

# **Neprilysin – Ein Schlüsselenzym zur Behandlung der Adipositas**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
*Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)***

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Nils Tappenbeck  
aus Braunschweig**

**im Jahr 2013**

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2009 bis Februar 2013 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Walther an der Hull York Medical School in Hull, England, und dem ECCPS in Gießen durchgeführt. Im Rahmen der Arbeit gab es zwei Forschungsaufenthalte am FMP in Berlin und am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mannheim.

**1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Walther**

**Disputation am 04.07.2013**

## Abkürzungsverzeichnis:

A $\beta$	Amyloid $\beta$ -Peptid
Abz	<i>o</i> -Aminobenzoyl
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
Agp	$\alpha$ -Amino-3-guanidino-propionsäure
AgRP	Agouti-verwandtes Protein
AICD	Intrazelluläre Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins
Amp	Ampicillin
ANP	Arteriell natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BGH	Rinder-Wachstumshormon
BMI	Body mass index
BSA	Bovines Serumalbumin
CALLA	Alternative Bezeichnung für Nephrylin (engl.: common acute lymphoblastic leukemia antigen)
CART	Kokain- und Amphetamin reguliertes Transkript
CCK	Cholecystokinin
CIP	Kalbsdarm Phosphatase (calf intestine phosphatase)
CMV	Cytomegalievirus
CRH	Corticotropin-freisetzende Hormon
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDDnp	2,4-dinitrophenyl
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM-2	Endotheliales Wachstumsmedium
FCS	Fetales Kälberserum
GIP(R)	Glucose-abhängiges insulinotropisches Polypeptid (Rezeptor)
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GRP-10	Gastrin freisetzendes Peptid-10
GTE	Grüner Tee-Extrakt

EC-Nummer	Enzyme Commission-Nummer
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, Ausgabe 10
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kb	Kilobasen
LPS	Lipopolysaccharide
MC4R	Melanocortinrezeptor 4
MCH	Melanin konzentrierendes Hormon
<i>MME</i>	Bezeichnung des NEP-codierenden Gens (Membranmetalloendopeptidase)
mRNA	Boten-RNA
NEP	Nepilysin
NPY	Neuropeptid Y
NSE	Neuron-spezifische Enolase
OXM	Oxyntomodulin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POMC	Proopiomelanocortin
PP	pankreatisches Polypeptid
PYY	Peptid YY
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRH	Thyreotropin-freisetzende Hormon
UTB	untranslatierter Bereich
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die Abkürzungen zur Bezeichnung der Aminosäuren und Nukleotide entsprechen der Drei- bzw. Ein-Buchstaben-Nomenklatur.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Beschreibung und Klassifizierung von Enzymen .....	1
1.2. Beschreibung des Enzyms Neprilysin .....	2
1.2.1. Die Entdeckung des Enzyms .....	2
1.2.2. Struktur und molekulare Eigenschaften .....	3
1.2.3. Lokalisation und Expression .....	6
1.2.4. Pharmakologisch bedeutsame Funktionen von NEP .....	7
1.2.4.1. Hydrolyse der Enkephaline.....	7
1.2.4.2. Hydrolyse der natriuretischen Peptide.....	8
1.2.4.3. Hydrolyse des Amyloid $\beta$ -Peptids.....	8
1.2.4.4. NEP in der Krebsdiagnostik.....	9
1.3. Transgene Tiermodelle .....	10
1.3.1. Einsatz transgener Tiermodelle in der Forschung.....	10
1.3.2. Erkenntnisse aus NEP-knockout-Mäusen.....	11
1.4. Adipositas und Regulation der Nahrungsaufnahme .....	12
1.4.1. Adipositas: Definition, Ursachen und Folgen .....	13
1.4.2. Behandlung der Adipositas .....	15
1.4.3. Molekulare Regulation der Nahrungsaufnahme .....	17
1.4.3.1. Entdeckung des anorexigenen Peptids Leptin.....	17
1.4.3.2. Hunger regulierende Hormone im peripheren System.....	19
1.4.3.3. Signalverarbeitung im Hypothalamus .....	20
1.5. Ziel der Arbeit .....	22
<b>2. Material</b> .....	<b>23</b>
2.1. Chemikalien .....	23
2.2. Lösungen und Puffer (in alphabetischer Reihenfolge).....	23
2.3. Enzyme.....	25
2.4. Bakterienstämme .....	25

2.5. Zelllinien .....	26
2.6. Nährmedien für Bakterien .....	26
2.7. Zellkulturlösungen und – medien .....	27
2.8. Vektoren und Plasmide .....	27
2.8.1. Kommerziell erhältliche Vektoren.....	27
2.8.2. Erstellte und genutzte Plasmide .....	28
2.9. Oligonukleotide und Primer Assays .....	29
2.10. Antikörper .....	29
2.10.1. Primäre Antikörper.....	29
2.10.2. Sekundäre Antikörper.....	30
2.11. Verwendete Mausstämme .....	30
<b>3. Methoden.....</b>	<b>31</b>
3.1. Zellbiologische Methoden .....	31
3.1.1. Kultivierung von neuronalen Zelllinien .....	31
3.1.1.1. SK-N-SH .....	31
3.1.1.2. Neuro-2a .....	31
3.1.2. Kultivierung von endothelialen Zelllinien .....	31
3.1.2.1. BAEC, PAEC.....	31
3.1.2.2. HDMEC.....	32
3.1.3. Kultivierung anderer Zelllinien.....	32
3.1.3.1. COS-7und HEK293 Zellen .....	32
3.1.4. Auftauen eingelagerter Zellen.....	32
3.1.5. Quantifizierung von Zellen .....	32
3.1.6. Einfrieren von Zellen.....	33
3.1.7. Transfektionstechniken.....	33
3.1.7.1. Transfektion mit PolyFect (Quiagen) .....	33
3.1.7.2. Transfektion mit Lipofectamine®2000 (Invitrogen) .....	34
3.1.7.3. Transfektion mit FuGene (Roche) .....	34

3.1.8.	Anfärben von Zellen mit X-Gal.....	34
3.1.9.	Stimulation von NEP in Zellekulturversuchen .....	35
3.1.9.1.	Akute Zellstimulation zur Aktivitätsbestimmung .....	35
3.1.9.2.	Zellstimulation für 24 Stunden, 48 Stunden und 96 Stunden zur Aktivitätsbestimmung.....	35
3.1.9.3.	Zellstimulation für 24 Stunden für Untersuchung der RNA-Expression .....	36
3.2.	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.2.1.	Klonierungstechniken .....	36
3.2.1.1.	Restriktionsverdau von DNA .....	36
3.2.1.2.	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	36
3.2.1.3.	Auffüllen des Überhangs an DNA-Enden mit Klenow-Fragment.....	37
3.2.1.4.	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese .....	37
3.2.1.5.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	37
3.2.1.6.	Phenol/Chloroform-Reinigung .....	38
3.2.1.7.	Bestimmung der DNA Konzentration.....	38
3.2.1.8.	Ligation .....	38
3.2.1.9.	TA-Klonierung .....	39
3.2.1.10.	Transformation in Bakterien .....	39
3.2.2.	Präparation von Plasmid-DNA.....	39
3.2.2.1.	Mini-Präparation.....	39
3.2.2.2.	Maxi-Präparation.....	40
3.2.3.	Präparation von genomischer DNA aus Mausohren .....	40
3.2.4.	Genotypisierung mittels PCR.....	40
3.2.5.	Ortsspezifische Mutagenese.....	41
3.2.6.	Isolierung von RNA.....	42
3.2.7.	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) .....	42
3.3.	Biochemische Methoden.....	42
3.3.1.	Homogenisation von Gewebe.....	42
3.3.2.	Membranpräparation aus Gewebehomogenaten.....	42

3.3.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	43
3.3.4.	Western Blot Analyse .....	43
3.3.4.1.	SDS-Gelelektrophorese.....	43
3.3.4.2.	Coomassie-Färbung.....	43
3.3.4.3.	Elektrophoretischer Transfer („Blotten“).....	44
3.3.4.4.	Ponceaurot-Färbung .....	44
3.3.4.5.	Immunfärbung der Proteine auf Nitrocellulosemembran.....	44
3.3.5.	NEP-Aktivitätsmessung .....	45
3.3.5.1.	DALEK-Methode .....	45
3.3.5.2.	Fluoreszenzmethode.....	45
3.3.5.3.	High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)-Analysen .....	46
3.4.	Versuche am Mausmodell.....	46
3.4.1.	Einfluss von GTE auf fettleibige BMFI-Mäuse.....	46
3.4.2.	Einfluss von GTE auf NEP-defiziente Mäuse .....	47
3.4.3.	Tötung und Organentnahme.....	47
3.5.	Statistik.....	47
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1.	Entwicklung einer fluorimetrischen Methode zur spezifischen Bestimmung der NEP-Aktivität .....	48
4.1.1.	Hydrolyse des Substrates Abz-Gly-Gly- <sup>D</sup> Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp durch NEP	48
4.1.2.	Untersuchung des Substratabbaus in Nierenhomogenaten .....	51
4.1.3.	Untersuchung des Substratabbaus in Lungengewebe .....	54
4.1.4.	Untersuchung des Substratabbaus in weiteren Organen .....	55
4.1.5.	Identifizierung der Produkte mittels Massenspektrometrie .....	57
4.1.6.	Untersuchungen des NEP spezifischen Produkts Abz-Gly-Gly- <sup>D</sup> Phe-Leu-Arg-Arg.	58
4.1.7.	Reaktivität des veränderten Substrats Abz-Gly-Gly- <sup>D</sup> Phe-Leu- <sup>D</sup> Arg-Arg-Val-EDDnp in Nierenhomogenaten .....	60
4.1.8.	Reaktivität des veränderten Substrats Abz-Gly-Gly- <sup>D</sup> Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp in murinen Nieren .....	61



4.1.9.	Untersuchung des Substratabbaus in Lungengewebe .....	62
4.1.10.	Untersuchung des Substratabbaus in weiteren Organen .....	63
4.1.11.	Reaktivität der Substrate im Zellkulturversuch .....	65
4.2.	Entwicklung neuer transgener Mausmodelle mit gewebespezifischer Überexpression von NEP .....	67
4.2.1.	NEP-Überexpression in neuronalen Zellen .....	67
4.2.1.1.	Klonierung des pNSEmNEP-Vektors.....	68
4.2.1.2.	Überprüfung der zellspezifischen Aktivität von pNSEmNEP .....	70
4.2.1.3.	Klonierung von pNSEmNEP-2 und Überprüfung der zellspezifischen Aktivität ...	74
4.2.1.4.	Genotypisierung der Mäuse zur Identifizierung transgener Tiere.....	76
4.2.1.5.	Bestimmung der NEP-Aktivität in transgenen Tieren .....	77
4.2.2.	NEP-Überexpression in endothelialen Zellen.....	78
4.2.2.1.	Generierung des Plasmids pTie2P .....	79
4.2.2.2.	Generierung des Plasmids pT2mNEP .....	80
4.2.2.3.	Generierung des Plasmids pTie2mNEP-s .....	81
4.2.2.4.	Generierung des Plasmids pTie2mNEP .....	83
4.2.2.5.	Untersuchung der NEP-Aktivität der Plasmide in COS7-Zellen .....	87
4.2.2.6.	Untersuchung der NEP-Aktivität der Plasmide in Endothelzellen.....	88
4.2.2.7.	Erstellung und Identifizierung transgener Tiere .....	89
4.2.2.8.	Genotypisierung der Tiere .....	90
4.3.	Stimulation von NEP mit verschiedenen Substanzen in Zellkulturversuchen.....	92
4.3.1.	Einfluss von GW0742 auf die NEP-Aktivität.....	92
4.3.2.	Einfluss von Grünem Tee-Extrakt und Fraktionen des Grünen Tee-Extrakts auf die NEP-Aktivität .....	93
4.3.2.1.	Stimulation von SK-N-SH-Zellen .....	93
4.3.2.2.	Stimulation von Endothelzellen.....	97
4.3.3.	Hochdurchsatz-Suche zur Identifizierung NEP stimulierender Substanzen.....	103
4.3.3.1.	Stimulation von SK-N-SH-Zellen .....	104
4.3.3.2.	Stimulation von endothelialen Zellen .....	107
4.4.	Einfluss von GTE auf die Gewichtsentwicklung in Mäusen .....	112

4.4.1.	Einfluss von GTE auf fettleibige BMFI-Mäuse.....	112
4.4.2.	Einfluss von GTE auf NEP-defiziente Mäuse .....	115
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>118</b>
5.1.	Entwicklung einer fluorimetrischen Methode zur Messung der NEP-Aktivität .....	118
5.1.1.	Validierung der NEP-Spezifität von Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp..	119
5.1.2.	Validierung der Reaktivitäten der veränderten Substrate .....	122
5.2.	Generierung neuer transgener Mausmodelle .....	124
5.2.1.	Generierung des Mausmodells mit neuronaler Überexpression .....	125
5.2.2.	Generierung des Mausmodells mit endothelialer Überexpression.....	126
5.3.	Versuche zur Stimulation von NEP .....	128
5.3.1.	Einfluss akuter Stimulation auf die NEP-Aktivität .....	130
5.3.2.	Einfluss von GW0742 auf die NEP-Aktivität.....	130
5.3.3.	Einfluss längerfristiger Stimulation von GTE und den daraus erhaltenen Fraktionen auf die NEP-Aktivität.....	131
5.3.4.	Einfluss längerfristiger Stimulation mit den Substanzen aus dem HTS auf die NEP-Aktivität.....	133
5.4.	Einfluss von GTE auf die Gewichtsentwicklung in Mäusen .....	135
5.4.1.	Einfluss von GTE auf fettleibige BMFI-Mäuse.....	136
5.4.2.	Einfluss von GTE auf NEP-defiziente Mäuse .....	138
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>141</b>
<b>7.</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>143</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>145</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>161</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>162</b>

# 1. Einleitung

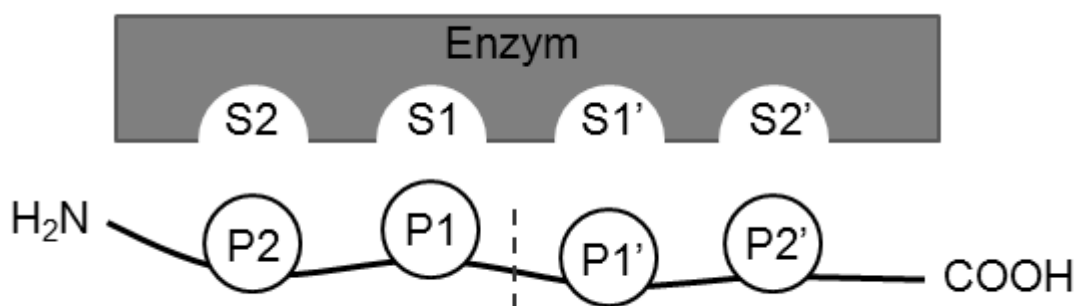
## 1.1. Beschreibung und Klassifizierung von Enzymen

Enzyme sind solche Proteine, die eine oder mehrere biochemische Reaktionen katalysieren können. Im lebenden Organismus steuern diese Moleküle fast alle ablaufenden Reaktionen, und sind somit von entscheidender biologischer und auch pharmakologischer Bedeutung. Das Verständnis von Struktur und Funktion eines bestimmten Enzyms ermöglicht dabei eine gezielte Manipulation des Systems, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Die Enzyminhibition hat hierbei schon sehr viele Therapiemöglichkeiten eröffnet. Mit der Hemmung von Cyclooxygenasen durch Acetylsalicylsäure (Aspirin) zur Entzündungshemmung (Vane und Botting, 2003), oder den verschiedenen Hemmern des Enzyms Angiotensin-konvertierendes Enzym (*Angiotensin-Converting Enzyme*, ACE), die zur Blutdruckregulation eingesetzt werden (Edwards und Padfield, 1985; Bicket, 2002; Brugts *et al.*, 2009), seien hier nur zwei Beispiele genannt. Es kann jedoch auch wünschenswert sein, ein Enzym zu stimulieren, um positive enzymatische Effekte zu verstärken. Die direkte Aktivierung eines Enzyms gelang bislang nur in wenigen Fällen als allosterische Aktivierung, wie bei der Glukokinase (Grimsby *et al.*, 2003). Häufiger wird die Expression eines Zielenzym erhöht, und hierüber der gewünschte Effekt erzielt.

