zellextrakte mit Hilfe des Substrates Z-Gly-Pro-AMC. Es konnte in beiden Kulturüberständen PEP-Aktivität nachgewiesen werden. Die im Kulturüberstand der Zelllinien SH-SY5Y und U-343 ermittelten Aktivitäten von $4,26 \pm 0,2$ mU/ml Probe und $1,6 \pm 0,1$ mU/ml Probe sind sehr gering und vergleichbar mit den gemessenen Aktivitäten im humanen Liquor. Auch sie liegen im Bereich der Nachweisgrenze (1 mU/ml Probe) des verwendeten Aktivitätsassays. Dabei entsprechen die ermittelten Werte in den Kulturüberständen $4,75 \pm 0,25$ % bzw. $1,15 \pm 0,15$ % der PEP-Gesamtaktivität (Kulturüberstand + löslicher Überstand des Zellextraktes) in den Zelllinien SH-SY5Y und U-343. Mit Hilfe des CytoTox96-Assays (Fa. Promega) konnte ermittelt werden, daß in den Zelllinien SH-SY5Y und U-343 $8,3 \pm 0,3$ % bzw. $7,6 \pm 0,3$ % der Gesamtaktivität an LDH in den Kulturüberständen vorliegen. Im prozentualen Vergleich zu den extrazellulären post-Protein-spaltenden Aktivitäten ist damit das 1,75- bzw. das 6,6fache an LDH-Aktivität

nachweisbar (Abb. 19). Auf Grund dieser prozentualen Verteilung muß davon ausgegangen werden, daß lysierte Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache der extrazellulären post-Protein-spaltenden-Aktivitäten darstellen. Die Kulturüberstände von SH-SY5Y- und U-343-Zellen zeigten keinerlei PEP-Immunreaktivitäten in den Westernblot-Analysen.

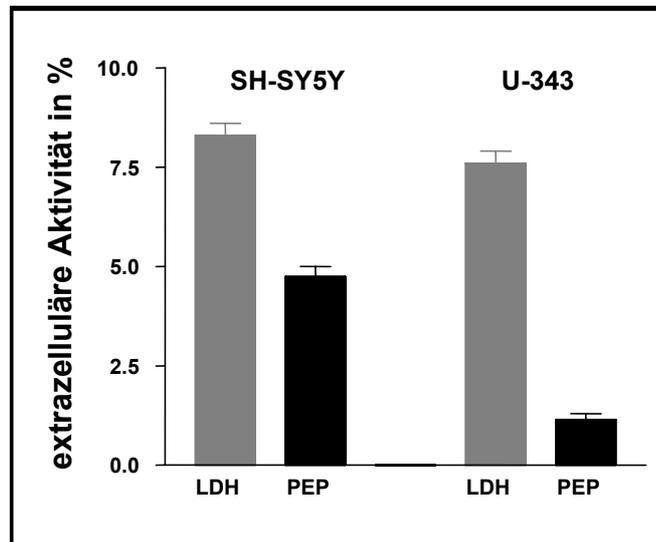


Abb. 19 Prozentualer Anteil der extrazellulären PEP- und LDH-Aktivität im Kulturüberstand humaner Zelllinien .

Die Zellen wurden für 24 Stunden in 1ml serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Nach Entfernen des Kulturüberstandes erfolgte der Aufschluß der löslichen Proteinfractionen durch Frost-Tau-Lyse in 1ml frischem serumfreiem DMEM-Medium und anschließender Zentrifugation (14500 u/min., 5 Minuten, 4°C) der Gesamtextrakte. Die LDH-Aktivität wurde mit Hilfe des kolorimetrischen Assays CytoTox96 (Fa. Promega) ermittelt. Die PEP-Aktivität wurde bei 37° mit 20 µM Z-Gly-Pro-AMC bestimmt (siehe Kap. 2.3.4.5)

3.2.3 Prolylendopeptidase im Rattenhirn

Für die Aufklärung der physiologischen Rolle von PEP im Zentralen Nervensystem ist neben der subzellulären Lokalisation auch die regionale Verteilung im Gehirn von großer Bedeutung. Die einzelnen Hirnregionen üben sehr spezifische Funktionen aus. Auf Grund einer entsprechenden Verteilung von PEP könnten Schlußfolgerungen für die Beteiligung von PEP an speziellen neurologischen Prozessen getroffen werden. Deshalb wurden mit Hilfe des Substrates Z-Gly-Pro-AMC und Westernblot-Analyse in 6 ausgewählten Hirnregionen von männlichen Wanderratten (*Rattus norvegicus*) die Aktivität und die Expression von PEP untersucht. Die Gewebeproben wurden im Institut für Neurobiologie, Abteilung Neurophysiologie (Dr. Detlef Balschun) von Dr. Maxim Sokolov präpariert.

3.2.3.1 Verteilung von PEP-Aktivität im Rattenhirn

Die schockgefrorenen und bei -70°C gelagerten Gewebeprouben wurden mit Hilfe eines Mikromörsers (Fa. Roth) aufgeschlossenen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PEP-Aktivität in den Überständen der Gewebeextrakte. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. In allen Überständen konnte PEP-Aktivität nachgewiesen werden. Die Verteilung der PEP-Aktivität in den untersuchten Hirnregionen ist homogen (Abb 20). Die ermittelten spezifischen Aktivitäten liegen zwischen $0,93 \pm 0,01$ mU/mg Protein (Kleinhirn) und $0,77 \pm 0,03$ mU/mg Protein (Hippokampus). Die Charakterisierung der PEP-Aktivität in den Gewebeextrakten erfolgte mittels des spezifischen PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyr-CN. Die Aktivität in den Extrakten kann mit dem Inhibitor vollständig gehemmt werden. Der ermittelte IC_{50} -Wert beträgt 200 pM. Dieser korreliert mit dem ermittelten IC_{50} -Wert (168 pM, Kap. 3.1.5.2) für die Hemmung intrazellulärer PEP-Aktivität in U-343-Zellen.

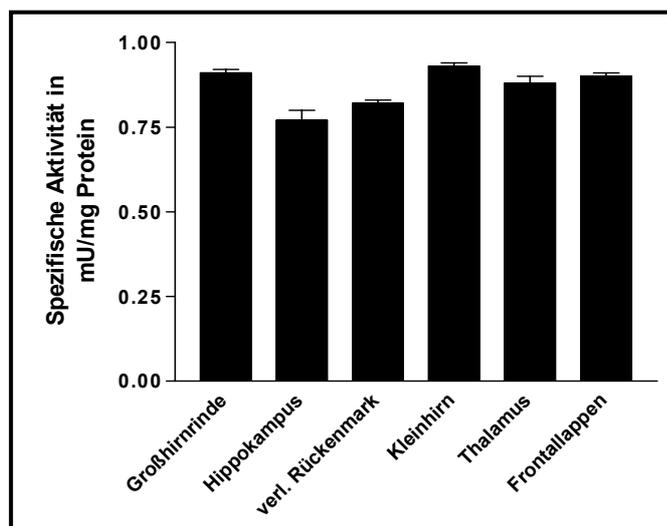


Abb. 20 Regionale Verteilung von PEP-Aktivität im Rattenhirn.

Der Aufschluß der Gewebeprouben erfolgte mit Hilfe eines Mikromörsers (Fa. Roth) und anschließender Zentrifugation (14500 u/min., 5 Minuten, 4°C) der Gesamtgewebeextrakte. Die PEP-Aktivität wurde bei 16°C mit $10 \mu\text{M}$ Z-Gly-Pro-AMC bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. Verl. Rückenmark: verlängertes Rückenmark

3.2.3.2 PEP-Expression im Rattenhirn

Die Überstände der Gewebeextrakte wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend mit Hilfe der Westernblot-Analyse die Expression von PEP untersucht. Als Positivkontrolle wurde rekombinante humane PEP (rhPEP, 80 kD) verwendet. In allen untersuchten Gehirnregionen konnte PEP nachgewiesen werden (Abb. 21). Dabei

korreliert die Intensität der detektierten Bande mit der ermittelten spezifischen Aktivität (Abb. 20 und 21).

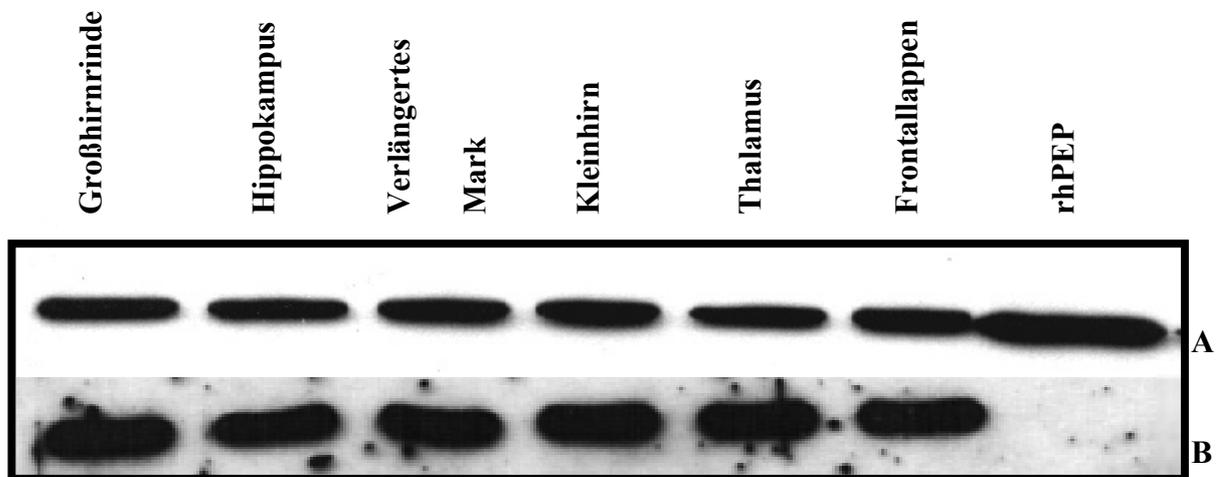


Abb. 21 Westernblot-Analyse der Expression von PEP im Rattenhirn.

Die Auftrennung der löslichen Gewebeextrakte (30 µg Protein/Probe) erfolgte in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die immobilisierten Proteinextrakte wurden mit den polyklonalen Primär-Antikörpern S449 (A, Anti-PEP, 1:400) und Anti-Actin (B, 1:1000, Sigma) inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mittels des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) analog den Anweisungen des Herstellers. rhPEP: humane rekombinante Prolylendopeptidase (75 ng Protein)

3.3 Subzelluläre Lokalisation von PEP in humanen Zelllinien

Mit Hilfe von Westernblot-Analysen (PEP-Immunreaktivität in Zellfraktionen), Aktivitätsmessungen (Nachweis post-Prolin-spaltender Aktivitäten), EGFP-Fusionsproteinen (direkte Visualisierung der PEP-Lokalisation) sowie Immunmarkierungen (PEP-Immunreaktivität in fixierten Zellen) wurde die zelluläre Lokalisation von PEP in humanen Zelllinien untersucht.

3.3.1 Zellfraktionierung der humanen neuronalen Zelllinien SH-SY5Y und U-343

Ausgehend vom Gesamtzellextrakt (ZE) erfolgte durch differentielle Zentrifugation die Fraktionierung der humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y. Die P1-Fraktion enthält in stark angereicherter Form neben allen löslichen Kernproteinen auch die Bestandteile der Kernmembran. In der P20-Fraktion befinden sich die größeren Zellstrukturen wie Lysosomen, Endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Apparat und Bruchstücke der Plasmamembran. Die Peroxisomen, Mitochondrien, freien Ribosomen und kleinere Membranbruchstücke wurden in der P100-Fraktion angereichert. Der Überstand (S100) der P100-Fraktion enthält alle löslichen zytosolischen Proteine.

3.3.1.1 Westernblot-Analyse der Zellfraktionen

Die gewonnenen Zellfraktionen wurden in 12%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mittels Westernblot-Analyse die Verteilung von PEP und ausgewählten Markerproteinen (*c-fos*, PDI, Actin) untersucht. Die Markerproteine dienen zur Charakterisierung der einzelnen Zellfraktionen hinsichtlich der Anreicherung mit bestimmten Zellkompartimenten. Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen *c-fos*, PDI und Actin konnte in der Westernblot-Analyse gezeigt werden, daß die durch differentielle Zentrifugation unternommene Zellfraktionierung erfolgreich war. Alle Marker-Proteine wurden ausschließlich bzw. überwiegend in den entsprechenden Zellfraktionen detektiert (Abb. 22). In den jeweils restlichen Zellfraktionen waren die Markerproteine nur sehr schwach oder gar nicht nachweisbar. PEP konnte neben dem Gesamtzellextrakt ausschließlich in der zytosolischen S100-Fraktion detektiert werden (Abb. 22).

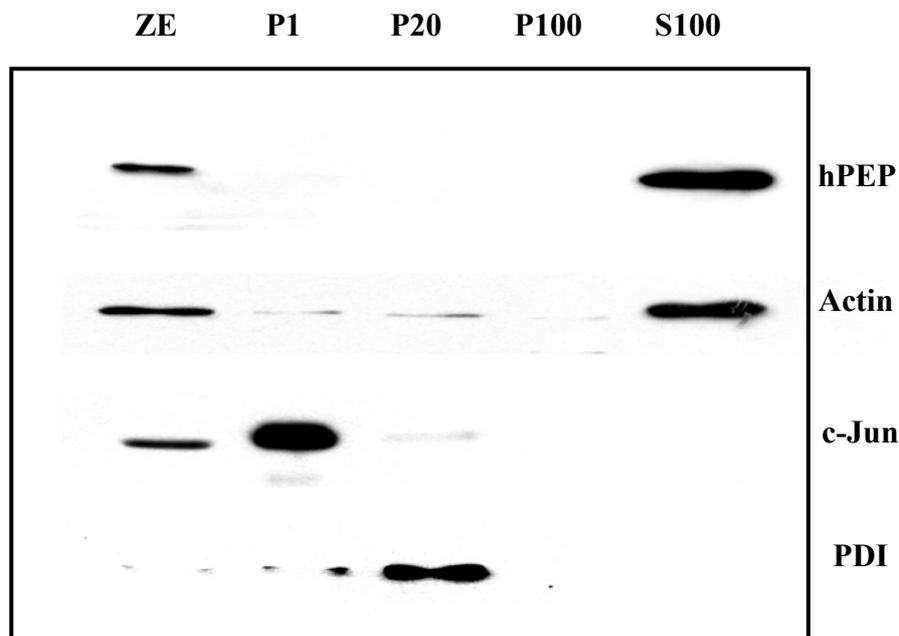


Abb. 22 Westernblot-Analyse der Expression von PEP und Markerproteinen in den Zellfraktionen der humanen Zelllinie U-343.

Es wurden je Zellfraktion 30 µg Protein in einem 12 %igen SDS-Acrylamidgel aufgetrennt (ZE: Gesamtzellextrakt, P1: angereicherte Kernfraktion, P20: angereicherte Fraktion der größeren Zellstrukturen wie Lysosomen, größere intakte Zellmembranstrukturen, ER- und Golgi-Strukturen, P100: angereicherte Fraktion der kleineren Zellstrukturen wie freie Ribosomen, Mitochondrien, Peroxisomen und kleinerer Membranbruchstücke, S100: angereicherte Fraktion der löslichen zytoplasmatischen Proteine). Die immobilisierten Proteinextrakte wurden mit den polyklonalen Primär-Antikörpern S449 (Anti-PEP, 1:400), Anti-Actin (1:1000, Sigma), Anti-*c-fos* (1:50, Oncogene) und Anti-PDI (1:100, Stressgen) inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

3.3.1.2 Die Verteilung der PEP-Aktivität in den Zellfraktionen

Die Bestimmung der Aktivität von PEP in den gewonnenen Zellfraktionen erfolgte mit Hilfe des Substrates Z-Gly-Pro-AMC. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. Es konnte in allen Zellfraktionen PEP-Aktivität gemessen werden (Abb. 23). In der S100-Fraktion der Zelllinien U343 und SH-SY5Y befanden sich 87 ± 2 % bzw. 99 ± 1 % der Gesamtaktivität. In den 3 restlichen Zellfraktionen lag der prozentuale Anteil der Gesamtaktivität zwischen 0,1 und 0,5 %. Während der Präparation der Fraktionen gingen bei der Zelllinie U-343 10 % der Ausgangsaktivität verloren. In der Zelllinie SH-SY5Y blieb nahezu die gesamte Aktivität erhalten. Die Verteilung der Aktivität von PEP korreliert mit der Verteilung der PEP-Expression (Abb. 22 und 23).

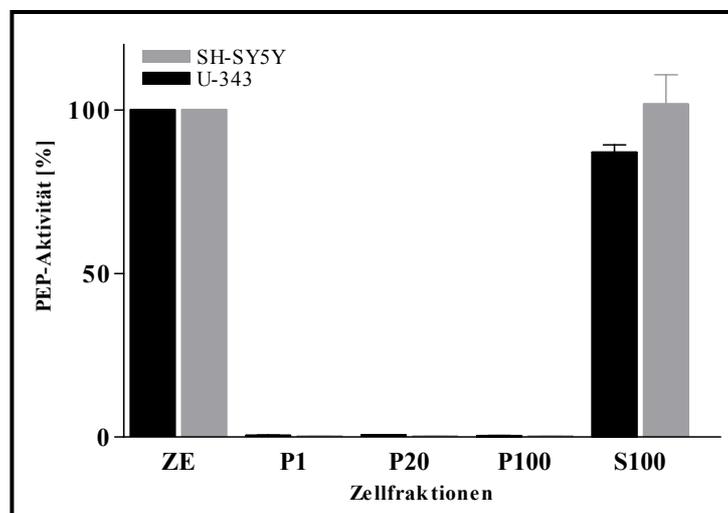


Abb. 23 Prozentuale Verteilung der PEP-Aktivität in den Zellfraktionen der humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y.

Die Aktivität von PEP in den durch differentielle Zentrifugation gewonnenen Zellfraktionen (ZE: Gesamtzellextrakt, P1: angereicherte Kernfraktion, P20: angereicherte Fraktion der größeren Zellstrukturen wie Lysosomen, größere intakte Zellmembranstrukturen, ER- und Golgi-Strukturen, P100: angereicherte Fraktion der kleineren Zellstrukturen wie freie Ribosomen, Mitochondrien, Peroxisomen und kleinerer Membranbruchstücke, S100: angereicherte Fraktion der löslichen zytoplasmatischen Proteine) wurde bei 16°C mit 10 μ M Z-Gly-Pro-AMC bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt.

3.3.2 Verteilung des PEP/EGFP-Fusionsproteines in humanen neuronalen Zelllinien

Zur Untersuchung der zellulären Verteilung von PEP erfolgte in den humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 die ektopische Expression eines PEP/EGFP-Fusionsproteines. Zusätzlich wurde als Kontrolle das nichtfusionierte EGFP-Protein in diesen Zelllinien expremiert. Die Transfektion der auf Deckgläsern kultivierten Zellen mit dem Expressionsvektor pEGFP (Fa. Clontech) und dem PEP/EGFP-Fusionskonstrukt pIS-7

(Kap.3.1.1.2) erfolgte unter Verwendung von POLYFECTIN (Fa. Biontex) analog den Anweisungen des Herstellers. Nach einer Kultivierungsdauer von 12 bis 48 Stunden wurden die Zellen mit 4 % (w/v) PFA in PBS fixiert und mit Hilfe des Laserscanning- Mikroskopes LSM510 (Fa. Zeiss) untersucht. Für das EGFP-Protein wurde eine homogene Verteilung über den gesamten Zellkörper einschließlich Zellkern gefunden (siehe Abb. 24A, U-343-Zelllinie). Dagegen weist das PEP/EGFP-Fusionsprotein eine ausschließlich zytoplasmatische Verteilung auf (siehe Abb. 24B-F). Ein besonders hoher Anteil des Fusionsproteines befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Zellkern (= perinukleärer Raum). Neben der perinukleären Verteilung konnte in LN-405- und SH-SY5Y-Zellen ein fibrilläres, zytoskelettähnliches Verteilungsmuster des Fusionsproteines beobachtet werden (siehe Abb. 24C, E und F). Eine Sekretion des PEP/EGFP-Fusionsproteines in den Kulturüberstand bzw. eine nukleäre Lokalisation konnte in keiner der untersuchten Zelllinien beobachtet werden.

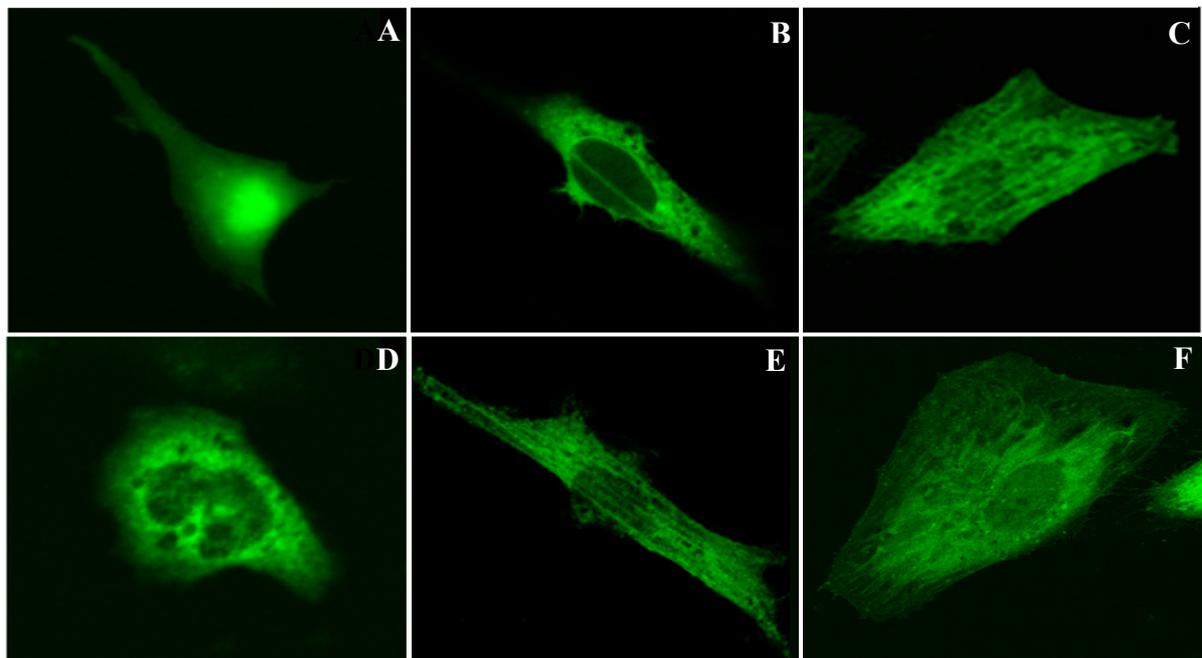


Abb. 24 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Verteilung des PEP/EGFP-Fusionsproteines in humanen Zelllinien.

Die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 wurden unter Verwendung von POLYFECTIN (Fa. Biontex) mit dem Expressionsvektor pEGFP (Fa. Clontech) und dem PEP/EGFP-Fusionskonstrukt pIS-7-MP7 entsprechend den Anweisungen des Herstellers transfiziert. Nach einer Kultivierungsdauer von 12 bis 24 Stunden wurden die Zellen mit 4 % (w/v) PFA in PBS fixiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Laserscanning-Mikroskopie (LSM510, Fa. Zeiss), Erklärung siehe Text.

3.3.3 Immunzytologische Lokalisation von Prolylendopeptidase in humanen Zelllinien

Zur Untersuchung der Lokalisation der endogenen PEP in humanen Zelllinien wurden parallel zu der Untersuchung mit dem EGFP-Fusionsprotein der monoklonale PEP-

Antikörper 4D4D6 eingesetzt. Durch den Vergleich der Untersuchungen können unspezifische Lokalisationen durch mögliche Überexpressionsartefakte des Fusionsproteines oder Kreuzreaktivitäten seitens des Antikörpers ermittelt werden. Weiterhin war es ein Ziel des Vergleiches, zu prüfen, ob mit Hilfe des Antikörpers die teilweise nukleäre Lokalisation des Fusionsproteines bestätigt werden kann. Weiterhin erfolgte zur Untersuchung der zytoplasmatischen Lokalisation die parallele Immunmarkierung ausgesuchter Zellkompartimente und der PEP.

3.3.3.1 Immunmarkierung von Prolylendopeptidase

Die Immunmarkierung von PEP in den humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 erfolgte mit unverdünntem Zellkulturüberstand der Hybridomazelllinie 4D4D6. In den 3 untersuchten Zelllinien konnte eine heterogene zytoplasmatische Lokalisation von PEP nachgewiesen werden. Eine intensive Markierung zeigt sich um den Zellkern herum, die zur Peripherie hin deutlich abnimmt (siehe Abb. 25A-F).

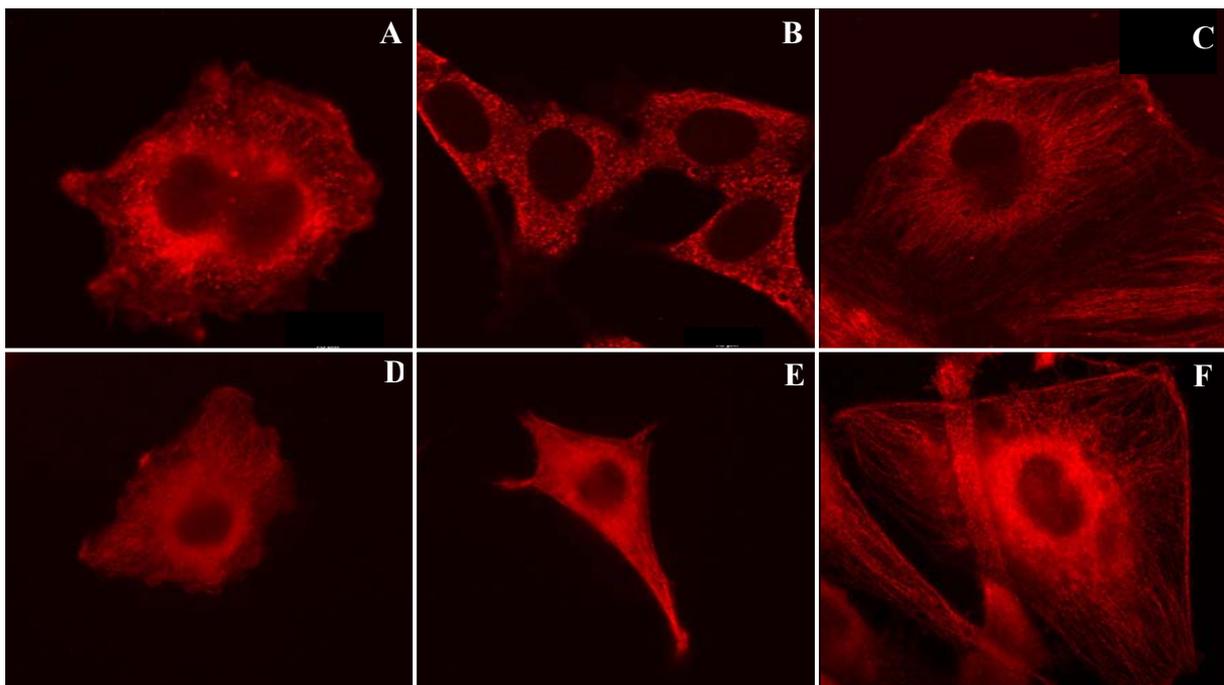


Abb. 25 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Immunmarkierung von PEP in humanen Zelllinien mit dem PEP-Antikörper 4D4D6.

Die humanen Zelllinien U-343 (A,D), SH-SY5Y (B,E) und LN-405 (C,F) wurden für 24 Stunden auf Deckgläsern in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Serum kultiviert. Anschließend wurden die fixierten Zellen (4 % (w/v) PFA in PBS) für 2 Stunden bei RT mit unverdünntem Kulturüberstand der Hybridomazelllinie 4D4D6 inkubiert. Die Auswertung und Dokumentation der immunmarkierten Zellen erfolgte mit Hilfe der Laserscanning-Mikroskopie (A-C, LSM510, Fa. Zeiss) bzw. mit inverser Fluoreszenz-Mikroskopie (D-F; Axiovert S100, Fa. Zeiss; CCD-SPOT RT SLIDER-Kamera, Fa. VisitronSystem; 1000fache Vergrößerung), Erklärung siehe Text.

