

**MODULATION DER NEUTRALEN ENDOPEPTIDASE  
IM HUMANEN ZELLKULTURSYSTEM DURCH  
PFLANZLICHE DROGENEXTRAKTE  
UND NATURSTOFFE**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

Eingereicht im  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der  
Freien Universität Berlin

Vorlegt von  
SHEREEN AYOUB  
aus Palästina

Berlin 2007

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hubert Borchert**

**Disputation am: 05.02.2007**

## **Kurzfassung (deutsch)**

Die Neutrale Endopeptidase (Neprilysin, EC 3.4.24.11, NEP) ist eine Metallopeptidase, die ein großes Substratspektrum hat. Ein Einfluss der NEP auf verschiedene pathologische Vorgänge oder Krankheiten wie Bluthochdruck, Adipositas, krankhafte Prostataveränderungen oder Alzheimer-Demenz (AD) ist bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen der NEP und der Alzheimer-Krankheit beschrieben. Weiterhin wurden die Effekte von ausgewählten Arzneipflanzenextrakten wie Grüntee-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen, Ginkgo-biloba-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen, Flavonoiden und anderen ausgewählten Naturstoffen auf die Aktivität der NEP in Zellen der SK-N-SH-Zelllinie, einer humanen Neuroblastomazelllinie, untersucht. Im Anschluss wurden die Wirkungsmechanismen, die diesen Effekten zu Grunde liegen könnten, betrachtet. Die Erhöhung der NEP-Aktivität durch verschiedene ausgewählte Testsubstanzen könnte für die Behandlung der AD durch den Abbau von  $\beta$ -Amyloid-Peptidn ( $A\beta$ ), welche für die AD charakteristisch sind, interessant sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Induktion der NEP-Aktivität auf dem Verhältnis zwischen Zelldifferenzierung und Zellproliferation sowie zusätzlich auf der Erhöhung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in SK-N-SH-Zellen beruht. Zusätzlich sollten in der Arbeit die Einflüsse von ausgewählten Naturstoffen, welche die Aktivität der NEP erhöhten, auf das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE, EC 3.4.15.1) untersucht werden, um die Spezifität dieser Naturstoffe bezüglich ihrer Wirkungen auf die NEP zu prüfen. Auch ACE kann  $A\beta$  abbauen und die Ablagerung von  $A\beta$  hemmen. Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit beider Enzyme zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass manche Testsubstanzen nur die NEP-Aktivität erhöhten ohne die ACE-Aktivität zu beeinflussen. Weiterhin wurde die von den Zellen produzierte und ins Medium sezernierte Menge  $A\beta_{1-42}$  wie auch die cAMP-Konzentration nach der Behandlung der Zellen mit den ausgewählten Testsubstanzen, die die NEP-Aktivität erhöhten, beobachtet. Die Untersuchungen der cAMP-Bildung durch die ausgewählten Substanzen lieferten Ansatzpunkte für die Beziehung zwischen der Erhöhung der NEP-Aktivität und der Erhöhung von cAMP in SK-N-SH-Zellen. Die Induktion der NEP- und der ACE-Aktivität führte zur Hemmung von  $A\beta_{1-42}$ . Es konnte festgestellt werden, dass die Induktion sowohl der NEP- als auch der ACE-Aktivität und die damit verbundene Zunahme des Abbaus von  $A\beta$  einen vielversprechenden neuartigen Ansatz zur Behandlung und/oder zur Prävention der Alzheimer-Krankheit darstellen könnte.