Zur Klassifizierung von Enzymen gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Das wohl am häufigsten genutzte System zur systematischen Benennung von Enzymen ist die von der „*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*“ (IUBMB) vorgeschlagene Nomenklatur der *Enzyme Commission*-Nummern (EC-Nummern). Dabei wird jedem bekannten Enzym, entsprechend der Natur der chemischen Reaktion die es katalysiert, eine EC-Nummer zugeteilt. Jede EC-Nummer besteht aus vier durch Punkte voneinander getrennten Zahlen. Dem im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Enzym Nephilysin, das im folgenden Kapitel eingehend beschrieben wird, wurde die EC-Nummer EC3.4.24.11 zugeordnet. Dies bedeutet: das Enzym ist eine Hydrolase (3), die auf eine Peptidbindung einwirkt (Peptidase) (4); es gehört zur Gruppe der Metalloendopeptidasen (24) und hydrolysiert Polypeptide hauptsächlich zwischen hydrophoben Gruppen, im Besonderen mit Phenylalanin oder Tyrosin an der P1'-Position (11). Die P1'-Position wird durch das *substrate-Positions and enzyme-Subsite*-Modell definiert (siehe Abb. 1). Nach dieser Nomenklatur wird die erste Aminosäure (AS) unmittelbar vor der Spaltstelle des peptidischen Substrates (in N-terminaler Richtung) mit P1 bezeichnet. Die nächsten AS in N-terminaler Richtung erhalten die Bezeichnungen P2, P3 usw. In C-terminaler Richtung von der Spaltstelle werden die AS mit P1', P2', P3' usw. benannt. Die Bindungsstellen des Enzyms werden mit S1, S2, S3 usw. bzw. S1', S2', S3' usw. bezeichnet, wobei eine

Enzymbindungsstelle allerdings nicht zwangsläufig auf eine komplementäre AS beschränkt ist, sondern auch mehrere AS aufnehmen kann.

Zur Benennung der sehr großen Gruppe der Peptidasen wurde eine weitere Nomenklatur von der MEROPS-Gruppe vorgeschlagen (Rawlings *et al.*, 2012). Die Peptidase wird dabei zuerst nach ihrem katalytischen Typ, und anschließend aufgrund evolutionärer Ähnlichkeiten, die mit Hilfe von Sequenzanalysen identifiziert werden, in Familien eingeteilt. Familien mit demselben evolutionären Vorgänger werden in einem Clan zusammengefasst. Nach dieser Nomenklatur erhält Neprilysin die Bezeichnung M13.001 und begründet die M13 Familie, wobei das M für den katalytischen Typ der Metallopeptidasen steht und die 13 eine willkürlich zugewiesene Nummer für die Neprilysinfamilie ist.



**Abb. 1** Schematische Darstellung der Bindung eines Enzymes an sein Substrat nach dem *substrate-Positions and enzyme-Subsite-Modell*. Die Hydrolysierungsstelle im Substrat ist durch die gestrichelte Linie markiert (P: N-terminal der Schnittstelle gelegene Aminosäuren; P': C-terminal der Schnittstelle gelegene Aminosäuren; S und S': Enzymbindungsstellen).

## 1.2. Beschreibung des Enzyms Neprilysin

### 1.2.1. Die Entdeckung des Enzyms

Neprilysin wurde erstmals 1968 als eine mikrosomale Peptidase in Rattennieren beschrieben, die bei neutralem pH-Wert aktiv ist und die B-Kette des Insulins hydrolysiert (Wong-Leung und Kenny, 1968). Später wurde es in Präparationen der Bürstensaummembran von Kaninchennieren als eines der dort hauptsächlich lokalisierten Enzyme gefunden, und „Neutrale Peptidase“ genannt (George und Kenny, 1973). In nachfolgenden Experimenten konnte es schließlich aus diesen Präparationen aufgereinigt werden und wurde als Metalloendopeptidase erkannt (Kerr und Kenny, 1974). Nachdem dem Enzym die EC-Nummer 3.4.24.11 zugewiesen wurde, wurde es in der Literatur auch als „Endopeptidase-24.11“ bezeichnet.

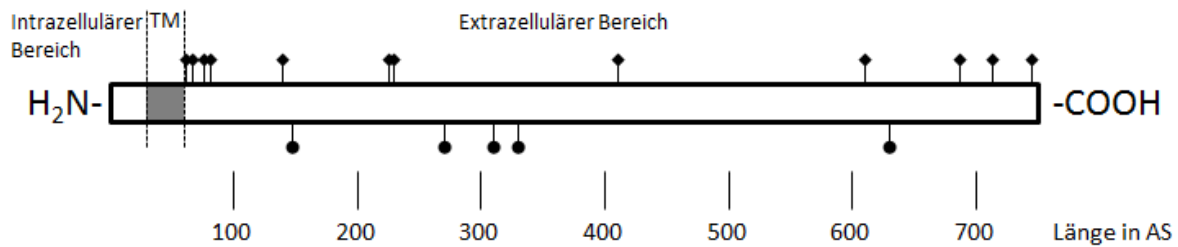
Unabhängig hiervon wurde das Enzym als *common acute lymphoblastic leukemia antigen* (CALLA, CD10) identifiziert (Greaves, 1975), ein Oberflächenmarker, der zur Diagnose von akuter lymphatischer Leukämie eingesetzt wird. Auch im Gehirn wurde das Enzym gefunden. In weiteren unabhängigen Versuchen wurde im Gehirn ein Enzym identifiziert, das Enkephaline hydrolysieren kann. Auf Grund dieser Eigenschaft erhielt es den Namen „Enkephalinase“ (Malfroy *et al.*, 1978). Die übereinstimmende Identität von „Endopeptidase-24.11“ und „Enkephalinase“ wurde kurz darauf postuliert, da beide Enzyme immunologisch nicht unterscheidbar waren. Darüber hinaus ließen sich beide Enzyme mit unterschiedlichen Inhibitoren vergleichbar hemmen, und wiesen ein identisches kinetisches Profil bei der Hydrolyse von D-Ala<sup>2</sup>-Leu-Enkephalin und der B-Kette des Insulin auf (Relton *et al.*, 1983). Das Neprilysin identisch mit „CALLA“ ist, wurde hingegen erst herausgefunden, nachdem die Enzyme kloniert und sequenziert worden waren (Devault *et al.*, 1987; Letarte *et al.*, 1988). Erst kürzlich wurde ein weiteres Enzym identifiziert, bei dem es sich ebenfalls um NEP handeln soll: die *human skin fibroblast* Elastase. Sie zeigt in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen ein mit NEP identisches Reaktionsverhalten (Morisaki *et al.*, 2010), jedoch liegt ein Vergleich der DNA-Sequenzen bislang noch nicht vor.

Das Enzym hat im Laufe der Jahre aufgrund seines großen Substratspektrums eine große Anzahl an Bezeichnungen erhalten, die zum Teil noch heute benutzt werden. Neben den bereits genannten, ist es unter anderem auch als Neutrale Endopeptidase und Atriopeptidase bekannt. Um die Nomenklatur zu vereinheitlichen, hat die IUBMB 1992 den Namen Neprilysin für die Peptidase vorgeschlagen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die übliche Abkürzung NEP für Neprilysin verwendet.

### **1.2.2. Struktur und molekulare Eigenschaften**

NEP ist eine Zink(II)-abhängige Metallopeptidase, die aus ca. 750 AS besteht. Humanes NEP besteht aus 752 AS. Hiervon bilden 25 AS eine kurze, intrazelluläre Region, gefolgt von einem, die Membran einmal durchspannenden, Transmembranbereich von 24 AS Länge (Abb. 2). Der größte Teil der Peptidase ist mit 703 AS extrazellulär lokalisiert, wo sich auch das aktive Zentrum mit dem Zinkbindungsmotiv (His-Glu-X-X-His) befindet. Der N-Terminus liegt intrazellulär und somit wird NEP als Typ-II-Transmembranprotein klassifiziert.

Das molekulare Gewicht von NEP variiert zwischen 85 und ca. 100 kD, abhängig von der Glykolysierung des Enzyms. Es enthält fünf Asparagin-Reste in der für N-Glykolysierung typischen Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr und zwölf Cysteine (Shipp *et al.*, 1988). Insgesamt stabilisieren vier Disulfidbrücken das Molekül, die auch für die Enzymaktivität entscheidend sind (Tam *et al.*, 1985).



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Primärstruktur von NEP (nach Devault et al., 1987). Das Enzym besteht aus einem kurzen N-terminalen intrazellulären Bereich, gefolgt vom Transmembranbereich und dem ca. 700 Aminosäuren umfassenden extrazellulären Bereich. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind mit ● markiert, Cysteine mit ▲; AS: Aminosäure; TM: Transmembranbereich.

NEP ist ein im Tierreich weit verbreitetes und konserviertes Enzym. Die Sequenzen von NEP in Mensch, Maus, Ratte und Kaninchen stimmen zu über 90 % miteinander überein, und die Aminosäuren die an der katalytischen Funktion beteiligt sind, sind in allen vier Spezies identisch. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um die zwei Histidine His<sup>583</sup> und His<sup>587</sup> sowie die Glutaminsäure Glu<sup>646</sup>, die zusammen das Zink-komplexierende Element bilden, und Glu<sup>584</sup>, das bei Vorhandensein einer freien Carboxylgruppe in P2'-Position des Substrates in der Lage ist, diese Gruppe zu stabilisieren und damit die Katalyse zu begünstigen. Des Weiteren sind die Aminosäuren Arg<sup>102</sup>, Asn<sup>542</sup>, Val<sup>553</sup>, Lys<sup>598</sup>, Asp<sup>650</sup>, Lys<sup>683</sup>, His<sup>711</sup> und Arg<sup>747</sup> für die Funktion der NEP essentiell (Chen *et al.*, 1992).

Mit der Aufklärung der Röntgenkristallstruktur der extrazellulären Region des humanen NEP bei 2,1 Å im Komplex mit dem NEP-Inhibitor Phosphoramidon (Abb. 3) konnte das Verständnis der Struktur des Enzyms weiter vertieft werden (Oefner *et al.*, 2000): Zwei große  $\alpha$ -helikale Untereinheiten sind durch verflochtene Peptidsegmente miteinander verbunden. Die größere, N-terminale, Domäne D1 besteht aus 326 AS und enthält die Zink-bindende Domäne sowie das katalytische Zentrum. Die kleinere Domäne D2 setzt sich aus 286 AS zusammen. Die beiden Domänen bilden, zusammen mit vier die Domänen verbindenden Fragmenten (zusammen der „Linker“), eine nahezu kugelförmige Aushöhlung mit dem aktiven Zentrum, die nur durch eine kleine Öffnung aus geladenen Seitenketten zugänglich ist. Diese strukturelle Eigenheit führt dazu, dass die Öffnung wie ein molekulares Sieb wirkt und es nur Proteinen mit einer maximalen Größe von etwa 50 AS ermöglicht, das katalytische Zentrum zu erreichen. Auch bei Molekülen mit geringerer Größe kann es aufgrund geringer Abweichungen in der Molekülstruktur zu sterischen Behinderungen kommen, die einige Peptide als Substrate ausschließen (Pankow *et al.*, 2009).

NEP hat ein sehr großes Substratspektrum, auf das in Kapitel 1.2.4. genauer eingegangen wird. Untersuchungen der Substratspezifität ergaben, dass Substrate die von NEP hydrolysiert werden können, in der P1'-Position eine voluminöse, hydrophobe Aminosäure aufweisen. Diese bilden stabilisierende Wechselwirkungen mit den hydrophoben Seitenketten der S1'-Bindungstasche aus. Besonders gut eignen sich Substrate mit Phenylalanin oder Tyrosin in P1'-Position. Substrate mit Tryptophan, Tyrosin, Leucin und Isoleucin in der P1'-Position sind schlechtere Substrate, die aber dennoch erkannt werden (Erdös und Skidgel, 1989).

Untersuchungen der kinetischen Parameter von Substraten mit Alanin, Phenylalanin und Glycin in verschiedener Anordnung in P1-Position und P2-Position zeigten, dass Alanin in der P1-Position zur größtmöglichen Wechselzahl führt, und für Substrate mit Glycin und Alanin in P2-Position die optimale Aminosäure ist. Substrate mit Phenylalanin in P2-Position weisen jedoch mit Glycin in P1-Position den geringsten Wert für die Michaeliskonstante  $K_M$  auf, was diese Substrate trotz geringer Wechselzahl zu den effektivsten Substraten macht. Zusammenfassend wurden Substrate mit der Sequenz Phenylalanin-Glycin-Phenylalanin in den Positionen P2-P1-P1' als sehr gute Substrate beschrieben (Pozsgay *et al.*, 1986).