In 90 % aller LN-405-Zellen findet man ein fibrilläres, zytoskelettähnliches Verteilungsmuster von PEP (siehe Abb. 25C und F). In den U-343- (siehe Abb. 25D) und SH-SY5Y-Zelllinien (siehe Abb. 25E) konnte ebenfalls dieses Verteilungsmuster bei 10-30 % der Zellen beobachtet werden. Damit wurde unabhängig voneinander mit 2 verschiedenen Nachweismethoden eine vergleichbare zytoplasmatische Lokalisation für PEP nachgewiesen (siehe Abb. 24C, E und F, und Abb. 25C-F). Die nukleäre Lokalisation des EGFP-Fusionsproteines konnte mit Hilfe der Immunmarkierung nicht bestätigt werden. Dies zeigt, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit bei der bisher beschriebenen nukleären Lokalisation um einen Artefakt handelt.

3.3.3.2 Kolokalisation von Prolylendopeptidase mit dem Zytoskelett

Mit Hilfe der Immunmarkierung und des EGFP-Fusionsproteines wurde demonstriert, daß PEP generell zytoplasmatisch lokalisiert ist. Dabei kommt PEP in hohen Konzentrationen um den Zellkern vor und nimmt zur Peripherie hin ab. Dies ist typisch für eine ER-Lokalisation. Mit Hilfe der parallelen Immunmarkierung von PEP und Calnexin, einem ER-Transmembranprotein, wurde eine mögliche Assoziation von PEP mit dem ER untersucht. Eine ER-Lokalisation selbst wird auf Grund der im Kapitel 3.3.1 dargestellten Ergebnisse ausgeschlossen. PEP und Calnexin besitzen ähnliche Verteilungsmuster (siehe Abb. 26A-B, D-E). Die Abbildung der beiden Immunmarkierungen aufeinander zeigt, daß sich die Fluoreszenzsignale im perinukleären Raum überlappen. Dagegen konnte keine Überlagerung der peripheren Calnexin- und PEP-Markierungen festgestellt werden (siehe Abb. 26C und F). Dazu erfolgte die parallele Immunmarkierung der Zelllinien U-343 und LN-405 mit PEP-Antikörper 4D4D6 und wahlweise mit Anti-Calnexin bzw Anti-Tubulin. Calnexin ist ein Membranprotein und diente als ER-Marker. Tubulin-Antikörper wurde zur Immunmarkierung des Zytoskeletts verwendet. Die Kolokalisation von PEP mit den untersuchten Zellkompartimenten wurde auf Grund von Überlagerungen der roten und grünen Fluoreszenzsignale (TexasRed, Fluorescein) ermittelt. Zur spezifischen Immunmarkierung des Endoplasmatischen Retikulums wurde monoklonaler Calnexin-Antikörper (Fa. Streßgene, 1:100) eingesetzt.

Die Immunmarkierung des Zytoskeletts erfolgte mit Hilfe von polyklonalem Tubulin-Antikörper (Fa. Sigma, 1:100). Auf Grund der Verwendung von PFA zur Fixierung der Zellen, kommt es zu einer minderwertigen Markierung von Tubulin. Bei Einsatz der dafür besser geeigneten Methanol-Fixierung kommt es dagegen zum völligen Verlust der spezifischen PEP-Immunmarkierung. Für PEP und Tubulin wurden in beiden untersuchten Zelllinien identische Verteilungsmuster gefunden (siehe Abb. 27A-B, 27D-E). Die Überlagerungen der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der PEP- und Tubulin-Immunmarkierungen zeigen eine nahezu vollständige Übereinstimmung (siehe Abb. 27C und F).

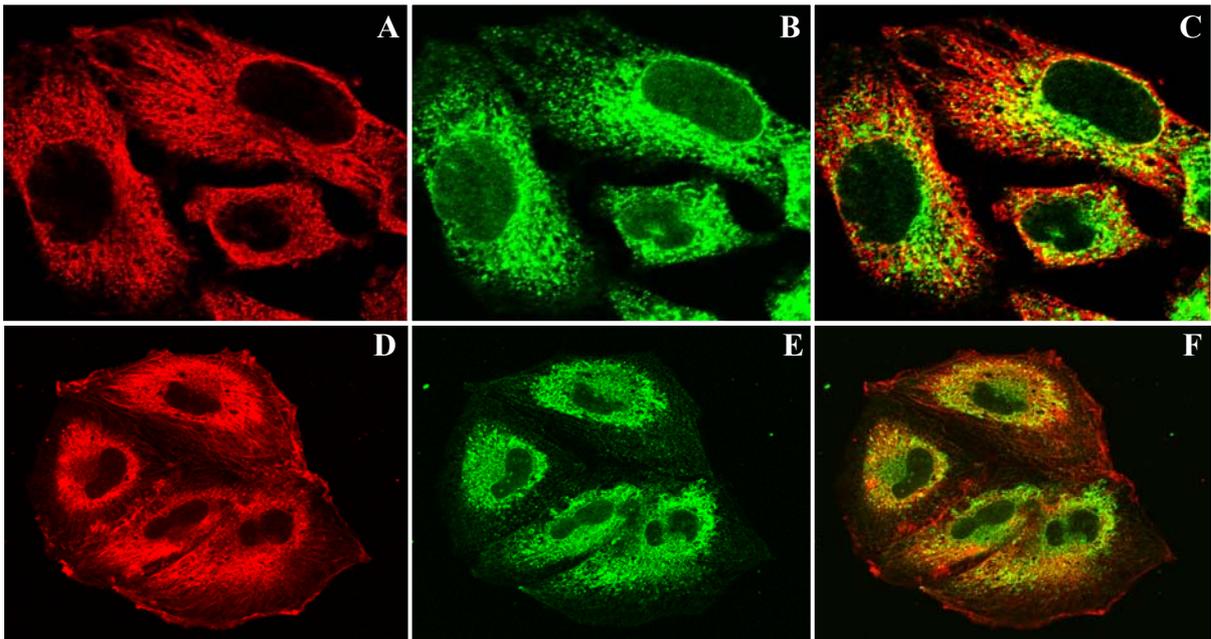


Abb. 26 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der parallelen Immunmarkierung humaner Zelllinien mit PEP- und Calnexin-Antikörper.

Die humanen Zelllinien U-343 (A-C) und LN-405 (D-F) wurden für 24 Stunden auf Deckglas in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Serum kultiviert. Anschließend wurden die fixierten Zellen (4 % (w/v) PFA in PBS) für 2 Stunden bei RT mit unverdünntem Kulturüberstand der Hybridomazelllinie KW4D4D6 (rot) und mit polyklonalem Calnexin-Antikörper (grün, Fa. Streßgene, 1:100) inkubiert. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe der Laserscanning-Mikroskopie (LSM510, Fa. Zeiss) bei den Wellenlängen 546/590 nm (rot) und bei 490/515 nm (grün). Erklärung siehe Text.

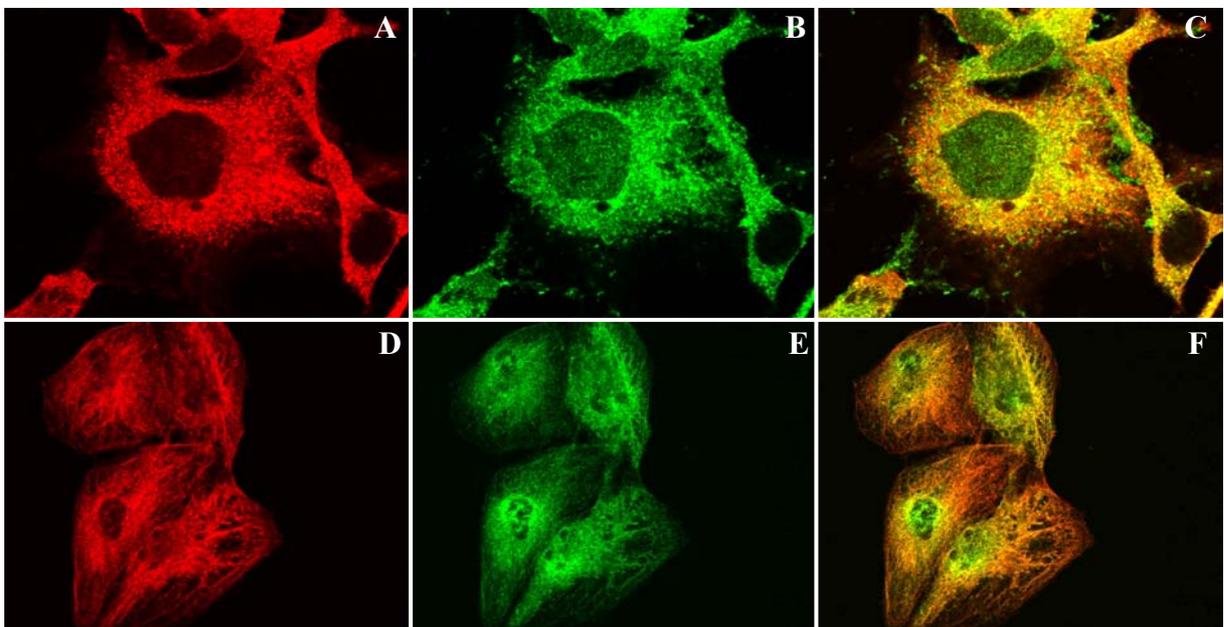


Abb. 27 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der parallelen Immunmarkierung humaner Zelllinien mit PEP- und Tubulin-Antikörper.

Die Kultivierung und Präparation der humanen Zelllinien U-343 (A-C) und LN-405 (D-F) sowie die Auswertung und Dokumentation erfolgte analog dem Standardprotokoll (siehe Abb. 26). Die humanen Zellen wurden bei RT für 2 Stunden mit unverdünntem Kulturüberstand der Hybridomazelllinie 4D4D6 (rot) sowie mit polyklonalem Tubulin-Antikörper (grün, Fa. Sigma, 1:100) inkubiert. Erklärung siehe Text.

3.3.3.3 Einfluß der Mikrotubuli-Depolymerisation auf das zytoplasmatische Verteilungsmuster von Prolylendopeptidase

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen PEP und dem Zytoskelett (Tubulin) wurden die humanen Zelllinien U-343 und LN-405 mit der Mikrotubuli-depolimerisierenden Substanz Nocodazol (2 µg/ml, Fa. Sigma) inkubiert. Anschließend erfolgte die separate Immunmarkierung der Zellen mit monoklonalem Tubulin-Antikörper (Fa. Sigma, 1:100) und PEP-Antikörper (4D4D6). Die Verwendung des monoklonalen Tubulin-Antikörpers erfolgte auf Grund der besseren Ergebnisse bei der Immunmarkierung PFA-fixierter Zellen gegenüber dem polyklonalen Tubulin-Antikörper (siehe Abb. 27B und E). In den unbehandelten Zelllinien U-343 (siehe Abb. 28A und B) und LN-405 (siehe Abb. 28 C und D) konnten identische Verteilungsmuster, wie im Kap. 3.3.3.1 und 3.3.3.2 beschrieben, von PEP und Tubulin nachgewiesen werden. Neben einer intensiven Markierung des perinukleären Raumes wurden ebenfalls fibrilläre Strukturen im gesamten Zytoplasma immunmarkiert. Die Behandlung beider Zelllinien mit Nocodazol führt zum vollständigen Verlust der fibrillären Tubulin- und PEP-Strukturen (siehe Abb. 28E-H). Die Tubulin- und PEP-markierten perinukleären Strukturen weisen ebenfalls starke Veränderungen auf. Während die behandelten LN-405-Zellen ähnliche perinukleäre Verteilungsmuster für Tubulin und für PEP aufweisen (siehe Abb. 28G und H), existieren in der Zelllinie U-343 signifikante Unterschiede. Nach Behandlung von U-343-Zellen mit Nocodazol erfolgt eine diffuse Markierung von Tubulin über das gesamte Zytoplasma (siehe Abb. 28E). Dagegen ist PEP fast ausschließlich in bläschenartigen Ausstülpungen der Zellmembran zu finden (siehe Abb. 28 F).

Zur Kontrolle der spezifischen Zerstörung des Zytoskeletts durch die Mikrotubuli-depolymerisierende Substanz Nocodazol erfolgte die Immunmarkierung von LN-405-Zellen mit Calnexin-Antikörper. In Nocodazol-behandelten LN-405-Zellen konnte gegenüber unbehandelten Zellen keine Veränderung des spezifischen Verteilungsmusters von Calnexin festgestellt werden (siehe Abb. 29).

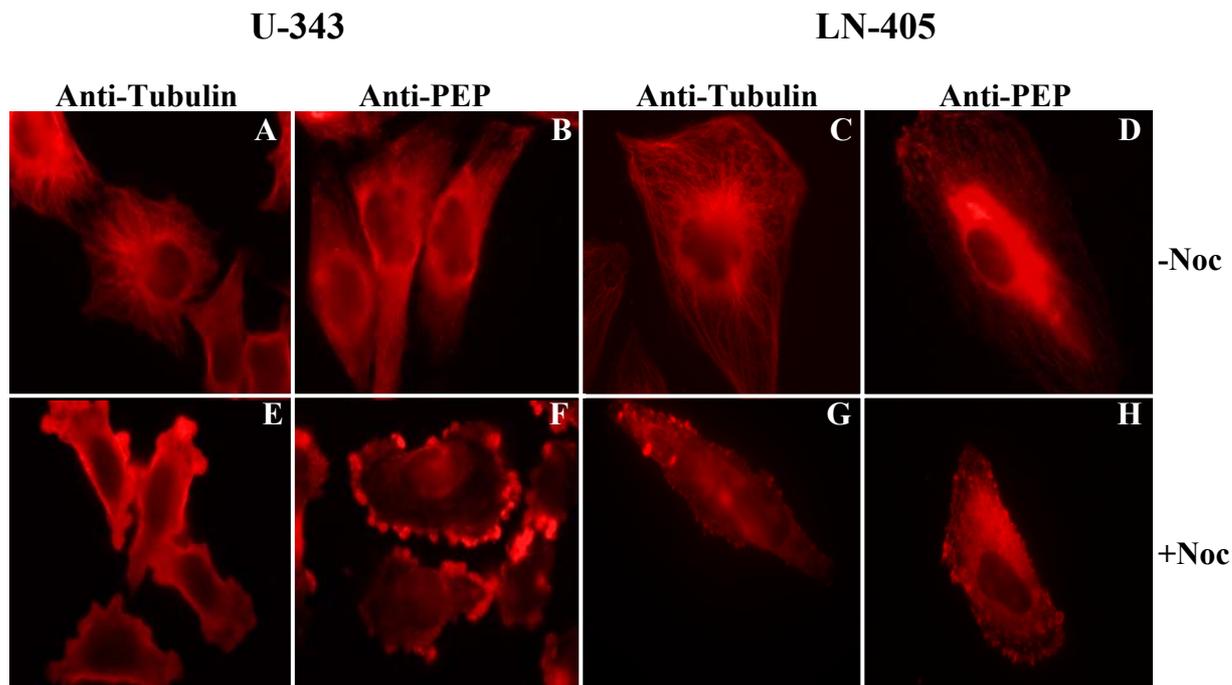


Abb. 28 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der separaten Immunmarkierung humaner Zelllinien mit Tubulin- und PEP-Antikörper in Abhängigkeit von Nocodazol.

Die humanen Zelllinien U-343 und LN-405 wurden für 24 Stunden auf Deckglas in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Serum kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit 2 µg/ml Nocodazol für 15 Minuten bei 37°C (+Noc). Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen verwendet (-Noc). Die fixierten Zellen (4 % (w/v) PFA in PBS) wurden für 2 Stunden bei RT mit Anti-PEP (4D4D6, unverdünnter Zellkulturüberstand) und Anti-Tubulin (Fa. Sigma, 1:100) inkubiert. Die Auswertung und Dokumentation der immunmarkierten Zellen erfolgte mit Hilfe eines CCD-Kamera-bestückten (Fa. VisitronSystems, SPOT RT SLIDER) inversen Fluoreszenz-Mikroskopes (Axiovert S100, Fa. Zeiss; CCD-SPOT-Kamera, 1000fache Vergrößerung). Erklärung siehe Text.

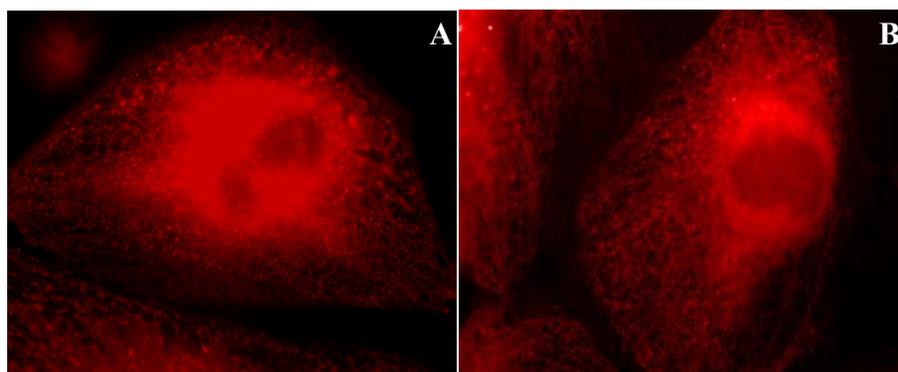


Abb. 29 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Immunmarkierung von LN-405-Zellen mit Calnexin-Antikörper in Abhängigkeit von Nocodazol.

Die humane Zelllinie LN-405 wurde für 24 Stunden auf Deckglas in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Serum kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit 2 µg/ml Nocodazol für 15 Minuten bei 37°C (B). Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet (A). Die fixierten Zellen (4 % (w/v) PFA in PBS) wurden für 2 Stunden bei RT mit Anti-Calnexin (Fa. Streßgen, 1:100) inkubiert. Die Auswertung und Dokumentation der immunmarkierten Zellen erfolgte mit Hilfe eines CCD-Kamera-bestückten (Fa. VisitronSystems, SPOT RT SLIDER) inversen Fluoreszenz-Mikroskopes (Axiovert S100, Fa. Zeiss; CCD-SPOT-Kamera, 1000fache Vergrößerung). Erklärung siehe Text.

3.4 Einfluß von Prolylendopeptidase auf Morphologie und Vitalität humaner Zelllinien

Im Gegensatz zu umfassenden Daten und Vorstellungen zum Katalysemechanismus, Struktur und Substratspezifität, ist die physiologische Funktion einschließlich endogener Substrate und Bindungspartner von PEP noch weitgehend unbekannt. Die Aufklärung der physiologischen Funktion bedingt aber die Identifizierung der entsprechenden Interaktionspartner. Die Identifizierung von physiologischen und morphologischen Veränderungen in Abhängigkeit der Expression und Aktivität eines Zielproteines bilden die Grundlage für eine gerichtete Isolierung von Interaktionspartnern durch entsprechende Screening-Systeme. Außerdem können unmittelbar an Hand von physiologischen und morphologischen Veränderungen Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des zu untersuchenden Proteines gezogen werden. Um neue Hinweise zur Funktion von PEP zu erhalten und zur Vorbereitung eines geplanten Screenings von Interaktionspartnern, wurde deshalb in humanen Zelllinien die Konzentration an PEP mit Hilfe der ektopischen Expression von EGFP-Fusionsproteinen erhöht und mit Hilfe von anti-sense-mRNA reduziert. Weiterhin erfolgte mittels des spezifischen PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyr-CN die vollständige Hemmung der Aktivität. Anschließend wurden die humanen Zelllinien auf mögliche Veränderungen hinsichtlich der Zellmorphologie und der Zellvitalität untersucht.

3.4.1 Erhöhung der endogenen Expression von Prolylendopeptidase

Für die ektopische Expression zur Erhöhung der PEP-Konzentration in den Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 wurden die EGFP-Fusionskonstrukte pIS-9 und pIS-11 (Kap. 3.1.1.3) verwendet. Das Expressionskonstrukt pIS-9 stellt die Fusion von EGFP mit dem Wildtyp von PEP dar. Im Konstrukt pIS-11 wurde dagegen in PEP die Aminosäure Serin an Position 554 des vollständigen ORF's gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Auf Grund dieses Austausches besitzt die S554A-Mutante von PEP keine katalytische Aktivität. Damit können mögliche Effekte der ektopischen Expression von pIS-11 ausschließlich auf Protein-Protein-Bindungen zurückgeführt werden. Die Transfektion der humanen Zelllinien erfolgte mit Hilfe von „Superfect2000“-Lösung (Fa. Life Technologies). Zur Kontrolle wurden alle 3 Zelllinien mit dem Expressionsvektor pEGFP (Fa. Clontech) transformiert. Die Selektion von stabilen Zelllinien erfolgte mit Hilfe von G-418 (400 µg/ml) unter Nutzung der Expressionsvektorvermittelten Neomycinresistenz.

In allen 3 Zelllinien lag die ermittelte Transfektionsrate für den Expressionsvektor pEGFP bei ca. 50 %. Dagegen wurden mit den Fusionskonstrukten pIS-9 und pIS-11 lediglich Transformationsraten von unter 1% erreicht. Von allen 3 untersuchten Zelllinien konnten stabile EGFP-Protein exprimierende Zelllinien etabliert werden. Es war nicht möglich, stabile G418-resistente Zelllinien zu gewinnen, die das Wildtyp-Protein- bzw. die S554A-PEP-

Mutante exprimieren. Die ektopische Expression beider Protein-Varianten führt innerhalb von 14 Tagen zum Zelltod. Dabei zeigte ein Großteil der absterbenden Zellen typische apoptotische Merkmale. Zuerst kann eine Vakuolisierung des Zytoplasmas beobachtet werden (siehe Abb. 30A). Dann erfolgt, beginnend mit der „bläschenartigen“ Auffaltung der Zellmembran (Abb. 30B), der Zerfall der Zellen in sogenannte „Apoptotische Körperchen“ (siehe Abb. 30D-F). Weiterhin konnte keine einzige Zellteilung einer mit pIS-9 und pIS-11-transfizierten Zelle beobachtet werden. Die Ergebnisse legen nahe, daß es durch die ektopische Expression von PEP zur Störung der Zellteilung und zur Induktion von apoptotischen Prozessen kommt. Dabei treten die beobachteten Effekte unabhängig von der PEP-Aktivität auf.

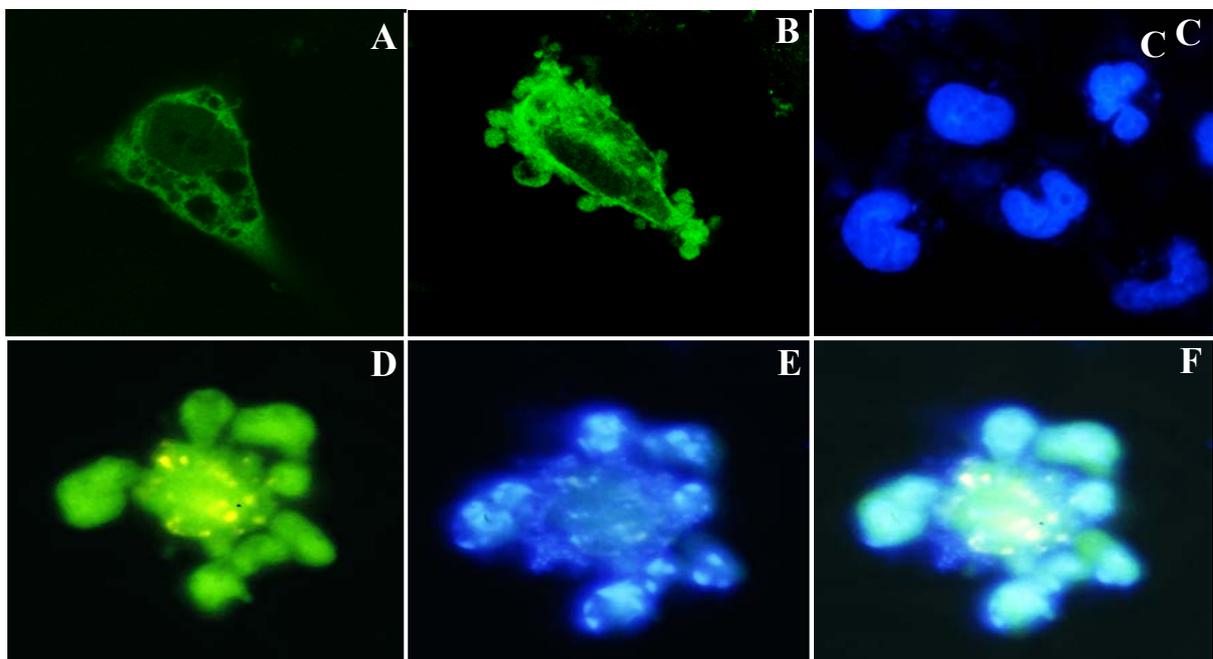


Abb. 30 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PEP/EGFP-Fusionsprotein-exprimierenden U-343-Zellen.

Die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 wurden unter Verwendung von „Superfect2000“-Lösung (Fa. Life Technologies) mit den PEP/EGFP-Expressionskonstrukten pIS-9-MP10 und pIS-11-MP7 analog den Anweisungen des Herstellers transfiziert. Nach einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden wurden die Zellen permanent mit G-418 (400 µg/ml) behandelt. Die Auswertung und Dokumentation der fixierten Zellen (4 % (w/v) PFA in PBS) erfolgte mit Hilfe der Laserscanning-Mikroskopie (A-B, LSM510, Fa. Zeiss) bzw. mit inverser Fluoreszenz-Mikroskopie (C- F; Axiovert S100, Fa. Zeiss; Negativ-Film Select, 400 Kodak; Mikroskopkamera MS50, Fa. Zeiss; 1000fache Vergrößerung). A: U-343-PEP/EGFP 24h, B: U-343-PEP/EGFP 48h, C: DAPI, intakte Zellkerne von nichttransfizierten U-343-Zellen, D: U-343-PEP/EGFP 72h, E: DAPI U-343-PEP/EGFP 72h, fragmentierter Zellkern einer transfizierten U-343-Zelle, F: Negativ-Multiplikation von D und E.

3.4.2 Verringerung der endogenen Expression von Prolylendopeptidase

Zur Untersuchung des Einflusses einer reduzierten endogenen PEP-Konzentration auf die Zellmorphologie und Zellvitalität wurden die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 mit dem anti-sense-Konstrukt pIS-5 transfiziert (Kapitel 3.1.2.1). Die Dokumentation morphologischer Veränderungen erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera (SPOT, Fa. Visitron) bestückten inversen Mikroskopes (Axiovert S100, Fa. Zeiss). Die Zellvitalität wurde mittels Zytotoxizitätsassay (CytoTox96, Fa. Promega) untersucht.

Die isolierten U343-anti-sense-Zellen zeigen bis auf eine Ausnahme keine phänotypischen Veränderungen in Größe und Gestalt. Die anti-sense-Zelllinie U-343-as11 mit der geringsten Restaktivität von 30 % weist gegenüber der Wildtyp-Zelllinie eine 3- bis 5fache Vergrößerung der Zellen auf (siehe Abb. 31). Weiterhin hat sich der Anteil an amöboiden Zellen gegenüber der Wildtyp-Zelllinie von ca. 50 auf 90 % erhöht. In den U-343-anti-sense-Zelllinien konnte kein erhöhter Zelltod bzw. eine verringerte Proliferation festgestellt werden (Abb. 33 und 34).

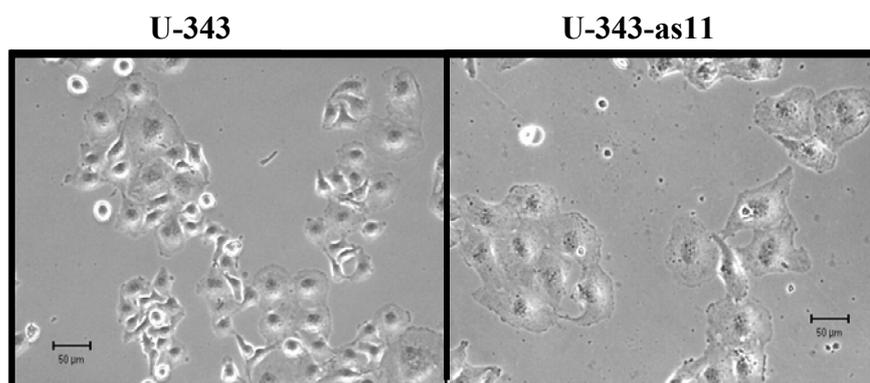


Abb. 31 Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen des U-343-Zellphänotyps in Abhängigkeit der Transkription von PEP-anti-sense-RNA.

Zur Dokumentation der Phänotypen wurden die anti-sense-Zelllinien U-343-as11 und -as60 in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Serum kultiviert. Die Aufnahmen im Phasenkontrast erfolgten mit Hilfe eines inversen Mikroskopes (Axiovert S100, Fa. Zeiss) und einer CCD-Kamera (SPOT, Fa. Visitron).

