

## 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. Ibotenat-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 Kompartiments-spezifische 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  $87 \pm 2$  % bzw.  $99 \pm 1$  % 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 Kernlokalisierungen 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 „Kernlokalisierungen“ 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 Chaparon-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 IP<sub>3</sub> 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,  $\beta$ -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  $\mu$ 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 IP<sub>3</sub>-Erhöhung gegenüber der Wildtyp-Zelllinie (Abb. 46). Dies beeinflusst aber nicht das Ergebnis, daß PEP auch die Neuropeptid-vermittelte Stimulation der IP<sub>3</sub>-Synthese beeinflusst. Dem gegenüber wird im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie der allgemeine Verlauf von IP<sub>3</sub>-Synthese und -Abbau nicht durch PEP beeinflusst (Abb. 45).

Zur Aufklärung, inwieweit der beschriebene Effekt von PEP auf die SP-vermittelte IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub>- 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 IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub> 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 $\alpha$  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 IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub>-Konzentration, wurde dies erwartet. Zur Untersuchung des Einflusses von PEP auf die IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub> 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 IP<sub>3</sub>

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 <sup>IP4BP</sup> und Gap1 <sup>m</sup> )	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 $\alpha$	Organisation des Zytoskelett's und des Vesikeltransportes
Golgi Coatomer	cis-trans-Transport von Vesikeln
p130	bindet IP <sub>3</sub> , 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 IP<sub>3</sub> bindet (Kanematsu et al. 1996). Die IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub>-Bindung an p130 zur Beeinflussung neuronaler Prozesse führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß PEP die IP<sub>3</sub>-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 IP<sub>3</sub>-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.