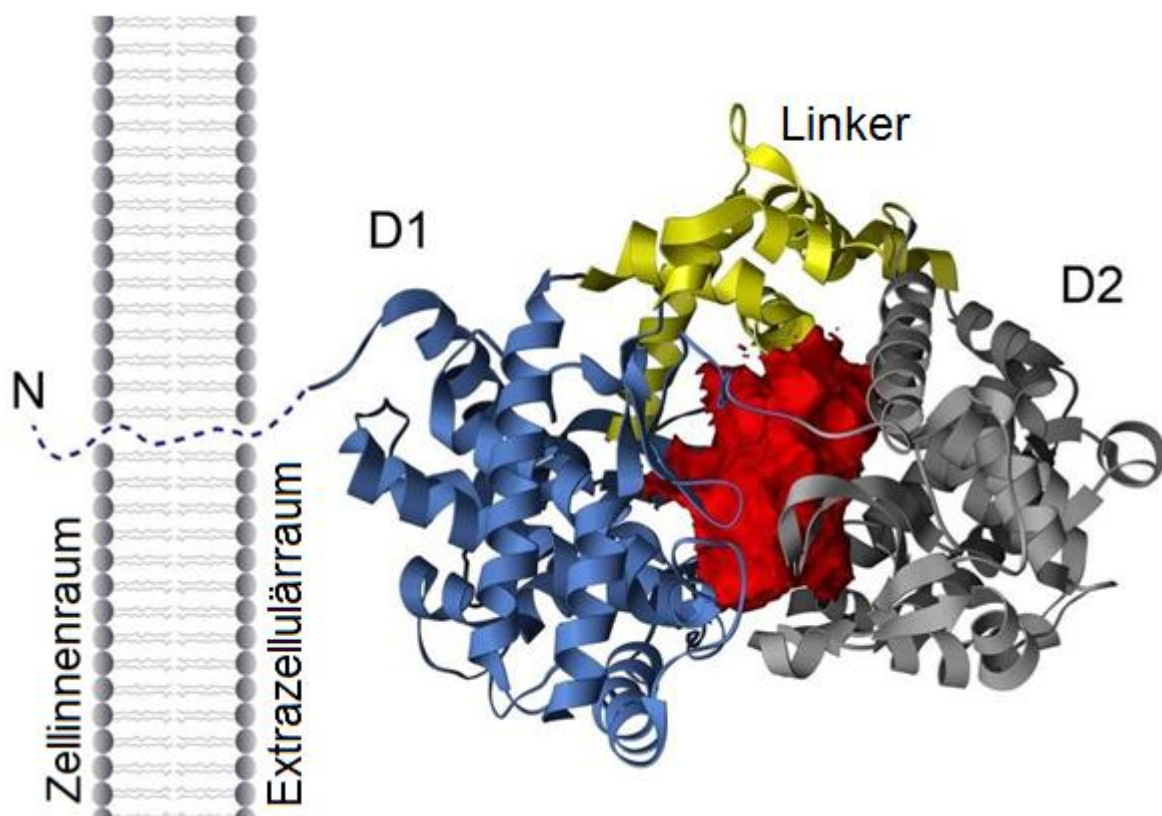


Abb. 3 Röntgenstruktur von NEP (nach Malito *et al.*, 2008). Die Domäne D1 beinhaltet den katalytischen Bereich und ist mit der kleineren Domäne D2 über den „Linker“ verbunden. Im rot dargestellten Bereich im Zentrum des Moleküls muss sich das Substrat anordnen.

### 1.2.3. Lokalisation und Expression

NEP ist auf dem *MME*-Gen kodiert, das einen Bereich von über 80 Kilobasen umfasst. Das Gen besteht aus 24 Exons und ist in der chromosomalen Region 3(q21-q27) lokalisiert (Barker *et al.*, 1989). Das Initiatorcodon liegt im Exon 3, zusammen mit der gesamten zytoplasmatischen Domäne und dem Transmembranbereich. Der Großteil des extrazellulären Bereiches ist auf den jeweils recht kleinen Exons 4 –23 kodiert. Das Exon 24, bestehend aus ca. 3400 Basenpaaren (bp), kodiert das C-terminale Ende des Enzyms, sowie den gesamten 3'-untranslatierten Bereich (UTB) (D'Adamio *et al.*, 1989). Drei unterschiedliche mRNA-Varianten werden aufgrund von Unterschieden im 5'-UTB generiert: Typ1 mRNA enthält die Sequenz des Exons 1, während die Typen 2a und 2b durch alternatives „Splicing“ von Exon 2 generiert werden. Die verschiedenen mRNA-Varianten werden organspezifisch in unterschiedlichen Verhältnissen exprimiert, kodieren aber alle dasselbe Protein. Auch in anderen Spezies wurden mehrere mRNA-Varianten gefunden, die dort ebenfalls alle zu einem identischen Enzym translatiert werden (Li *et al.*, 1995).

NEP ist im gesamten Organismus sehr weit verbreitet. Im peripheren Gewebe ist es am höchsten in der Bürstensaummembran der Niere exprimiert, wo es ca. 4% der gesamten Proteinmenge ausmacht. Ebenfalls in Lungen, Darm, Lymphknoten, Epithelzellen der Prostata und Hoden wurde NEP in hohen Konzentrationen nachgewiesen (Erdös und Skidgel, 1989; Song *et al.*, 2004). In geringerer Konzentration wurde es in Leber, Milz, Bauchspeicheldrüse, Aorta und Arteria mesenterica gefunden (Gee *et al.*, 1985; Howell *et al.*, 1991). Hauptsächlich ist NEP in Fibroblasten und Epithelzellen lokalisiert und wurde in allen Schichten der Blutgefäßwand nachgewiesen (Johnson *et al.*, 1985; Barber *et al.*, 2006).

Um NEP präzise im zentralen Nervensystem (ZNS) zu lokalisieren, wurden ausführliche quantitative autoradiographische Untersuchungen mit dem tritiierten NEP-Inhibitor [<sup>3</sup>H] N-[(R,S)-3-hydroxyaminocarbonyl-2-benzyl-1-oxopropyl]-glycin ([<sup>3</sup>H]HACBO-Gly) durchgeführt (Waksman *et al.*, 1985). Dabei wurden im Gehirn von Ratten die höchsten Konzentrationen des Inhibitors in den Hirnstrukturen Plexus choroideus, Substantia nigra, Putamen, Palladium, Tuberculum olfactorium und Nucleus accumbens, sowie in der Substantia gelatinosa des Rückenmarks gefunden. Mäßige Konzentrationen wurden in Amygdala, Tegmentum mesencephali, Stratum molecular des Cerebellum, im periaquäduktalem Grau und im Hippocampus detektiert. Dabei wurde ebenfalls festgestellt, dass die Verteilung der NEP-Expression häufig mit der Verteilung der Opioid-Rezeptoren korreliert (Waksman *et al.*, 1986). Diese Ergebnisse wurden auch durch Untersuchungen im ZNS von Schweinen bestätigt, bei denen NEP immunologisch markiert wurde (Matsas *et al.*, 1986). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Neostriatum der Ratte, bei denen NEP mit



einem Antikörper markiert wurde, deuten darauf hin, dass das Enzym hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird, und über die gesamte Zelle verteilt auftritt. Zu einem geringeren Teil wurde NEP aber auch auf Gliazellen (Astrozyten und Schwann'sche Zellen) gefunden (Marcel *et al.*, 1990).

#### **1.2.4. Pharmakologisch bedeutsame Funktionen von NEP**

Für das Enzym wurden bereits kurz nach seiner Entdeckung eine große Anzahl an Substraten identifiziert. Nachdem NEP in Nierenmembranen durch die - physiologisch nicht relevante - Hydrolyse der B-Kette des Insulins nachgewiesen werden konnte, wurden bald darauf mit Substanz P, Angiotensin I und Angiotensin II, Bradykinin, Neurotensin, Somatostatin und Corticotropin zahlreiche weitere Substrate in *in vitro* Experimenten beschrieben (Mumford *et al.*, 1981). Auch für die Tachykinine Neurokinin A und Neurokinin B konnte gezeigt werden, dass sie *in vitro* von NEP abgebaut werden (Hooper *et al.*, 1985). Später konnte auch eine physiologische Relevanz des Abbaus dieser Peptide durch NEP gezeigt werden (Brokaw und White, 1994). Auf einige physiologisch und pharmakologisch besonders wichtige Substrate soll im Folgenden etwas genauer eingegangen werden.

##### **1.2.4.1. Hydrolyse der Enkephaline**

Die erste physiologisch relevante Reaktion von NEP die erkannt wurde, war die Hydrolyse der Enkephaline. Malfroy und Kollegen fanden im Corpus Striatum der Maus ein Enzym, dass mit hoher Geschwindigkeit und Spezifität Leu-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) an der Gly-Leu Bindung spaltet (Malfroy *et al.*, 1978). Die physiologische Bedeutung dieser Reaktion konnte in Mäusen mit dem synthetischen NEP-Inhibitor Thiorphan belegt werden: Thiorphan verminderte den Abbau der Enkephaline *in vivo* und führte so zu einer reduzierten Schmerzwahrnehmung. Dieser Effekt konnte mit dem Opioid-Antagonist Naloxon rückgängig gemacht werden (Roques *et al.*, 1980) und machte NEP somit zu einem interessanten Ziel für die Schmerztherapie. Derzeit befinden sich einige „Dual-Enkephalinase“-Inhibitoren, die NEP und Aminopeptidase N inhibieren, in klinischen Testphasen (Roques *et al.*, 2012). Die Annahme, es handelte sich hierbei um eine „Enkephalinase“, also ein Enzym das spezifisch für diese Peptidfamilie ist, wurde allerdings bereits kurze Zeit nach der Erstbeschreibung im Jahr 1978 angezweifelt, denn schon 1982 tauchten erste Hinweise auf, dass es sich bei der „Enkephalinase“ um das bereits in mehreren Organen nachgewiesene Enzym „Neutrale Endopeptidase“ handelte (Fulcher *et al.*, 1982).

#### 1.2.4.2. Hydrolyse der natriuretischen Peptide

Ende der 1980er Jahre wurde entdeckt, dass NEP in der Lage ist das atriale natriuretische Peptid (auch: natriuretisches Peptid Typ A; ANP) zu metabolisieren (Stephenson und Kenny, 1987a). ANP führt zu einer erhöhten Ausscheidung von Natrium (Natriurese), was wiederum zu einer erhöhten Harnausscheidung führt. Es wirkt außerdem vasodilatatorisch, und hemmend auf das Renin-Angiotensin-System. Somit senkt ANP sowohl das Blutvolumen, als auch den Blutdruck. Die Inhibition eines ANP-abbauenden Enzyms war deshalb für die Behandlung des Bluthochdrucks von großem Interesse. Dass die Angiotensine ebenfalls von NEP metabolisiert werden können (Stephenson und Kenny, 1987b), und somit die Spiegel des Vasokonstriktors Angiotensin II verringert werden können, steigerte dieses Interesse zusätzlich. Die Infusion von ANP in Ratten zeigte eine Verringerung des mittleren arteriellen Blutdrucks und die zeitgleiche Gabe eines NEP-Inhibitors konnte die Wirkung von ANP noch zusätzlich verstärken (Webb *et al.*, 1989). Auch im Menschen konnte eine Verringerung des Blutdruckes durch NEP-Inhibition gezeigt werden (Richards *et al.*, 1993). In späteren Studien wurde versucht, die Effektivität von ACE-Hemmern zu erhöhen, indem kombinierte ACE- und NEP-Hemmer entwickelt und eingesetzt wurden (Weber, 2001). Bislang führte dieser Ansatz allerdings zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, da bei diesen Substanzen ein erhöhtes Risiko für ein Angioödem auftritt (Campbell, 2003). Als möglicher Grund wird die Erhöhung von Bradykinin diskutiert, das ebenfalls ein Substrat beider Enzyme ist. Untersuchungen der zwei strukturell ähnlichen natriuretischen Peptide, natriuretisches Peptid Typ B (BNP) und natriuretisches Peptid Typ C (CNP), zeigten, dass nur letzteres ebenfalls von NEP direkt abgebaut werden kann (Walther *et al.*, 2004; Pankow *et al.*, 2007).

#### 1.2.4.3. Hydrolyse des Amyloid $\beta$ -Peptids

Ein weiteres physiologisch relevantes Substrat von NEP ist das Amyloid  $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ). Aus diesem Peptid bilden sich durch Aggregation Plaques, die als Auslöser der Alzheimer-Krankheit vermutet werden. Zum ersten Mal wurde im Jahr 1995 ein Abbau von  $A\beta_{1-40}$  durch NEP beschrieben (Howell *et al.*, 1995), doch erst als für das erheblich schädlichere  $A\beta_{1-42}$  sowohl *in vitro* der Abbau des Peptids durch NEP, als auch *in vivo* in Ratten die Akkumulation des Peptides nach Infusion eines NEP-Inhibitors gezeigt werden konnte, gelangte NEP in den Fokus der Alzheimerforschung (Iwata *et al.*, 2000). Untersuchungen von NEP-defizienten Mäusen bestätigten endgültig die Relevanz von NEP bei dieser Erkrankung (Iwata *et al.*, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass humanes NEP in der Lage ist,  $A\beta$ -Oligomere abzubauen und somit die schädlichen Plaques im Gehirn zu bekämpfen,

die für das Absterben der Neuronen im Verlauf der Erkrankung verantwortlich gemacht werden (Kanemitsu *et al.*, 2003). Bis heute konnte zwar noch keine wirksame Therapie entwickelt werden, es besteht jedoch die Hoffnung, über gentherapeutische Methoden die Expression von NEP zu erhöhen und darüber den Abbau des A $\beta$  zu erreichen, was auch in Mäusen bereits erfolgreich gezeigt wurde (Hong *et al.*, 2006). Um diese NEP-Aktivierung zu erreichen wird versucht, den NEP-Promotor gezielt zu beeinflussen. So wurde beispielsweise in Versuchen mit der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y gezeigt, dass die NEP-Expression durch das Östrogen 17 $\beta$ -Estradiol stimuliert wurde, und es wurden zwei Östrogen *Response Elements* im NEP-Promotor identifiziert (Liang *et al.*, 2010). Ein weiteres Beispiel ist der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor  $\delta$  (PPAR  $\delta$ ), für den in der Literatur ebenfalls eine NEP-aktivierende Wirkung gezeigt und *Response Elements* im Promotor identifiziert wurden (Kalinin *et al.*, 2009). Auch die intrazelluläre Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins (*Amyloid precursor protein Intracellular Cytoplasmic/C-terminal Domain*, AICD) wird als NEP-aktivierend diskutiert, allerdings ist die Datenlage hierzu bislang widersprüchlich. Während einige Arbeiten keine Regulation durch AICD feststellen können (Hebert *et al.*, 2006) deuten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von A. Turner darauf hin, dass eine Regulation möglich ist, und von den verwendeten Zelllinien abhängt (Belyaev *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die verschiedenen mRNA-Varianten in die Überlegungen einzubeziehen, die unterschiedlich reguliert werden und jeweils spezifische Transkriptionselemente aufweisen (Ishimaru und Shipp, 1995). Eine Übersicht über den Stand der Forschung zur Alzheimerbehandlung gibt der Artikel von Nilsson und Kollegen (Nilsson *et al.*, 2010).

#### **1.2.4.4. NEP in der Krebsdiagnostik**

In der Literatur wird NEP außerdem auch mehrfach im Zusammenhang mit Krebs genannt: Während das Enzym erstmals von Greaves und Kollegen als CALLA zur Diagnose von akuter lymphatischer Leukämie eingesetzt wurde (Greaves, 1975), wurden erhöhte Mengen des Enzyms in den Tumoren bei Nierenzellkarzinomen (Chu und Arber, 2000), kolorektalen Karzinomen (Ogawa *et al.*, 2002), Mammakarzinomen (Iwaya *et al.*, 2002), Magenkarzinomen (Huang *et al.*, 2005) und malignen Melanomen (Velazquez *et al.*, 2007) gefunden und NEP wird hierfür als diagnostischer Marker diskutiert. Im Gegensatz dazu wurde bei Bronchialkarzinomen eine verringerte NEP-Expression im betroffenen Lungengewebe detektiert (Cohen *et al.*, 1996). Die Gründe für die veränderten Regulationen, und ob NEP ebenfalls eine Rolle in der Krebstherapie spielen kann, ist derzeit noch nicht geklärt.