SH-SY5Y-anti-sense-Zellen zeigen starke phänotypische Veränderungen gegenüber den Wildtyp-Zellen. Insgesamt erfolgte die Isolierung von insgesamt 20 Zelllinien, bei denen eine drastische Veränderung der Zellgröße und der Zellform festgestellt werden konnte. Die Zellen sind um das 5-30fache vergrößert (siehe Abb. 32A und B) und besitzen gegenüber der Wildtyp-Zelllinie (siehe Abb. 32C) keine dendriten- und axonen-artigen Fortsätze mehr. Ca. 90 % aller anti-sense-Zellen lassen sich 2 verschiedenen morphologischen Phänotypen zuordnen. Phänotyp 1 besitzt einen nadeldünnen, geraden oder auch gebogenen Zellkörper mit sehr kleinem Zellkern (siehe Abb. 32D-1). Charakteristisch für den 2. morphologischen Phänotyp sind längliche, amöboide Zellen mit großem Zellkern (siehe Abb. 32E). Es existieren fließende Übergänge zwischen diesen beiden morphologischen Phänotypen (siehe Abb. 32D-

2). Die prozentuale Verteilung der morphologischen Phänotypen in den einzelnen isolierten Zellklonen ist sehr unterschiedlich. Außerdem lagen alle anti-sense-Zelllinien als Mischkulturen vor. Alle 20 Linien zeigen signifikante Störungen der Zellvitalität. Auf Grund eines verstärkten Zelltodes mit typischen apoptotischen Merkmalen (siehe Abb. 32F) gingen 16 von 20 Linien innerhalb von 6 Monaten verloren. Im Gegensatz zu EGFP-Fusionsprotein exprimierenden Zellen proliferieren die anti-sense-Zellen. Bei den restlichen 4 Zelllinien stellte sich ein solches Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod ein, daß die Zellzahl nur sehr langsam zunahm bzw. stagnierte. Auf Grund der erhöhten Mortalitätsrate konnte daher lediglich von 9 Zelllinien mittels Aktivitätsassay eine reduzierte PEP-Aktivität nachgewiesen werden. Für ebenfalls isolierte G418-resistente Zelllinien ohne sichtbare Veränderungen des Phänotypes konnten ausschließlich Restaktivitäten zwischen 70 % und 100 % ermittelt werden.

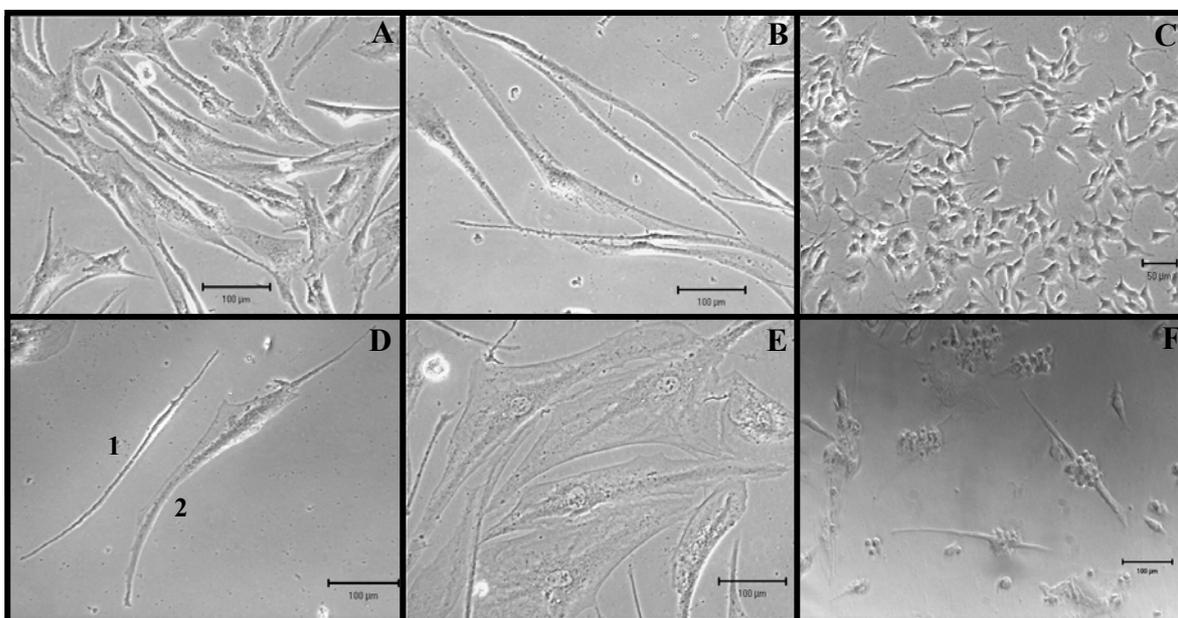


Abb. 32 Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen des SH-SY5Y-Zellphänotyps in Abhängigkeit der Transkription von PEP-anti-sense-RNA.

Zur Dokumentation der veränderten Phänotypen wurden die Zellen in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Serum kultiviert. Die Aufnahmen im differentiellen Phasenkontrast erfolgten mit Hilfe eines inversen Mikroskopes (Axiovert S100, Fa. Zeiss) und einer CCD-Kamera (SPOT, Fa. Visitron). A: SH-SY5Y-as15, B: SH-SY5Y-as18, C: Wildtyp, D1: Bautyp 1, D2: intermediärer Bautyp, E: Bautyp 2, F: SH-SY5Y-as1 (Stadium nach 3 Monaten in Kultur).

Wie bereits dargelegt (Kap. 3.1.2.1), konnten von der humanen Astrozytomazelllinie LN-405 keine G418-resistenten Zellklone isoliert werden. Alle sich entwickelnden Zellkolonien gingen unter starker zytosolischer Vakuolisierung zu Grunde. Die Etablierung von stabilen EGFP exprimierenden Zellen zeigt (Daten nicht gezeigt), daß generell transgene LN-405-Zelllinien hergestellt werden können.

3.4.3 Vollständige Hemmung der Aktivität von Prolylendopeptidase

Mit Hilfe des spezifischen PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyrr-CN wurde der Einfluß von PEP-Aktivität auf die Zellvitalität und die Zellmorphologie der humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 untersucht. Die Zellen wurden für 72 Stunden in serumfreiem DMEM-Medium mit 5 μ M Fmoc-AlaPyrr-CN bzw. als Kontrolle mit 0,05 % DMSO kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zytotoxizität und der Proliferationsrate unter Verwendung kommerzieller Assaysysteme (CytoTox96, CellTiter 96 AQueousOne, Fa. Promega). Weiterhin wurden die Zellen hinsichtlich morphologischer Änderungen untersucht. Zur Kontrolle der vollständigen Hemmung wurde die Hälfte des konditionierten Kulturmediums für die Frost-Tau-Lyse der Zellen verwendet, um anschließend die intrazelluläre PEP-Aktivität bestimmen zu können.

Die Bestimmung der Zytotoxizitätswerte für die DMSO-Kontrolle ergab, daß die SH-SY5Y-Zelllinie mit 44 % und die Zelllinie LN-405 mit 23 % Zytotoxizität im Vergleich zur Zelllinie U-343 mit nur 15 % Zytotoxizität um das 3- bzw. 1,5fache sensitiver sind, gegenüber der Kultivierung in serumfreiem, DMSO-haltigen Medium (Abb. 33).

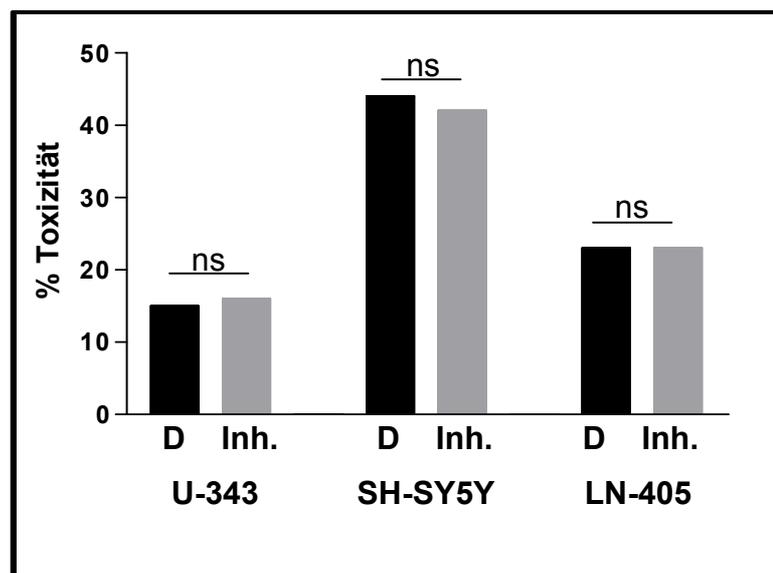


Abb. 33 Zytotoxische Wirkung des PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyrr-CN gegenüber verschiedenen humanen Zelllinien.

Zur Untersuchung des Einflusses von PEP auf die Zellvitalität wurden die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 für 72 Stunden mit 5 μ M Fmoc-AlaPyrr-CN (Inh.) bzw. als Kontrolle mit 0.05 % DMSO (D) in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Zur Ermittlung der Zytotoxizität wurde die Hälfte des konditionierten Kulturmediums abgenommen. Die andere Hälfte des Mediums wurde zum Aufschluß der Zellen durch Frost-Tau-Lyse verwendet. Nach Zentrifugation des Zellextraktes (14500 u/min., 5 Minuten, 4°C) erfolgte die Bestimmung der LDH-Aktivität in den Medien und im Überstand der Zellextrakte sowie die Berechnung der Zytotoxizitätswerte mit Hilfe des kolorimetrischen Assays CytoTox96 (Fa. Promega) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. ns: nicht signifikant

Demgegenüber konnten keine Unterschiede zwischen den DMSO- und Fmoc-AlaPyrr-CN behandelten Zellen innerhalb der untersuchten Zelllinien festgestellt werden (Abb. 25). Im parallel durchgeführten Aktivitätsassay konnte nachgewiesen werden, daß die PEP-Aktivität über den Versuchszeitraum von 72 Stunden vollständig gehemmt war (Daten nicht gezeigt).

Die Proliferationsraten sind in allen 3 humanen Zelllinien nach Inkubation mit Inhibitor bzw. mit DMSO um ca. 10 % erhöht (Abb. 34). Die Unterschiede zwischen Inhibitor- und DMSO behandelten Zellen liegen zwischen 2 und 4 %.

Damit führt die vollständige Hemmung der Aktivität von PEP weder zu einem verstärkten Zelltod, noch zu einer signifikanten Beeinflussung der Proliferation in den untersuchten humanen Zelllinien. Weiterhin konnten für alle 3 humanen Zelllinien keine morphologischen Veränderungen während der Inkubation von 72 Stunden mit Fmoc-AlaPyrr-CN beobachtet werden.

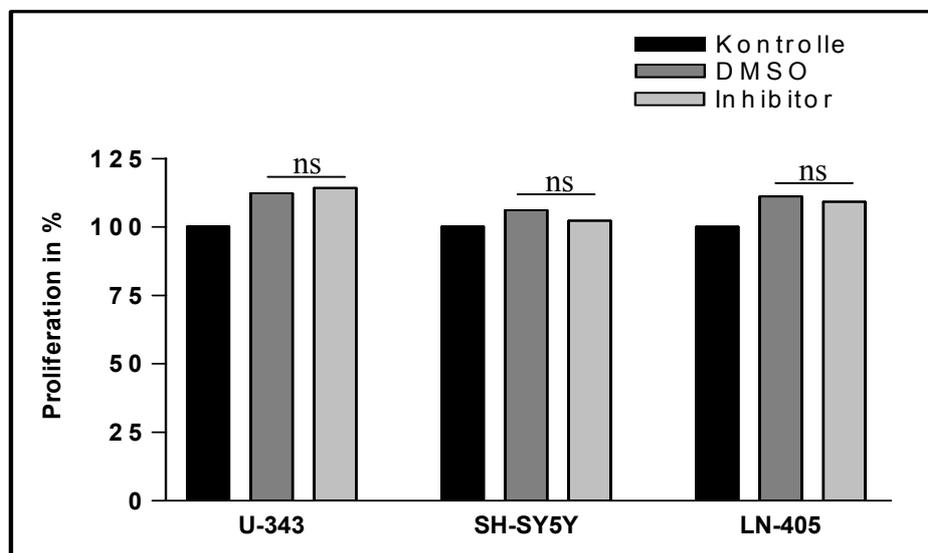


Abb. 34 Einfluß des PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyrr-CN auf die Proliferation verschiedener humaner Zelllinien.

Zur Untersuchung des Einflusses von PEP auf die Proliferation wurden die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 für 72 Stunden mit 5 μ M Fmoc-AlaPyrr-CN (Inhibitor) bzw. mit 0,05 % DMSO in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proliferationsrate mit Hilfe des Assay-Systemes CellTiter96 AQueousOne (Fa. Promega) analog den Anweisungen des Herstellers. ns: nicht signifikant

3.5 Einfluß von Prolylendopeptidase auf Signalketten in humanen Zelllinien

In der aktuellen Literatur wird für PEP eine Beteiligung an psychischen und neurodegenerativen Erkrankungen sowie an Lern- und Gedächtnisprozessen diskutiert. Eine wichtige Grundlage dieser physiologischen bzw. pathophysiologischen Prozesse ist die Aufnahme und Weiterleitung von Informationen durch Signalketten. Eine mögliche

intrazelluläre Beeinflussung von Komponenten dieser Signalketten durch PEP hat unmittelbare Auswirkungen auf die oben genannten Prozesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Phosphoinositid- und die Adenylat-Cyclase-Kaskade in Abhängigkeit der Expression und Aktivität von PEP untersucht. Für die Aufklärung des Einflusses von PEP auf die Signalketten wurden die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 verwendet. Weiterhin erfolgte der Einsatz der transgenen Zelllinien U-343-as2, U343-as11, U-343-as60 und U-343-CRE1. Zur vollständigen Hemmung der PEP-Aktivität wurde der spezifische PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyr-CN benutzt.

3.5.1 Einfluß der Prolylendopeptidase-Aktivität auf die Adenylat-Cyclase-Kaskade

Durch die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Adenylat-Cyclase und somit zur Synthese von cAMP. Die cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB, welcher durch Bindung an das DNA-Enhancer-Element *CRE* die Transkription des in cis-Position liegenden Genes bedingt. Zur Untersuchung des Einflusses von PEP auf die Adenylat-Cyclase-Kaskade mit Hilfe eines *in vivo* Zellkultur-Assays wurde die stabile transgene Zelllinie U-343-CRE1 eingesetzt (Kap.3.1.3). In dieser Zelllinie steht die EGFP-Expression unter der Kontrolle des *CRE*-Enhancer-Elementes und ist somit abhängig von der Aktivierung der Adenylat-Cyclase-Kaskade.

Mit Hilfe des spezifischen PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyr-CN wurde untersucht, ob die vollständige Hemmung von PEP zu einer Stimulation der EGFP-Expression führt. Dafür wurden 50000 Zellen/Kavität in 96er-Mikrotiterplatten für 24 Stunden mit 5 μ M Inhibitor sowie als Negativ- und Positiv-Kontrolle mit 0,05 % DMSO bzw. 10 μ M Forskolin inkubiert. Nach 24 Stunden konnte an Hand der EGFP-Fluoreszenz-Intensität bei 485/535 nm nachgewiesen werden, daß es durch die Inkubation mit PEP-Inhibitor und DMSO zu keiner Erhöhung der EGFP-Expression kommt (Abb. 35). Dagegen konnte mit Forskolin die EGFP-Fluoreszenz-Intensität um das 2,8fache erhöht werden.

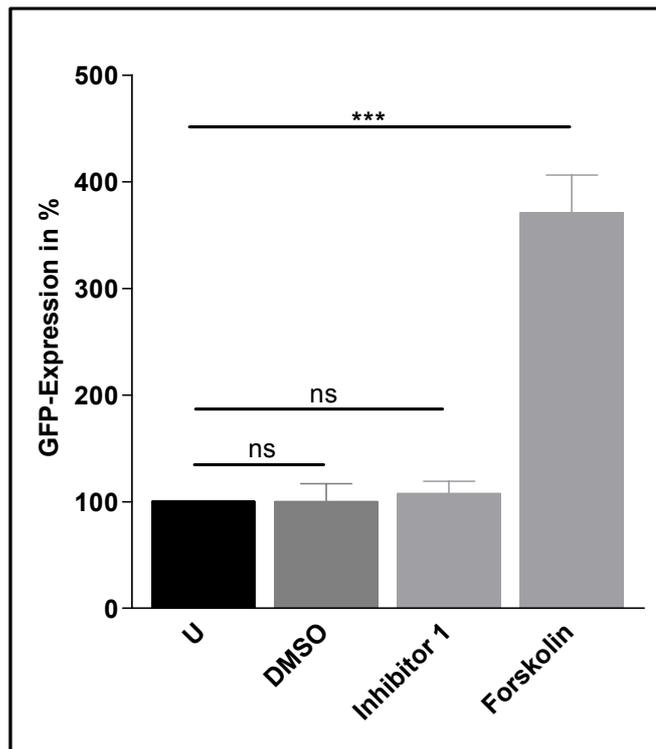


Abb. 35 Einfluß der vollständigen Hemmung von PEP auf die Adenylat-Cyclase-Kaskade .

Mit Hilfe der stabilen transgenen Zelllinie U-343-CRE1 wurde die Adenylat-Cyclase-Kaskade abhängige EGFP-Expression in Abhängigkeit von der PEP-Aktivität untersucht. Dazu wurden 50000 Zellen/Kavität in 96er-Mikrotiterplatten eingesät und für 24 Stunden in serumhaltigem (10 % FBS) DMEM-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 5 μ M PEP- Fmoc-AlaPyrr-CN (Inhibitor 1). Zusätzlich wurden Zellen mit 10 μ M Forskolin (F) bzw. mit 0,05 % (v/v) DMSO (D) behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in PBS überführt und bei 485/530 nm die EGFP-Fluoreszenz ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Software-Programm „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software). ns: nicht signifikant

Weiterhin wurde untersucht, ob die vollständige Hemmung von PEP inhibitorisch bzw. supprimierend auf die Forskolin vermittelte Aktivierung der Adenylat-Cyclase-Kaskade wirkt. U-343-CRE1-Zellen wurden für 15 Minuten, 12 und 24 Stunden mit 5 μ M des spezifischen PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyrr-CN bzw. mit 0,05 % (v/v) DMSO kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 10 μ M Forskolin für weitere 24 Stunden. Als Positivkontrolle wurden Zellen ausschließlich mit 10 μ M Forskolin behandelt. Die mit DMSO bzw. mit Inhibitor vorinkubierten Zellen zeigen einen geringeren Anstieg der Fluoreszenz als die ausschließlich mit Forskolin behandelten Zellen (Abb. 36). Dagegen konnte kein Unterschied der EGFP-Fluoreszenzerhöhung zwischen DMSO- und Inhibitor-behandelten Zellen festgestellt werden.

Die ermittelten Daten zeigen, daß die vollständige Hemmung der PEP-Aktivität weder zu einem stimulatorischen, noch zu einem inhibitorischen Effekt der Adenylat-Cyclase-Kaskade vermittelten EGFP-Expression in der Zelllinie U-343-CRE1 führt .

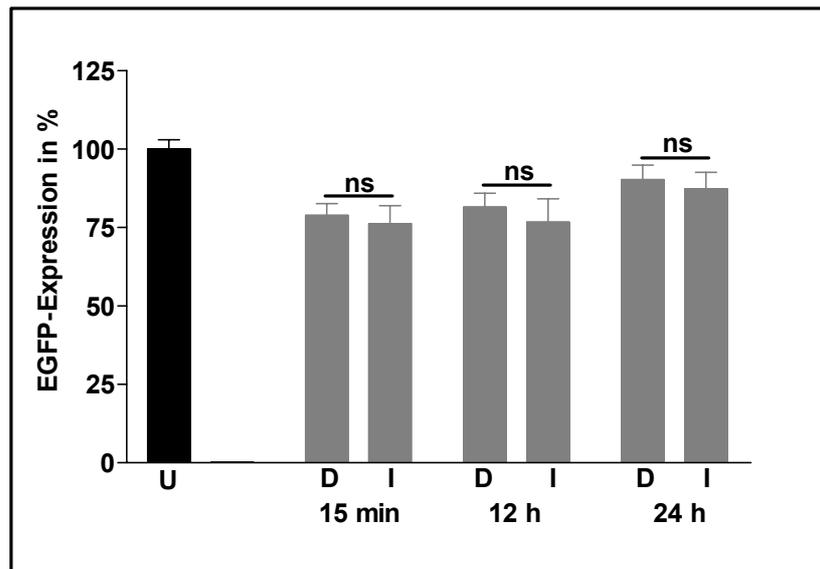


Abb.36 Einfluß der vollständigen Hemmung von PEP auf die Forskolin-vermittelte Proteinkinase A-Aktivierung.

Mit Hilfe der stabilen transgenen Zelllinie U-343-CRE1 wurde die Forskolin-vermittelte Erhöhung der EGFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der PEP-Aktivität untersucht. Dazu wurden 50000 Zellen/Kavität in 96er-Mikrotiterplatten eingesät und für 24 Stunden in serumhaltigem (10 % FBS) DMEM-Medium kultiviert. Anschließend wurden Zellen für 15 Minuten sowie für 12 und 24 Stunden mit 5 μ M Fmoc-AlaPyrr-CN (I) inkubiert. Nach den entsprechenden Vorinkubationszeiten erfolgte die Behandlung mit 10 μ M Forskolin. Als Positivkontrollen wurden Zellen mit 0,05 % (v/v) DMSO (D) vorinkubiert bzw. ausschließlich mit 10 μ M Forskolin (U) behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in PBS überführt und bei 485/530 nm die EGFP-Fluoreszenz ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Software-Programm „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software). ns: nicht signifikant

3.5.2 Einfluß von Prolylendopeptidase auf die Phosphoinositidkaskade

Mit Hilfe der Bestimmung von IP_3 in den humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 wurde der Einfluß von PEP auf die Phosphoinositidkaskade untersucht. Die Ermittlung der IP_3 -Konzentration erfolgte mit Hilfe des Rezeptor-Verdrängungstests TRK1000 (Fa. Amersham-Pharmacia). Zur Untersuchung der IP_3 -Konzentration in Abhängigkeit von PEP wurden der Fmoc-AlaPyrr-CN und die U343-anti-sense-Zelllinien (Kap. 3.1.5.1 und 3.1.2.1) eingesetzt. Zusätzlich wurde der Einfluß von PEP auf die Substanz P-vermittelte Aktivierung der Phosphoinositidkaskade untersucht.

3.5.2.1 Abhängigkeit der IP_3 -Konzentration von der Prolylendopeptidase-Aktivität

Zur Ermittlung der Ausgangskonzentration an IP_3 wurden die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 in serumhaltigem DMEM-Medium bis zur Ausbildung eines vollständigen Zellrasens kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden in Optimem I-Medium

kultiviert. Die Zellextraktion und die Bestimmung der IP₃-Konzentration erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Fa. Amersham-Pharmacia, TRK1000). Die Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 verfügen über verschieden hohe Konzentrationen an IP₃. In der Zelllinie LN-405 konnte mit $3,49 \pm 0,8$ pmol IP₃/1x 10⁶ Zellen die höchste Konzentration gemessen werden. Dagegen ist die ermittelte Menge an IP₃ in den Zelllinien U-343 ($0,32 \pm 0,03$ pmol IP₃/1x 10⁶ Zellen) und SH-SY5Y ($0,27 \pm 0,02$ pmol IP₃/1x 10⁶ Zellen) um das 11-13fache geringer (Abb. 37).

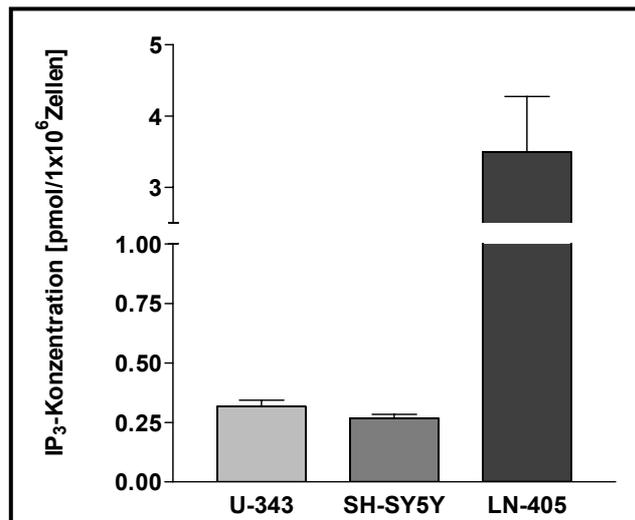


Abb. 37 IP₃-Konzentration in verschiedenen humanen Zelllinien.

Zur Bestimmung der IP₃-Ausgangskonzentration in den Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 erfolgte die Kultivierung der Zellen in serumhaltigem (10 % FBS) DMEM-Medium bis zur vollständigen Konfluenz. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden in Optimem I-Medium (Fa. Life Technologies) kultiviert. Der Zellaufschluß und die Bestimmung der IP₃-Konzentration wurden analog den Anweisungen des Herstellers (Fa. AmershamPharmacia, TRK1000) durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software).

Für die Messung der IP₃-Konzentration bei gleichzeitig vollständiger Hemmung von PEP erfolgte die Kultivierung der humanen Zelllinien in Gegenwart von 5 µM Fmoc-AlaPyr-CN für 3, 6, 12 und 24 Stunden in Optimem I-Medium. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die IP₃-Konzentration bestimmt. Zur Kontrolle der vollständigen Hemmung von PEP über den gesamten Versuchszeitraum wurde parallel zu jeder IP₃-Konzentrationsbestimmung die Restaktivität von PEP ermittelt.

In allen 3 Zelllinien führt die Inkubation mit Fmoc-AlaPyr-CN zu einer Erhöhung der IP₃-Konzentration gegenüber dem Ausgangsniveau (Abb. 38).

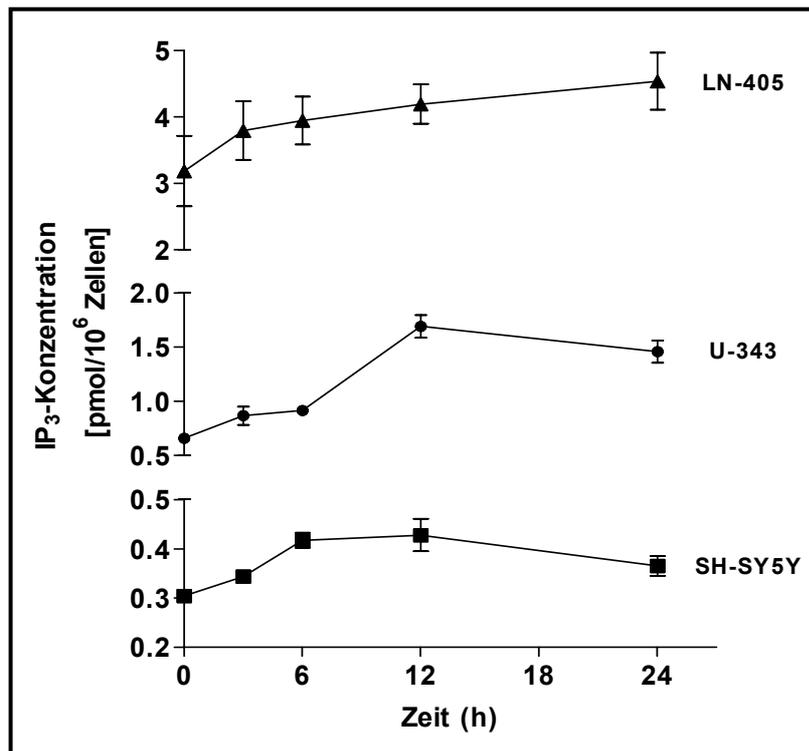


Abb. 38 Zeitlicher Verlauf der IP₃-Akkumulation in verschiedenen humanen Zelllinien.

Zur Untersuchung des Einflusses von PEP auf die IP₃-Konzentration erfolgte die Kultivierung der Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 für 24 Stunden in Optimem I-Medium. Dabei wurden die Zellen für 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden mit 5 μ M Fmoc-AlaPyrr-CN inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß und die Bestimmung der IP₃-Konzentration entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Fa. AmershamPharmacia, TRK1000). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) durchgeführt.

