

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) ist ein interessantes Target in der Forschung der Alzheimer-Demenz (AD). Überexpression und/oder eine physiologisch gesteigerte Aktivität der NEP haben für den Abbau von  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ) und für die Verhinderung der Ablagerung von  $A\beta$ , welches für die Entstehung und Progression der AD verantwortlich ist, eine funktionelle Bedeutung. Seit kurzem gilt die Stimulation von NEP und anderen Enzymen, die  $A\beta$  abbauen, als therapeutischer Ansatz für die AD. Auch Angiotensin-Converting Enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) kann  $A\beta$  abbauen und die Ablagerung von  $A\beta$  hemmen. Zahlreiche Studien mit Grünem Tee, Ginkgo-biloba und Flavonoiden belegen einen neuroprotektiven Effekt dieser Naturprodukte. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Grüntee-Extrakt und seine Inhaltsstoffe, Ginkgo-biloba-Extrakt und seine Inhaltsstoffe, ausgewählte Flavonoide und andere ausgewählte Substanzen die NEP- und ACE-Aktivität in SK-N-SH-Zellen beeinflussen und welche Mechanismen dafür verantwortlich sein könnten. Zusätzlich wurde der Induktionseffekt der NEP- und ACE-Aktivität durch die ausgewählten Substanzen hinsichtlich der Menge von  $A\beta_{1-42}$ , die von SK-N-SH-Zellen produziert und im Medium sekretiert wird, beobachtet.

- Erstmals wurde ein konzentrationsabhängiger Induktionseffekt bezüglich der Aktivität von NEP durch Grüntee-Extrakt, Coffein, Theophyllin, Theobromin, Theanin, Deoxyepigallocatechin gallate, Ginkgo-biloba-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Vinpocetin, und Curcumin im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet.
- Dieser Induktionseffekt wurde von einer Proliferationshemmung der SK-N-SH-Zellen begleitet. Dieser könnte so interpretiert werden, dass die Zunahme der zellulären Enzym-Aktivität mit einer erhöhten Zelldifferenzierung verbunden ist.
- Zusätzlich konnte die Kombination zwischen Arabinosylcytosin und ausgewählten Substanzen, wie Apigenin, Luteolin, Vinpocetin und EC, EGC, EGCG in Kombination mit Coffein als Einzelstoffe zeigen, dass der Induktionseffekt der NEP-Aktivität durch die untersuchten Substanzen unabhängig von der Zellproliferationshemmung war. Rolipram, Forskolin und Dibutyryl-cAMP konnten die NEP-Aktivität induzieren ohne die Zellproliferation zu beeinflussen.

- 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-Aktivität könnte auf einer Stimulation der Zelldifferenzierung basieren.
- Um die Spezifität der untersuchten Substanzen auf die NEP-Aktivität aufzuzeigen, wurde ihr Effekt auch auf die ACE-Aktivität untersucht. Grüntee-Extrakt, Ginkgo-biloba-Extrakt, Coffein und Theophyllin konnten die ACE-Aktivität im Vergleich zu NEP nur leicht induzieren. Rolipram, Forskolin und Dibutyryl-cAMP hatten keinen Effekt auf die ACE-Aktivität, während Apigenin, Luteolin und Vinpocetin sowohl die ACE- als auch die NEP-Aktivitäten signifikant induzieren konnten.
- Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Erhöhung der NEP und ACE-Aktivitäten durch Apigenin, Luteolin und Curcumin zur Hemmung der produzierten und ins Medium sezernierten Menge an A $\beta$ 1-42 führen. Der Kurzeiteffekt des Grüntee-Extrakts führte zur direkten Hemmung der NEP-Aktivität und zu einer Zunahme von endogenem A $\beta$ 1-42 um 162 %. Der Grüntee-Extrakt ist ein direkt NEP-Inhibitor. Die gesteigerte NEP-Aktivität durch den Langzeiteffekt des Grüntee-Extrakts führte zu einer Zunahme von endogenem A $\beta$ (1-42) um 34 %. Diese Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass Apigenin, Luteolin und Curcumin in den Langzeitversuchen sowohl die NEP- als auch die ACE-Aktivität erhöhen, während der Grüntee-Extrakt die NEP-Aktivität erhöhte ohne die ACE-Aktivität zu beeinflussen.
- Die Induktion sowohl der NEP- als auch der ACE-Aktivität könnte einen vielversprechenden neuartigen Ansatz zur Behandlung und/oder Prävention der AD durch die Zunahme des Abbaus von A $\beta$  darstellen.

