

**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>]

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.