Die Akkumulation an IP₃ korreliert mit zunehmender Dauer der vollständigen PEP-Hemmung. Der zeitliche Verlauf und die maximale Erhöhung der IP₃-Akkumulation unterscheiden sich innerhalb der 3 untersuchten Zelllinien. Die vollständige Hemmung von PEP in der Zelllinie U-343 führt innerhalb der ersten 6 Stunden lediglich zu einer moderaten IP₃-Akkumulation, gefolgt von einer starken Konzentrationserhöhung mit einem Maximum bei 12 Stunden von $1,69 \pm 0,2$ pmol IP₃/1x10⁶ Zellen. Nach 24 Stunden konnte ein leichter Abfall der IP₃-Konzentration festgestellt werden. Eine ähnliche IP₃-Akkumulation wurde in der Zelllinie SH-SY5Y beobachtet. Jedoch erfolgt gegenüber der Zelllinie U-343 zwischen 6 und 12 Stunden eine geringere IP₃-Akkumulation, welche nach 12 Stunden zu einer maximalen IP₃-Konzentration von $0,4 \pm 0,04$ pmol IP₃/1x10⁶ Zellen führt. Demgegenüber steigt die IP₃-Konzentration in der Zelllinie LN-405 über die gesamte Versuchsdauer von 24 Stunden kontinuierlich auf $4,53 \pm 0,8$ pmol IP₃/1x10⁶ Zellen an.

Obwohl in allen 3 untersuchten Zelllinien durch die vollständige Hemmung von PEP eine zeitabhängige Akkumulation von IP₃ nachgewiesen werden konnte, unterscheiden sich die maximalen Konzentrationserhöhungen von einander. Die vollständige Hemmung von PEP

führt in der Zelllinie U-343 zur stärksten IP₃-Akkumulation (Abb. 39). Die IP₃-Konzentration ist gegenüber dem Ausgangsniveau um das 3,2fache erhöht. In den Zelllinien SH-SY5Y und LN-405 wurde nur eine Erhöhung der IP₃-Konzentration um das 1,4- bzw. das 1,6fache gemessen. Die ermittelten maximalen IP₃-Erhöhungen korrelieren nicht mit den ermittelten endogenen Aktivitäten von PEP.

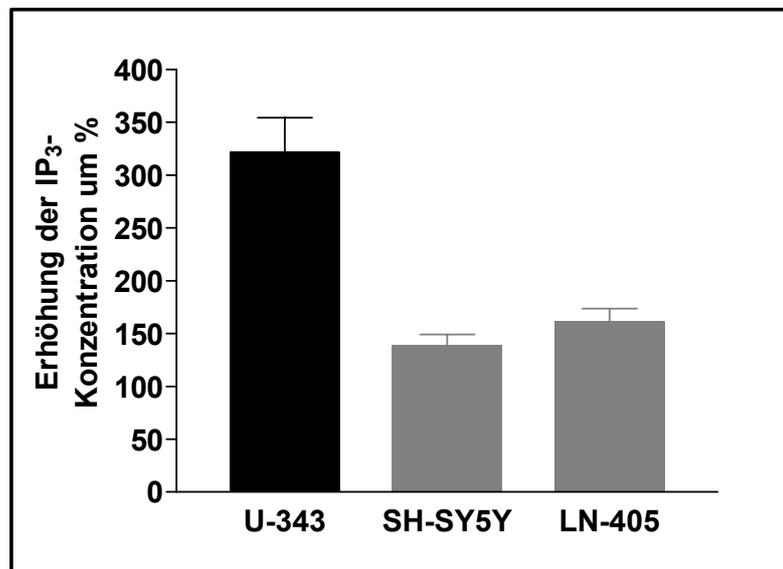


Abb. 39 Maximale IP₃-Konzentrationserhöhungen in verschiedenen humanen Zelllinien durch die vollständige Hemmung von Prolylendopeptidase.

Die durch die vollständige Hemmung von PEP ermittelten maximalen Erhöhungen der IP₃-Konzentration in den humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 wurden prozentual ins Verhältnis zu den jeweiligen Ausgangsniveaus gesetzt.

3.5.2.2 Abhängigkeit der IP₃-Konzentration von der Prolylendopeptidase-Expression

Die U-343 anti-sense-Zelllinien (Kap. 3.1.2.1) wurden zur Bestimmung der Konzentration an IP₃ für 24 Stunden in Optimem I-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß und die Bestimmung der IP₃-Konzentration. In allen untersuchten anti-sense-Zelllinien konnte eine Erhöhung der IP₃-Konzentration gegenüber der Wildtyp-Zelllinie U-343 nachgewiesen werden (Abb. 40). Dabei korreliert das Ausmaß der IP₃-Erhöhung mit den ermittelten PEP-Restaktivitäten in den einzelnen anti-sense-Zelllinien. In der Zelllinie U343-as11 mit $0,95 \pm 0,03$ pmol IP₃/1x10⁶ Zellen und einer PEP-Restaktivität von 30 % konnte gegenüber der mit Fmoc-AlaPyr-CN inkubierten Wildtyp-Zelllinie U-343 eine vergleichbare Erhöhung der IP₃-Konzentration um das 3,3fache nachgewiesen werden. Dagegen zeigt die anti-sense-Zelllinie U-343-as110 mit einer PEP-Restaktivität von 80 % und $0,36 \pm 0,02$ pmol IP₃/1x10⁶ Zellen lediglich eine 1,25fach erhöhte IP₃-Konzentration. In der Zelllinie U343-pIRES, welche ausschließlich über den Expressionsvektor pIRES ohne anti-sense-Fragment verfügt, konnte keine signifikante Erhöhung der IP₃-Konzentration nachgewiesen werden.

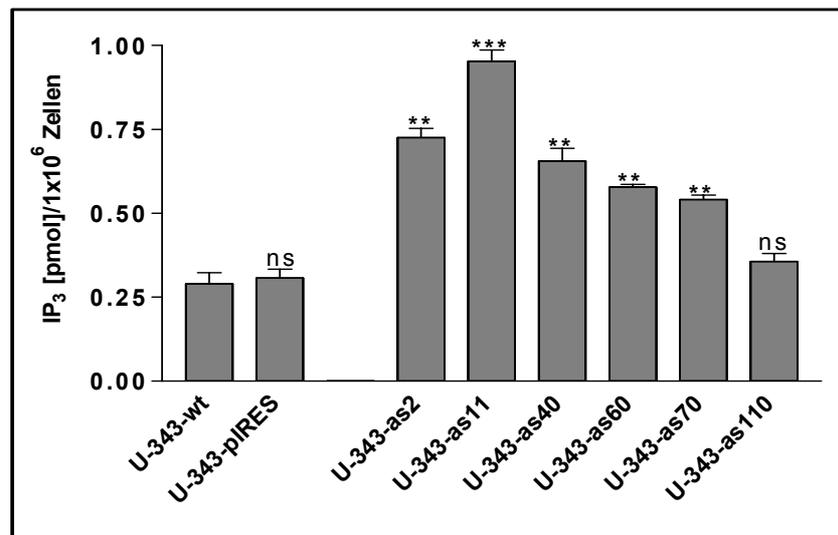


Abb. 40 IP₃-Konzentrationen in verschiedenen U-343-anti-sense-Zelllinien.

Zur Ermittlung der IP₃-Konzentration in U-343-anti-sense-Zelllinien erfolgte die Kultivierung der Zellen für 24 Stunden in Optimem I-Medium. Dabei wurde die Zelllinie U343-pIRES, welche ausschließlich über den Expressionsvektor pIRES ohne anti-sense-Fragment verfügt, als Kontrolle mitgeführt. Der Zellaufschluß und die Bestimmung der IP₃-Konzentration erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Fa. AmershamPharmacia, TRK1000). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) durchgeführt.

Mit Hilfe der anti-sense-Zelllinien konnte der Einfluß von PEP auf die IP₃-Konzentration bestätigt werden. Die Verringerung der endogenen PEP-Konzentration mittels anti-sense-mRNA auf 30 % als auch die vollständige Hemmung der Aktivität durch den PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyr-CN führen zu identischen IP₃-Erhöhungen. Außerdem belegen die Daten, daß die dadurch erhöhte IP₃-Konzentration permanent erhalten bleibt, und die Zellen dabei lebensfähig sind. Weiterhin belegen die Ergebnisse, daß zwischen der IP₃-Konzentration und der Restaktivität mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,887$ eine signifikante negative Korrelation besteht (Abb. 41)

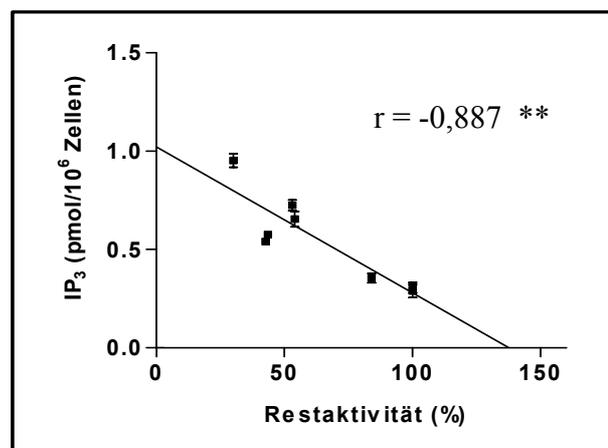


Abb. 41 Abhängigkeit der IP₃-Konzentration von der PEP-Restaktivität.

Zum Nachweis einer Beziehung zwischen den IP₃-Konzentrationen in den U-343 anti-sense-Zelllinien und den jeweiligen Restaktivitäten wurde mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) der Korrelationskoeffizient berechnet. **: $p = 0,0033$

3.5.2.3 Einfluß von Prolylendopeptidase auf die Neuropeptid-vermittelte IP₃-Synthese

Der molekulare Mechanismus für die beschriebenen Effekte von PEP-Inhibitoren auf neuronale Prozesse ist unbekannt und wird in der aktuellen Literatur lediglich spekulativ diskutiert. Auf Grund von *in vitro*-Untersuchungen zur Substratspezifität wird angenommen, daß PEP mitverantwortlich ist für die extrazelluläre Inaktivierung von Neuropeptiden. Daraus schlußfolgernd, würde es durch die Hemmung von PEP zu einer Beeinflussung des peptidergen Systemes kommen, was wiederum massive Auswirkungen auf die oben erwähnten neuronalen Prozesse hätte. Auf Grund des nachgewiesenen Einflusses von PEP auf die IP₃-Konzentration besteht allerdings die Möglichkeit, daß PEP durch intrazelluläre Interaktionen das peptiderge System beeinflusst. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde der Einfluß von PEP auf die Neuropeptid-vermittelte IP₃-Synthese ermittelt. Für die Untersuchungen wurde Substanz P (SP) ausgewählt. SP ist in der Lage, in Gliazellen und Neuronen durch die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Phosphoinositidkaskade zu aktivieren. In diesem Zusammenhang ist SP an der Regulation von neurodegenerativen Prozessen sowie an Lern- und Gedächtnisvorgängen beteiligt.

3.5.2.3.1 Charakterisierung der Substanz P-vermittelten IP₃-Synthese

Die Aktivierung der Phosphoinositidkaskade erfolgt durch Bindung von SP an Neurokininrezeptoren (NK-Rezeptoren). Eine besonders hohe Bindungsaffinität besteht zu dem Neurokininrezeptor NK-1. Mit Hilfe von RT-PCR und anschließender Sequenzierung der PCR-Syntheseprodukten konnte in der Zelllinie U-343 die Rezeptoren NK-1 und NK-3 nachgewiesen werden (Abb. 42). Für den Rezeptor NK-2 konnte kein spezifisches PCR-Produkt erhalten werden.

Da SP von PEP *in vitro* inaktiviert wird (Welches 1993; Wilk 1983), wurde mittels MALDI-TOF MS Analyse die Abbaustabilität von SP inkubiert mit 24 Stunden-konditioniertem U-343-Kulturüberstand untersucht. Nach Inkubation von 10 µM Substanz P für 30 Minuten bei 37°C mit U-343-Kulturüberstand konnten keine SP-Abbauprodukte detektiert werden. Durch die Zugabe von 5330 ng/ml rhPEP zum Kulturüberstand erfolgte die vollständige PEP-spezifische Spaltung der gesamten Menge an SP. Anschließend wurde der Einfluß der Konzentration sowie der Inkubationsdauer von SP auf die Erhöhung der IP₃-Konzentration in U-343-Zellen untersucht.

Die Inkubation von U-343-Zellen mit 1µM SP führt innerhalb von 7 Sekunden zu einer maximalen Erhöhung der IP₃-Konzentration auf $5,2 \pm 0,5$ pmol IP₃/1x10⁶Zellen. Das entspricht dem 9fachen der Ausgangskonzentration. Danach nimmt die IP₃-Konzentration langsam wieder ab und erreicht nach ca. 3 Minuten ihr Ausgangsniveau (Abb. 43).

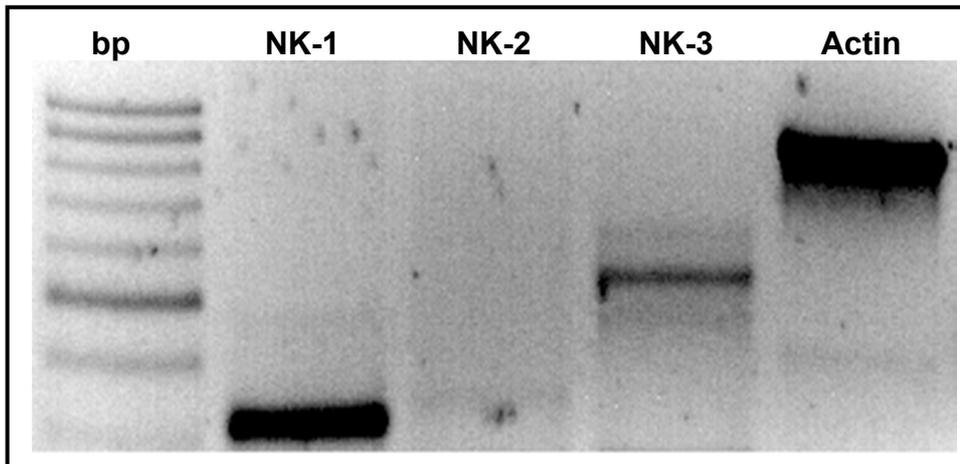


Abb. 42 Agarosegel-Elektrophorese von Neurokininrezeptor-PCR-Produkten.

Zum Nachweis der Neurokinin-Rezeptoren wurde mit Hilfe von TriZol-Reagenz (Fa. Life Technologies) Gesamt-RNA aus der humanen Zelllinie U-343 isoliert. Die Konvertierung der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des THERMOSCRIPT™ RT-PCR SYSTEMS (Fa. Life Technologies) unter Verwendung von Hexanukleotiden als „Random-Primer“ (Fa. Promega). Für die Amplifizierung ausgewählter DNA-Fragmente mit genspezifischen NK-Primern (Fa. Metabion) wurde das PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity System (Fa. Life Technologie) eingesetzt. Als Kontrolle wurde Actin mitgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 0,8%igem Agarosegel.

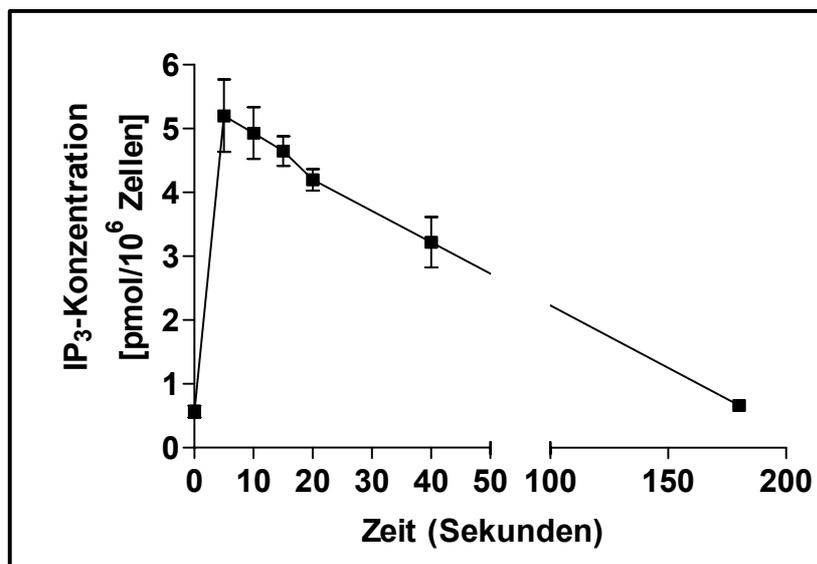


Abb. 43 Zeitlicher Verlauf der IP₃-Erhöhung durch Stimulation von U-343-Zellen mit SP.

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der SP-vermittelten IP₃-Erhöhung wurden U-343-Zellen für 24 Stunden in Optimem I-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 1 μ M SP für einen Zeitraum von 7 Sekunden bis 3 Minuten. Der Zellaufschluß und die Bestimmung der IP₃-Konzentration erfolgte analog den Anweisungen des Herstellers (Fa. AmershamPharmacia, TRK1000). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) durchgeführt.

Die Stimulation von U-343-Zellen für 7 Sekunden mit 0,05 sowie 0,1; 0,5 und 1 μM SP zeigt, daß die IP_3 -Synthese abhängig von der eingesetzten SP-Konzentration ist (Abb. 44). Bereits eine Konzentration von 50 nM SP führt zu einer signifikanten Erhöhung der IP_3 -Konzentration um das 4,5fache der Ausgangskonzentration.

Die Inkubation der humanen Zelllinien SH-SY5Y und LN-405 mit SP führt ebenfalls zu einer Stimulation der IP_3 -Synthese. Allerdings erhöht sich in den Zelllinien SH-SY5Y und LN-405 die IP_3 -Konzentrationen nach Stimulation mit 1 μM SP lediglich um das 1,5- bzw. um das 2fache (Daten nicht gezeigt).

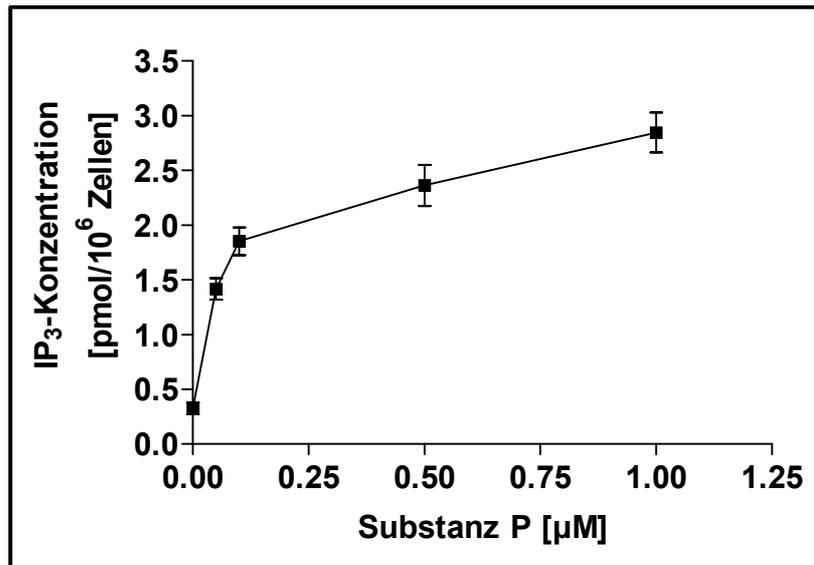


Abb. 44 Abhängigkeit der IP_3 -Synthese von verschiedenen SP-Konzentrationen.

Zur Untersuchung der SP-abhängigen Erhöhung der IP_3 -Konzentration wurden U-343-Zellen für 24 Stunden in Optimum I-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte für 7 Sekunden die Stimulation der Zellen mit SP-Konzentrationen zwischen 0,05 und 1 μM . Der Zellaufschluß und die Bestimmung der IP_3 -Konzentration erfolgten entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Fa. AmershamPharmacia, TRK1000). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) durchgeführt.

3.5.2.3.2 Prolylendopeptidase beeinflusst die Substanz P-vermittelte IP_3 -Synthese

Zur Untersuchung der SP-vermittelten Erhöhung von IP_3 in Abhängigkeit der Aktivität und Expression von PEP wurden U-343-Zellen für 12 Stunden mit Fmoc-AlaPyr-CN inkubiert und anschließend mit 1 μM SP 40 Sekunden stimuliert. Die gleiche Stimulation erfolgte mit der anti-sense-Zelllinie U-343-as2. Als Kontrolle wurde die Ausgangszelllinie U-343 mitgeführt. Der generelle Verlauf der Substanz P vermittelten IP_3 -Erhöhung ist bei allen 3 Zelllinien identisch (Abb. 45). Nach 7 Sekunden Inkubation mit SP wurde eine maximale Erhöhung an IP_3 gemessen, die innerhalb von 40 Sekunden wieder abfällt, ohne das Ausgangsniveau zu erreichen. Dagegen konnten signifikante Unterschiede in dem Ausmaß der maximalen IP_3 -Erhöhung ermittelt werden (Abb. 45). Gegenüber der Ausgangszelllinie U-343 mit $3,04 \pm 0,3$ pmol $\text{IP}_3/1 \times 10^6$ Zellen ist die absolute maximale IP_3 -Konzentration in der

Fmoc-AlaPyr-CN behandelten Zelllinie U-343 mit $4,47 \pm 0,2$ pmol $IP_3/1 \times 10^6$ Zellen um das 1,45fache erhöht. Die in der anti-sense-Zelllinie U-343-as2 nachgewiesene 1,35fache Erhöhung der absoluten maximalen IP_3 -Konzentration auf $4,1 \pm 0,1$ pmol $IP_3/1 \times 10^6$ Zellen bestätigt den Einfluß der PEP-Aktivität auf die SP-vermittelte IP_3 -Synthese. Vergleichbar mit der Korrelation zwischen PEP-Restaktivität und dem Ausmaß der IP_3 -Erhöhung (Kapiteln 3.5.2.1 und 3.5.2.2) besteht ebenfalls eine Korrelation zwischen der PEP-Restaktivität und dem Umfang der SP-vermittelten maximalen IP_3 -Erhöhung.

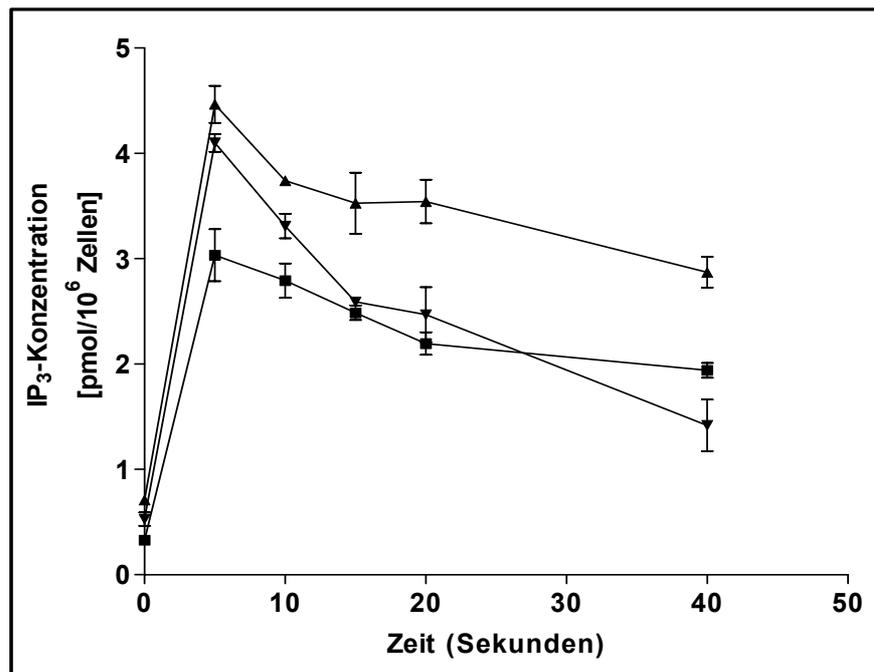


Abb. 45 Abhängigkeit der SP-vermittelten IP_3 -Synthese in Gegenwart vom PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyr-CN bzw. von PEP-anti-sense-mRNA.

Zur Untersuchung der SP-vermittelten Erhöhung der IP_3 -Konzentration in Abhängigkeit von PEP wurden U-343- (▼) und U-343-as2-Zellen (■) für 24 Stunden in Optimum I-Medium kultiviert. Ein Teil der U-343-Zellen wurde die letzten 12 Stunden mit $5 \mu M$ Fmoc-AlaPyr-CN behandelt (▲). Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit $1 \mu M$ SP für 40 Sekunden. Der Zellaufschluß und die Bestimmung der IP_3 -Konzentration erfolgte analog den Anweisungen des Herstellers (Fa. AmershamPharmacia, TRK1000). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.“ (Fa. GraphPad software) durchgeführt.

Obwohl die IP_3 -Ausgangskonzentrationen in der mit Fmoc-AlaPyr-CN behandelten Wildtyp-Zelllinie sowie in der anti-sense-Zelllinie gegenüber der Wildtyp-Zelllinie erhöht sind, unterscheiden sich die absoluten (Abb. 45) und die durch Normalisierung der Meßwerte erhaltenen relativen maximalen IP_3 -Erhöhung (Abb. 46). nicht signifikant voneinander. Damit haben die erhöhten IP_3 -Ausgangskonzentrationen keinen Einfluß auf die Interpretation zur Abhängigkeit der SP-vermittelten IP_3 -Stimulation von PEP.

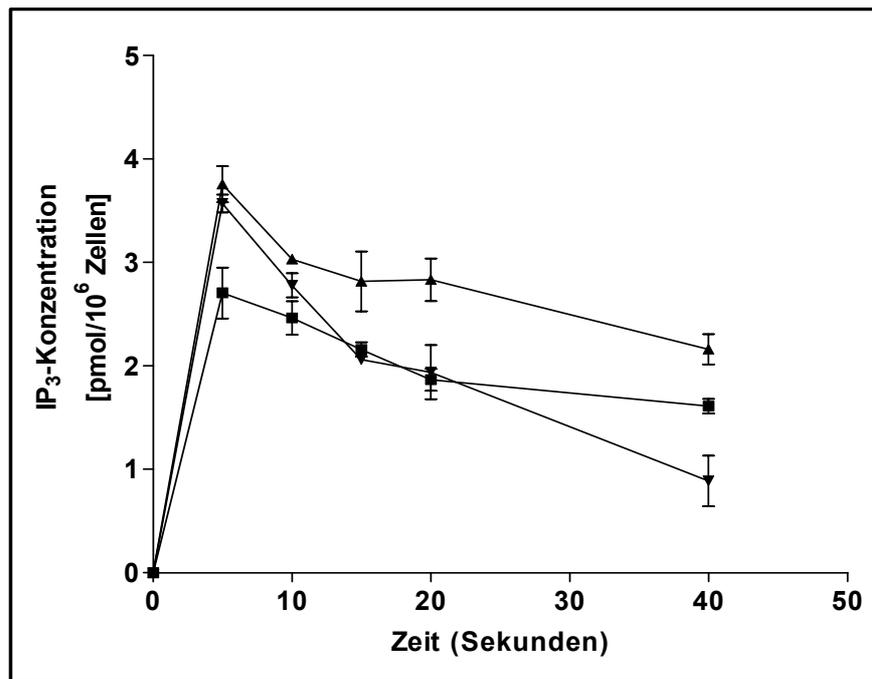


Abb. 46 Abhängigkeit der relativen SP-vermittelten IP₃-Synthese in Gegenwart vom PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyrr-CN bzw. von PEP-anti-sense-mRNA.

Für den Vergleich der relativen Erhöhung der IP₃-Konzentrationen durch Substanz P wurden die absoluten Meßwerte (Abb. 45) der Wildtypzelllinie U-343 (▼), der anti-sense-Zelllinie U-343-as2 (■) und der für 12 Stunden mit 5 µM Fmoc-AlaPyrr-CN behandelten Wildtypzelllinie (▲) normalisiert. Dazu wurde von jedem Meßwert die entsprechende IP₃-Ausgangskonzentration abgezogen.

3.5.3 Einfluß von Prolylendopeptidase auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung in humanen Zelllinien

Es konnte gezeigt werden, daß PEP die Ausgangskonzentration von IP₃ und die SP-vermittelte IP₃-Synthese beeinflusst (Kap. 3.5.2.1, 3.5.2.2 und 3.5.2.3.2). Untersuchungen zur Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumfreisetzung sollten zeigen, inwieweit die PEP-vermittelte Modifikation der IP₃-Ausgangskonzentration und der IP₃-Neusynthese die Signalweiterleitung innerhalb der Phosphoinositidkaskade beeinflussen. Für die Untersuchungen wurden die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 sowie die anti-sense-Zelllinien U-343-as11 und U-343-as60 eingesetzt. Die stimulierte intrazelluläre Kalziumfreisetzung wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung des kalziumabhängigen Farbstoffes Fura 2-AM (Fa. Molecular Probes) untersucht.

