

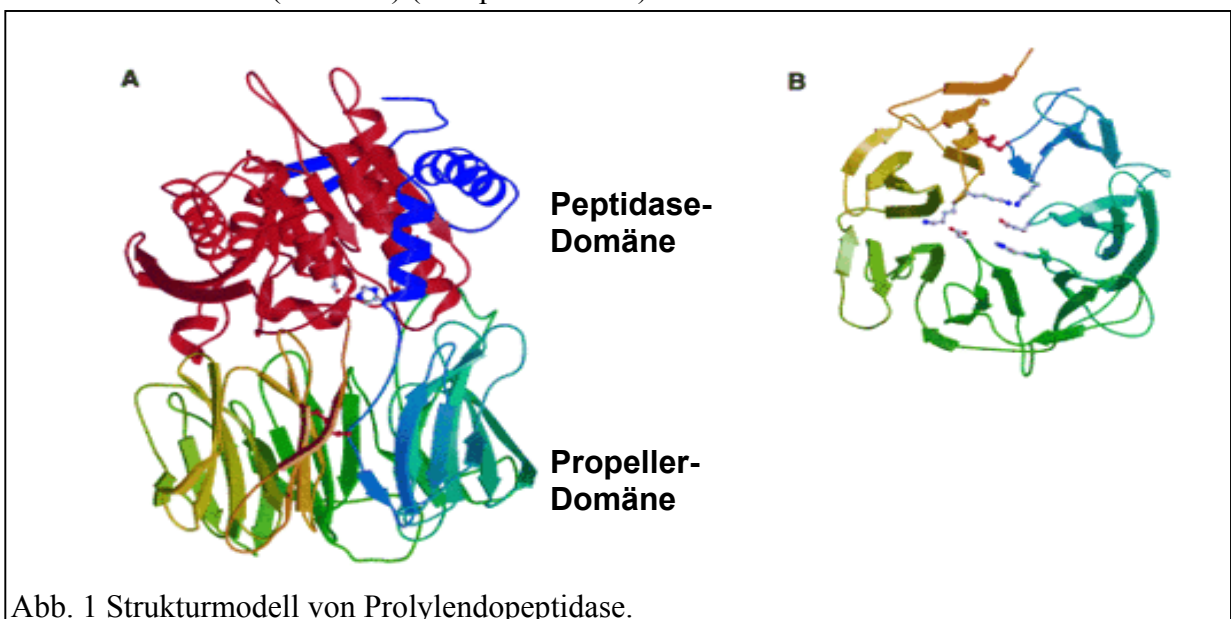
1 Einleitung

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 „Zugangsfiler“ 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.