## 6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die NEP beeinflusst eine Vielzahl von physiologischen/ pathophysiologischen Prozessen, indem sie endogene Mediatoren mit Peptidstruktur hydrolysiert. Aus diesen vielfältigen Funktionen des Enzyms können bestimmte pathologische Vorgänge durch eine pharmakologische Modulation der NEP (Aktivierung oder Hemmung) beeinflusst werden (z. B. Blutdruck, Adipositas, Alzheimer-Demenz (AD)).

In den letzten 10-15 Jahren wurde die Möglichkeit einer Hochregulierung der NEP besonders in Zusammenhang mit der AD häufiger diskutiert (Iwata et al. 2005), aber realistische Behandlungsansätze fehlen immer noch. Die gentechnischen Ansätze zur Erhöhung der NEP-Aktivität bei Mäusen unter Nutzung von Lentiviren als Genfähren (Marr et al. 2003) sind sicher kein praktikabler Weg als Therapieform der näheren Zukunft. Die Induktion der NEP-Aktivität an Zellmodellen durch Somatostatin, Quercetin, Resveratrol und Grüntee-Extrakt sind viel versprechende Ansatzpunkte für spätere Arzneimittelentwicklungen (Saito et al. 2005; Melzig et al. 2002; 2003). Die Erhöhung der NEP-Aktivität könnte auch für die Behandlung des Adipositas förderlich sein. Bei übergewichtigen Mäusen wird eine Reduktion des Körpergewichtes durch die regelmäßige Gabe von Epigallocatechinen, welche in großem Maß in Grüntee-Extrakt vorkommen, beobachtet (Klaus et al. 2005). Gleichzeitig muss aber das Risiko einer unerwünschten Beeinflussung anderer Funktionen, wie der Regulierung des Blutdrucks und der Natriurese, beachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen NEP und der AD beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es nicht nur, die Einflüsse von ausgewählten Arzneipflanzenextrakten auf die NEP-Aktivität in SK-N-SH-Zellen in vitro hinsichtlich einer Induktion des Abbaus von  $\beta$ -Amyloid-Peptid ( $A\beta$ ) zu untersuchen, sondern auch Ansätze zu den möglichen Wirkungsmechanismen der vermuteten neuroprotektiven Wirkung der ausgewählten Drogen und Naturstoffe bei neurodegenerativen Erkrankungen aufzuzeigen. Zusätzlich sollten in der Arbeit die Einflüsse von ausgewählten Naturstoffen, welche die Aktivität der NEP erhöhten, auf das Enzym ACE untersucht werden, um die Spezifität dieser Naturstoffe bezüglich ihrer Wirkungen auf die NEP zu prüfen.

Trotz der großen Ähnlichkeit beider Enzyme zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass manche Testsubstanzen nur die NEP-Aktivität erhöhten ohne die ACE-Aktivität zu

beeinflussen. Dies könnte damit erklärt werden, dass die beiden Enzyme mit unterschiedlichen Mechanismen induzierbar sind. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Struktur der Enzyme auf DNA-Ebene bzw. die unterschiedlichen Mechanismen der Transkriptionssteuerung sein. Die Erhöhung der cAMP-Bildungsrate könnte eine gesteigerte CREB-Phosphorylierung (cAMP responsive element-binding protein, als Transkriptionsfaktor) verursachen. Bis jetzt gibt es keine Studien, die auf einen Zusammenhang zwischen NEP-Gen-Expression und CREB-Phosphorylierung hinweisen. Für manche der untersuchten Substanzen in der Arbeit (Rolipram, Forskolin, Dibutyryl-cAMP, Apigenin, Luteolin und Catechine) wurde nachgewiesen, dass sie die Expression und die Phosphorylierung von CREB erhöhen können. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die These aufgestellt, dass die Aktivierung von CREB-Phosphorylierung die Gen-Expression der NEP induzieren könnte. Künftig sollte durch weitere Untersuchungen die Beziehung zwischen CREB und Gen-Expression der NEP sowie der Zusammenhang zwischen der Erhöhung des cAMP-Niveaus und der Induktion der NEP- und ACE-Aktivität (die hier vorgestellten Ansätze) abgeklärt werden.