### **1.3. Transgene Tiermodelle**

#### **1.3.1. Einsatz transgener Tiermodelle in der Forschung**

In der biomedizinischen Forschung spielen transgene Tiermodelle heutzutage eine zentrale Rolle. Als transgene Tiere werden Tiere bezeichnet, deren Genom mittels gentechnischer Methoden gezielt verändert wurde. Die Veränderung kann sowohl die Abschaltung eines oder mehrerer Gene (*knockout*), als auch das Hinzufügen arteigener oder artfremder Gene sein. Es gibt unterschiedliche Methoden zur Generierung von transgenen Tieren, mit denen bestimmte Genmodifikationen erzielt werden können. Die beiden am häufigsten genutzten Methoden sind die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen und die DNA-Mikroinjektion in den Vorkern einer befruchteten Eizelle.

Die Methode der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen wurde erstmals an Mäusen beschrieben (Capecchi, 1989). Mit dieser Methode können theoretisch beliebige Genmodifikationen gezielt in das Genom eingeführt werden. Aufgrund des sehr hohen Arbeitsaufwandes wird diese Methode aber fast ausschließlich genutzt um Gene zu unterbrechen (*knockout*). Die embryonalen Stammzellen werden dabei mit einem DNA-Konstrukt transfiziert, das Bereiche mit hoher Homologie zum auszuschaltenden Zielgen aufweisen muss. Darüber hinaus muss es einen geeigneten Selektionsmarker enthalten, der häufig ein Exon des Zielgens ersetzt. Der Selektionsmarker unterbricht nun einerseits die kodierende DNA-Sequenz, und zum anderen wird durch die Selektion eine erfolgreiche Transfektion verifiziert. Die transfizierten Zellen können vermehrt werden und die so erhaltenen embryonalen Stammzellen mit dem unterbrochenen Gen in eine Blastozyste injiziert werden. Zuletzt wird diese wiederum einem scheinchwangeren Weibchen implantiert (Capecchi, 1989).

Um eine Überexpression bestimmter Gene zu erhalten oder ein artfremdes Gen in das Genom einzubringen, wird die DNA-Mikroinjektion in den Vorkern einer befruchteten Eizelle angewandt. Diese Methode wurde erstmals 1980 von Gordon und Mitarbeitern beschrieben (Gordon *et al.*, 1980). Das Transgen wird hierbei in einem Klonierungsvektor erstellt. Anschließend wird das linearisierte und gereinigte Konstrukt, das zusätzlich zur kodierenden Gensequenz einen Promotor und eine Polyadenylierungssequenz enthalten muss, in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle injiziert. Anschließend wird die Eizelle einem scheinchwangeren Weibchen implantiert. Es können weitere regulatorische Elemente wie transkriptionsverstärkende Strukturen (*Enhancer*) mit übertragen werden. Durch die Wahl geeigneter Promotor/Enhancer-Systeme ist es möglich, dass Proteine nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Aufgrund der zufälligen Integration der DNA, die bei dieser Methode auftritt, ist es notwendig, mehrere transgene Mausstämme herzustellen und

untereinander zu vergleichen. Denn da durch die zufällige Integration des DNA-Konstrukts eine zufällige Zerstörung eines Gens auftreten kann, kann dies zu einem veränderten Phänotyp führen, der unabhängig vom eingeführten Transgen ist (Furth *et al.*, 1991). Darüber hinaus kann die Expression des Transgens durch benachbarte Enhancer- oder Repressorelemente beeinflusst werden. Mittlerweile werden auch induzierbare Promotoren verwendet, wodurch z.B. die Untersuchung von Genprodukten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien möglich ist (Jaisser, 2000).

In der Forschung haben sich die Arbeiten mit transgenen Tiermodellen als essentieller Bestandteil zur Aufklärung der physiologischen Aufgaben eines Genproduktes etabliert. Dafür werden die transgenen Tiere phänotypisiert und Unterschiede zu wildtypischen Tieren aufgezeigt. Für eine umfassende Untersuchung zu den biologischen Funktionen des Zielgens sind sowohl Modelle, in denen dieses ausgeschaltet, als auch solche in denen es überexprimiert wird, notwendig, da bei einem ausgeschalteten Gen die biologische Funktion von anderen Genprodukten ausgeglichen werden kann. In den transgenen Tiermodellen können dann Krankheitssituationen nachgestellt und erforscht werden und dadurch das Verständnis zu Ursache und Behandlung von Krankheiten vertieft werden. Letztlich können die so gewonnen Erkenntnisse zur Behandlung von Menschen genutzt werden.

### **1.3.2. Erkenntnisse aus NEP-knockout-Mäusen**

Schon 1995 wurde von Lu ein Mausmodell beschrieben, bei dem das *Mme*-Gen unterbrochen wurde (Lu *et al.*, 1995). Er beschreibt, dass die Tiere sich weitgehend normal entwickelten, aber eine stark erhöhte Reaktion in verschiedenen Modellen des septischen Schocks zeigten. Sowohl die Injektion von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), als auch der Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), führten in NEP-defizienten Tieren, im Vergleich zu ihren wildtypischen Kontrollen, zu einem verstärkten Endotoxinschock. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass NEP auch bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielt. Erste Hinweise darauf wurden bereits einige Jahre zuvor bei Versuchen mit dem NEP-Substrat Substanz P gefunden (Borson *et al.*, 1989). NEP ist seitdem mit einer Vielzahl von Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht worden, insbesondere im Darm (Hwang *et al.*, 1993; Barbara *et al.*, 2003) und in der Lunge (Di Maria *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2010; Samarasinghe *et al.*, 2010).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NEP-defiziente Tiere freiwillig mehr Alkohol konsumieren, als ihre wildtypischen Kontrollen, was auf eine mögliche Beteiligung von NEP bei der Entstehung von Alkoholismus hindeutet (Siems *et al.*, 2000; Maul *et al.*, 2012). Unsere Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass die Gendefizienz in hohem Alter zu

einer verbesserten Lernfähigkeit in den Tieren führt (Walther *et al.*, 2009). Diese Verbesserung geht einher mit einem reduzierten Abbau der Peptide Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) und Galanin im Gehirn der Tiere.

GLP-1 und Galanin werden nicht nur im Gehirn gefunden, sondern werden auch im Verdauungstrakt exprimiert. Beide werden neben dem Einfluss auf das Lern- und Erinnerungsvermögen, auch mit der Regulation des Hungergefühls und der Nahrungsaufnahme in Verbindung gebracht (Abu-Hamdah *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2012). Eine ganze Reihe weiterer der *in vitro* gefundenen NEP-Substrate sind ebenfalls an der Nahrungsaufnahme beteiligt, z.B. die Peptide Gastrin freisetzendes Peptid-10 (*gastrin releasing peptide-10*, GRP-10) (Bunnett *et al.*, 1985), Cholecystokin-8 (CCK-8) (Deschodt-Lanckman und Strosberg, 1983), oder Peptid YY (PYY) (Medeiros und Turner, 1994). Gemeinsam mit GLP-1 zählen diese Peptide zu den anorexigenen Peptiden, haben also eine appetithemmende Wirkung. Doch auf der anderen Seite zählen, neben Galanin, unter anderem die Peptide Neuropeptid Y (NPY) (Rose *et al.*, 2009) und Melanin konzentrierendes Hormon (MCH) (Checler *et al.*, 1992) zu den Substraten von NEP, die orexigene (appetitanregende) Eigenschaften besitzen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass NEP-Defizienz zu einer Erhöhung der Nahrungsaufnahme und dadurch im fortgeschrittenen Alter zur Entwicklung einer Adipositas führt (Becker *et al.*, 2010).

#### **1.4. Adipositas und Regulation der Nahrungsaufnahme**

Fast allen Organismen müssen Wasser, Kohlenhydrate, Proteine, Lipide, Vitamine, Mineralien und Spurenelemente zugeführt werden um Wachstum, Reproduktion und Aufrechterhaltung der Körperfunktionen zu ermöglichen. Die Aufnahme von Nahrung, die diese notwendigen Stoffe enthält, ist somit ein lebensnotwendiger Prozess und ist dementsprechend stark reguliert. Kohlenhydrate, Proteine und Fette werden als Makronährstoffe bezeichnet und von den Mikronährstoffen unterschieden. Als Energielieferanten werden hauptsächlich Kohlenhydrate und Fette genutzt.

Vertebraten sind in der Lage, Energie in Form energiereicher Moleküle (primär als Fette) zu speichern, um bei Bedarf die in ihnen enthaltene chemische Energie für den Körper nutzbar zu machen. Zur Aufrechterhaltung der lebensnotwendigen Körperfunktionen, der Thermogenese und von Prozessen, wie Verdauung und Geweberegeneration, benötigt der Körper fortlaufend Energie. Darüber hinaus wird zusätzliche Energie für Bewegung benötigt, insbesondere für körperliche Arbeit und Sport. Aus der Differenz zwischen Energieverbrauch und Energieaufnahme ergibt sich die Energiemenge, die als Fett gespeichert werden kann

oder aus den Energiespeichern abgebaut werden muss. Die Nahrungsaufnahme ist über komplexe Mechanismen (siehe Kapitel 1.4.3.) so reguliert, dass die Energieaufnahme den Verbrauch ausgleicht und es zu keinen deutlichen Gewichtsschwankungen kommt. Um die Genauigkeit dieser Mechanismen zu veranschaulichen, bedenke man folgendes: Im Alter zwischen 20 und 40 Jahren nimmt ein Mensch pro Jahr durchschnittlich um ca. 0,9 kg an Gewicht zu, was einer Energiemenge von ca. 7.000 kcal entspricht (Hill *et al.*, 2003). Dies entspricht einem Energieüberschuss von ca. 20 kcal am Tag, und somit grade einmal 1% der empfohlenen Menge von 2.000 kcal pro Tag. Kommt es jedoch über einen längeren Zeitraum zu einer auch nur leicht höheren Nahrungsaufnahme, führt dies zu einer deutlichen Gewichtszunahme, und somit letztlich zu Übergewicht und Adipositas (siehe Kapitel 1.4.1.).

#### **1.4.1. Adipositas: Definition, Ursachen und Folgen**

Adipositas (auch Fettsucht oder Fettleibigkeit) ist definiert als anormale oder übermäßige Vermehrung von Körperfett, welches die Gesundheit negativ beeinflusst. Nach der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde die Adipositas mit ihren Unterformen in der Gruppe E66 zusammengefasst (<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/E66.0> ; abgerufen am 20. November 2012). Alleine in Europa waren im Jahr 2010 schätzungsweise 150 Millionen Erwachsene und 15 Millionen Kinder an Adipositas erkrankt (Tsigos *et al.*, 2008). Die starke Zunahme an adipösen Patienten setzte zwar zuerst in den westlichen Industrienationen ein, ist aber mittlerweile ebenso in den Entwicklungsländern zu beobachten (Popkin *et al.*, 2012). Die Prävalenz ist dabei in fast allen Altersgruppen gestiegen, und ist geschlechtsunabhängig (Rokholm *et al.*, 2010). In den letzten Jahrzehnten sind die Zahlen der übergewichtigen und adipösen Menschen weltweit so stark gestiegen, dass Adipositas als eines der bedeutendsten Gesundheitsprobleme mit pandemischem Ausmaß angesehen wird (Swinburn *et al.*, 2011).

Näherungsweise kann der Anteil des Körperfetts über den *body mass index* (BMI) ermittelt werden. Dabei wird das Körpergewicht in kg durch die quadrierte Körpergröße in m dividiert. Nach diesem System wird Übergewicht definiert als BMI zwischen 25 und 29.9 kg/m<sup>2</sup>, und Adipositas bei BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. Der BMI unterscheidet allerdings nicht zwischen Muskel- und Fettmasse, wodurch der BMI eines Sportlers leicht im übergewichtigen oder sogar adipösen Bereich liegen kann. Darüber hinaus unterscheidet der BMI nicht zwischen viszeralem und subkutanem Fettgewebe. Diese Unterscheidung ist jedoch außerordentlich wichtig, da hauptsächlich die Menge des Viszeralfetts mit den Folgeerkrankungen der Adipositas korreliert (Seidell und Bouchard, 1997). Auf der Suche nach einer verbesserten Messgröße

werden deshalb zur Zeit auch der Bauchumfang und der Quotient Bauchumfang zu Körpergröße diskutiert, die besser mit dem Risiko für Folgeerkrankungen zu korrelieren scheinen (Ashwell *et al.*, 2012).

Die Entstehung der Adipositas lässt sich vereinfacht mit einer Dysregulation von Nahrungsaufnahme, und somit Energiezufuhr, und Energieverbrauch zusammenfassen (Daniels *et al.*, 2005). An der Komplexität der Mechanismen, die die Nahrungsaufnahme regulieren (siehe 1.4.3.), wird deutlich, wie schwierig es ist, die molekularen Grundlagen aufzuklären, die zu diesem Ungleichgewicht führen. Der rasante Anstieg von Übergewicht und Adipositas in wenigen Jahrzehnten wird hauptsächlich auf die Veränderungen in unserer Ernährungs- und Lebensweise zurückgeführt (Prentice und Jebb, 1995). So gibt es mittlerweile ein großes Angebot an sehr günstiger, energiereicher Nahrung. Zusätzlich sind die angebotenen Portionen noch vergrößert worden (z.B. „*super size meals*“). Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl an kalorienreichen Getränken, die ebenfalls einen signifikanten Beitrag zur Erhöhung des Körpergewichts leisten können, wie in Mäusen gezeigt wurde (Jurgens *et al.*, 2005). Nicht zuletzt, nimmt die Notwendigkeit sich zu bewegen, sowohl im Bereich der Arbeit, als auch der Freizeit, immer weiter ab.

Die Adipositas besitzt jedoch auch eine genetische Komponente, wie anhand von Zwillingsstudien gezeigt werden konnte (Maes *et al.*, 1997; Hjelmberg *et al.*, 2008). In den letzten Jahren konnte eine große Anzahl an Risikogenen, die mit Adipositas in Verbindung stehen, identifiziert werden (Speliotes *et al.*, 2010; Bradfield *et al.*, 2012). Viele dieser Gene und ihrer Genprodukte sind Gegenstand aktueller Forschung und insbesondere mit Hilfe transgener Tiermodelle wurde das Verständnis der Regulationsmechanismen stark erweitert. Einige Beispiele sind das *FTO*-Gen (Tung und Yeo, 2011) und die Proteine Melanocortinrezeptor 4 (MC4R) (Tao, 2010), Proopiomelanocortin (POMC) (Wardlaw, 2011) sowie Glucose-abhängiges insulino-tropisches Polypeptid (GIP) und dessen Rezeptor (GIPR) (Irwin und Flatt, 2009). Mittlerweile gilt es als unstrittig, dass es „Das Eine“ Adipositas-Gen nicht gibt, und dass die Adipositas eine polygenetische Erkrankung ist.

