

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.