3.5.3.1 Charakterisierung der intrazellulären Kalziumfreisetzung durch Liganden-vermittelte Aktivierung der Phosphoinositidkaskade

Die Charakterisierung der Liganden-vermittelten IP₃-Synthese hat gezeigt, daß SP die Phosphoinositidkaskade in den Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 aktiviert (Kap. 3.5.2.3.1.). Durch die Bindung von IP₃ an Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren (InsP₃) erfolgt die intrazelluläre Freisetzung von Kalziumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Zur Untersuchung der SP-vermittelten intrazellulären Kalziumfreisetzung wurden die Zelllinien für 24 Stunden in Optimum I-Medium auf Deckgläsern kultiviert. Anschließend erfolgte in kalziumhaltigem Meßpuffer die Inkubation mit 2 µM Fura2-AM für 15 Minuten bei 37°C. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Ionomycin inkubiert, was zu einer maximalen Kalziumfreisetzung in den 3 untersuchten Zelllinien führte (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation mit 1 µM SP führt ausschließlich in der Zelllinie LN-405 zu einer intrazellulären Kalziumfreisetzung (Abb. 47A).

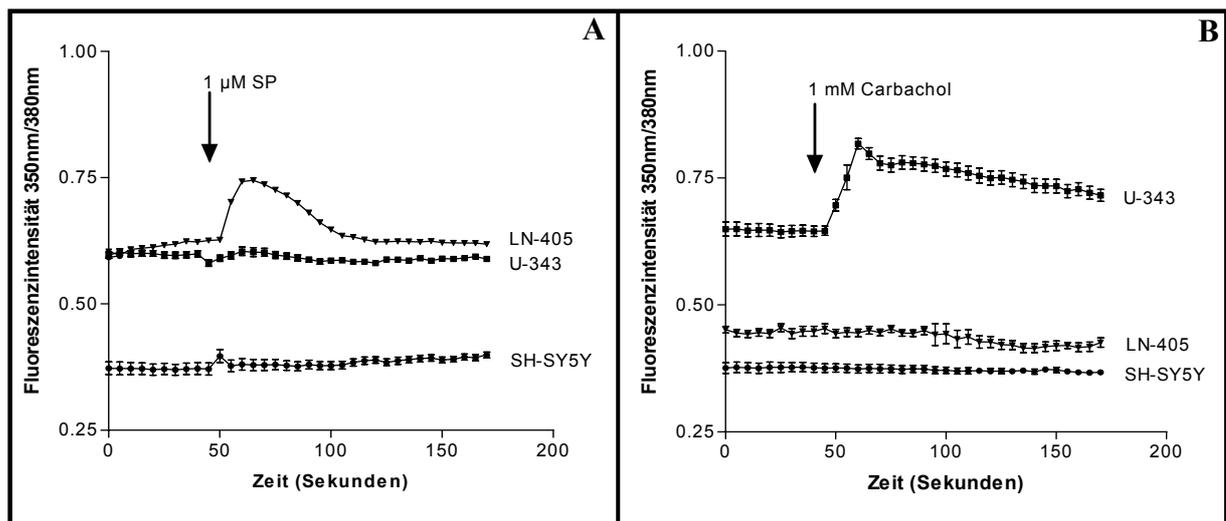


Abb. 47 Kalziumabhängige Fluoreszenz-Intensität in verschiedenen humanen Zelllinien in der Gegenwart von Carbachol und Substanz P.

Die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 wurden für 24 Stunden in Optimum I-Medium auf Deckgläsern kultiviert und anschließend mit 2 µM Fura2-AM und 0,1 % Pluronic in kalziumhaltigem Meßpuffer für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Stimulierung der Zellen erfolgte mit 1 µM SP (A) bzw. mit 1 mM Carbachol (B). Die Fluoreszenz-Intensitäten wurden alle 5 Sekunden bei 350 und 380 nm gemessen. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte mit Hilfe der CCD-Kamera C4880-80 (Fa. Hamamatsu) unter Nutzung des Fluoreszenz-Mikroskopes Axiovert 100TV (Fa. Zeiss) sowie des Software-Programmes Openlab2.2.5 (Fa. Improvision).

Auf Grund dieser Tatsache wurden weitere Substanzen getestet, von denen bekannt ist, daß sie die Phosphoinositidkaskade via Bindung an G_p-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren (Abb. 48). Von den untersuchten Substanzen stimuliert lediglich Carbachol in der Zelllinie U-343 die intrazelluläre Kalziumfreisetzung (Abb. 47B). Vergleichbar mit der SP-Stimulation in

U-343-Zellen, reagieren nur 2 % der untersuchten LN-405-Zellen mit einem Kalziumsignal nach SP-Stimulation. In der Zelllinie SH-SY5Y konnte mit keiner der untersuchten Substanzen die intrazelluläre Kalziumfreisetzung stimuliert werden (Abb. 47A und 48).

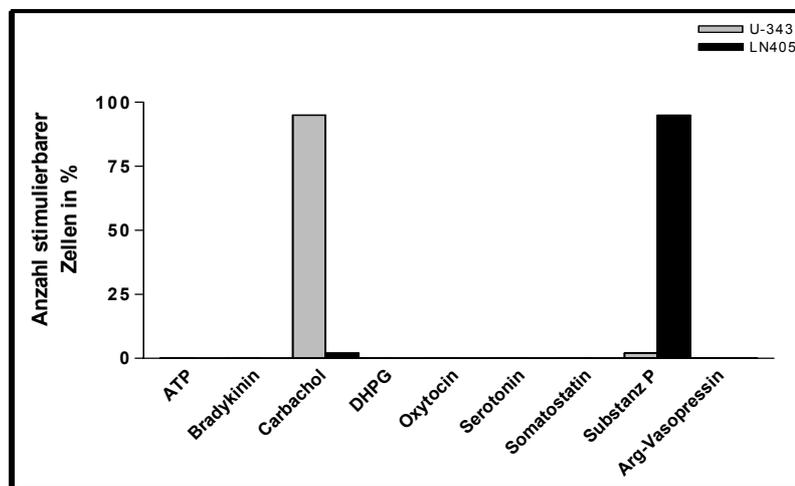


Abb. 48 Anzahl an stimulierten Zellen verschiedener humaner Zelllinien in Abhängigkeit von verschiedenen bioaktiven Substanzen.

Eine Anzahl von Substanzen wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, via Aktivierung der Phosphoinositidkaskade eine Freisetzung intrazellulärer Kalziumionen aus dem ER zu stimulieren. Die humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 wurden für 24 Stunden in Optimem I-Medium auf Deckgläsern kultiviert und anschließend mit 2 μ M Fura2-AM und 0,1 % Pluronic in kalziumhaltigem Meßpuffer für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten sowie die Dokumentation und Auswertung erfolgte analog dem Standardprotokoll (siehe Abb. 47).

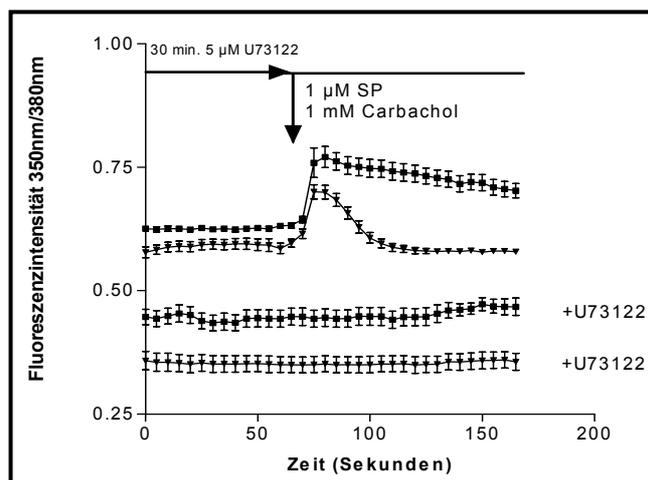


Abb. 49 Kalziumabhängige Fluoreszenz-Intensität in verschiedenen humanen Zelllinien in der Gegenwart des Phospholipase C-Inhibitors U73122.

Mit Hilfe des PLC-Inhibitors U73122 wurde die Carbachol- bzw. SP-vermittelte intrazelluläre Kalziumfreisetzung unterdrückt. Die humanen Zelllinien U-343 (■) und LN-405 (▼) wurden für 24 Stunden in Optimem I-Medium auf Deckgläsern kultiviert und anschließend für 30 Minuten mit 4 μ M U73122 sowie für 15 Minuten mit 2 μ M Fura2-AM und 0,1 % Pluronic in kalziumhaltigem Meßpuffer inkubiert. Die Stimulierung der Zellen erfolgte mit 1 μ M SP bzw. mit 1 mM Carbachol. Die Messung der Fluoreszenz-Intensitäten sowie die Dokumentation und Auswertung erfolgte analog dem Standardprotokoll (siehe Abb. 47).

Mit Hilfe des spezifischen PLC-Inhibitors U73122 (Fa. Calbiochem) konnte gezeigt werden, daß die nachgewiesene intrazelluläre Kalziumfreisetzung in den Zelllinien U-343 und LN-405 von der Aktivierung der Phosphoinositidkaskade abhängig ist (Abb. 49). Auf Grund dieser Ergebnisse sind die charakterisierten Modellsysteme U-343/Carbachol und LN-405/SP geeignet, den Einfluß von PEP auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung zu untersuchen.

3.5.3.2 Einfluß von Prolylendopeptidase auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung

Mit Hilfe des Inhibitors Fmoc-AlaPyr-CN und der U-343-anti-sense-Zelllinien U-343-as11 und U-343-as60 (Kap. 3.1.2.1) wurde der Einfluß von PEP auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung untersucht. Zur Aufklärung eines möglichen stimulatorischen Effektes von PEP wurden für 24 Stunden die humanen Zelllinien U-343 und LN-405 auf Deckgläsern in Optimem I-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 5 μM Fmoc-AlaPyr-CN. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten bei 350/380 nm über einen Zeitraum von 30 Minuten zeigt, daß die vollständige Hemmung von PEP nicht zur intrazellulären Kalziumfreisetzung führt (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchung eines möglichen suppressiven bzw. inhibitorischen Effektes von PEP wurden die humanen Zelllinien U-343 und LN-405 für 12 Stunden mit 5 μM Fmoc-AlaPyr-CN inkubiert und anschließend mit 1 mM Carbachol bzw. mit 1 μM SP stimuliert. Als Kontrolle wurden 0,05 % DMSO-behandelte Zellen mitgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, daß die vollständige Hemmung von PEP keinen Einfluß auf die Carbachol- bzw. SP-vermittelte intrazelluläre Kalziumfreisetzung hat (Abb. 50A und B).

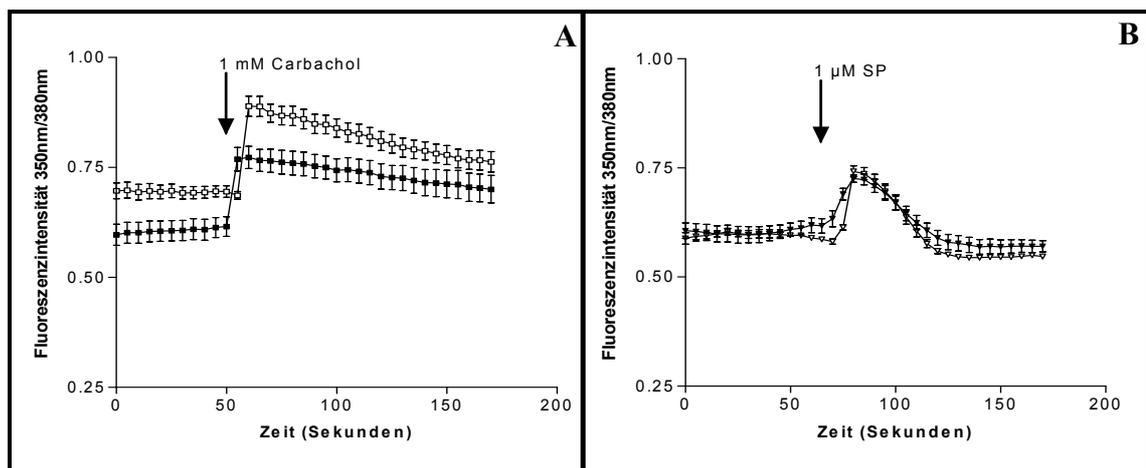


Abb. 50 Kalziumabhängige Fluoreszenz-Intensität in verschiedenen mit PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyr-CN inkubierten humanen Zelllinien in der Gegenwart von Carbachol und SP.

In den humanen Zelllinien U-343 und LN-405 erfolgte mit Hilfe des Inhibitors Fmoc-AlaPyr-CN (5 μM) für 12 Stunden die vollständige Hemmung von PEP (■, ▼). Als Kontrolle wurden mit 0,05 % DMSO-behandelte Zellen mitgeführt (□, =). Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 15 Minuten mit 2 μM Fura2-AM und 0,1 % Pluronic in kalziumhaltigem Meßpuffer. Die Stimulierung der Zellen erfolgte mit 1 μM SP bzw. mit 1 mM Carbachol. Die Messung der Fluoreszenz-Intensitäten sowie die Dokumentation und Auswertung erfolgte analog dem Standardprotokoll (siehe Abb. 47).

Weiterhin erfolgte die Stimulation der anti-sense-Zelllinien U-343-as11 und U-343-as60 mit 1 mM Carbachol bzw. mit 1 μ M SP. Die Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten bei 350/380 nm bestätigen die mit dem Fmoc-AlaPyr-CN erhaltenen Ergebnisse. Die Reduzierung der endogenen PEP-Expression um 44 bzw. 30 % hat keinen Einfluß auf die Carbachol- bzw. SP-vermittelte Stimulation der intrazellulären Kalziumfreisetzung (Abb. 51). Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse muß davon ausgegangen werden, daß die erhöhte IP₃-Synthese weder einen stimulatorischen noch einen inhibitorischen Einfluß auf die nachfolgende intrazelluläre Kalziumfreisetzung besitzt.

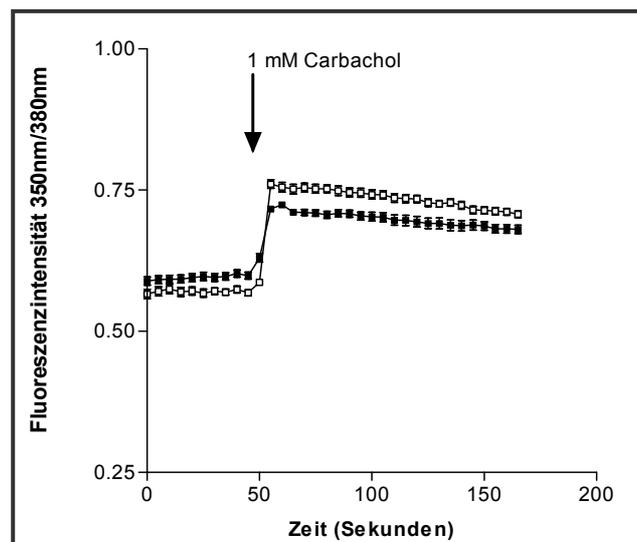


Abb. 51 Kalziumabhängige Fluoreszenz-Intensität in verschiedenen U-343-anti-sense-Zelllinien in der Gegenwart von Carbachol.

Zur Untersuchung des Einflusses der PEP-Expression auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung wurden die humanen anti-sense-Zelllinien U-343-as11 (□) und U-343-as60 (■) für 24 Stunden in Optimem I-Medium auf Deckgläsern kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 15 Minuten mit 2 μ M Fura2-AM und 0,1 % Pluronic in kalziumhaltigem Meßpuffer. Die Stimulierung der Zellen erfolgte mit 1 mM Carbachol. Die Messung der Fluoreszenz-Intensitäten sowie die Dokumentation und Auswertung erfolgte analog dem Standardprotokoll (siehe Abb. 47).

3.5.4 Einfluß von Prolylendopeptidase auf die Expression des Transkriptionsfaktors *c-fos*

Parallel zu den Messungen der intrazellulären Kalziumfreisetzung (Kap. 3.5.3.) wurde untersucht, ob die PEP-vermittelte Störung der IP₃-Synthese zu stimulatorischen bzw. zu inhibitorischen Effekten auf die Expression des Transkriptionsregulators *c-fos* führt. Die Expression von *c-fos* wird durch eine Anzahl von Faktoren kontrolliert, wie z.B. die intrazelluläre Freisetzung von Kalziumionen bzw. die Synthese von cAMP, die zur Calmodulin- bzw. zur PKA-abhängigen Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *CREB* führen.

3.5.4.1 Charakterisierung der *c-fos*-Expression in Abhängigkeit von Carbachol, Substanz P und PMA

Zur Charakterisierung der Phosphoinositidkaskade bzw. PKC abhängigen Stimulation von *c-fos* wurden die humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y für 24 Stunden in Optimum I-Medium kultiviert und anschließend für 0,5 sowie 1 und 2 Stunden mit 1 μ M SP und 1 mM Carbachol sowie mit 0,1 μ M PMA inkubiert. Westernblot-Analysen der isolierten Zellkernfraktionen zeigen, daß weder die Inkubation mit Carbachol, noch die mit SP zur Stimulation der *c-fos*-Expression führt (Daten nicht gezeigt). Für die Zelllinie SH-SY5Y stimmt dieses Ergebnis vollständig mit den durchgeführten Untersuchungen zur intrazellulären Kalziumfreisetzung überein. Dort konnte weder mit Carbachol, noch mit SP ein Kalziumsignal stimuliert werden. Das gleiche gilt für die Zelllinie U-343 hinsichtlich der Stimulation mit SP, nicht aber in Bezug auf Carbachol. Die Stimulation mit Carbachol führt in U-343-Zellen zur intrazellulären Freisetzung von Kalziumionen. Auf Grund dieser Ergebnisse ist weder Carbachol noch SP geeignet, einen möglichen inhibitorischen Effekt von PEP auf die Stimulation der *c-fos*-Expression zu untersuchen. Dagegen kann in beiden Zelllinien mit Hilfe von PMA die Expression von *c-fos* stimuliert werden. Bereits nach 30 Minuten Inkubation erfolgt eine deutlich sichtbare Erhöhung der Proteinkonzentration von *c-fos* (Abb. 52).

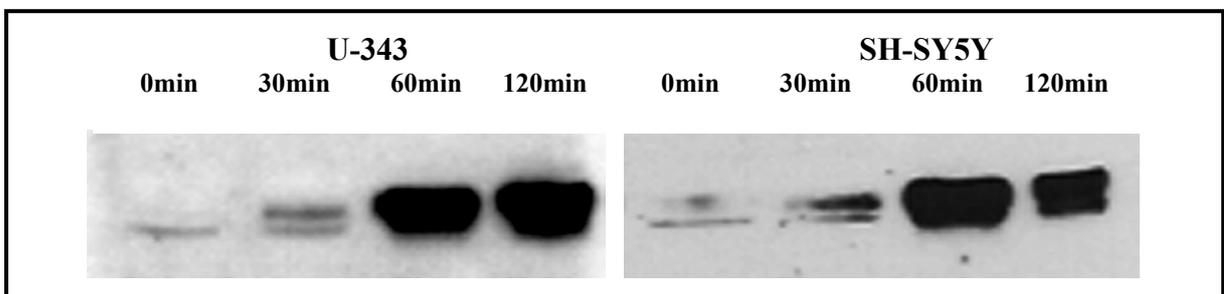


Abb. 52 Westernblot-Analyse der *c-fos*-Expression in Abhängigkeit von PMA.

Zur Stimulation der *c-fos*-Expression wurden die humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y für 24 Stunden in Optimum I-Medium kultiviert und anschließend für 0,5 sowie 1 und 2 Stunden mit 0,1 μ M PMA inkubiert. Von den isolierten Kernfraktionen wurden je 7,5 μ g Proteinextrakt in einem 12 %igen SDS-Acrylamidgel getrennt. Die immobilisierten Proteinextrakte wurden ÜN mit polyklonalem *c-fos*-Antikörper (1:50, Fa. Oncogene) bei 8°C inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

3.5.4.2 Abhängigkeit der *c-fos*-Expression von Prolylendopeptidase-Aktivität

Mit Hilfe des Inhibitors Fmoc-AlaPyr-CN wurde untersucht, ob die vollständige Hemmung von PEP einen Einfluß auf die Expression von *c-fos* hat. Die humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y wurden generell für 24 Stunden in Optimum I-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte für die Untersuchung eines möglichen stimulatorischen Effektes die Inkubation der

Zellen für 0,5 sowie 1 und 2 Stunden mit 5 μM Fmoc-AlaPyr-CN. Die Analyse der isolierten Zellkernextrakte mittels Westernblot-Analyse zeigt, daß die vollständige Hemmung von PEP zu keiner Stimulation der *c-fos*-Expression führt (Abb. 53A). Für die Ermittlung eines möglichen inhibitorischen Effektes auf die PMA-vermittelte Stimulation der *c-fos*-Expression erfolgte die Präinkubation der Zellen für 12 und 24 Stunden bzw. für 5 Minuten mit 5 μM Fmoc-AlaPyr-CN. Anschließend wurden die Zellen für 0,5 sowie 1 und 2 Stunden mit 0,1 μM PMA stimuliert. Es konnte nachgewiesen werden, daß die vollständige Hemmung von PEP und der damit verbundenen Akkumulation von IP_3 keinen Einfluß auf die PMA-vermittelte Stimulation der *c-fos*-Expression hat (Abb. 53B). Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren mit den Untersuchungen zur intrazellulären Kalziumfreisetzung. In beiden Fällen können keine stimulatorischen und inhibitorischen Einflüsse auf die untersuchten physiologischen Prozesse nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Tatsachen muß davon ausgegangen werden, daß es durch die nachgewiesene PEP-abhängige IP_3 -Akkumulation zu keiner Beeinflussung der Signalweiterleitung kommt.

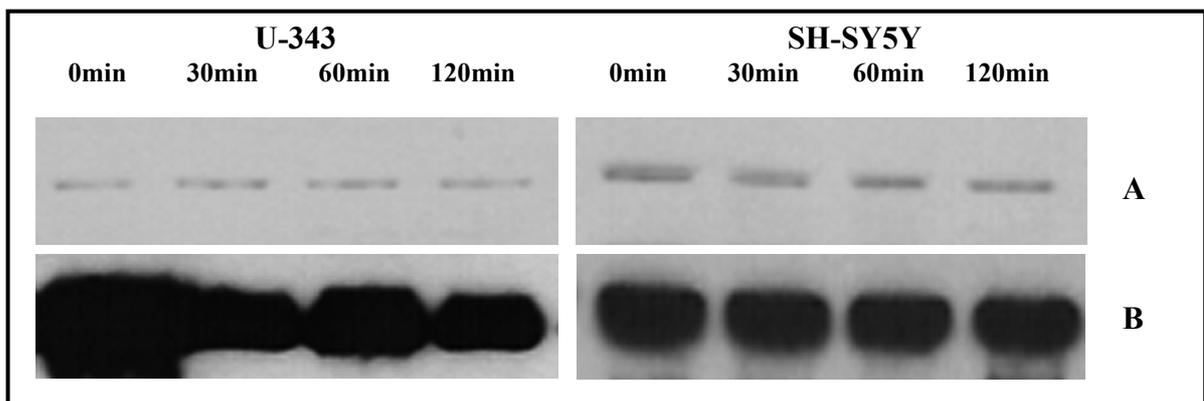


Abb. 53 Westernblot-Analyse der *c-fos*-Expression in Abhängigkeit der PEP-Aktivität.

Zur Untersuchung eines stimulatorischen Effektes von PEP auf die *c-fos*-Expression wurden die humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y für 0 bis 120 Minuten mit 5 μM Fmoc-AlaPyr-CN inkubiert (A). Zur Untersuchung eines inhibitorischen Effektes von PEP erfolgte vor der Stimulation mit 0,1 μM PMA die vollständige Hemmung der Aktivität für 5 Minuten, sowie für 12 und 24 Stunden mit 5 μM Fmoc-AlaPyr-CN (B). Von den isolierten Kernfraktionen wurden je 7,5 μg Proteinextrakt in einem 12 %igen SDS-Acrylamidgel getrennt. Die immobilisierten Proteinextrakte wurden ÜN mit polyklonalem *c-fos*-Antikörper (1:50, Fa. Oncogene) bei 8°C inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) analog den Anweisungen des Herstellers.

4 Diskussion

Für die Lebensfähigkeit und die Reproduktion von Organismen ist die Steuerung einer Vielzahl von physiologischen Prozessen notwendig. Wesentliche Bestandteile solcher physiologischen Prozesse sind Signalketten und Signalmoleküle. Sie bilden die molekulare Grundlage zur Aufnahme, Weiterleitung, Verarbeitung, Speicherung und für das Abrufen von Informationen. Besonders in höheren Lebewesen stellen diese Abläufe komplexe physiologische Prozesse dar. Störungen dieser Prozesse, wie im Fall von depressiven und neurodegenerativen Erkrankungen, führen durch morphologische und biochemische Veränderungen im ZNS zu drastischen Einschränkungen von Gehirnfunktionen und somit der Lebensfähigkeit. In der aktuellen Literatur wird für die post-Prolin-spaltende Serinprotease Prolylendopeptidase (PEP, EC 3.4.21.26), eine Beteiligung an neurodegenerativen Prozessen sowie an Lern- und Gedächtnisvorgängen diskutiert. Mit Hilfe von spezifischen PEP-Inhibitoren konnten in Ratten positive Effekte auf altersbedingte bzw. Ibotonat-induzierte Gedächtnisdefizite (Marighetto et al. 2000; Shinoda et al. 1997) sowie auf die Scopolamin-induzierte Amnesie gezeigt werden (Yoshimoto et al. 1987). Weiterhin besitzen PEP-Inhibitoren neuroprotektive und neurotrophische Eigenschaften hinsichtlich neurodegenerativer Prozesse wie Ischämie (Shishido et al. 1999), der Alzheimerschen Erkrankung (Katsube et al. 1996) und altersbedingter Apoptose (Katsube et al. 1999). Unabhängig von PEP-Inhibitoren werden abnormale PEP-Aktivitäten mit der Alzheimerschen Krankheit (Yoshida, Nakajima, et. al. 1996), Chorea Huntington (Pittaway et al. 1984) und depressiven Erkrankungen (Maes et al. 1994; Maes et al. 1995) korreliert. Dabei wird die Hydrolyse von Neuropeptiden in der aktuellen Literatur als molekulare Grundlage für den Einfluß von PEP auf die genannten physiologischen Prozesse diskutiert. Neuropeptide spielen durch die Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Signalkaskaden eine wesentliche Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (De Wied 1997; Feany 1996; Kovacs und De Wied 1994). Für PEP ist gezeigt worden, daß sie *in vitro* Neuropeptide wie Substanz P, Arginin-Vasopressin und TRH durch limitierte Proteolyse inaktiviert (Wilk 1983; Mentlein et al. 1990). Die *in vitro* nachgewiesene post-Prolin-spaltende Hydrolyse und die *in vivo* beobachteten Effekte von PEP-Inhibitoren führten zu der Annahme, daß PEP *in vivo* für die Inaktivierung von Neuropeptiden verantwortlich ist. Dafür müßte PEP extrazellulär lokalisiert sein. Auf Grund der primären Aminosäuresequenz muß aber davon ausgegangen werden, daß PEP ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist. Dies voraussetzend, kann PEP nicht an der Inaktivierung von Neuropeptiden beteiligt sein. Daher sollten zum einen die nachgewiesenen Effekte von PEP-Inhibitoren auf intrazellulären Interaktionen basieren, wie zum Beispiel die Beeinflussung von Mitgliedern verschiedener Signalkaskaden. Und zum anderen sollten neben PEP weitere post-Prolin-spaltende Proteasen existieren, die extrazellulär lokalisiert, für die Modifizierung der Bioaktivität von Neuropeptiden

verantwortlich sind. Ausgehend von diesen Vermutungen ergaben sich folgende Aufgabenstellungen:

1. Klärung der exakten subzellulären Lokalisation von PEP in humanen Zelllinien.
2. Charakterisierung von post-Prolin-spaltenden Aktivitäten in extrazellulären Flüssigkeiten.
3. Untersuchungen zum Einfluß von PEP auf die Morphologie und Vitalität humaner Zelllinien.
4. Untersuchungen zum Einfluß von PEP auf verschiedene Signalkaskaden.