Wie wichtig es ist, effektive Behandlungsmethoden für die Adipositas zu entwickeln, wird besonders deutlich, wenn man die resultierenden Folgeerkrankungen betrachtet (Tabelle 1): Bei adipösen Patienten ist das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und für einen Diabetes mellitus Typ 2 stark erhöht (Tsigos *et al.*, 2008). Daneben ist beispielsweise das Risiko für Lungenerkrankungen und verschiedenste Arten von Krebs in adipösen Patienten erhöht. Zusätzlich zu den physischen Folgen hat der adipöse Patient mit psychologischen Konsequenzen zu leben, wie beispielsweise einem verminderten Selbstwertgefühl oder gar Depressionen. Häufig kommt es sowohl im Berufsleben, als auch in der Freizeit zu Diskriminierung.



**Tabelle 1 Gesundheitsrisiken und Komplikationen in Folge einer Adipositas (nach Tsigos et al., 2008). Die spezifischen Risiken variieren abhängig vom Grad der Adipositas, Alter, Geschlecht, ethnischer und sozialer Herkunft.**

<u>Metabolismus</u>	<u>Gastrointestinaltrakt</u>	<u>Genitaltrakt</u>
Diabetes Typ 2	Erkrankungen der Gallenblase	Zyklusstörungen, Unfruchtbarkeit, Hirsutismus, polyzystische Ovarien
Dyslipidämie	Hernie	Fehlgeburt
Metabolisches Syndrom	Refluxösophagitis	Schwangerschaftsdiabetes
Hyperurikämie, Gicht	Steatosis hepatis oder Steatohepatitis	Präeklampsie, Makrosomie, Fehlbildungen
<u>Kardiovaskuläres System</u>	<u>Krebs</u>	Dystokie, Kaiserschnitt
Hypertonie	Ösophagus, Dünndarm, Kolon, Rektum, Leber, Gallenblase, Pankreas, Niere, Leukämie, Multiples Myelom, Lymphom	<u>Andere</u>
Koronare Herzkrankheit	In Frauen: Endometrium, Cervix uteri, Ovar	Pseudotumor cerebri
Herzinsuffizienz	In Männern: Prostata	Proteinurie, nephrotisches Syndrom
Schlaganfall	Harninkontinenz	Hautinfektion
Thrombose		Lymphödem
<u>Atmungssystem</u>		Komplikationen bei Anästhesie
Asthma		Parodontitis, Parodontose
Schlafapnoe		
Hypoxämie		
Pickwick-Syndrom		
Arthrose und Arthralgie		

#### **1.4.2. Behandlung der Adipositas**

Die Behandlung von Übergewicht erfolgt über das Wiederherstellen des Gleichgewichts von Energieaufnahme und –verbrauch. Verschiedene Diäten, mit unterschiedlicher Gewichtung der Makronährstoffe, haben keine gravierenden Unterschiede bei der Behandlung gezeigt; das wichtigste Kriterium ist eine kalorienarme Ernährung (Wadden *et al.*, 2012). Allerdings können bestimmte Diäten in Verbindung mit anderen Erkrankungen Vorteile bieten, wie beispielsweise eine kohlenhydratarme Diät für Typ 2-Diabetiker (Wadden *et al.*, 2007). Neben der Veränderung der Essgewohnheiten ist es essentiell, dass zusätzlich die körperliche Aktivität erhöht wird, um den Energieverbrauch zu steigern. Patienten die ihre Lebensweise in dieser Weise umstellen, reduzieren im Durchschnitt innerhalb von 6 Monaten ihr Gewicht um ca. 10%. Weitere Gewichtsreduktionen können kaum erreicht

werden. Im Gegenteil gewinnen im ersten Jahr nach der Behandlung die meisten Patienten etwa 35% des verlorenen Gewichts zurück, und nach 5 Jahren haben bereits mehr als die Hälfte der Patienten ihr Ursprungsgewicht wieder erreicht (Sarwer *et al.*, 2009).

Die derzeit einzige dauerhaft erfolgreiche Behandlungsmethode mit starker Gewichtsreduktion ist die bariatrische Chirurgie (Sjostrom *et al.*, 2004). Dazu zählen unterschiedliche Eingriffe, wie das Einengen des Magendurchmessers mit einem Magenband oder der Magenbypass, bei dem ein Großteil des Magens umgangen wird. Zwei Jahre nach dem Eingriff ist das Gewicht der Patienten um ca. 20% reduziert, und die Reduktion hält auch nach 10 Jahren noch an (Picot *et al.*, 2009). Die Studie zeigt außerdem, dass mit der Gewichtsreduktion eine Verringerung der Risiken für Folgeerkrankungen einhergeht. Da es sich bei dieser Behandlungsmethode um einen schweren chirurgischen Eingriff handelt, werden für diese Behandlung nur stark adipöse Patienten, mit einem BMI  $\geq 40$  bzw. BMI  $\geq 35$  mit Adipositas-bedingter Komorbidität, bei denen andere Behandlungsmethoden erfolglos geblieben sind, berücksichtigt.

Es wird seit geraumer Zeit intensiv an pharmakologischen Behandlungsmethoden geforscht, um eine langfristige Gewichtsreduktion zu erzielen, die Umstellung der Lebensweise zu unterstützen und den chirurgischen Eingriff überflüssig zu machen. Mehrere Medikamente wie z.B. Sibutramin wurden zur Behandlung der Adipositas bereits eingesetzt. Sibutramin hemmt die Wiederaufnahme der Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin in die Nervenzelle. Dadurch wird die Erregung von Adrenozeptoren verstärkt, was zu einer Verringerung des Appetits führt (Lean, 2001). Die meisten Medikamente wurden jedoch in den letzten Jahren wegen zu starker Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen (Kang und Park, 2012). Eines der wenigen Medikamente, das in den meisten Ländern noch zugelassen ist, ist Orlistat, ein Inhibitor gastrointestinaler Lipasen (Li *et al.*, 2005). Die Aufnahme von Fetten aus der Nahrung wird damit um ca. 30% reduziert, jedoch wird auch die Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen vermindert. Nach 12 monatiger Behandlung beträgt die Gewichtsreduktion bei Orlistat-behandelten Patienten etwa 2,9 kg, im Vergleich zu der Placebogruppe. Orlistat ist auch das einzige derzeit in Deutschland zugelassene Medikament zur Adipositasbehandlung.

Durch das erweiterte Verständnis der Regulation der Nahrungsaufnahme und der beteiligten Peptide, sowohl auf gastrointestinaler Ebene als auch im Nervensystem, wurde eine Vielzahl möglicher pharmakologischer Angriffsstellen identifiziert, und eine große Anzahl neuer Substanzen befindet sich derzeit in der Entwicklung und in klinischen Tests. Im peripheren System wirkende Substanzen sind beispielsweise das GLP-1-Analogon Liraglutid und das Amylin-Analogon Pramlintid (Kushner, 2012). Eine im ZNS wirkende Substanz ist Lorcaserin, ein Agonist des Serotoninrezeptorsubtyps 5-HT<sub>2C</sub>. Lorcaserin hat im Juni 2012 von der US-Amerikanischen Gesundheitsbehörde eine Zulassung erhalten

([http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2012/022529Orig1s000Approv.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/022529Orig1s000Approv.pdf); abgerufen am 20. November 2012). Weitere Substanzen sind in einem Artikel von Kim und Kollegen aufgelistet, wobei auffällt, dass diese Substanzen jeweils nur an einer Stelle des Regulationssystems zur Nahrungsaufnahme ansetzen (Kim *et al.*, 2011). Bei einer polygenetischen Erkrankung wie der Adipositas erscheint es allerdings sinnvoll, an mehreren Punkten gleichzeitig anzusetzen. Enzyme wie NEP, die ein sehr breites Substratspektrum abdecken, sind deshalb vielversprechende Kandidaten bei der Suche nach neuen pharmakologischen Behandlungsmethoden.

### **1.4.3. Molekulare Regulation der Nahrungsaufnahme**

#### **1.4.3.1. Entdeckung des anorexigenen Peptids Leptin**

Da die Regulation der Nahrungsaufnahme als eine der grundlegendsten Funktionen zum Überleben eines Organismus angesehen werden kann, besteht an der Aufklärung der zugrundeliegenden Prozesse schon seit langer Zeit ein starkes wissenschaftliches Interesse. In den 1940er Jahren konnte erstmals in Läsionsstudien an Ratten gezeigt werden, dass der Hypothalamus das wesentliche Zentrum für die Steuerung der Nahrungsregulation im Gehirn ist (Hetherington und Ranson, 1942). In dieser Studie führte eine Schädigung im Bereich des ventromedialen Hypothalamus bei den Versuchstieren zur Entwicklung einer Adipositas, die auf einer Erhöhung der Nahrungsaufnahme beruhte. Die Arbeit führte zu der Hypothese, dass in gesunden Tieren in dieser Hirnstruktur ein Sättigungssignal verarbeitet wird. Diese Annahme wurde durch einen weiteren Versuch bestätigt, bei dem zwei Ratten chirurgisch so mit einander verbunden wurden, dass beide Tiere einen gemeinsamen Blutkreislauf teilten (Parabiose) (Hervey, 1959). Wurde nun einem der Tiere eine Läsion im ventromedialen Hypothalamus zugefügt, nahm dieses Tier dramatisch an Gewicht zu und entwickelte rasch eine Adipositas, während das zweite Tier weniger fraß und an Gewicht verlor. Die Beobachtung wurde damit erklärt, dass ein Sättigungssignal, welches im Tier mit der Läsion nicht mehr verarbeitet werden konnte, durch die Parabiose auf das zweite Tier übertragen, und dort im Hypothalamus verarbeitet wurde. Dies führte zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme. Zur Klärung der Herkunft dieses Signals war bereits einige Jahre zuvor die Lipostat-Theorie aufgestellt worden, die besagte, dass Signalmoleküle vom Fettgewebe ausgeschüttet und im Hypothalamus verarbeitet würden (Kennedy, 1953).

Dieses Molekül konnte durch unterschiedliche experimentelle Ansätze von Coleman und Friedmann identifiziert werden. In den Jackson-Laboratorien wurden durch Inzucht zwei Mauslinien generiert, die eine Adipositas entwickelten. Die Gene, in denen die

zugrundeliegenden Mutationen auftraten, wurden *obese (ob)* (Ingalls *et al.*, 1950) und *diabetes (db)* (Coleman und Hummel, 1967) genannt. Nachdem die Linien auf den gleichen genetischen Hintergrund gekreuzt wurden, waren die Phänotypen beider Mauslinien kaum voneinander zu unterscheiden (Hummel *et al.*, 1972; Coleman und Hummel, 1973). In Parabiose-Experimenten wurden Tiere die homozygot für die *db* Mutation sind (*db/db*-Mäuse), mit solchen die homozygot für die *ob* Mutation sind (*ob/ob*-Mäuse), verbunden (Coleman, 1973). Die *ob*-Mäuse begannen rasch Gewicht zu verlieren, und starben letztlich durch Verhungern. Bei den *db*-Mäusen traten hingegen keine Veränderungen auf. Die Beobachtung erklärte Coleman damit, dass ein Sättigungssignal in hohen Konzentrationen in den *db*-Mäusen gebildet wurde, das Signal jedoch in diesen Tieren nicht verarbeitet werden konnte. Im Gegensatz dazu führt die homozygote Mutation im *ob*-Gen zum Fehlen eines Sättigungssignals, wie auch ein weiterer Versuch in dieser Studie zeigt: Wurde der Blutkreislauf der *ob*-Mäuse mit denen von wildtypischen Geschwistern verbunden, konnte die Gewichtszunahme deutlich verringert werden.

Im Labor von Friedmann wurde erstmals das Gen kloniert, das die *ob* Mutation trägt. Das Gen kodiert das Hormon Leptin (Zhang *et al.*, 1994). In den *ob/ob*-Mäusen ist Leptin durch die Mutation nicht mehr funktionsfähig. Weiterhin konnte die Gruppe zeigen, dass das *db*-Gen für einen Leptin-Rezeptor kodiert (Lee *et al.*, 1996). Sie konnten sechs unterschiedliche „*splice*“-Varianten des Rezeptors identifizieren, von denen in den *db/db*-Mäusen nur eine einzige durch die Mutation funktionsunfähig ist. Diese „*splice*“-Variante wird hauptsächlich im Hypothalamus exprimiert, wie in der Studie ebenfalls gezeigt werden konnte.

Leptin wird von den Adipozyten proportional zu ihrer Größe sekretiert (Considine *et al.*, 1996), seine Wirkung entfaltet es jedoch im Gehirn (Myers *et al.*, 2008). Daran wird deutlich, dass die Signale zur Regulation der Nahrungsaufnahme, zwar im Gehirn verarbeitet werden, aber dort nicht entstehen müssen. Vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass Leptin nicht nur in Adipozyten, sondern auch in Zellen der Magenschleimhaut produziert wird (Peters *et al.*, 2005). Es wird während der Nahrungsaufnahme von der Magenschleimhaut ausgeschüttet und wirkt appetithemmend. Allerdings ist die Leptinkonzentration im Magen vergleichsweise gering. Die Gabe von rekombinantem Leptin zur Behandlung von Adipositas wurde kurz nach Entdeckung des Peptids diskutiert. Da jedoch die überwiegende Anzahl der adipösen Patienten einen hohen Leptinspiegel aufweisen, der proportional zur Körperfettmenge ansteigt, waren diese Behandlungsversuche in den wenigsten Fällen erfolgreich.