## **Abstract (english)**

The neutral endopeptidase (neprilysin, EC 3.4.24.11, NEP), as a metallopeptidase with a large substrate spectrum, affects different pathological processes or diseases such as hypertonia, Alzheimer's disease, adiposity or pathologic changes of the prostate. In this work, the relation of NEP to Alzheimer's disease was examined in details. Furthermore, the effects of selected natural products such as green tea extract and its constituents, Ginkgo biloba extract and its constituents, flavonoids and other selected natural substances on the specific cellular activity of NEP using the human neuroblastoma cell line SK-N-SH were examined. Also the possible responsible mechanisms for these pharmacological effects were investigated. The increase of the specific cellular activity of NEP by different selected test substances could be interesting for the treatment of Alzheimer's disease by increasing  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) clearance. The results of this work show that the induction of the specific NEP activity depends on the differentiation improvement as well as on the increasing of the concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in SK-N-SH cells. Moreover, the consequences of using selected natural substances, which increased the specific activity of NEP, were examined on the angiotensin-converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) in order to observe the specificity of these substances for the NEP. ACE plays a role in  $A\beta$  degradation and prevents its deposition in the brain. In spite of the large structural similarity of both NEP and ACE enzymes, the results of this work show that many test substances increase only the specific NEP activity without affecting the specific ACE activity. Within this work the effects of the increasing of the specific NEP activity after treating the cells with some selected test substances were observed on the amount of endogenously produced and in medium secreted  $A\beta_{1-42}$  as well as on the concentration of intracellular cAMP. The results of these investigations build a strong base for the relation between the increase of the specific NEP activity and the increase of intracellular cAMP in SK-N-SH cells. The induction of the specific cellular NEP- and ACE-activity leads to the inhibition of  $A\beta_{1-42}$  accumulation. In conclusion, the induction of both NEP- and ACE-activity and the associated increase of the  $A\beta$  destruction could be a promising novel estimation for the treatment and/or the prevention of Alzheimer's disease.

<b>1</b>	<b>  <b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNGEN</b></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>  Alzheimer-Demenz</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Definition, Häufigkeit, Symptome und Warnzeichen .....	1
1.1.2	Pathogenese .....	3
1.1.3	Ursachen und Risikofaktoren .....	7
1.1.4	Therapie .....	14
<b>1.2</b>	<b>  Neutrale Endopeptidase und Abbau von Amyloid-Plaques</b> .....	<b>24</b>
1.2.1	Definition, Funktion und physiologische Bedeutung der NEP .....	26
1.2.2	Abbau von Amyloid-Plaques .....	30
1.2.3	Bedeutung der NEP für den Abbau der Amyloid-Plaques .....	31
<b>1.3</b>	<b>  Ziele der Arbeit</b> .....	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>  <b>MATERIAL UND METHODEN</b></b> .....	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>  Allgemeine Hinweise</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>  Geräte</b> .....	<b>34</b>
2.2.1	Zellkultur .....	34
2.2.2	Sonstige Geräte .....	34
<b>2.3</b>	<b>  Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>35</b>
2.3.1	Untersuchungsmaterialien .....	35
2.3.2	Zellkultur .....	35
2.3.3	Chemikalien .....	37
2.3.4	Puffer und weitere Lösungen .....	38
<b>2.4</b>	<b>  Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>39</b>
2.4.1	Kultivieren und Passagieren von SK-N-SH Zellen .....	39
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	39
<b>2.5</b>	<b>  Methoden der Enzymbestimmungen</b> .....	<b>40</b>
2.5.1	Bestimmung der Aktivität der NEP .....	40
2.5.1.1.	Aufnahme einer Kalibriergeraden für 7-Amino-4-methylcumarin ....	40
2.5.1.2.	NEP-Bestimmung im Akutversuch .....	41
2.5.1.3.	NEP-Bestimmung im Langzeitversuch .....	42
2.5.2	Bestimmung der Aktivität des ACE .....	42
2.5.2.1.	Aufnahme einer Kalibriergeraden für das Reaktionsprodukt aus H- Histidyl-L-Leucin (H-His-L-Leu) und o-Phthalaldehyd .....	42
2.5.2.2.	ACE-Bestimmung im Langzeitversuch .....	43
<b>2.6</b>	<b>  DNA-Bestimmung</b> .....	<b>44</b>
2.6.1	Prinzip der Bestimmung .....	44