4.1 Lokalisation von Prolylendopetidase

Die Lokalisation ist für die physiologische Funktion eines Proteines von entscheidender Bedeutung. Daher wurde die regionale und subzelluläre Verteilung von PEP in humanen Zelllinien und in Gewebeproben von ausgesuchten Gehirnregionen der Wanderratte, *Rattus norvegicus* untersucht. Der Nachweis von PEP in insgesamt 23 humanen Zelllinien und in allen 6 untersuchten Gehirnproben zeigt, daß PEP ubiquitär verteilt ist (Abb. 20, Tab. 9 und 10). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Untersuchungen, wo PEP in Muskel-, Nieren-, Hoden-, Lungen- und Gehirngewebsproben von Säugern nachgewiesen werden konnte (Goossens et al. 1996; Irazusta et al. 2002). Dies läßt vermuten, daß PEP an grundlegenden physiologischen Prozessen in den Zellen beteiligt ist. Besonders hohe Konzentrationen an PEP wurden in den astroglialen Zelllinien LN-405, LN-308, U-343 und in der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y nachgewiesen (Tab. 9). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß in allen untersuchten Gehirnregionen der Ratte hohe PEP-Konzentrationen vorkommen (Abb. 20 und 21). Vergleichbare Ergebnisse sind für die Großhirnrinde und dem Neostriatum beim Mensch und Ratte beschrieben (Irazusta et al. 2002) sowie für kultivierte Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten aus der Großhirnrinde der Wanderratte (Mentlein et al. 1990).

Die exakte subzelluläre Lokalisation von PEP ist unklar. Auf Grund von Untersuchungen, welche auf Aktivitätsmessungen oder Immunmarkierungen beruhen, werden in der aktuellen Literatur unterschiedliche intrazelluläre und extrazelluläre Lokalisationen diskutiert. Ausgehend von der Aminosäuresequenz die weder ein Signalpeptid noch Kernlokalisationssequenzen, Transmembranregionen sowie andere Kompartimentspezifische Konsensussequenzen enthält, muß davon ausgegangen werden, daß PEP ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert ist.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme, konnten in den mittels differentieller Zentrifugation fraktionierten Zelllinien U-343 und SH-SY5Y 87 ± 2 % bzw. 99 ± 1 % der gesamten PEP-Aktivität in der zytosolischen S100-Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 23). Dabei muß erwähnt werden, daß bei der U-343-Zellfraktionierung 10 % der Gesamtaktivität verloren gegangen sind. In allen anderen, partikulären Fraktionen wurden nur geringe, sich an

der Nachweisgrenze befindliche Aktivitäten gemessen. Die PEP-Expression konnte ausschließlich in der zytosolischen S100-Fraktion nachgewiesen werden. Grund für die gemessenen Aktivitäten könnte zum einen die unvollständige Trennung der einzelnen Fraktionen sein, bzw. die Existenz weiterer post-Prolin-spaltenden Proteasen im Zellkern, die nicht mit PEP identisch sind.

Untersuchungen zur Verteilung eines EGFP-Proteines und der immunmarkierten endogenen PEP bestätigen die zytoplasmatische Lokalisation. Im Gegensatz zur Immunmarkierung mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper konnte in einer Anzahl von untersuchten Zellen das EGFP-Protein im Zellkern detektiert werden. Auf Grund möglicher Effekte durch die ektopische Expression des EGFP-Proteines, und daß mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper PEP nicht im Kern detektiert werden kann, muß davon ausgegangen werden, daß es sich hier um eine artifizielle Kernlokalisierung handelt. In der aktuellen Literatur wurde bereits für PEP eine „Kernlokalisierung“ für die embryonale Zelllinie NIH-Sape-4 von *Sarcophaga peregrina* (Ohtuski et al. 1997) und für die Maus-Fibroblasten-Zelllinie Swiss 3T3 beschrieben (Ishino et al. 1998). Die mit Hilfe der Immunmarkierung gezeigten Kernlokalisationen konnten jedoch nicht mit Hilfe der Westernblot-Analyse bestätigt werden. Auf Grund von eigenen Untersuchungen zur Etablierung monoklonaler Antikörper zur Immunmarkierung ist bekannt, daß es zu Kreuzreaktivitäten mit Kernproteinen kommt (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe von anti-sense-Zelllinien und Westernblot-Analysen konnte jedoch gezeigt werden, daß die im Zellkern detektierten Proteine nicht mit PEP identisch sind (Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, daß die beschriebenen „Kernlokalisationen“ von PEP auf Grund unspezifischer Immunmarkierungen erhalten wurden. In allen untersuchten humanen Zelllinien konnte keine vesikuläre bzw. membranständige Aktivität bzw. Expression von PEP nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Vermutung, daß es sich bei der in synaptosomalen Vesikeln bzw. Membranen nachgewiesenen post-Prolin-spaltenden Aktivität nicht um PEP handelt (O'Leary und O'Connor 1995; O'Leary et al. 1996).

Besonders interessant ist, daß mit Hilfe eines EGFP-Fusionsproteines und Immunmarkierungen nachgewiesen werden konnte, daß unmittelbar um den Zellkern hohe Konzentrationen an PEP vorkommen, die zur Plasmamembran hin abnimmt (Abb. 24 und 25). Weiterhin konnten in den Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 fibrilläre, dem Zytoskelett vergleichbare Strukturen festgestellt werden (Abb. 24 und 25). Mit Hilfe von Calnexin- und Tubulin-Antikörpern konnte nachgewiesen werden, daß PEP nicht mit dem ER kolokalisiert (Abb. 26), sondern vollständig mit dem Zytoskelett assoziiert ist (Abb. 27). Die Interaktion von PEP mit Tubulin wird dadurch bestätigt, daß die Depolymerisation des Zytoskelettes mit Hilfe von Nocodazol beide fibrilläre Verteilungsmuster zerstört, nicht hingegen von dem als Kontrolle verwendeten Calnexin-Proteines (Abb. 28 und 29).

Weiterhin konnte mit Hilfe des spezifischen PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyrr-CN gezeigt werden, daß die vollständige Hemmung der Aktivität zur keiner Beeinflussung des Verteilungsmusters von Tubulin und PEP führt. Dies läßt darauf schließen, daß PEP nicht aktiv an der

Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist, sondern zur Ausübung anderer physiologischer Funktionen am Zytoskelett fixiert ist. So konnte z.B. nachgewiesen werden, daß PEP für den Abbau einer abnormalen Spleiß-Variante des p40-phox-Proteines verantwortlich ist (Hasebe et al. 2001). Dem gegenüber ist von Tubulin und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen bekannt, daß sie auf Grund von Chaperon-Eigenschaften an der Faltung von Proteinen beteiligt sind (Manna et al. 2001). Ausgehend von der postulierten Beteiligung von PEP am intrazellulären Metabolismus Prolin-haltiger Oligopeptide (O'Cuinn 1998) besteht die Möglichkeit, daß PEP am gezielten Abbau mißgefalteter Proteine beteiligt ist. Weiterhin wäre denkbar, daß PEP eine Rolle spielt beim Metabolismus des mit Tubulin assoziierten TAU-Proteines (Nagiec et al. 2001). TAU ist an den neurodegenerativen Prozessen in der Alzheimerschen Krankheit beteiligt (Augustinack et al. 2002; Brion 1998). Dem gegenüber wurde nachgewiesen, daß PEP-Inhibitoren neuroprotektiven Eigenschaften besitzen (Kato et al. 1997; Laitinen et al. 2001).

In den untersuchten Zelllinien konnte weder mit Hilfe des EGFP-Fusionproteines noch mittels Fluoreszenzimmunmarkierungen und Westernblot-Analysen eine Sekretion von PEP beobachtet werden. Dem gegenüber konnte PEP-Aktivität in humanem Serum, in lumbalem Liquor cerebrospinalis (CSF) und in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Zur Charakterisierung der Aktivitäten in den extrazellulären Flüssigkeiten wurden die spezifischen PEP-Inhibitoren Fmoc-AlaPyr-CN und Z-XaaPro-BT sowie der Serinprotease-Inhibitor AEBSF eingesetzt. Alle 3 Substanzen zeigten eine vergleichbare Hemmung der Aktivitäten in den Kulturüberständen und im CSF gegenüber der intrazellulären PEP-Aktivität in U-343-Zellen. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich in den Kulturüberständen und im CSF um PEP handelt. Mit Hilfe der ermittelten extrazellulären Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH) konnte gezeigt werden, daß PEP durch Zell-Lyse in die Kulturüberstände und CSF gelangt ist und nicht durch Sekretion. Im Gegensatz zu den Kulturüberständen und dem CSF konnte mit Hilfe der 3 verwendeten Inhibitoren keine Übereinstimmung zwischen der Hemmung von PEP-Aktivität im Serum und in U-343-Zellen beobachtet werden. Auf Grund der hohen LDH-Aktivitäten im Serum kann aber davon ausgegangen werden, daß auch im Serum eine Freisetzung von PEP durch Zell-Lyse erfolgt ist. Lediglich 30 % der gesamten Aktivität im Serum konnten unabhängig mit beiden PEP-spezifischen Inhibitoren gehemmt werden. Dabei wurden Inhibitor-Konzentrationen bis zu 10 mM eingesetzt. Im Vergleich dazu genügt eine Konzentration von 100 nM an Inhibitor Fmoc-AlaPyr-CN zur vollständigen Hemmung der PEP-Aktivität in U-343-Zellen. Die ermittelten IC_{50} -Werte für den hemmbaren Anteil an Aktivität im Serum sind für die Fmoc-AlaPyr-CN und Z-XaaPro-BT im Vergleich zur Hemmung der intrazellulären PEP um das 2,5- bzw. 13,5fache erhöht. Trotz Berücksichtigung der nachgewiesenen Inaktivierung von Z-PhePro-BT durch das Serum ist der IC_{50} -Wert um das 7fache erhöht. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Serinprotease-Inhibitor AEBSF gegenüber den spezifischen PEP-Inhibitoren Fmoc-AlaPyr-CN und Z-XaaPro-BT die post-Prolin-spaltenden Aktivitäten im Serum effektiver hemmt, als in U-343-

Zellen. Die Ergebnisse legen nahe, daß in dem untersuchten Serum mindestens 2 unabhängige post-Prolin-spaltende Serinproteasen existieren müssen, die nicht mit PEP identisch sind. Dabei sind die 2 verwendeten PEP-Inhibitoren in der Lage, mindestens eine dieser nicht mit PEP identischen Serinproteasen zu hemmen. Das PEP-Inhibitoren auch andere post-Prolin-spaltende Serinproteasen hemmen, ist bereits in der aktuellen Literatur für den Inhibitor JTP-4819 beschrieben (Toide et al. 1998). Dem gegenüber wurde vor kurzem eine neue post-Prolin-spaltende Protease isoliert, deren Aktivität nicht mit den PEP-spezifischen Inhibitoren JTP-4819 und S 17092-1 gehemmt werden kann, aber genau wie PEP Z-Gly-Pro-AMC hydrolysiert (pers. Mitteilung). Dabei handelt es sich um die Z-Gly-Pro-AMC-hydrolysierende Protease (ZIP) aus dem Rinder-Serum (Birney und O'Connor 2001). Interessant ist, daß es im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen post-Prolin-spaltenden Aktivitäten und bestimmten Erkrankungsbildern eine Reihe weiterer Proteasen existieren, die nachweislich extrazellulär lokalisiert sind, und teilweise die selben Substrate wie PEP hydrolysieren (Tab. 12).

Tab. 12 Prolin-spaltende extrazelluläre Proteasen

Dipeptidylpeptidase IV, DP IV, EC 3.4.14.5 (Misumi et al. 1992)
Aminopeptidase P, APP, EC 3.4.11.9 (Yaron und Mlynar 1968)
Z-Gly-Pro-AMC-hydrolyzing peptidase, ZIP (Birney und O'Connor 2001)
novel serine protease , NSP (Meckelein et al. 1998)
fibroblast activation protein, FAP (Scanlan et al. 1994)
synaptosomale Prolin-spezifische Protease (O'Leary und O'Connor 1995)

So konnte gezeigt werden, daß ZIP Neuropeptide wie Angiotensin I, II und TRH hydrolysiert (Birney und O'Connor 2001). Die synaptosomale Prolin-spezifische Protease spaltet Bradykinin, Substanz P, Neurotensin, TRH und Angiotensin II (O'Leary und O'Connor 1995; O'Leary et al. 1996). Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) hydrolysiert ebenfalls Neuropeptide wie Substanz P und Neuropeptid Y (Ahmad et al. 1992; Bouras et al. 1995; Mentlein et al. 1993), nicht aber das N-terminal blockierte Substrat Z-Gly-Pro-AMC. Aminopeptidase P ist in der Lage, Bradykinin und Neuropeptid Y zu prozessieren (Mentlein und Roos 1996).

Auf Grund der Ergebnisse zur Lokalisation von PEP und der Existenz bereits bekannter und noch unbekannter weiterer post-Prolin-spaltenden Proteasen muß es als unwahrscheinlich angesehen werden, daß es sich bei der post-Prolin-spaltenden Aktivität im Serum, welche mit neuronalen Erkrankungen bzw. seelischen Störungen in Verbindung gebracht wird (Laitinen et al. 2001; Maes et al. 1995; Hagihara und Nagatsu 1987), um PEP handelt.

4.2 Einfluß von Prolylendopeptidase auf Zellmorphologie und Zellvitalität

Ziel dieser Untersuchungen war es, an Hand von Veränderungen der Morphologie und Vitalität neue Ansatzpunkte für die Aufklärung der physiologischen Rolle von PEP zu finden. Dazu wurde die PEP-Konzentration mit Hilfe der ektopischen Expression von EGFP-Fusionsproteinen erhöht, zum anderen wurde die Konzentration an PEP mittels anti-sense-mRNA reduziert. In der aktuellen Literatur sind keine Untersuchungen beschrieben, die sich mit möglichen Effekten auf die Zellmorphologie und Zellvitalität in Abhängigkeit von der Erhöhung bzw. Reduzierung der PEP-Expression befassen. Dagegen konnten neuroprotektive und neurotrophe Effekte von PEP-Inhibitoren nachgewiesen werden (Katsube et al. 1996; Laitinen et al. 2001; Shinoda et al. 1997; Shishido et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnten durch die vollständige Hemmung der PEP-Aktivität keine proliferativen und zytotoxischen Effekte auf die Zelllinien SH-SY5Y, U-343 und LN-405 nachgewiesen werden. Dagegen konnte gezeigt werden, daß die Erhöhung bzw. Reduzierung der endogenen PEP-Expression zu drastischen Veränderungen der Zellmorphologie und/oder der Zellvitalität führen (Abb. 32). Da die Expression und nicht die Aktivität von PEP Einfluß auf die Zellvitalität und die Zellmorphologie hat, kann geschlußfolgert werden, daß PEP parallel zur katalytischen Aktivität auch als Interaktionspartner physiologische Funktionen ausübt. Dies wird dadurch bestätigt, daß die ektopische Expression von Wildtyp-PEP und der katalytisch inaktiven Mutante PEP-S554A als EGFP-Fusionsproteine in allen 3 Zelllinien gleichermaßen zum apoptotischen Zelltod führt. Für die PEP-verwandte Protease Dipeptidylpeptidase VI (DPIV) sind schon Interaktionen mit anderen Proteinen nachgewiesen worden (Kameoka et al. 1993; Loster et al. 1995; Piazza et al. 1989). Im Gegensatz zur ektopischen Expression der EGFP-Fusionsproteine reagieren die einzelnen Zelllinien unterschiedlich auf die anti-sense-mRNA vermittelte Reduzierung der PEP-Expression. Die isolierten anti-sense-Zellklone der Zelllinie U-343 zeigen keine Effekte auf die Zellproliferation und Zelltoxizität gegenüber dem Wildtyp. Ausschließlich für die anti-sense-Zelllinie U-343-as11 mit der geringsten PEP-Restaktivität konnte eine Zunahme der Zellgröße um das 3-5fache nachgewiesen werden (Abb. 31). In der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y führt bereits eine Reduktion der endogenen PEP um 30% zu drastischen Veränderungen in Zellgröße, Zellform und Zellvitalität. Die gegenüber dem Wildtyp um das 5-30fach vergrößerten Zellen nehmen unter vollständigem Verlust der dendriten- und axonenartigen Fortsätze eine nadelförmige bzw. amöboide Form an. Es ist denkbar, daß die gezeigte Kolokalisation von PEP mit dem Zytoskelett und der damit verbundenen Ausübung noch unbekannter Funktionen, die molekulare Grundlage für die morphologischen Veränderungen bildet. Vergleichbar mit den Zellen, die EGFP-Fusionsproteine exprimieren, wurden für anti-sense-Zellen apoptotische Prozesse beobachtet, die zum Verlust der Mehrzahl an isolierten Zelllinien führte (Abb. 32). Da die Zellen weiter proliferierten, konnte die Mehrzahl der isolierten Zelllinien über einen Zeitraum von 2-6 Monaten kultiviert werden. Von den

insgesamt 60 isolierten Zelllinien existieren noch 4, bei denen auf Grund des Verhältnisses von Proliferation und Zelltod die Anzahl der Zellen konstant bleibt bzw. minimal zunimmt. Für die Zelllinie LN-405 konnte trotz mehrfacher Wiederholung keine anti-sense-Zelllinie etabliert werden. Nach der Transfektion konnten anfänglich Kolonien von G418-resistenten Zellen beobachtet werden, die aber nach 3-4 Wochen abstarben. An Hand der Transformation mit dem Expressionsvektor pEGFP und der Isolierung G418-resistenter Zellklone konnte eine zytotoxische Wirkung des verwendeten Transfektionsreagenz ausgeschlossen werden. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß die Reduzierung der PEP-Expression in der Zelllinie LN-405 zum völligen Verlust der Zellvitalität führt. Interessant ist, daß die zytotoxische Wirkung der anti-sense-mRNA mit steigender Konzentration an endogener PEP in den 3 untersuchten Zelllinien zunimmt. Da die apoptotischen Effekte der anti-sense-mRNA abhängig und die der EGFP-Fusionsproteine unabhängig von der Konzentration an endogener PEP sind, kann geschlußfolgert werden, daß in beiden Fällen für die Ausprägung der beobachteten Effekte unterschiedliche molekulare Mechanismen verantwortlich sein müssen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die nachgewiesenen Effekte auf die Zellmorphologie und die Zellvitalität auf generelle, PEP-unabhängigen Prozessen basieren. Bezugnehmend auf die durchgeführten Untersuchungen mit EGFP-Fusionsproteinen gibt es Untersuchungen, die zeigen, daß die Überexpression von Proteinen und die damit verbundene Störung von Proteinfaltungsprozessen für die Auslösung apoptotischer Vorgänge verantwortlich sein kann (Trotter et al. 2001; Welihinda et al. 1999). Weiterhin ist es möglich, daß die Integration der Expressionsvektoren in das Genom verantwortlich ist. Ausgeschlossen werden kann dies bei Vorliegen von mehreren Zellklonen mit gleichen Effekten, wie im Falle der SH-SY5Y-anti-sense-Zelllinien. Dies gilt nicht für die isolierten U-343-anti-sense-Zelllinien, wo ausschließlich Linie 11 einen Effekt auf die Zellgröße aufweist.

4.3 Prolylendopeptidase und Signaltransduktionskaskaden

Ziel dieser Untersuchungen war es, die molekularen Zusammenhänge zwischen PEP und neurodegenerativen Prozessen sowie Lern- und Gedächtnisvorgängen aufzuklären. Beide neuronalen Prozesse sind eng mit Signaltransduktionskaskaden verbunden (Berridge 1998; Bhat 1995; Selcher et al. 2002; Bezchlibnyk und Young 2002; Selcher et al. 2002). Aus diesem Grund wurde der Einfluß von PEP auf die Phosphoinositid- und die Adenylat-Cyclase-Kaskade untersucht. Dazu wurde, unabhängig von extrazellulären Stimuli, der Einfluß von PEP auf die Erhöhung der Konzentration von IP₃ sowie auf die CRE-Enhancer-Element gekoppelte EGFP-Expression in humanen Zelllinien untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte in serumfreiem Medium, um ausschließlich intrazelluläre Effekte von PEP zu erfassen. Im Falle der Adenylat-Cyclase-Kaskade konnte gezeigt werden, daß die vollständige Hemmung der PEP-Aktivität in der Zelllinie U-343-CRE1 zu keiner

Erhöhung der EGFP-Fluoreszenz führt. Dagegen war es in der Positiv-Kontrolle möglich, durch die Forskolin-vermittelte Aktivierung der Adenylat-Cyclase die EGFP-Fluoreszenz um das 2,8fache zu erhöhen. Dies zeigt, daß PEP in der untersuchten Zelllinie keinen Einfluß auf die CRE-vermittelte Genexpression besitzt.

Im Gegensatz zur Adenylat-Cyclase-Kaskade konnte ein Einfluß von PEP auf die Phosphoinositid-Kaskade festgestellt werden. Mit Hilfe von U-343-anti-sense-Zellen erfolgte der Nachweis, daß die Reduzierung der endogenen Expression von PEP zu einer IP_3 -Erhöhung führt. Dabei ist die IP_3 -Erhöhung abhängig von der Restaktivität in den anti-sense-Zelllinien. Eine zunehmende Reduzierung der PEP-Expression korreliert mit steigenden IP_3 -Konzentrationen in den anti-sense-Zelllinien (Abb. 41). Die vollständige Hemmung von PEP mit Hilfe von Fmoc-AlaPyr-CN führt ebenfalls zur Erhöhung der IP_3 -Konzentration in Wildtyp-Zellen. Dies zeigt, daß für den Einfluß von PEP auf IP_3 die katalytische Aktivität verantwortlich ist. Die IP_3 -Konzentration erhöhte sich in den humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 um das 3,2fache bzw. um das 1,4- und 1,6fache des Ausgangsniveaus. Interessant ist, daß die IP_3 -Erhöhung nicht innerhalb von Sekunden erfolgt, wie bei der rezeptorvermittelten Aktivierung der Phosphoinositid-Kaskade. Die PEP-abhängige Erhöhung von IP_3 ist ein zeitabhängiger, langsam verlaufender Akkumulationsprozess (Abb. 38). Ein erster signifikanter Einfluß auf die IP_3 -Konzentration konnte 3 Stunden nach der vollständigen Hemmung von PEP nachgewiesen werden. Es erfolgte ein kontinuierlicher langsamer Anstieg von IP_3 über mindestens 12 Stunden. Der Abfall der IP_3 -Konzentration nach 12 Stunden in den Zelllinien U-343 und SH-SY5Y kann nicht mit Hilfe der Inaktivierung des eingesetzten Inhibitors erklärt werden. Nachweislich wurde die Aktivität von PEP über den gesamten Versuchszeitraum von 24 Stunden vollständig gehemmt. Es wird davon ausgegangen, daß die Beeinträchtigung der Zellvitalität auf Grund der Verwendung von serumfreiem Kulturmedium für den Abfall der IP_3 -Konzentration verantwortlich ist. Der nachgewiesene Zusammenhang von PEP und IP_3 -Synthese in humanen Zelllinien wird durch Untersuchungen an der PEP-Nullmutante *dpoA* im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* bestätigt (Williams et al. 1999). Der vollständige Verlust an PEP in der *dpoA*-Mutante sowie die Behandlung von Wildtyp-Zellen mit einem spezifischen PEP-Inhibitor führen ebenfalls zu einer 3-4fachen Erhöhung der IP_3 -Konzentration. Das zeigt, daß die IP_3 -Konzentration im Vergleich zu humanen Zelllinien ebenfalls in *Dictyostelium discoideum* von der katalytischen PEP-Aktivität abhängig ist. Da alle IP_3 -Messungen nach einer Kultivierungsdauer von 6 Stunden erfolgten, gibt es keine Aussagen zum zeitlichen Verlauf der IP_3 -Erhöhung. Zusätzlich konnten Williams et. al. (1999) zeigen, daß weder die Synthese aus Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat (PIP_2) durch Phospholipase C (PLC) noch die Dephosphorylierung zu Inositol durch Inositol-Phosphatasen für die erhöhte IP_3 -Konzentration verantwortlich sind. Dem gegenüber konnte eine erhöhte Dephosphorylierung von Inositol-1,3,4,5,6-pentaphosphat (IP_5) zu IP_3 in der *dpoA*-Mutante nachgewiesen werden. Die Dephosphorylierung von Inositol-Polyphosphaten wie IP_4 , IP_5 und IP_6 ist ein alternativ

existierender IP_3 -Syntheseweg zu der PLC-vermittelten Hydrolyse von PIP_2 (van Dijken et al. 1995). Enzyme, wie die Multiple Inositol-Polyphosphatase (MIPP), die Inositol-Polyphosphate dephosphorylieren, wurden in *Dictyostelium discoideum* und in Säugern nachgewiesen (Caffrey et al. 1999; Mochizuki und Takenawa 1999; Nogimori et al. 1991; Oliver et al. 1992) (van Dijken et al. 1997; Shears 1998). Obwohl die molekularen Mechanismen nicht bekannt sind, kann an Hand der nachgewiesenen Effekte auf die IP_3 -Synthese postuliert werden, daß PEP die Aktivität von Inositol-Polyphosphatasen beeinflusst. Dies könnte durch eine direkte proteolytische Modifikation oder indirekt durch die Prozessierung regulatorischer Interaktionspartner von Inositol-Polyphosphatasen erfolgen.

Neurodegenerative Prozesse sowie Lern- und Gedächtnisvorgänge sind eng mit der Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden verbunden (Dragunow 1996; Tischmeyer und Grimm 1999). Neuropeptide, wie Vasopressin, Somatostatin, Oxytocin, β -Endorphin oder Substanz P, aktivieren über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Phosphoinositidkaskade (Kovacs und De Wied 1994). Der Nachweis, daß der ermittelte Effekt von PEP auf die IP_3 -Synthese einen Einfluß auf die Phosphoinositid-Kaskade hat, würde erlauben, neben der PEP-vermittelten Inaktivierung von Neuropeptiden einen neuen molekularen Mechanismus zu postulieren, der die beschriebenen Wirkungen von PEP-Inhibitoren auf die oben genannten neuronalen Prozesse erklären würde. Deshalb wurde die Aktivierung der Phosphoinositid-Kaskade durch Substanz P in Abhängigkeit von PEP untersucht. Substanz P (SP), ein Neuropeptid aus der Klasse der Tachykinine, aktiviert durch Bindung an den G_p -Protein-gekoppelten Neurokininrezeptor NK-1 die Phosphoinositid-Kaskade. NK-1-Rezeptoren existieren sowohl an der Membranoberfläche von Neuronen wie auch von Glia-Zellen (Luo et al. 1996; Luo et al. 1997). Mit Hilfe der PCR-Technik und anschließender Sequenzierung konnte in der humanen Gliomazelllinie U-343 die endogene Expression des Neurokininrezeptors NK-1 nachgewiesen werden (Abb. 42). In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen konnte durch SP in der Gliomazelllinie U-343 die Synthese von IP_3 stimuliert werden (Eistetter et al. 1992; Marriott et al. 1991; Renzetti et al. 1999; Torrens et al. 1989). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die IP_3 -Synthese konzentrationsabhängig ist. Bei 50 nm SP steigt die ermittelte IP_3 -Konzentration auf das 4,5fache, bei 1 μ M auf das 9fache des Ausgangsniveaus an (Abb. 44). Auf Grund dieser Ergebnisse ist SP geeignet, den Einfluß von PEP auf die Aktivierung der Phosphoinositid-Kaskade zu untersuchen. Nach SP-Stimulation von Wildtyp-Zellen steigt die Konzentration an IP_3 innerhalb von 5 Sekunden auf ein Maximum an (Abb. 44). Danach fällt die IP_3 -Konzentration langsam ab und erreicht nach ca. 40 Sekunden 50% der maximalen Erhöhung. Die Ausgangskonzentration wird nach 3 Minuten erreicht. In Wildtyp-Zellen, die für 12 Stunden mit dem PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyr-CN preinkubiert werden, führt die SP-Stimulation zu einer maximalen IP_3 -Konzentration, die gegenüber unbehandelten Wildtyp-Zellen um 50 % erhöht ist (Abb. 45). Dieser PEP-abhängige Effekt auf die SP-Stimulation konnte mit Hilfe der anti-sense-Zelllinie U-343-as2 bestätigt werden. Für diese Zelllinie konnte eine Erhöhung der maximalen IP_3 -

Konzentration um 35 % nachgewiesen werden. Die Normalisierung der Meßwerte führt zu einer geringfügigen Verringerung der relativen maximalen IP₃-Erhöhung gegenüber der Wildtyp-Zelllinie (Abb. 46). Dies beeinflusst aber nicht das Ergebnis, daß PEP auch die Neuropeptid-vermittelte Stimulation der IP₃-Synthese beeinflusst. Dem gegenüber wird im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie der allgemeine Verlauf von IP₃-Synthese und -Abbau nicht durch PEP beeinflusst (Abb. 45).