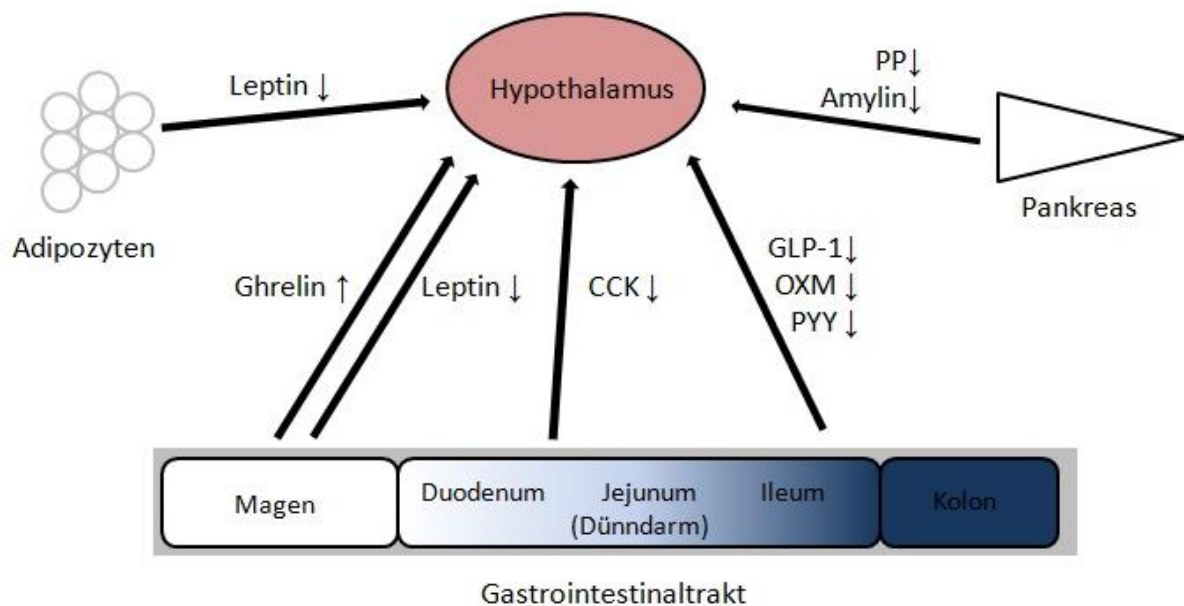
### 1.4.3.2. Hunger regulierende Hormone im peripheren System

Im Darm wurden in den unterschiedlichen Abschnitten spezifische Peptide identifiziert, die die Nahrungsaufnahme beeinflussen können. Im Duodenum und Jejunum wird das Peptid CCK nach der Aufnahme von Fetten und Proteinen sekretiert, das die Entleerung des Magens verzögert und die Nahrungsaufnahme reduziert (Dockray, 2009). CCK konnte in mehreren unterschiedlichen Formen identifiziert werden; hauptsächlich gefunden wurden CCK-58, -33, -22 und -8, die alle biologisch aktiv sind. In Ratten konnte erstmals gezeigt werden, dass die CCKs zu einer Verminderung der Nahrungsaufnahme führen. Der Effekt trat nicht mehr auf, wenn CCK mehr als 30 Minuten vor dem Beginn der Mahlzeit verabreicht wurde (Gibbs *et al.*, 1973). Mit dem Oktapeptid CCK-8 wurde der anorexigene Effekt später auch im Menschen nachgewiesen (Kissileff *et al.*, 1981). Im Ileum und Kolon wurden die Peptide GLP-1, Oxyntomodulin (OXM) und PYY identifiziert, die alle die Nahrungsaufnahme sowohl im Tiermodell als auch im Menschen verringern (Flint *et al.*, 1998; Batterham *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2003). Sowohl GLP-1, als auch OXM, werden posttranslational im Darm aus dem Protein Proglucagon gebildet. GLP-1 regt zusätzlich die Ausschüttung von Insulin an, was bei Überlegungen zu Therapiemöglichkeiten bedacht werden muss (Baggio und Drucker, 2007). In einer Studie zur Wirkung von OXM wurde beobachtet, dass in übergewichtigen und adipösen Patienten, neben dem anorexigenen Effekt, zusätzlich eine Erhöhung der physischen Aktivität, und dadurch ein erhöhter Energieverbrauch, während der Behandlung mit OXM auftrat (Wynne *et al.*, 2006).

Vom Pankreas werden nach der Nahrungsaufnahme die Hormone pankreatisches Polypeptid (PP), Amylin und Insulin ausgeschüttet. Die beiden Erstgenannten zeigen im Tiermodell eine anorexigene Wirkung; im Menschen konnte bislang jedoch nur für Amylin ein solcher Effekt bestätigt werden (Karra und Batterham, 2010). Die Wirkung von Insulin ist noch nicht abschließend geklärt. Insulintherapie im Menschen führt zwar häufig zu einer Gewichtszunahme der Patienten, doch dies ist möglicherweise auch auf die verwendeten Insulinanaloga zurückzuführen, wie Versuche an Ratten zeigen (Rojas *et al.*, 2011).

Das einzige bislang identifizierte Signalmolekül im Gastrointestinaltrakt, das eine orexigene Wirkung hat, ist das Peptid Ghrelin. In Ratten wurde sowohl nach subkutaner, als auch nach intracerebroventrikulärer Injektion von Ghrelin gezeigt, dass die Nahrungsaufnahme, und daraus resultierend das Körpergewicht, dosisabhängig erhöht werden konnte (Tschöp *et al.*, 2000). Auch im Menschen führt Ghrelin zu gesteigertem Appetit und erhöhter kalorischer Aufnahme (Wren *et al.*, 2001). Interessanterweise wurden jedoch im Blut adipöser Patienten verringerte Ghrelin-Konzentrationen gefunden (Tschöp *et al.*, 2001). In Mäusen mit einer Ghrelin-Defizienz sieht man zudem keine Veränderung im Fressverhalten, verglichen mit ihren wildtypischen Wurfgeschwistern (Sun *et al.*, 2003). Die peripher ausgeschütteten

Peptide, welche die Nahrungsaufnahme beeinflussen, sind in Abb. 4 noch einmal zusammengefasst.



**Abb. 4 Schematische Übersicht der peripher ausgeschüttete Hormone und deren Effekt auf die Nahrungsaufnahme (CCK = Cholecystokinin, GLP-1 = Galanin-like peptide 1, OXM = Oxyntomodulin, PYY = Peptide YY, PP = Pankreatisches Peptid, ↑ = orexigener Effekt, ↓ = anorexigener Effekt)**

### 1.4.3.3. Signalverarbeitung im Hypothalamus

Die Verarbeitung der Peptidsignale im Gehirn findet im Wesentlichen im Nucleus arcuatus des Hypothalamus statt. Hier befinden sich zwei Arten von Nervenzellen erster Ordnung, die für die Regulation der Nahrungsaufnahme verantwortlich sind:

1) POMC und Kokain- und Amphetamin reguliertes Transkript (*Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) exprimierende Neuronen (POMC/CART-Neuronen) vermitteln die Signale zur Verminderung des Appetits und der Nahrungsaufnahme und steuern energieverbrauchende Prozesse. POMC ist ein Vorläuferprotein aus dem eine Reihe weiterer biologisch aktiver Peptide abgespalten werden, von denen  $\alpha$ -Melanoytostimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) eine entscheidende Rolle bei der Nahrungsaufnahme spielt (Cone, 2005). Tiere mit einer POMC-Defizienz, haben, aufgrund einer erhöhten Nahrungsaufnahme, ein erhöhtes Körpergewicht, verglichen mit ihren wildtypischen Wurfgeschwistern (Yaswen *et al.*, 1999). Durch intraperitoneale Injektion von  $\alpha$ -MSH konnte das Gewicht dieser Tiere reduziert werden. Ebenso konnte bei intracerebroventrikuläre

Injektion von CART in Ratten ein anorektischer Effekt gezeigt werden. (Kristensen *et al.*, 1998).

2) NPY und Agouti-verwandtes Protein (*Agouti-related protein*) exprimierende Neuronen (NPY/AgRP-Neuronen) verarbeiten Signale die zu einer Erhöhung des Appetits und der Nahrungsaufnahme führen; durch intracerebroventrikuläre Injektion von NPY und AgRP konnte belegt werden das beide Substanzen orexigen wirken (Morley *et al.*, 1987; Rossi *et al.*, 1998).

Die Aktivierung dieser beiden Neuronentypen führt zu einer Signalweiterleitung in den paraventriculären Nucleus und den lateralen Hypothalamus, die ihrerseits orexigene Peptide wie MCH oder Orexin bzw. anorexigene Substanzen wie das Corticotropin-freisetzende Hormon (*corticotropin-releasing hormone*; CRH) oder Thyreotropin-freisetzende Hormon (*thyreotropin-releasing hormone*; TRH) freisetzen (Gao und Horvath, 2007). Bei der Prozessierung werden im Gehirn noch eine Reihe weiterer Signale, beispielweise sensorische Signale von Geruch oder Geschmack berücksichtigt (Berthoud und Morrison, 2008), deren Betrachtung den Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch sprengen würden.

## 1.5. Ziel der Arbeit

Das Enzym Nephrylsin besitzt ein sehr breites Substratspektrum und konnte bereits mit vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in Verbindung gebracht werden, wie z. B. der Blutdruckregulation und der Alzheimer Krankheit (Turner, 2003; Skidgel und Erdos, 2004). Auch eine Reihe von Peptiden die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind, gehören zu den Substraten von NEP. In unserer Arbeitsgruppe konnte der Einfluss von NEP auf die Nahrungsaufnahme im Tiermodell nachgewiesen werden (Becker *et al.*, 2010). Es könnte gezeigt werden, dass es bei NEP-defizienten Tieren ab einem Alter von ca. 6 Monaten zu einer Erhöhung der Nahrungsaufnahme und damit zur Entwicklung eines adipösen Phänotypen kommt. Bei wildtypischen Tieren wurde durch die Gabe des peripher wirkenden NEP-Inhibitors Candoxatril ebenfalls eine Erhöhung der Nahrungsaufnahme induziert, die zu einer Erhöhung des Körpergewichts der Tiere führte. Der Effekt des peripheren NEP auf die Regulation der Nahrungsaufnahme sollte weiter untersucht werden. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- 1) Das Reaktionsverhalten des in der Literatur beschriebenen fluoreszierenden NEP-Substrates Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp sollte evaluiert werden um Substrat und Reaktionsbedingungen für eine Etablierung einer fluorimetrischen Messmethode zur NEP-Aktivitätsmessung großer Probenansätze zu optimieren.
- 2) Es sollten DNA-Konstrukte kloniert werden, um sie zur Generierung zweier transgener Mauslinien mit gewebsspezifischer Überexpression von NEP einzusetzen:
  - Überexpression in neuronalen Zellen.
  - Überexpression in endothelialen Zellen.
- 3) Die NEP-aktivierende Wirkung unterschiedlicher Substanzen sollte in Zellkultur-experimenten evaluiert werden.
  - Validierung der Aktivitätssteigerung von in der Literatur beschriebenen Substanzen und von Substanzen aus einer Hochdurchsatz-Suche.
  - Diskimierung zwischen NEP-Aktivitätssteigerung durch allosterische Modulation und erhöhter Enzymmenge.
- 4) Es sollte im Tierversuch die Frage geklärt werden, ob durch eine Erhöhung der Aktivität von NEP eine Gewichtsreduktion induziert werden kann.



## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den folgenden Firmen: Fluka, Calbiochem, Merck, Pierce, Roth, Roche, Serva und Sigma-Aldrich. Restriktionsenzyme wurden von Roche, DNA-Aufreinigungskits wurden von Qiagen bezogen. Molekularbiologische Reagenzien stammen von Invitrogen, Promega, Qiagen und Stratagene. Oligonukleotide wurden von Invitrogen bezogen.

### 2.2. Lösungen und Puffer (in alphabetischer Reihenfolge)

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Lösungen und Puffer mit Milli-Q Wasser angesetzt.

Anodenpuffer I (Elektrophoretischer Transfer)	30 mM Tris Base 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II (Elektrophoretischer Transfer)	300 mM Tris Base 20% (v/v) Methanol
Auffüllpuffer (10x) (Klenow-Fragment)	500 mM Tris (pH 7.5) 100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT 500 µg/ml BSA
Blockierungslösung (Western Blot)	5-9% (w/v) Magermilchpulver in TBST, je nach verwendeten Antikörpern (siehe dort)
Coomassie Entfärbelösung (Coomassie Färbung)	0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig
Coomassie Färbelösung (Coomassie Färbung)	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig
Coomassie Fixierungslösung (Coomassie Färbung)	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig
dNTP-stock Lösung (PCR)	je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

GTE-Puffer (Plasmid Mini Präparation)	25 mM Tris/HCl (pH 8,0) 25mM Glukose 10mM EDTA 1 mg/mL
Ethidiumbromid-Lösung (DNA Gelelektrophorese)	
Kathodenpuffer (Elektrophoretischer Transfer)	25 mM Tris Base 40 mM 6-Aminocaprinsäure 20% (v/v) Methanol
Ohrlochpuffer (Genotypisierung)	10 mM Tris (pH 8,5) 5 mM EDTA (pH 8,0) 0,2% (w/v) SDS 200 mM NaCl 5% (v/v) Essigsäure
Ponceau-Entfärbelösung (Ponceaurot Färbung)	
Ponceau S Lösung (Ponceaurot Färbung)	1% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Ponceau S
Proteinase K Stammlösung (Genotypisierung)	10 mg/mL
RNase A Stammlösung (Genotypisierung)	4 mg/mL
SDS-Laufpuffer (10x) (SDS-Page)	0,25 M Tris/HCl, pH 8,3 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (5x) (SDS-PAGE)	185 mM Tris/HCl, pH 6,8 50% (v/v) Glycerol 10% (w/v) SDS 250 mM DTT 0,05% (w/v) Bromphenolblau
SDS/NaOH-Lösung (Plasmid Mini Präparation)	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS
TAE (10x) (DNA-Gelelektrophorese)	40 mM Tris/HCl, pH 8,2 40 mM Na-Acetat 1 mM EDTA
TB Medium (1) (Nährmedium)	13,3 g/L Bacto-Trypton 26,7 g/L Hefeextrakt 0,44% (v/v) Glycerol

TB Phosphatpuffer	170 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
(Nährmedium)	720 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
TBS (10x)	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
(Western Blot)	1,5 M NaCl
TBS-T	TBS
(Western Blot)	0,05% (v/v) Tween 20
TE	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
X-Gal Färbelösung	5 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]
	5 mM K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mg/mL 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galacto- pyranosid (X-Gal)

### 2.3. Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
Klenow Fragment	Roche
Rekombinantes humanes NEP	R&D Systems
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Restriktionsenzyme	Roche, NEB
RNase A	Sigma-Aldrich
Taq-Polymerase	Bioline
T4-DNA Ligase	Roche

### 2.4. Bakterienstämme

<b><i>E. coli</i> DH5α (subcloning efficiency)</b> (Invitrogen)	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> λ- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> λ <sup>-</sup>
<b><i>E. coli</i> XL-1 Blue (subcloning grade)</b> (Stratagene)	F' <i>proAB lacIq</i> ΔM15Tn10Tet <sup>r</sup> <i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i>

## 2.5. Zelllinien

<b>BAEC</b> (Primärkultur)	<i>bovine aortic endothelial cell</i> , endotheliale Zelllinie aus Rinderaorten
<b>HDMEC</b> (PromoCell)	<i>human dermal microvascular endothelial cell</i> , endotheliale Zelllinie aus humaner juveniler Vorhaut und adulter Haut
<b>PAEC</b> (Primärkultur)	<i>porcine aortic endothelial cell</i> , endotheliale Zelllinie aus Schweineaorten
<b>Neuro-2a</b> (ATCC)	murine Neuroblastoma Zelllinie
<b>SK-N-SH</b> (ATCC)	humane Neuroblastoma Zelllinie
<b>COS-7</b>	Zelllinie aus Nierenzellen der Grünen Meerkatze
<b>HEK293</b>	<b>human embryonic kidney</b> , Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen

## 2.6. Nährmedien für Bakterien

<b>LB-Medium</b>	10 g/L Bacto-Trypton, pH 7,4 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt
<b>TB-Medium</b>	900 mL TB Medium (1) 100 mL TB Phosphatpuffer (frisch ansetzen)
<b>LB-Amp-Medium</b>	100 mg/L Ampicillin in LB-Medium
<b>LB-Amp-Platten</b>	15 g/L Agar in LB-Medium 100 mg/L Ampicillin
<b>X-Gal Platten</b>	15 g/L Agar in LB-Medium 100 mg/L Ampicillin 50 mg/L

## 2.7. Zellkulturlösungen und – medien

DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ) (Invitrogen)	Grundmedium
Komplettes DMEM	DMEM 10% Fetales Kälberserum 1% Natriumpyruvat 1% Penicillin/Streptomycin
SK-N-SH Medium	Komplettes DMEM 1% nicht-essentielle Aminosäuren
EGM-2 ( <i>endothelial growth medium</i> ) (Lonza)	Kultivierungsmedium nach Anweisung des Herstellers
RPMI-1640 ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ) (Invitrogen)	Grundmedium
Einfriermedium	Kultivierungsmedium 10% Fetales Kälberserum 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)
Trypsin/EDTA-Lösung	0.05% Trypsin 200 mg/L EDTA

## 2.8. Vektoren und Plasmide

Vektorkarten von allen verwendeten Konstrukten sind im Anhang 2 aufgeführt. Alle Schnittstellen, die im Zuge der Klonierungen genutzt worden sind, wurden eingezeichnet.