2.6.2	Aufnahme einer Kalibriergeraden .....	45
2.6.3	Bestimmung der DNA-Konzentration in 24-Well Zellkulturplatten.....	46
<b>2.7</b>	<b>Bestimmung des <math>\beta</math>-Amyloid-Peptids (1-42).....</b>	<b>46</b>
2.7.1	Vorbereitung der Lösungen .....	47
2.7.2	Vorbereitung der Testproben.....	47
2.7.2.1.	Erste Experimentserie.....	47
2.7.2.2.	Zweite Experimentserie.....	48
2.7.3	Messverfahren.....	48
<b>2.8</b>	<b>Bestimmung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP).....</b>	<b>49</b>
2.8.1	Vorbereitung der Testproben.....	49
2.8.2	Isolierung des intrazellulären cAMP .....	49
2.8.3	Vorbereitung der Lösungen .....	50
2.8.4	Messverfahren.....	51
<b>2.9</b>	<b>Hämatoxylin-Färbung von Zellkulturen nach Arabinosylcytosin-Behandlung .....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von Grüntee-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation.....</b>	<b>53</b>
3.1.1	Einfluss des Grüntee-Extrakts .....	53
3.1.2	Untersuchung von Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin .....	54
3.1.3	Untersuchung von Polyphenolen: (-) Epicatechin, (-)Epigallocatechin und Epigallocatechingallat.....	57
<b>3.2</b>	<b>Einfluss von Ginkgo-biloba-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation.....</b>	<b>60</b>
3.2.1	Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts.....	60
3.2.2	Einfluss von Bilobalid, Ginkgolid A, Ginkgolid B und Amentoflavon .....	61
3.2.3	Einfluss von Bilobalids und der Ginkgolide A und B in Kombination.....	62
<b>3.3</b>	<b>Einfluss von Flavonoiden auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation .....</b>	<b>63</b>
<b>3.4</b>	<b>Untersuchung von weiteren Naturstoffen .....</b>	<b>65</b>
<b>3.5</b>	<b>Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen der untersuchten Extrakte und Reinsubstanzen .....</b>	<b>67</b>
3.5.1	Blockade der Synthese von DNA durch Arabinosylcytosin.....	67

3.5.2	Einfluss von ausgewählten untersuchter Substanzen in Kombination mit Arabinosylcytosin .....	70
3.5.3	Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram .....	71
<b>3.6</b>	<b>Einfluss ausgewählter Substanzen auf die ACE-Aktivität .....</b>	<b>73</b>
3.6.1	Einfluss von Coffein und Theophyllin .....	73
3.6.2	Einfluss von EC und EGC in Kombination .....	74
3.6.3	Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts .....	75
3.6.4	Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram .....	76
3.6.5	Einfluss von Apigenin und Luteolin .....	77
3.6.6	Einfluss von Vinpocetin, Curcumin und Triiodotyronin .....	78
<b>3.7</b>	<b>Einfluss von ausgewählten Substanzen auf die Menge von endogen gebildetem <math>\beta</math>-Amyloid-Peptid 1-42 (<math>A\beta</math>1-42) .....</b>	<b>79</b>
3.7.1	Erste Experimentserie .....	80
3.7.2	Zweite Experimentserie .....	81
<b>3.8</b>	<b>Einfluss von ausgewählten Testsubstanzen auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration .....</b>	<b>83</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
<b>4.1</b>	<b>Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Grüntee-Extrakt und seine Inhaltsstoffe .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2</b>	<b>Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Ginkgo-biloba-Extrakt und seine Inhaltsstoffe .....</b>	<b>90</b>
<b>4.3</b>	<b>Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Flavonoide .....</b>	<b>92</b>
<b>4.4</b>	<b>Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch weitere Substanzen .....</b>	<b>93</b>
<b>4.5</b>	<b>Beeinflussung der NEP-Aktivität durch Arabinosylcytosin und andere ausgewählte Substanzen in Kombination mit Arabinosylcytosin .....</b>	<b>97</b>
<b>4.6</b>	<b>Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram .....</b>	<b>98</b>
<b>4.7</b>	<b>Beeinflussung der ACE-Aktivität und der Zellproliferation durch ausgewählte Substanzen .....</b>	<b>99</b>
<b>4.8</b>	<b>Beeinflussung der Menge von endogen produzierten <math>A\beta</math>1-42 durch ausgewählte Substanzen .....</b>	<b>100</b>

<b>4.9</b>	<b>Beeinflussung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch ausgewählte Substanzen .....</b>	<b>104</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>114</b>