Zur Aufklärung, inwieweit der beschriebene Effekt von PEP auf die SP-vermittelte IP₃-Synthese einen Einfluß auf die Signalweiterleitung innerhalb der Phosphoinositid-Kaskade hat, wurden in Abhängigkeit von PEP die Expression des Transkriptionsfaktors *c-fos* und die intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus dem ER untersucht. SP stimuliert in primären und permanenten Astrozyten-Zellkulturen die Expression von *c-fos* (Eistetter et al. 1992; Luo et al. 1996; Luo et al. 1997). Dieser Prozeß erfolgt über die Phospholipase C-vermittelte IP₃-Synthese und der anschließenden intrazellulären Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die dadurch aktivierte Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) führt mit Hilfe des im Promotorbereich des *c-fos*-Genes befindlichen Enhancerelementes *CRE* zur Stimulation der Transkription (Spitznagel et al. 2001). Zur Kontrolle der Stimulierbarkeit von *c-fos* wurden U-343- und SH-SY5Y-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem funktionellen Diacylglycerin-Analoga, inkubiert. Mit Hilfe der Westernblot-Analyse konnte nachgewiesen werden, daß 30 Minuten nach der direkten Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) eine signifikante Erhöhung der *c-fos*-Expression in beiden Zelllinien erfolgt (Abb. 53A). Die vollständige Hemmung der PEP-Aktivität mit Hilfe des spezifischen PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyrr-CN führt zu keiner detektierbaren Stimulation der *c-fos*-Expression (Daten nicht gezeigt). Es konnte ebenfalls kein PEP-vermittelter Effekt auf die PMA-Stimulation von *c-fos* nachgewiesen werden (Abb. 53B). Dies zeigt, daß die vollständige Hemmung der PEP-Aktivität weder zu einem stimulatorischen noch zu einem inhibitorischen Einfluß auf die IP₃- bzw. auf die PKC-vermittelte Expression von *c-fos* führt.

Die Untersuchungen zur SP-abhängigen intrazellulären Kalziumfreisetzung führten zu unerwarteten Ergebnissen. Obwohl gezeigt werden konnte, daß die SP-Stimulation in beiden Zelllinien zu einer Erhöhung der IP₃-Konzentration führt, konnte in den Zelllinien SH-SY5Y und U-343 keine, bzw. bei weniger als 1 % der untersuchten Zellen eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte die Ursache dafür sein, daß nach SP-Stimulation keine Erhöhung der Expression von *c-fos* nachgewiesen werden konnte. Auf Grund der veränderten physiologischen Verhältnisse in Karzinomzelllinien kann vermutet werden, daß dies die Ursache für die Unterbrechung der Signalkette zwischen IP₃ und der Kalziumfreisetzung aus dem ER ist. So konnte gezeigt werden, daß die Zelllinie U-343 im Vergleich zu anderen Karzinomzelllinien resistent gegenüber bestimmten Chemotherapeutika ist. Als Ursache dafür wird die nachgewiesene erhöhte Expression von PKC α und *bcl-2* sowie die geringere Konzentration an *p53* vermutet

(Blackburn et al. 1998). Auf Grund dieser Ergebnisse ist das Modellsystem, bestehend aus den humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und dem Neuropeptid Substanz P, nicht geeignet, den Einfluß von PEP auf die Expression von *c-fos* und auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung zu untersuchen. Deshalb wurde die Astrozytomazelllinie LN-405 sowie weitere Neuropeptide bzw. bioaktive Moleküle hinsichtlich ihres Einflusses auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung untersucht. Oxytocin, Vasopressin, Carbachol, Dihydrophenylglyzin (DHPG), Bradykinin, Serotonin und ATP binden wie SP an G-Proteingekoppelte Rezeptoren und bewirken damit die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium (Inagaki et al. 1991; Jalonen et al. 1997; Scala-Guenot et al. 1994; Shao und McCarthy 1995; Cruzblanca et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, daß von den untersuchten Substanzen Carbachol in U-343-Zellen und SP in LN-405-Zellen zu einem detektierbaren intrazellulären Kalziumsignal führen (Abb. 47). Alle anderen untersuchten Substanzen bewirken keine intrazelluläre Kalziumfreisetzung. Gegenüber den Zelllinien U-343 und LN-405 konnten SH-SY5Y-Zellen generell nicht stimuliert werden. Mit Hilfe des spezifischen PLC-Inhibitors U73122 konnte gezeigt werden, daß die Carbachol- sowie die SP-abhängige Kalziumfreisetzung durch die Aktivierung der Phosphoinositid-Kaskade erfolgt (Abb. 49). Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, daß die Modellsysteme U-343/Carbachol und LN-405/SP geeignet sind, um den Einfluß von PEP auf die IP₃-vermittelte intrazelluläre Kalziumfreisetzung zu untersuchen.

Die alleinige Zugabe des spezifischen PEP-Inhibitors Fmoc-AlaPyrr-CN führt zu keiner Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Daten nicht gezeigt). Auf Grund des langsamen, für die Stimulation eines Kalziumsignals untypischen Anstieges der IP₃-Konzentration, wurde dies erwartet. Zur Untersuchung des Einflusses von PEP auf die IP₃-vermittelte Kalziumfreisetzung erfolgte die Preinkubation der Zellen für 12 Stunden mit dem PEP-Inhibitor Fmoc-AlaPyrr-CN. Die vollständige Hemmung von PEP und die damit verbundene IP₃-Akkumulation hat keinen Einfluß auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung in den untersuchten Zelllinien (Abb. 50). Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe von U-343-antisense-Zellen bestätigt werden (Abb. 51). Schlußfolgernd kann postuliert werden, daß die beschriebenen Effekte von PEP-Inhibitoren auf neurodegenerative Prozesse sowie auf Lern- und Gedächtnisvorgänge nicht auf der Beeinflussung der IP₃-vermittelten Kalziumfreisetzung basieren. Auf Grund der hier gezeigten und der in der aktuellen Literatur beschriebenen Daten, existieren alternative Möglichkeiten, wie die Effekte von PEP auf IP₃ neuronale Prozesse beeinflussen können. Interessant ist, daß die Isolierung der PEP-Nullmutante in *Dictyostelium discoideum* an Hand der Revertierung des Lithium-vermittelten Phänotyps erfolgte (Williams et al. 1999). Lithium ist der am längsten bekannte und eingesetzte Stimmungsstabilisator zur Behandlung depressiver Erkrankungen. Als molekularer Mechanismus für die Wirkungsweise von Lithium wird die nachgewiesene Hemmung der Enzyme Inositol-Polyphosphatase (IPP) und Inositol-Monophosphatase (IMP) diskutiert. Beide Inositol-Phosphatasen sind beteiligt an der sequentiellen Dephosphorylierung von IP₃

zu Inositol (Gee et al. 1988b; Gee et al. 1988a). Auf Grundlage dessen erfolgte die Postulierung der sogenannten „inositol depletion“-Theorie (Berridge et al. 1989). Die „inositol depletion“-Theorie besagt, daß es durch die Lithium-vermittelte Hemmung von IPP und IMP zur Akkumulation von IP_2 und IP kommt. Dies wiederum führt durch die Reduzierung an freiverfügbaren Inositol zur Störung der PIP_2 - sowie PIP_3 -Synthese. Beide Moleküle besitzen wichtige physiologische Funktionen im Rahmen von Signaltransduktionsprozessen. Im Vergleich dazu konnte gezeigt werden, daß es in Abhängigkeit von der PEP-Aktivität durch eine gesteigerte Dephosphorylierung von IP_5 zu einer Erhöhung der IP_3 -Konzentration kommt. In Anlehnung an die von Berridge et. al. (1989) vorgeschlagene Theorie kann aus diesem Grund eine „polyinositol depletion theory“ postuliert werden. Diese geht davon aus, daß es durch die Hemmung der PEP-Aktivität zur drastischen Verringerung der Vorräte an den Inositol-Polyphosphaten IP_{4-6} kommt. Diese Störung des Inositol-Metabolismus sollte zur Beeinflussung unterschiedlicher physiologischer Prozesse führen. Interessant ist, daß in der aktuellen Literatur neben dem IP_3 -Rezeptor in der ER-Membran noch eine Anzahl weiterer Polyinositol-bindende Proteine beschrieben sind (Tab 13). Diese Proteine bzw. Proteinfamilien werden durch PIP_2 , PIP_3 sowie IP_{3-6} aktiviert oder inhibiert (Fukuda und Mikoshiba 1997). Sie regulieren unter anderem die Kalzium-Homeostasis, die Neurotransmitter-Freisetzung, das neuronale Wachstum, das Zytoskelett und intrazelluläre Transportvorgänge (Cunningham et al. 2001; Fukuda und Mikoshiba 1997; Yang et al. 1999). Damit besteht eine Vielzahl von alternativen Möglichkeiten, wie PEP ohne direkte Modifikation von Neuropeptiden physiologische und pathophysiologische Prozesse intrazellulär beeinflussen kann. Eine in diesem Fall besonders interessante Gruppe von Inositol-Polyphosphat-bindenden Proteinen ist die Synaptotagmin-Familie (Marqueze et al. 2000). Die Synaptotagmine sind unter anderem an Prozessen wie Kalzium-regulierter Transport, Exozytose von sekretorischen Vesikeln, Nervenwachstum und neuronaler Plastizität beteiligt (Fukuda und Mikoshiba 2000; Hou und Dahlstrom 2000; Kabayama et al. 1999; Mikoshiba et al. 1999). Für die Synaptogamine I und II wurde nachgewiesen, daß sie durch die Bindung von Kalzium an die C2A-Domäne aktiviert und durch die Bindung von Polyphosphat-Inositolen an die C2B-Domäne inaktiviert werden (Schiavo et al. 1996; Zhang et al. 1998). Die PEP-vermittelte Reduzierung von freiverfügbaren Inositol-Polyphosphaten würde zu einer verminderten Inaktivierung von Synaptotagminen führen. Dadurch käme es zu einer erhöhten Neurotransmitter-Ausschüttung sowie zur Verstärkung neuroprotektiver und neurotropher Effekte. Die damit verbundene Beeinflussung der Neuroplastizität und neurodegenerativer Prozesse führt zur Steigerung bzw. zum Erhalt der Leistungs- und Funktionsfähigkeit des Nervensystems. Identische Effekte werden mit spezifischen PEP-Inhibitoren im Rahmen von Untersuchungen zu neurodegenerativen Prozessen sowie zu Lern- und Gedächtnisvorgängen erzielt.

Tab. 13 Inositol-Polyphosphat-bindende Proteine

Inositol-Polyphosphat-bindende Proteine	bekannte Funktion
Synaptotagmine	integrale Membranproteine sekretorischer Vesikel, Sensor für Kalzium-abhängige Neurotransmitter-Ausschüttung (Exozytose)
GTPase-aktivierende Proteine (Gap1 ^{IP4BP} und Gap1 ^m)	Aktivierung der GTPase <i>Ras</i> , Genexpression, Organisation des Zytoskelett's, vesikulärer und nukleärer Transport
Bruton's Tyrosin-Kinase (Btk)	B-Zell-Entwicklung, reguliert PLC $\gamma_{1/2}$
Proteolipid-Protein (PLP)	Vesikeltransport
Vinculin	Zytoskelett-Organisation
Centaurin α	Organisation des Zytoskelett's und des Vesikeltransportes
Golgi Coatomer	cis-trans-Transport von Vesikeln
p130	bindet IP ₃ , Proteinphosphatase 1 und GABA-Rezeptor
AP-2	Clathrin-Aufbau und Endozytose
AP-3	Clathrin-Aufbau und Vesikelgröße

Das PLC-verwandte p130-Protein ist ein weiteres sehr interessantes Protein, da es mit hoher Affinität IP₃ bindet (Kanematsu et al. 1996). Die IP₃-Bindung beeinflusst die Funktionalität des GABA-Rezeptors sowie der Protein-Phosphatase 1 (Kanematsu et al. 2002; Yoshimura et al. 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, daß p130 die intrazelluläre Kalziumfreisetzung unterdrücken kann (Takeuchi et al. 2000). Vergleichbar mit den Synaptotagminen könnte die PEP-vermittelte Steigerung der IP₃-Bindung an p130 zur Beeinflussung neuronaler Prozesse führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß PEP die IP₃-Konzentration in humanen Zelllinien beeinflusst. Der dafür verantwortliche molekulare Mechanismus bleibt unaufgeklärt. Auf Grund der vorliegenden Daten wird postuliert, daß die Beeinflussung des Inositol-Metabolismus durch PEP die Ursache für die beschriebenen Effekte von PEP-Inhibitoren auf neurodegenerative Erkrankungen sowie auf Lern- und Gedächtnisprozesse ist. Diese Aussage wird unterstützt durch den Nachweis, daß PEP die IP₃-vermittelte Wirkung von Stimmungsstabilatoren auf neuronale Prozesse beeinflusst (Williams et al. 2002).

Der Nachweis der zellulären, insbesondere zytoskeletären Lokalisation der Prolyl Endopeptidase, der in dieser Arbeit gelang, sowie die überraschende Negativekorrelation zwischen PEP-Aktivität und Inositolkonzentration verlangen nach weiteren Untersuchungen um die molekularen Details dieser Befunde besser zu verstehen. Daher bleibt das Ziel zukünftiger Untersuchungen die Aufklärung der physiologischen Funktion von PEP sowie die zu Grunde liegenden Mechanismen und endogenen Substrate. Dafür bieten die vorliegenden Ergebnisse Ausgangspunkte zur Bearbeitung folgender Schwerpunkte:

- der Einfluß von PEP auf andere Inositol- bzw. Phosphatidylinositol-abhängige Prozesse
- der Einfluß von PEP-Aktivität auf Polyinositol-Phosphatasen
- die Beteiligung von PEP an apoptotischen bzw. neuroprotektiven Prozessen
- die Suche nach möglichen Interaktionspartnern.

5 Zusammenfassung

Die hochspezifische Serinprotease Prolylendopeptidase (PEP, EC 3.4.21.26) ist ubiquitär im Organismenreich verbreitet. Sie hydrolysiert vorzugsweise Peptidbindungen C-terminal der Aminosäure Prolin. Intensive Untersuchungen in den letzten 2 Jahrzehnten haben dazu geführt, daß die Struktur, die Substratspezifität und der Katalysemechanismus weitestgehend aufgeklärt werden konnten. Nur wenige Aussagen gibt es über die physiologische Funktion sowie über die exakte subzelluläre Lokalisation. Obwohl gezeigt werden konnte, daß PEP an der Regulation von neuronalen Prozessen beteiligt ist, sind die dafür verantwortlichen Mechanismen unbekannt. Es wird postuliert, daß PEP an der extrazellulären Inaktivierung von Neuropeptiden beteiligt ist. Dies steht im Widerspruch zur Aminosäuresequenz, welche auf eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation hindeutet. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß die Beteiligung von PEP an neuronalen Prozessen ausschließlich auf intrazellulären Interaktionen basiert.

PEP wurde in 23 humanen Zelllinien nachgewiesen, wobei besonders in glialen und neuronalen Zelllinien hohe Konzentrationen an PEP nachgewiesen werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß PEP in hohen Konzentrationen homogen verteilt im Gehirn der Wanderratte, *Rattus norvegicus* vorkommt. Entgegen früheren Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation, wo hohe PEP-Aktivitäten im Zellkern und in sekretorischen Vesikeln beschrieben sind, wurden in den ausgewählten humanen Zelllinien U-343 und SH-SY5Y 97 bzw. 99 % der gesamten Menge an PEP im Zytosol nachgewiesen. Dagegen konnte erstmalig gezeigt werden, daß PEP in den humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405 vollständig mit Tubulin kolokalisiert. Die vollständige Hemmung hat keinen Einfluß auf die Lokalisationsmuster von PEP und Tubulin.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen wurden PEP-Aktivitäten im Zellkulturüberstand sowie in humanem Serum und lumbaler Liquorflüssigkeit gemessen. Es konnte gezeigt werden, daß die ermittelten post-Prolin-spaltenden Aktivitäten in den Zellkulturüberständen und in humaner lumbaler Liquorflüssigkeit auf der lytischen Freisetzung von intrazellulärer PEP basieren. Die Charakterisierung der post-Prolin-spaltenden Aktivitäten in humanem Serum ergab, daß neben Zell-lytisch freigesetzter PEP mindestens noch 2 weitere Prolin-spaltende Serinproteasen vorkommen müssen.

Die vollständige Hemmung der PEP-Aktivität führt zu keinen sichtbaren Effekten auf die Zellmorphologie und Zellvitalität der humanen Zelllinien U-343, SH-SY5Y und LN-405. Dagegen konnte gezeigt werden, daß unabhängig von der katalytischen Aktivität die ektopische Expression von PEP als EGFP-Fusionsprotein apoptotischen Prozesse auslöst. Außerdem konnte beobachtet werden, daß die Proliferation vollständig gehemmt wurde. Die Verringerung der endogenen Expression durch anti-sense-mRNA führt teilweise bzw. generell in den Zelllinien U-343 und SH-SY5Y zu einer Vergrößerung der Zellen um das 5-

30fache. Dabei verändern SH-SY5Y-Zellen ihre typische Morphologie und bilden langgestreckte nadelförmige bzw. amöboide Zellkörper aus. Weiterhin wurden in den Zelllinien LN-405 und SH-SY5Y apoptotische Prozesse beobachtet, die zum Verlust der isolierten Zellklone führten. Im Gegensatz zur ektopischen Expression von Fusionsproteinen wird die Proliferation aber nicht vollständig gehemmt.

Untersuchungen zur *CRE*-abhängigen Transkription haben gezeigt, daß die vollständige Hemmung von PEP keinen Einfluß auf die Adenylat-Cyclase-Kaskade hat. Dem gegenüber führt die vollständige Hemmung bzw. teilweise Reduzierung der endogenen Expression von PEP zu einer maximalen Erhöhung der IP_3 -Konzentration auf das 2,4fache des Ausgangsniveaus. Die Zunahme der IP_3 -Konzentration ist ein langsamer, über Stunden andauernder Akkumulationsprozeß, der ausschließlich auf intrazellulären Interaktionen von PEP beruht. Das Ausmaß der IP_3 -Akkumulation ist abhängig von der vorhandenen PEP-Restaktivität. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß PEP die Substanz P-vermittelte Stimulation der IP_3 -Synthese beeinflusst. Gegenüber dem Wildtyp ist die absolute maximale IP_3 -Konzentration um 35 bis 45 % erhöht, und die relative maximale IP_3 -Erhöhung um 46 bis 55 % reduziert. Untersuchungen zur Beeinflussung der nachfolgenden Signalweiterleitung haben gezeigt, daß weder die absolute Erhöhung noch die relative Verringerung der IP_3 -Synthese einen Einfluß auf die Expression des Transkriptionsfaktors *c-fos* und auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung haben.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmad, S., L. Wang, und P. E. Ward. 1992. Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260:1257-1261.
- Ansorge, S. und E. Schön. 1987. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV), a functional marker of the T lymphocyte system. *Acta Histochem.* 82:41-46.
- Aoyagi, T., M. Nagai, K. Ogawa, F. Kojima, M. Okada, T. Ikeda, M. Hamada, und T. Takeuchi. 1991. Poststatin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase, produced by *Streptomyces viridochromogenes* MH534-30F3. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)* 44:949-955.
- Aoyagi, T., T. Wada, M. Nagai, F. Kojima, S. Harada, T. Takeuchi, H. Takahashi, K. Hirokawa, und T. Tsumita. 1990. Increased gamma-aminobutyrate aminotransferase activity in brain of patients with Alzheimer's disease. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 38:1748-1749.
- Atack, J. R., N. Suman-Chauhan, G. Dawson, und J. J. Kulagowski. 1991. *In vitro* and *in vivo* inhibition of prolyl endopeptidase. *Eur. J. Pharmacol.* 205:157-163.
- Augustinack, J. C., A. Schneider, E. M. Mundelkew, und B. T. Hyman. 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl)* 103:26-35.
- Barelli, H., A. Petit, E. Hirsch, S. Wilk, G. De Nanteuil, P. Morain, und F. Checler. 1999. S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:657-661.
- Berridge, M. J. 1993. Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* 365:388-389.
- Berridge, M. J. 1998. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13-26.
- Berridge, M. J., C. P. Downes, und M. R. Hanley. 1989. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 59:411-419.
- Bezchlibnyk, Y. und L. T. Young. 2002. The neurobiology of bipolar disorder: focus on signal transduction pathways and the regulation of gene expression. *Can. J. Psychiatry* 47:135-148.
- Bhat, N. R. 1995. Signal transduction mechanisms in glial cells. *Dev. Neurosci.* 17:267-284.
- Birney, Y. A. und B. F. O'Connor. 2001. Purification and characterization of a Z-pro-prolinal-insensitive Z-Gly-Pro-7-amino-4-methyl coumarin-hydrolyzing peptidase from bovine serum - a new proline-specific peptidase. *Protein Expr. Purif.* 22:286-298.
- Blackburn, R. V., S. S. Galoforo, C. M. Berns, N. M. Motwani, P. M. Corry, und Y. J. Lee. 1998. Differential induction of cell death in human glioma cell lines by sodium nitroprusside. *Cancer* 82:1137-1145.
- Bouras, M., J. F. Huneau, C. Luengo, C. Erlanson-Albertsson, und D. Tome. 1995. Metabolism of enterostatin in rat intestine, brain membranes, and serum: differential involvement of proline-specific peptidases. *Peptides* 16:399-405.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brion, J. P. 1998. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* 40:130-140.
- Caffrey, J. J., K. Hidaka, M. Matsuda, M. Hirata, und S. B. Shears. 1999. The human and rat forms of multiple inositol polyphosphate phosphatase: functional homology with a histidine acid phosphatase up-regulated during endochondral ossification. *FEBS Lett.* 442:99-104.

- Camargo, A. C., M. L. Almeida, und P. C. Emson. 1984. Involvement of endo-oligopeptidases A and B in the degradation of neurotensin by rabbit brain. *J. Neurochem.* 42:1758-1761.
- Cohen, S. N., A. C. Chang, und L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 69:2110-2114.
- Crawford, J. L., W. N. Lipscomb, und C. G. Schellman. 1973. The reverse turn as a polypeptide conformation in globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 70:538-542.
- Creighton, E. T. 1978. Possible implications of many proline residues for the kinetics of protein unfolding and refolding. *J. Mol. Biol.* 125:401-406.
- Crumpton, M. J. und D. Snary. 1974. Preparation and properties of lymphocyte plasma membrane. *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 3:27-56.
- Cruzblanca, H., D. S. Koh, und B. Hille. 1998. Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95:7151-7156.
- Cunningham, C. C., R. Vegners, R. Bucki, M. Funaki, N. Korde, J. H. Hartwig, T. P. Stossel, und P. A. Janmey. 2001. Cell permeant polyphosphoinositide-binding peptides that block cell motility and actin assembly. *J. Biol. Chem.* 276:43390-43399.
- Cunningham, D. F. und B. O'Connor. 1997. Proline specific peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1343:160-186.
- De Wied, D. 1997. Neuropeptides in learning and memory processes. *Behav. Brain Res.* 83:83-90.
- Defea, K., F. Schmidlin, O. Dery, E. F. Grady, und N. W. Bunnett. 2000. Mechanisms of initiation and termination of signalling by neuropeptide receptors: a comparison with the proteinase-activated receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 28:419-426.
- Demuth, H.-U., D. Schlenzig, A. Schierhorn, G. Grosche, M. P. Chapot-Chartier, und J. C. Gripon. 1993. Design of (omega-N-(O-acyl)hydroxy amid) aminodicarboxylic acid pyrrolidides as potent inhibitors of proline-specific peptidases. *FEBS Lett.* 320:23-27.
- Diefenthal, T., H. Dargatz, V. Witte, G. Reipen, und I. Svendsen. 1993. Cloning of proline-specific endopeptidase gene from *Flavobacterium meningosepticum*: expression in *Escherichia coli* and purification of the heterologous protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:90-97.
- Dragunow, M. 1996. A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav. Genet.* 26:293-299.
- Dresdner, K., L. A. Barker, M. Orłowski, und S. Wilk. 1982. Subcellular distribution of prolyl endopeptidase and cation-sensitive neutral endopeptidase in rabbit brain. *J. Neurochem.* 38:1151-1154.
- Eistetter, H. R., A. Mills, R. Brewster, S. Alouani, C. Rambosson, und E. Kawashima. 1992. Functional characterization of neurokinin-1 receptors on human U373MG astrocytoma cells. *Glia* 6:89-95.
- Ekman, R., P. Juhasz, M. Heilig, H. Agren, und C. E. Costello. 1996. Novel neuropeptide Y processing in human cerebrospinal fluid from depressed patients. *Peptides* 17:1107-1111.
- Feany, M. B. 1996. Neuropeptide modulation of learning and memory processes. *Rev. Neurosci.* 7:151-164.
- Feldkamp, M. M., N. Lau, und A. Guha. 1997. Signal transduction pathways and their relevance in human astrocytomas. *J. Neurooncol.* 35:223-248.
- Fiedorowicz, A., I. Figiel, B. Kaminska, M. Zaremba, S. Wilk, und B. Oderfeld-Nowak. 2001. Dentate granule neuron apoptosis and glia activation in murine hippocampus induced by trimethyltin exposure. *Brain Res.* 912:116-127.
- Fukuda, M. und K. Mikoshiba. 1997. The function of inositol high polyphosphate binding proteins. *Bioessays* 19:593-603.

- Fukuda, M. und K. Mikoshiba. 2000. Expression of synaptotagmin I or II promotes neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 295:33-36.
- Fulop, V., Z. Bocskei, und L. Polgar. 1998. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* 94:161-170.
- Fulop, V., Z. Szeltner, und L. Polgar. 2000. Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism. *EMBO Rep.* 1:277-281.
- Gallegos, M. E., M. M. Zannatha, E. G. Osornio, A. S. Sanchez, und F. A. Posadas del rio. 1999. The activities of six exo- and endopeptidases in the substantia nigra, neostriatum, and cortex of the rat brain. *Neurochem. Res.* 24:1557-1561.
- Gee, N. S., C. I. Ragan, K. J. Watling, S. Aspley, R. G. Jackson, G. G. Reid, D. Gani, und J. K. Shute. 1988a. The purification and properties of myo-inositol monophosphatase from bovine brain. *Biochem. J.* 249:883-889.
- Gee, N. S., G. G. Reid, R. G. Jackson, R. J. Barnaby, und C. I. Ragan. 1988b. Purification and properties of inositol-1,4-bisphosphatase from bovine brain. *Biochem. J.* 253:777-782.
- Goossens, F., M. De, I. G. Vanhoof, und S. Scharpe. 1992. A sensitive method for the assay of serum prolyl endopeptidase. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30:235-238.
- Goossens, F., M. De, I. G. Vanhoof, und S. Scharpe. 1996. Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34:17-22.
- Goossens, F., G. Vanhoof, M. De, I. K. Augustyns, M. Borloo, D. Tourwe, A. Haemers, und S. Scharpe. 1997. Development and evaluation of peptide-based prolyl oligopeptidase inhibitors--introduction of N-benzyloxycarbonyl-prolyl-3-fluoropyrrolidine as a lead in inhibitor design. *Eur. J. Biochem.* 250:177-183.
- Greene, L. J., A. C. Spadaro, A. R. Martins, W. D. Perussi De Jesus, und A. C. Camargo. 1982. Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension* 4:178-184.
- Griffiths, E. C., J. R. McDermott, und A. I. Smith. 1982. Inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and (3Me-His) TRH by brain peptidases studied by high-performance liquid chromatography. *Neurosci. Lett.* 28:61-65.
- Hagihara, M. und T. Nagatsu. 1987. Post-proline cleaving enzyme in human cerebrospinal fluid from control patients and parkinsonian patients. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 38:387-391.
- Hasebe, T., J. Hua, A. Someya, P. Morain, F. Checler, und I. Nagaoka. 2001. Involvement of cytosolic prolyl endopeptidase in degradation of p40-phox splice variant protein in myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 69:963-968.
- Holloschi, A. und M. Hafner. 2002. A new green fluorescent protein reporter cell line to measure the bioactivity of calcitonin. *Eur. J. Cell Biol.* 79:50.
- Hou, X. E. und A. Dahlstrom. 2000. Synaptic vesicle proteins and neuronal plasticity in adrenergic neurons. *Neurochem. Res.* 25:1275-1300.
- Inagaki, N., H. Fukui, S. Ito, und H. Wada. 1991. Type-2 astrocytes show intracellular Ca²⁺ elevation in response to various neuroactive substances. *Neurosci. Lett.* 128:257-260.
- Irazusta, J., G. Larrinaga, J. Gonzalez-Maeso, J. Gil, J. J. Meana, und L. Casis. 2002. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem. Int.* 40:337-345.
- Ishino, T., S. Ohtsuki, K. Homma, und S. Natori. 1998. cDNA cloning of mouse prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by Swiss 3T3 cells. *J. Biochem.(Tokyo)* 123:540-545.
- Jalonen, T. O., R. R. Margraf, D. B. Wielt, C. J. Charniga, M. L. Linne, und H. K. Kimelberg. 1997. Serotonin induces inward potassium and calcium currents in rat cortical astrocytes. *Brain Res.* 758:69-82.