### 2.8.1. Kommerziell erhältliche Vektoren

<b>pcDNA3.1(+)</b> (Invitrogen)	Expressionsvektor für Säugetierzellen
<b>pBluescript KS (+)</b> (Stratagene)	Klonierungsvektor (Phagemid)
<b>pSL301</b> (Invitrogen)	Klonierungsvektor
<b>pGem®T-easy Vektor</b> (Promega)	TA-Klonierungsvektor

## 2.8.2. Erstellte und genutzte Plasmide

<b>pcDNAmNEP</b>	pcDNA3.1(+) Vektor mit kodierender Sequenz von murinem NEP
<b>pNSE Mas</b>	Vektor mit NSE-Promotor gefolgt von der kodierenden Sequenz des Mas-Rezeptors (Alenina, 2003).
<b>pNSE<math>\Delta</math>XbaI</b>	Plasmid wurde aus pNSE Mas durch Verdau mit Restriktionsenzym <i>XbaI</i> und Religation erhalten – enthält nur den NSE-Promotor.
<b>pNSEmNEP</b>	Plasmid wurde aus pcDNAmNEP durch Austausch des CMV Promotors gegen den NSE-Promotor erhalten.
<b>pNSEmNEP-2</b>	Plasmid, das aus pNSEmNEP durch gezielte Mutation erhalten wurde.
<b>pLacZ</b>	Plasmid zur Expression von $\beta$ -Galactisodase, eingesetzt zur Bestimmung von Transfektionseffizienzen (Geschenk von Dr. Wang Yong)
<b>pT2HlacZpA11.7</b>	Plasmid bestehend aus Tie2-Promotor, einem LacZ kodierenden Abschnitt und dem kompletten Tie2-Enhancer (Erhalten von Prof Sato (Schlaeger <i>et al.</i> , 1997)).
<b>pTie2mNEP</b>	Plasmid bestehend aus dem Tie2-Promotor, der kodierenden Sequenz für murines NEP gefolgt von einer Polyadenylierungssequenz und dem kompletten Tie2-Enhancer
<b>pTie2mNEP-s</b>	Plasmid bestehend aus dem Tie2 Promotor, der kodierenden Sequenz für murines NEP gefolgt von einer Polyadenylierungssequenz und einem verkürzten Tie2-Enhancer ( <i>XhoI-KpnI</i> )
<b>pTie2P</b>	Plasmid basierend auf pcDNA3.1(+), bei dem der CMV-Promotor entfernt und der Tie2-Promotor in die <i>HindIII</i> -Schnittstelle des Polylinkers integriert wurde.
<b>pBS KSmNEP</b>	pBluescript KS (+) Vektor mit kodierender Sequenz von murinem NEP und BGH pA Terminator
<b>pT2PmNEP</b>	Plasmid wurde erhalten indem hinter dem Tie2-Promotor die kodierende Sequenz für murines NEP und ein BGH pA Terminator kloniert wurde.
<b>pSL-T2E-s</b>	Das Tie2 Enhancerfragment <i>XhoI-KpnI</i> wurde über diese Schnittstellen in den Klonierungsvektor pSL301 integriert

pcDNA-T2E-1  
 pcDNA-T2E-2  
 pcDNA-T2E-3  
 pT2PmNEP-T2E-3a  
 pT2PmNEP-T2E-4  
 pcDNA-T2E-5

Plasmide die als Zwischenprodukte bei der Klonierung von pTie2mNEP geschaffen wurden. Enthalten unterschiedliche Fragmente des Tie2 Enhancers (siehe 4.2.2.).

## 2.9. Oligonukleotide und Primer Assays

<b>NEP125</b>	GAA GTT GTT GTC TAT GCT CC
<b>NEP133</b>	CCA TTA TGA ACC TCC AGG AC
<b>NeoPvu</b>	GGC AGC GCG GCT ATC GTG G
<b>POBGH3</b>	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
<b>NSE_Mu3</b>	GGA TCC AAG CTT GCA CGC CTG CAG G
<b>NSE52</b>	GCC TGC TTC CCT CGA GTT GG
<b>Hs_MME_1_SG Primer Assay</b> (Qiagen)	humane NEP primer
<b>Hs_GAPDH_2_SG Primer Assay</b> (Qiagen)	humane GAPDH primer
<b>Mm_Mme_1_SG Primer Assay</b> (Qiagen)	murine NEP primer
<b>Mm_Gapdh_3_SG Primer Assay</b> (Qiagen)	murine GAPDH primer

## 2.10. Antikörper

### 2.10.1. Primäre Antikörper

NEP (NEP-12M) (Alpha Diagnostics)	Monoklonaler Anti-Human Neprilysin IgG, Ratte eingesetzt: 1:1.000 in 7% Blockierungslösung
GAPDH (G9545) (Sigma-Aldrich)	Polyklonaler Anti-GAPDH IgG, Kaninchen eingesetzt 1:10.000 in 9% Blockierungslösung
Calreticulin (Ab2907) (Abcam)	Polyklonaler Anti-Calreticulin IgG, Kaninchen Eingesetzt 1:750 in 5% Blockierungslösung

### 2.10.2. Sekundäre Antikörper

Anti-Rabbit (P0448) ( <i>DakoCytomation</i> )	Polyklonaler Anti-Kaninchen IgG, Ziege, HRP-gekoppelt Eingesetzt 1:1.000 in 5% Blockierungslösung
Anti-Rat (A5795) ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	Polyklonaler Anti-Ratte IgG, Kaninchen, HRP-gekoppelt Eingesetzt 1:100.000

### 2.11. Verwendete Mausstämme

BMFI	“Berlin Fat Mouse Inbred line”, Fettleibiges Mausmodell, generiert von Prof. Dr. Gudrun Brockmann, HU Berlin ( <i>Wagener et al.</i> , 2006)
NEP-KO	NEP defiziente Tiere auf einem C57/Bl6 Hintergrund, generiert von Bao Lu (M.D.), Harvard Medical School, Boston ( <i>Lu et al.</i> , 1995)
NSE NEP	Im Rahmen dieser Arbeit erstellte transgene Mauslinie
Tie2 NEP	Im Rahmen dieser Arbeit erstellte transgene Mauslinie



### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellbiologische Methoden**

Von allen Zelllinien wurde zu Beginn eine ausreichend große Menge an Zellen mit möglichst niedriger Passagenummer kultiviert und anschließend in Einfriermedium bis zur Durchführung der Versuche in flüssigem Stickstoff gelagert. Somit konnten alle Versuche einer Zelllinie mit Zellen gleicher Passagenummer durchgeführt werden.

##### **3.1.1. Kultivierung von neuronalen Zelllinien**

###### **3.1.1.1. SK-N-SH**

Die humanen SK-N-SH Zellen wurden im SK-N-SH Medium kultiviert. Es ist eine langsam wachsende Zelllinie, bei der alle drei bis vier Tage das Medium gewechselt wurde. Die Zellen wurden passagiert wenn ca. 90% Konfluenz erreicht war, wobei die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:4 aufgeteilt wurden. Die im Stickstofftank eingelagerten Zellen haben die Passagenummer P5.

###### **3.1.1.2. Neuro-2a**

Die murinen Neuro-2a Neuroblastoma Zellen wurden mit komplettem DMEM Medium kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert und die Zellen wurden bei ca. 80% -90% Konfluenz passagiert. Sie wurden dabei in einem Verhältnis von 1:6 aufgeteilt. Eingelagerte Zellen haben die Passagenummer P5.

##### **3.1.2. Kultivierung von endothelialen Zelllinien**

###### **3.1.2.1. BAEC, PAEC**

Bei diesen beiden endothelialen Zelllinien, handelt es sich um Zelllinien, die bereits im Labor vorhanden waren. Sie wurden in komplettem EGM-2 Medium kultiviert, und das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Die Zellen wurden bei mindestens 90% Konfluenz passagiert. Da die Zellen ein vermindertes Wachstum zeigen, wenn die Zelldichte sehr gering ist, wurden die Zellen höchstens im Verhältnis 1:4 aufgeteilt. Die Passagenummer der gelagerten BAEC Zellen ist P7, die der PAEC Zellen P6.

### **3.1.2.2. HDMEC**

HDMEC Zellen wurden mit komplettem DMEM Medium kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert und die Zellen wurden bei ca. 90% Konfluenz im Verhältnis 1:6 passagiert. Die Zellen wurden mit der Passagenummer P8 eingefroren.

### **3.1.3. Kultivierung anderer Zelllinien**

#### **3.1.3.1. COS-7 und HEK293 Zellen**

Diese beiden Zelllinien wurden in komplettem DMEM Medium kultiviert und das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Die Zellen wurden bei 70% - 90% Konfluenz passagiert und in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:8 aufgeteilt. Die Passagenummern der Zelllinien sind nicht bekannt, es wurden aber in beiden Fällen ein eigener Vorrat der Zelllinien angelegt, um ebenfalls Zellen gleicher Passagenummern für die Versuche verwenden zu können.

#### **3.1.4. Auftauen eingelagerter Zellen**

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Stickstofftank genommen und rasch aufgetaut. Der Inhalt eines Kryoröhrchens wurde in ein 15 mL Röhrchen überführt und mit dem jeweiligen Zellkulturmedium auf 10 mL aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen in der Zentrifuge bei RT für 5 min und 200 g pelletiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 mL frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt.

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre mit einem CO<sub>2</sub> Anteil von 5% kultiviert bis sie ausreichende Konfluenz erreicht hatten.

#### **3.1.5. Quantifizierung von Zellen**

Um Zellen zu quantifizieren wurden die Zellen auf den Zellkulturschalen oder in den Kavitäten der Mikrotiterplatten einmal mit sterilem PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche abgelöst. Für 10 cm Kulturschalen wurden 2 ml und für die Kavität einer 24-well Mikrotierplatte 500 µL der Trypsin/EDTA-Lösung verwendet.

Nachdem die Zellen von der Oberfläche abgelöst waren, wurde dieselbe Menge an Zellkulturmedium zugegeben und die Zellsuspension gründlich durchmischt. Es wurden 50 µL der Zellsuspension mit 50 µL 0,4%iger Trypanblau-Lösung vermischt und mit einer Neubauerzählkammer im Lichtmikroskop ausgezählt.

### **3.1.6. Einfrieren von Zellen**

Nachdem die Zellen in ausreichender Menge kultiviert worden waren, wurden die Zellen eingefroren und erst bei Bedarf für die entsprechenden Versuche wieder aufgetaut. Zum Einfrieren wurden die Zellen einer 10 cm Zellkulturschale zuerst mit Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden für 5 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pelett wurde in 800 µL des Kultivierungsmediums resuspendiert und in ein Kryoröhren überführt. Es wurde 100 µL FBS und 100 µL DMSO zugegeben und die Zellen in den -80°C Gefrierschrank gestellt. Nach einer Woche wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung eingelagert.

### **3.1.7. Transfektionstechniken**

#### **3.1.7.1. Transfektion mit PolyFect (Quiagen)**

Um die Plasmid DNA in die Zellen einzubringen wurden in dieser Arbeit überwiegend chemische Transfektionsverfahren genutzt. Das Transfektionsreagenz PolyFect (Quiagen) wurde zur Transfektion von COS-7 und HEK293 Zellen verwendet wie vom Hersteller beschrieben.

Für die Transfektion der Zelllinie Neuro-2a wurden die optimalen Transfektionsbedingungen nach den Empfehlungen des Herstellers im Vorversuch ermittelt (siehe 4.1.1.2.) und diese Bedingungen in allen nachfolgenden Versuchen verwendet. Danach wurden 100.000 Zellen pro Kavität einer 24-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden 0,5 µg Plasmid-DNA und 4 µL PolyFect in 100 µL DMEM-Medium ohne Serum und Antibiotika vermischt und für 15 Minuten bei RT stehen gelassen. Das Medium der Zellen wurde gegen 400 µL frisches komplettes DMEM-Medium ausgetauscht. Anschließend wurde der gesamte Transfektionsansatz hinzugegossen und die Zellen für 24 Std im Inkubator kultiviert.

### **3.1.7.2. Transfektion mit Lipofectamine®2000 (Invitrogen)**

Zur Transfektion von BAEC und PAEC Zellen wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine®2000 von Invitrogen genutzt. Beide Zelllinien wurden unter identischen Bedingungen transfiziert. Dazu wurden auf einer 24-well Platte pro Kavität 100.000 Zellen ausgesät, und über Nacht im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden pro Kavität 0,6 µg Plasmid-DNA zu 3,2 µL Lipofectamine®2000 in 100 µL Medium ohne Serum und Antibiotika gegeben. Das Gemisch wurde zur Komplexbildung 20 min bei RT stehen gelassen. In dieser Zeit wurde das Medium von den Zellen abgenommen und gegen 400 µL neues Medium, ohne Serum und Antibiotika, ausgetauscht. Anschließend wurde das Plasmid/Lipofectamine-Gemisch hinzu getropft. Die Zellen wurden für 4 Std. im Inkubator kultiviert, dann wurde das Medium mit dem Transfektionsgemisch abgenommen und zu den Zellen 500 µL des kompletten Kultivierungsmediums (mit Serum und Antibiotika) gegeben und für weitere 20 Stunden im Inkubator kultiviert.

### **3.1.7.3. Transfektion mit FuGene (Roche)**

Das Transfektionsreagenz FuGene von Roche wurde ebenfalls bei der Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen eingesetzt. Die Transfektionsbedingungen wurden eingesetzt wie im Handbuch des Herstellers vorgeschlagen. Es war aber bei den untersuchten Zelllinien den anderen Reagenzien nicht überlegen.