- Johnston, J. A., M. Jensen, L. Lannfelt, B. Walker, und C. H. Williams. 1999. Inhibition of prolylendopeptidase does not affect gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in a human neuroblastoma cell line. *Neurosci. Lett.* 277:33-36.
- Kabayama, H., K. Takei, M. Fukuda, K. Ibata, und K. Mikoshiba. 1999. Functional involvement of synaptotagmin I/II C2A domain in neurite outgrowth of chick dorsal root ganglion neuron. *Neuroscience* 88:999-1003.
- Kamei, H., T. Ueki, Y. Obi, Y. Fukagawa, und T. Oki. 1992. Protective effect of eurystatins A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors, on scopolamine-induced amnesia in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 60:377-380.
- Kameoka, J., T. Tanaka, Y. Nojima, S. F. Schlossman, und C. Morimoto. 1993. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 261:466-469.
- Kanematsu, T., I. S. Jang, T. Yamaguchi, H. Nagahama, K. Yoshimura, K. Hidaka, M. Matsuda, H. Takeuchi, Y. Misumi, K. Nakayama, T. Yamamoto, N. Akaike, M. Hirata, und K. Nakayama. 2002. Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *EMBO J.* 21:1004-1011.
- Kanematsu, T., Y. Misumi, Y. Watanabe, S. Ozaki, T. Koga, S. Iwanaga, Y. Ikehara, und M. Hirata. 1996. A new inositol 1,4,5-trisphosphate binding protein similar to phospholipase C-delta 1. *Biochem. J.* 313:319-325.
- Kato, A., A. Fukunari, Y. Sakai, und T. Nakajima. 1997. Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283:328-335.
- Kato, T., M. Okada, und T. Nagatsu. 1980. Distribution of post-proline cleaving enzyme in human brain and the peripheral tissues. *Mol. Cell Biochem.* 20:117-121.
- Katsube, N., K. Sunaga, H. Aishita, D. M. Chuang, und R. Ishitani. 1999. ONO-1603, a potential antidementia drug, delays age-induced apoptosis and suppresses overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured central nervous system neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288:6-13.
- Katsube, N., K. Sunaga, D. M. Chuang, und R. Ishitani. 1996. ONO-1603, a potential antidementia drug, shows neuroprotective effects and increases m3-muscarinic receptor mRNA levels in differentiating rat cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 214:151-154.
- Kovacs, G. L. und D. De Wied. 1994. Peptidergic modulation of learning and memory processes. *Pharmacol. Rev.* 46:269-291.
- Kyhse-Andersen, J. 1884. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10:203-209.
- Leammler, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Laitinen, K. S., T. van Groen, H. Tanila, J. Venalainen, P. T. Mannisto, und I. Alafuzoff. 2001. Brain prolyl oligopeptidase activity is associated with neuronal damage rather than beta-amyloid accumulation. *Neuroreport* 12:3309-3312.
- Loster, K., K. Zeilinger, D. Schuppan, und W. Reutter. 1995. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217:341-348.
- Luo, W., T. R. Sharif, P. J. Houghton, und M. Sharif. 1997. CGP 41251 and tamoxifen selectively inhibit mitogen-activated protein kinase activation and c-Fos phosphoprotein induction by substance P in human astrocytoma cells. *Cell Growth Differ.* 8:1225-1240.
- Luo, W., T. R. Sharif, und M. Sharif. 1996. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 56:4983-4991.

- Machleidt W., D.K. Nagler, I. Assfalg-Machleidt, M.T. Stubbs, H. Fritz und E.A. Auerswald. 1995. Temporary inhibition of papain by hairpin loop mutants of chicken cystatin. Distorted binding of the loops results in cleavage of the Gly(9)-Ala10 bond. *FEBS Lett.* 361:185-190.
- Maes, M., F. Goossens, S. Scharpe, J. Calabrese, R. Desnyder, und H. Y. Meltzer. 1995. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 58:217-225.
- Maes, M., F. Goossens, S. Scharpe, H. Y. Meltzer, P. D'Hondt, und P. Cosyns. 1994. Lower serum prolyl endopeptidase enzyme activity in major depression: further evidence that peptidases play a role in the pathophysiology of depression. *Biol. Psychiatry* 35:545-552.
- Manna, T., T. Sarkar, A. Poddar, M. Roychowdhury, K. P. Das, und B. Bhattacharyya. 2001. Chaperone-like activity of tubulin. binding and reactivation of unfolded substrate enzymes. *J. Biol. Chem.* 276:39742-39747.
- Mantle, D., G. Falkous, S. Ishiura, P. J. Blanchard, und E. K. Perry. 1996. Comparison of proline endopeptidase activity in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin. Chim. Acta* 249:129-139.
- Marighetto, A., K. Touzani, N. Etchamendy, C. C. Torrea, G. De Nanteuil, D. Guez, R. Jaffard, und P. Morain. 2000. Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. *Learn. Mem.* 7:159-169.
- Marqueze, B., F. Berton, und M. Seagar. 2000. Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* 82:409-420.
- Marriott, D. R., G. P. Wilkin, und J. N. Wood. 1991. Substance P-induced release of prostaglandins from astrocytes: regional specialisation and correlation with phosphoinositol metabolism. *J. Neurochem.* 56:259-265.
- Meckelein, B., D. C. Marshall, K. J. Conn, M. Pietropaolo, W. Van Nostrund, und C. R. Abraham. 1998. Identification of a novel serine protease-like molecule in human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 55:181-197.
- Mendez, M., C. Cruz, P. Joseph-Bravo, S. Wilk, und J. L. Charli. 1990. Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides* 17:55-62.
- Mentlein, R. 1988. Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett.* 234:251-256.
- Mentlein, R., P. Dahms, D. Grundt, und R. Kruger. 1993. Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul. Pept.* 49:133-144.
- Mentlein, R. und T. Roos. 1996. Proteases involved in the metabolism of angiotensin II, bradykinin, calcitonin gene-related peptide (CGRP), and neuropeptide Y by vascular smooth muscle cells. *Peptides* 17:709-720.
- Mentlein, R., M. von Kolszynski, R. Sprang, und R. Lucius. 1990. Proline-specific proteases in cultivated neuronal and glial cells. *Brain Res.* 527:159-162.
- Mikoshiba, K., M. Fukuda, K. Ibata, H. Kabayama, und A. Mizutani. 1999. Role of synaptotagmin, a Ca²⁺ and inositol polyphosphate binding protein, in neurotransmitter release and neurite outgrowth. *Chem. Phys. Lipids* 98:59-67.
- Misumi, Y., Y. Hayashi, F. Arakawa, und Y. Ikehara. 1992. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* 1131:333-336.
- Miura, N., S. Shibata, und S. Watanabe. 1995. Increase in the septal vasopressin content by prolyl endopeptidase inhibitors in rats. *Neurosci. Lett.* 196:128-130.

- Mochizuki, Y. und T. Takenawa. 1999. Novel inositol polyphosphate 5-phosphatase localizes at membrane ruffles. *J. Biol. Chem.* 274:36790-36795.
- Morain, P., J. L. Robin, G. De Nanteuil, R. Jochemsen, V. Heidet, und D. Guez. 2000. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 50:350-359.
- Moriyama, A., M. Nakanishi, und M. Sasaki. 1988. Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates. *J. Biochem.(Tokyo)* 104:112-117.
- Nagiec, E. W., K. E. Sampson, und I. Abraham. 2001. Mutated tau binds less avidly to microtubules than wildtype tau in living cells. *J. Neurosci. Res.* 63:268-275.
- Nakajima, T., Y. Ono, A. Kato, J. Maeda, und T. Ohe. 1992. Y-29794--a non-peptide prolyl endopeptidase inhibitor that can penetrate into the brain. *Neurosci. Lett.* 141:156-160.
- Nanri, M. und H. Kaneto. 1987. Anti-amnesic effect of prolyl endopeptidase inhibitors in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 89:323-329.
- Nogimori, K., P. J. Hughes, M. C. Glennon, M. E. Hodgson, J. W. Putney, Jr., und S. B. Shears. 1991. Purification of an inositol (1,3,4,5)-tetrakisphosphate 3-phosphatase activity from rat liver and the evaluation of its substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 266:16499-16506.
- O'Cuinn, G. 1998. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochem. Soc. Trans.* 26:279-292.
- O'Leary, R. M., S. P. Gallagher, und B. O'Connor. 1996. Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28:441-449.
- O'Leary, R. M. und B. O'Connor. 1995. Identification and localisation of a synaptosomal membrane prolyl endopeptidase from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 227:277-283.
- Ohmori, T., T. Nakagami, H. Tanaka, und S. Maruyama. 1994. Isolation of prolylendopeptidase-inhibiting peptides from bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:809-815.
- Ohtsuki, S., K. Homma, S. Kurata, und S. Natori. 1997. Molecular cloning of cDNA for Sarcophaga prolyl endopeptidase and characterization of the recombinant enzyme produced by an E. coli expression system. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:337-343.
- Ohtsuki, S., K. Homma, S. Kurata, und S. Natori. 1997. Nuclear localization and involvement in DNA synthesis of Sarcophaga prolyl endopeptidase. *J. Biochem.(Tokyo)* 121:1176-1181.
- Oliver, K. G., J. W. Putney, Jr., J. F. Obie, und S. B. Shears. 1992. The interconversion of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate and inositol tetrakisphosphates in AR4-2J cells. *J. Biol. Chem.* 267:21528-21534.
- Piazza, G. A., H. M. Callanan, J. Mowery, und D. C. Hixson. 1989. Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. *Biochem. J.* 262:327-334.
- Pittaway, K. M., G. P. Reynolds, und P. C. Emson. 1984. Decreased proline endopeptidase activity in the basal ganglia in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 43:878-880.
- Polgar, L. 1991. pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle. *Eur. J. Biochem.* 197:441-447.
- Polgar, L. 1992. Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family. *FEBS Lett.* 311:281-284.
- Polgar, L., E. Kollt, und M. Hollosi. 1993. Prolyl oligopeptidase catalysis. Reactions with thiono substrates reveal substrate-induced conformational change to be the rate-limiting step. *FEBS Lett.* 322:227-230.
- Rawlings, N. D., L. Polgar, und A. J. Barrett. 1991. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochem. J.* 279:907-908.

- Rees, D. C., M. Lewis, R. B. Honzatko, W. N. Lipscomb, und K. D. Hardman. 1981. Zinc environment and cis peptide bonds in carboxypeptidase A at 1.75-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78:3408-3412.
- Rennex, D., B. A. Hemmings, J. Hofsteenge, und S. R. Stone. 1991. cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry* 30:2195-2203.
- Renzetti, A. R., R. M. Catalioto, C. Carloni, M. Criscuoli, P. Cucchi, A. Giolitti, S. Zappitelli, L. Rotondaro, und C. A. Maggi. 1999. Defects of tyrosine289phenylalanine mutation on binding and functional properties of the human tachykinin NK2 receptor stably expressed in chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* 57:899-906.
- Scala-Guenot, D., D. Mougnot, und M. T. Strosser. 1994. Increase of intracellular calcium induced by oxytocin in hypothalamic cultured astrocytes. *Glia* 11:269-276.
- Scanlan, M. J., B. K. Raj, B. Calvo, P. Garin-Chesa, M. P. Sanz-Moncasi, J. H. Healey, L. J. Old, und W. J. Rettig. 1994. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91:5657-5661.
- Schiavo, G., Q. M. Gu, G. D. Prestwich, T. H. Sollner, und J. E. Rothman. 1996. Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93:13327-13332.
- Schneider, J. S., M. Giardiniere, und P. Morain. 2002. Effects of the prolyl endopeptidase inhibitor S 17092 on cognitive deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Neuropsychopharmacology* 26:176-182.
- Selcher, J. C., E. J. Weeber, A. W. Varga, J. D. Sweatt, und M. Swank. 2002. Protein kinase signal transduction cascades in mammalian associative conditioning. *Neuroscientist*. 8:122-131.
- Shao, Y. und K. D. McCarthy. 1995. Receptor-mediated calcium signals in astroglia: multiple receptors, common stores and all-or-nothing responses. *Cell Calcium* 17:187-196.
- Shears, S. B. 1998. The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim. Biophys. Acta* 1436:49-67.
- Shinoda, M., A. Miyazaki, und K. Toide. 1999. Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and on cholinergic and peptidergic neurons in rats with ibotenate-induced lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav. Brain Res.* 99:17-25.
- Shinoda, M., K. Toide, I. Ohsawa, und S. Kohsaka. 1997. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:641-645.
- Shishido, Y., M. Furushiro, S. Tanabe, S. Shibata, S. Hashimoto, und T. Yokokura. 1999. Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 372:135-142.
- Spitznagel, H., J. Baulmann, A. Blume, T. Unger, und J. Culman. 2001. C-FOS expression in the rat brain in response to substance P and neurokinin B. *Brain Res.* 16:11-21.
- Takeuchi, H., M. Oike, H. F. Paterson, V. Allen, T. Kanematsu, Y. Ito, C. Erneux, M. Katan, und M. Hirata. 2000. Inhibition of Ca(2+) signalling by p130, a phospholipase-C-related catalytically inactive protein: critical role of the p130 pleckstrin homology domain. *Biochem. J.* 349:357-368.
- Taylor, W. L., P. C. Andrews, C. K. Henrikson, und J. E. Dixon. 1980. New fluorogenic substrates for a rat brain proline endopeptidase. *Anal. Biochem.* 105:58-64.
- Tezuka, Y., W. Fan, R. Kasimu, und S. Kadota. 1999. Screening of crude drug extracts for prolyl endopeptidase inhibitory activity. *Phytomedicine.* 6:197-203.
- Tischmeyer, W. und R. Grimm. 1999. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol. Life Sci.* 55:564-574.

- Toide, K., M. Shinoda, und A. Miyazaki. 1998. A novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819--its behavioral and neurochemical properties for the treatment of Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 9:17-29.
- Torrens, Y., M. C. Dagué De Montety, M. el Etr, J. C. Beaujouan, und J. Glowinski. 1989. Tachykinin receptors of the NK1 type (substance P) coupled positively to phospholipase C on cortical astrocytes from the newborn mouse in primary culture. *J. Neurochem.* 52:1913-1918.
- Trotter, E. W., L. Berenfeld, S. A. Krause, G. A. Petsko, und J. V. Gray. 2001. Protein misfolding and temperature up-shift cause G1 arrest via a common mechanism dependent on heat shock factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:7313-7318.
- Umemura, K., K. Kondo, Y. Ikeda, T. Kobayashi, Y. Urata, und M. Nakashima. 1997. Pharmacokinetics and safety of JTP-4819, a novel specific orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in healthy male volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 43:613-618.
- Umemura, K., K. Kondo, Y. Ikeda, M. Nishimoto, Y. Hiraga, Y. Yoshida, und M. Nakashima. 1999. Pharmacokinetics and safety of Z-321, a novel specific orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in healthy male volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 39:462-470.
- van Dijken, P., J. C. Bergsma, und P. J. van Haastert. 1997. Phospholipase-C-independent inositol 1,4,5-trisphosphate formation in *Dictyostelium* cells. Activation of a plasma-membrane-bound phosphatase by receptor-stimulated Ca²⁺ influx. *Eur. J. Biochem.* 244:113-119.
- van Dijken, P., J. R. de Haas, A. Craxton, C. Erneux, S. B. Shears, und P. J. van Haastert. 1995. A novel, phospholipase C-independent pathway of inositol 1,4,5-trisphosphate formation in *Dictyostelium* and rat liver. *J. Biol. Chem.* 270:29724-29731.
- Vanhoof, G., F. Goossens, M. De, I. D. Hendriks, und S. Scharpé. 1995. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9:736-744.
- Walter, R., H. Shlank, J. D. Glass, I. L. Schwartz, und T. D. Kerényi. 1971. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* 173:827-829.
- Welches, W. R., K. B. Brosnihan, und C. M. Ferrario. 1993. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci.* 52:1461-1480.
- Welihinda, A. A., W. Tirasophon, und R. J. Kaufman. 1999. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.* 7:293-300.
- Wetzel, R. 1988. Structure, function, nomenclature. *Protein Eng.* 2:1-3.
- Wilk, S. 1983. Prolyl endopeptidase. *Life Sci.* 33:2149-2157.
- Williams, R. S., L. Cheng, A. W. Mudge, und A. J. Harwood. 2002. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature* 417:292-295.
- Williams, R. S., M. Eames, W. J. Ryves, J. Viggars, und A. J. Harwood. 1999. Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. *EMBO J.* 18:2734-2745.
- Yang, X., M. Rudolf, M. A. Carew, M. Yoshida, V. Nerreter, A. M. Riley, S. K. Chung, K. S. Bruzik, B. V. Potter, C. Schultz, und S. B. Shears. 1999. Inositol 1,3,4-trisphosphate acts in vivo as a specific regulator of cellular signaling by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *J. Biol. Chem.* 274:18973-18980.
- Yaron, A. 1987. The role of proline in the proteolytic regulation of biologically active peptides. *Biopolymers* 26 Suppl: S215-222. S215-S222.
- Yaron, A. und D. Mlynar. 1968. Aminopeptidase-P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32:658-663.
- Yaron, A. und F. Naider. 1993. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28:31-81.

- Yoshimoto, T., K. Kado, F. Matsubara, N. Koriyama, H. Kaneto, und D. Tsuru. 1987. Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J. Pharmacobiodyn.* 10:730-735.
- Yoshimoto, T., K. Miyazaki, N. Haraguchi, A. Kitazono, T. Kabashima, und K. Ito. 1997. Cloning and expression of the cDNA encoding prolyl oligopeptidase (prolyl endopeptidase) from bovine brain. *Biol. Pharm. Bull.* 20:1047-1050.
- Yoshimoto, T., T. Nishimura, T. Kita, und D. Tsuru. 1983. Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain. *J. Biochem.(Tokyo)* 94:1179-1190.
- Yoshimura, K., H. Takeuchi, O. Sato, K. Hidaka, N. Doira, M. Terunuma, K. Harada, Y. Ogawa, Y. Ito, T. Kanematsu, und M. Hirata. 2001. Interaction of p130 with, and consequent inhibition of, the catalytic subunit of protein phosphatase 1alpha. *J. Biol. Chem.* 276:17908-17913.
- Zhang, X., J. Rizo, und T. C. Sudhof. 1998. Mechanism of phospholipid binding by the C2A-domain of synaptotagmin I. *Biochemistry* 37:12395-12403.

7 Anhang

Anhang 1 Hergestellte Vektorkonstrukte

Die Konstrukte wurden mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (Kap. 2.3.2) hergestellt. Alle PCR-Produkte wurden zu erst in den Plasmidvektor pPCR-BlueScript (Fa. Stratagene) kloniert. Die Subklonierung der DNA-Fragmente in die Expressionsvektoren erfolgte mit Hilfe spezieller Endonuklease-Erkennungsequenzen. In der chronologischen Reihenfolge fehlende Konstrukte fanden keine Verwendung in der vorliegenden Arbeit. Die markierten **Klone** wurden zur Subklonierung bzw. zur Transfektion humaner Zelllinien eingesetzt. GVO: gentechnisch veränderter Organismus

Konstrukt	pIS-1	pIS-2	pIS-5	pIS-6	pIS-7	pIS-8	pIS-9	pIS-10	pIS-11
Vektor	pPCR-BlueScript	pcDNA3.1	pIRES	pPCR-BlueScript	pEGFP N3	pPCR-BlueScript	pIRES	pPCR-BlueScript	pIRES
Fragment	PEP-ORF AS 442-731	EcoRI-Fragment aus pIS-1 (PEP-ORF AS 442-731)	EcoRI-Fragment aus pIS-1 (PEP-ORF AS 442-731)	PEP-ORF AS 1-731	EcoRI/XhoI-Fragment aus pIS-6 (PEP-ORF AS 1-731)	gesamtORF PEP/EGFP aus pIS-7	NotI-Fragment aus pIS-8 (gesamtORF PEP/EGFP)	gesamtORF PEP/EGFP aus pIS-9 mit PEP-S554A	NotI/blund end - Fragment aus pIS-10 (gesamt ORF PEP/EGFP PEP-S554A)
Klone	pIS-1-MP2	pIS-2-MP24	pIS-5-MP7 pIS-5-MP16	pIS-6-MP1 pIS-6-MP2	pIS-7-MP7 pIS-7-MP16	pIS-8-MP1 pIS-8-MP2	pIS-9-MP10	pIS-10-MP10	pIS-11-MP7
GVO	X110-pIS-1-MP2	X110-pIS-2-MP24	X110-pIS-5-MP7 X110-pIS-5-MP16	X110-pIS-6-MP1 X110-pIS-6-MP2	JM109-pIS-7-MP7 JM109-pIS-7-MP16	X110-pIS-8-MP1 X110-pIS-8-MP2	X110-pIS-9-MP10	X110-pIS-10-MP10	X110-pIS-11-MP7
Verwendung	PCR-Klonierung	Herstellung von PEP- anti sense Zelllinien	Herstellung von PEP- anti sense Zelllinien	PCR-Klonierung	Expression PEP/EGFP-Fusionsprotein	PCR-Klonierung	Expression PEP/EGFP-Fusionsprotein	PCR-Klonierung	Expression von inaktivem PEP/EGFP-Fusionsprotein

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ingo Schulz geboren am 02.03.1968 in Annaberg-Buchholz, an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), August 2002

Lebenslauf

Name: Ingo Schulz

Geburtsdatum: 02.03.1968

Geburtsort: Annaberg-Buchholz

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

09/1974 – 06/1984 Polytechnische Oberschule in Crottendorf

09/1984 – 06/1986 Erweiterte Polytechnische Oberschule in Annaberg-Buchholz

10/1986 – 08/1989 Wehrdienst Nationale Volksmarine in Peenemünde

09/1989 – 03/1992 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Lehramt Biologie und Sport

04/1992 – 05/1995 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

06/1995 – 02/1996 Diplomarbeit zum Thema „*Molekulargenetische Analyse eines Enhancers für Positionseffekt-Variegation bei Drosophila melanogaster*“ unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. habil. G. Reuter und Dr. rer. nat. R. Dorn in der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik im Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

03/1996 – 12/1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Sonderforschungsbereich 363, Molekulare Zellbiologie pflanzlicher Systeme unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. habil. G. Reuter in der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik im Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit 01/1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Firma Probiodrug AG in der Arbeitsgruppe „protein engineering“, unter Leitung von Dr. rer. nat. B. Gerhartz

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmaforschungsunternehmen Probiodrug AG, Halle/S. angefertigt. Ich möchte mich hiermit erneut bei den Firmengründern Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Hans-Ulrich Demuth und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Conrad Glund für das mir geschenkte Vertrauen, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie für die außerordentliche Unterstützung bei der Anfertigung meiner Promotionsarbeit herzlich danken.

Die Anfertigung der Arbeit erfolgte unter Anleitung von Herrn Dr. rer. nat. Bernd Gerhartz. Durch seine hervorragende Betreuung trägt er einen großen Anteil daran, daß ich in der Lage war, die vorliegende Arbeit in diesem Umfang und in dieser Qualität anzufertigen. Deshalb danke ich Ihm ganz besonders. Seine Ratschläge hinsichtlich der Planung, Organisation und Durchführung sowie der Präsentation von wissenschaftlichen Arbeiten haben mich nachhaltig positiv beeinflusst.

Ich möchte mich hier im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls bei Herrn Professor Dr. rer. nat. habil. Gunter Reuter und Herrn Dr. rer. nat. Rainer Dorn, Institut für Genetik, MLU Halle für die mir angediehene genetische und molekularbiologische Ausbildung als studentische Hilfskraft, als Diplomant, sowie als wissenschaftlicher Mitarbeiter herzlich bedanken. Außerdem bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und die Möglichkeit der Nutzung des Konfokalen Laser Scanning Mikroskopes.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Mathias Hafner und Herrn Dipl. Ing. Andreas Holloschi, Zentrum für Med. Forschung Universität Heidelberg, Fachhochschule Mannheim danke ich für die großartige Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei der Planung und Durchführung von Experimenten zur intrazellulären Kalziumfreisetzung sowie zur Adenylat-Cyklase-Kaskade.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Detlef Balschun und Herrn Dr. rer. nat. Maxim Sokolov, Institut für Neurobiologie, Magdeburg danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie für die fachliche Unterstützung.

Herrn Dr. med. Kornhuber und Frau Köhler, Universitätsklinikum Kröllwitz Halle/S. danke ich für die Bereitstellung von humanen Liquorproben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Rolf Mentlein sowie den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, Anatomisches Institut, Christian Albrechts Universität Kiel danke ich für die prima Zusammenarbeit bei der Durchführung von Experimenten mittels EMSA-Technik.

Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaudia Brix, Internationale Universität Bremen danke ich für die wertvollen Hinweise bezüglich immuncytologischer Untersuchungen.

Herrn Dr. Dr. rer. nat. Gerd Hause, Abteilung Bildgebende Verfahren, Biozentrum MLU Halle/S. danke ich ganz besonders für die immer währende kompetente und freundschaftliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung von immuncytologischen und immunhistologischen Untersuchungen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Matthias Brandsch und seinen Mitarbeitern, Abteilung Zellkultur und Tierhaltung, Biozentrum MLU Halle/S. danke ich recht herzlich für die tatkräftige und

freundschaftliche Unterstützung bei der Erlernung grundlegender Techniken zur Kultivierung permanenter Zellkulturen sowie für die fachliche Hilfe bei der Einrichtung und Etablierung eines Zellkulturlabors.

Frau Dr. med. Dagmar Riemann, Institut für medizinische Immunologie, MLU Halle/S. danke ich recht herzlich für die Bereitstellung und teilweise Kultivierung eines Großteiles der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien.

Frau Dr. rer. nat. Margret Köck und Frau Klar, Abteilung Angew. biowiss. Forschung/Isotopenlabor, Biozentrum MLU Halle/S. danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung von radioaktiven Untersuchungen.

Frau Dr. rer. nat. Steffi Kuhfittig, Herrn Andreas Fischer und Herrn Gunnar Schotta, Institut für Genetik, MLU Halle/S. danke ich für die freundschaftliche Unterstützung bei der Nutzung des Konfokalen Laser Scanning Mikroskopes.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Protein engineering* sowie allen anderen Kollegen von Probiodrug AG, Halle/S. danke ich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit sowie die immer währende Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Im einzelnen danke ich herzlich:

Frau Leona Wagner für die Unterstützung bei der Isolierung und Kultivierung von humanen peripheren mononukleären Blutzellen sowie für die anregenden fachlichen Diskussionen,

Frau Anja Weber und Herrn Dr. rer. nat. Torsten Hoffmann für die Blutspende zur Gewinnung von humanem Serum,

Frau Antje Neubauer und Frau Dr. rer. nat. Kirstin Feußner für die Unterstützung bei der Charakterisierung der Prolylendopeptidase-Aktivität und deren spezifische Inhibitoren sowie der Bereitstellung von rekombinanter humaner Prolylendopeptidase,

Frau Izabela Piotrowska für die Hilfestellung bei der Anfertigung von immuncytologischen Präparaten und deren Auswertung,

Herrn Dr. rer. nat. Seamus Buckley für die enorme Unterstützung bei der Anfertigung von Publikationen, Postern und Vorträgen in englischer Sprache,

Frau Dr. rer. nat. Susanne Manhart sowie Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Heiser und Mitarbeiter(innen) für die Synthese und Bereitstellung von Inhibitoren und Oligopeptiden

Herrn Dr. rer. nat. Fred Rosche und Herrn Dr. rer. nat. Raik Wolf für die Unterstützung bei der Durchführung von Analysen mittels MALDI-TOF MS.

Herrn Dr. rer. nat. Torsten Hoffman, Herrn Dr. rer. nat. Gerold Wustmann und Herrn Dr. rer. nat. Jochen Heins für die fachliche Unterstützung,

und Herrn Steffen Böhme für die immer währende Unterstützung bei der Lösung von Problemen hinsichtlich der Geräte- und Computertechnik.

Ich danke meiner lieben Frau Jana von ganzem Herzen für die Geduld, das Verständnis sowie die Hilfe über die vielen Jahre hinweg und drücke unsere beiden Kinder Anna und Matti ganz toll. Meinen lieben Eltern danke ich für alles, besonders dafür, daß sie mir diesen Werdegang ermöglicht haben. Ebenso danke ich meinen Schwiegereltern und allen Großeltern, Verwandten, Bekannten und Freunden für die immer währende Hilfe und Unterstützung unserer Familie.