### **3.1.8. Anfärben von Zellen mit X-Gal**

Um Transfektionseffizienzen zu überprüfen wurden Zellen nach der Transfektion mit dem Plasmid pLacZ in 24-well Mikrotiterplatten angefärbt. Zum anfärben wurde X-Gal verwendet, dass durch  $\beta$ -Galactosidase in eine farbige Verbindung aufgespalten wird. Hierfür wurde das Kultivierungsmedium abgenommen und die Zellen für 10 min bei RT mit 500 µL 0,05% Glutaraldehyde inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Die fixierten Zellen wurden anschließend drei Mal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrte, wurde 1 mL der X-Gal Färbelösung auf die Zellen gegeben, und die Mikrotiterplatte für 24 Std bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionseffizienz unter dem Mikroskop durch auszählen der gefärbten Zellen ermittelt.

### **3.1.9. Stimulation von NEP in Zellekulturversuchen**

Stimulationsexperimente wurden für die Messung der NEP-Aktivität in 24-well Mikrotiterplatten, und für RNA-Messungen in 12-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Wurden die Zellen für mehr als 24 Stunden stimuliert, wurde jeden Tag das Medium gewechselt und das Stimulans in der verwendeten Konzentration erneut zugegeben.

Für alle Versuche wurden GTE und die sechs daraus erhaltenen Substanzen in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Substanz GW0742 wurde in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 100 µM, wie in 4.3.2.1 beschrieben. Die Substanzen, die bei Hochdurchsatz identifiziert wurden, wurden in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt.

#### **3.1.9.1. Akute Zellstimulation zur Aktivitätsbestimmung**

Bei den Experimenten wurden zur akuten Stimulation wurden die Zellen trypsiniert und anschließend gezählt. Es wurden 200.000 Zellen in 145 µL 50 mM lauwarmer Tris Puffer in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und 5 µL des jeweiligen Stimulans zugegeben, wobei jede Substanz zur Stimulation von drei Ansätzen eingesetzt wurde. Nach 10 min wurden 50 µL DALEK-Lösung zugegeben um die NEP-Aktivitätsmessung zu beginnen, wie in 3.3.5.1. beschrieben.

#### **3.1.9.2. Zellstimulation für 24 Stunden, 48 Stunden und 96 Stunden zur Aktivitätsbestimmung**

Es wurden 100.000 Zellen in 500 µL des jeweiligen Wachstumsmediums ausgesät und im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden 5 µL des jeweiligen Stimulans zugesetzt und die Zellen weiter im Inkubator kultiviert. Jede Substanz wurde zur Stimulation von Zellen in sechs Kavitäten verwendet. Sollten die Zellen für 24 Stunden stimuliert werden, so wurden die Zellen nach diesem Zeitraum einmal mit lauwarmem PBS gewaschen. Anschließend wurden in drei der Kavitäten die Anzahl der Zellen mit einer Neubauerzählkammer ermittelt, in den übrigen drei Kavitäten wurde mit der Aktivitätsmessung begonnen, wie in 3.3.5.1. beschrieben.

Bei den Ansätzen, bei denen die Zellen die für einen Zeitraum von 48 bzw. 96 Stunden stimuliert wurden, wurde jeweils nach 24 Stunden das Wachstumsmedium erneuert und erneut 5 µL der jeweiligen Stimulanzien zugegeben. Nach 96 Stunden wurden die Zellen

einmal mit lauwarmem PBS gewaschen, dann wurde in der Hälfte der Zellen die Anzahl bestimmt und in der anderen die NEP-Aktivität ermittelt (3.3.5.1.).

### **3.1.9.3. Zellstimulation für 24 Stunden für Untersuchung der RNA-Expression**

Zur Untersuchung der RNA-Expression der Zellen nach 24 stündiger Stimulation wurden ca. 200.000 Zellen pro Kavität einer 12-well Mikrotiterplatte in 1 mL Wachstumsmedium ausgesät und im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden 10 µL der jeweiligen Stimulanzen zu je drei der Kavitäten gegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden im Inkubator kultiviert. Dann wurden die Zellen einmal mit lauwarmem PBS gewaschen und die RNA isoliert (siehe 3.2.6.).

## **3.2. Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1. Klonierungstechniken**

#### **3.2.1.1. Restriktionsverdau von DNA**

Die zu schneidende DNA wurde nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen, in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer, für 1 Std inkubiert. Für einen Kontrollverdau wurde ein Ansatz mit Gesamtvolumen von 10 µL verwendet. Es wurden 0,5 µg bis 1 µg Plasmid mit 1 U Restriktionsenzym umgesetzt. Für einen präparativen Verdau wurden ca. 2,5 µg des Plasmids in 30 µL Gesamtvolumen mit der vom Hersteller empfohlene Menge des Enzyms verwendet. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die Pufferbedingungen gewählt, bei denen beide Enzyme mindestens eine Effizienz von 75% erreichten. Wenn es nicht möglich war einen Doppelverdau in einem für beide Enzyme geeigneten Puffer durchzuführen, wurde der Ansatz nach Verdau mit dem ersten Enzym im geeigneten Puffer über Mikrodialysemembranen Typ „VS 0,025µm“ (Millipore) aufgereinigt und anschließend mit dem zweiten Enzym in dem für dieses Enzym geeigneten Puffer verdaut.

#### **3.2.1.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Falls die geschnittene DNA dephosphoryliert werden musste um Religation zu verhindern, wurde je 0,5 µg des geschnittenen Plasmids 1 U alkalische Phosphatase (CIP; New England

Biolabs) in NEB-Puffer 4 in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ L hinzu pipettiert, und für 60 min bei 37°C inkubiert. War im Reaktionsansatz noch ein ausgeschnittenes Fragment vorhanden, musste die CIP-Konzentration verdoppelt werden um eine vollständige Dephosphorylierung aller Enden sicherzustellen. Im Anschluss an eine Dephosphorylierung musste der Ansatz gelelektrophoretisch aufgereinigt werden (siehe 3.2.1.4. und 3.2.1.5.) um weitere Reaktionen in nachfolgenden Schritten auszuschließen.

### **3.2.1.3. Auffüllen des Überhangs an DNA-Enden mit Klenow-Fragment**

Im Rahmen der Klonierung musste in einem Fall an einem in 5'-Richtung überstehenden Ende die komplementäre DNA aufgefüllt werden. Dies kann durch Klenow-Fragment erreicht werden. Dazu wurde 1  $\mu$ g Plasmid nach der Restriktion zusammen mit den notwendigen dNTPs in einer Konzentration von 1 mM und 1 U Klenow-Fragment (Roche) und 2  $\mu$ L Auffüllpuffer in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ L für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 20 minütige Inkubation des Ansatzes bei 65°C inaktiviert.

### **3.2.1.4. Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Ethidiumbromid-haltige Agarosegele in 1x TAE Puffer benutzt. Abhängig von den zu trennenden Fragmentgrößen wurden 1–1,5%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, bevor sie in die Taschen des Gels pipettiert wurden. Die Agarosegele liefen bei einer Spannung von 100-120 V und wurden nach der Auftrennung der Fragmente mit Hilfe eines Imagesystems (E.A.S.Y. RH Imager, Herolab) im UV-Licht analysiert.

### **3.2.1.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (UVT- 20 M, Herolab) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gelstück wurde dann auf eine selbst gebaute Säule gegeben. Dafür wurde die Spitze einer 1 mL Pipettenspitze abgeschnitten und mit einer kleinen Menge Glaswolle befüllt. Darauf wurde das Gelstück gelegt und mechanisch zerkleinert. Die Säule wurde dann auf ein 1,5 mL

Reaktionsgefäß gesetzt und für 10 min bei 15.000 g zentrifugiert. Die DNA haltige Lösung im Reaktionsgefäß konnte direkt weiter-verwendet oder mittels Phenol/Chloroform-Reinigung aufgereinigt werden.

#### **3.2.1.6. Phenol/Chloroform-Reinigung**

Die aufzureinigende Probe wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und mit der doppelten Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Das Gemisch wurde kurz gevortext und anschließend für 5 min bei 15.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die 2,5-fache Menge an eiskaltem abs. Ethanol zugegeben und zum Ausfällen der DNA für 30 min auf -20°C kalt gestellt. Danach wurde das Gemisch für 20 min bei 4°C mit 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellett einmal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellett wurde 5-10 min bei RT getrocknet und anschließend in 30 µL TE-Puffer aufgenommen.

#### **3.2.1.7. Bestimmung der DNA Konzentration**

Konzentrationen von Plasmid-DNA wurden Spektralphotometrisch mit dem S-30 Spectrophotometer (Boeco GmbH) bestimmt. Dazu wurden 10 µL der DNA-Probe mit Wasser auf 250 µL verdünnt und in eine Küvette pipettiert. Um den Hintergrund zu bestimmen wurde zuerst eine Probe reinen Wassers vermessen und anschließend die zu messende Probe. Das Gerät ermittelt zusätzlich das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Aus diesem Verhältnis lässt sich die Reinheit einer Probe abschätzen: für eine Probe von hoher Reinheit sollte der Wert zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

#### **3.2.1.8. Ligation**

Zur Ligation von DNA- Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase verwendet, wobei das Verhältnis zwischen Vektor und Fragment im Ansatz 1:3 betragen sollte. Ligationsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µL angesetzt. Für „sticky-end“ Ligationen wurden die Ansätze mit 1 U Ligase für 1 Stunde bei RT inkubiert, „blunt-end“-Ligationen wurden über Nacht bei 16°C mit 5 U inkubiert.



### **3.2.1.9. TA-Klonierung**

Fragmenten, die mittels PCR amplifiziert wurden, wurden mittels TA-Klonierung mit dem pGEM® T-Vektor System (Promega) zwischenkloniert. Dazu wurde das Fragment nach der Amplifikation in einem Verhältnis von 3:1 entsprechend dem Handbuch des Herstellers in den T-easy Vektor ligiert.

### **3.2.1.10. Transformation in Bakterien**

Zur Transformation der verwendeten *E. coli*-Stämme (DH5α bzw. XL-1 Blue) wurden 100 µL einer Suspension der chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA (10-100 ng) oder einem Ligationsansatz (3.2.1.8. und 3.2.1.9.) versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (60 sec, 42°C) und Abkühlung auf Eis für 2 min, wurden 800 µL LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden sedimentiert (15 sec, 13.000 g, RT) und der Überstand anschließend zum Großteil abgenommen. Das Zellpellet wurde im Restüberstand resuspendiert, auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

## **3.2.2. Präparation von Plasmid-DNA**

### **3.2.2.1. Mini-Präparation**

Mit den nach der Transformation erhaltenen Bakterienkolonien (siehe 3.2.1.10.) wurden 3 mL Ampicillin-haltiges LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 1,5 mL der Übernachtskultur in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien sedimentiert (15 sec, 13.000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µL GTE-Puffer wieder resuspendiert. Zur Lysierung wurden 250 µL SDS/NaOH-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und anschließend mit 250 µL 3M Kaliumacetatlösung (pH 4,8) neutralisiert. Das Gemisch wurde für 10 min bei 4°C und 15.000 g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein zweites Mal für 10 min bei 4°C und 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 500 µL Isopropanol versetzt. Nach Pellettierung durch Zentrifugation (30 min, 4°C, 15.000 g) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 30 µL TE-Puffer aufgenommen.

### **3.2.2.2. Maxi-Präparation**

Für die Maxi-Präparation wurden 250 mL Ampicillin-haltiges LB-Medium mit 50 µL von der Übernacht-Kultur (siehe 3.2.2.1) angeimpft. Das angeimpfte Medium wurde über Nacht unter kräftigem Schütteln bei 37°C inkubiert, um eine hohe Anzahl an Bakterien zu erhalten. Für die Isolation der DNA wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### **3.2.3. Präparation von genomischer DNA aus Mausohren**

Für die Markierung der transgenen Tiere wurden in der Tiereinheit kleine Stücke aus den Mausohren gestanzt. Diese Mausohrstücke wurden anschließend zur Genotypisierung der Tiere genutzt. Dazu wurde zu diesem Ohrstück in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß 100 µl des Ohrlochpuffers und 12 µl Proteinase K-Lösung gegeben und bei 37°C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen ist die Proteinase K durch Erhitzen der Lösung für 10 min auf 95°C inaktiviert worden. Nach Zugabe von 400 µl TE/RNase-Puffer, kurzem Vortexen und Anzentrifugieren wurde die DNA-haltige Lösung direkt für die PCR-Analyse genutzt oder bei -20°C bis zur späteren Verwendung gelagert.

### **3.2.4. Genotypisierung mittels PCR**

Zur Genotypisierung der genetisch veränderten Tiere wurden, spezifische Genabschnitte der genomischen DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) amplifiziert und anschließend im Agarosegel aufgetrennt. Zur vollständigen Genotypisierung der Tiere waren jeweils zwei PCRs notwendig. Bei den *knockout*-Mäusen wurde sowohl eine natürlich vorkommende Sequenz innerhalb des Zielgenes amplifiziert, als auch die veränderte DNA-Sequenz, die zur Ausschaltung des Genes führt. Bei den transgenen Tieren dagegen wurde einmal auf das Transgen geprüft, und in der zweiten Genotypisierungs-PCR auf die natürlich vorkommende NEP-Sequenz. Damit konnte sichergestellt werden, dass die verwendete DNA nicht beschädigt war und ein falsch-negatives Resultat lieferte.

Ein Ansatz enthielt die folgenden Substanzen und wurde mit H<sub>2</sub>O auf 45 µL aufgefüllt:

genomische DNA	2 µL
je Primer	1,8 µL
dNTPs [5mM]	2,4 µL
10x PCR-Puffer	4,5 µL
Taq-Polymerase	0,25 µL
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	X µL

Die PCR-Programme bestanden aus folgenden Schritten:

1) Erste Denaturierungsphase	95°C	3 min
2) Denaturierungsphase	95°C	1 min
3) Annealing	T	30 sec
4) Elongationsphase	72°C	Z
Die Schritte 2) - 4) wurden 35 mal wiederholt		
5) Finale Elongation	72°C	10 min

Die für die jeweiligen PCRs verwendeten Primer sowie das zugehörige Volumen X an MgCl<sub>2</sub>, die Annealingtemperatur T und die Elongationszeit Z sind in Tabelle 2 angegeben.

**Tabelle 2: PCR-Bedingungen für die zur Genotypisierung verwendeten PCRs**

PCR	Primer 1	Primer 2	MgCl <sub>2</sub> [50 mM]: X =	Annealing temp.: T =	Elongations- zeit: Z =
NEP Wildtyp	NEP125	NEP133	2,6 µL	56°C	25 sec
NEP knockout	NEP125	NeoPvu	2,2 µL	58°C	1 min
NEP transgen	NEP125	POBGH3	2,0 µL	61°C	1 min

### 3.2.5. Ortsspezifische Mutagenese

Im Zuge der Klonierungsarbeiten sollte eine Base in der DNA-Sequenz eines Plasmids ausgetauscht werden. Diese ortsspezifische Mutagenese wurde mit einer PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer waren NSE52 und NSEMu3. Die PCR wurde durchgeführt wie unter 3.2.4. beschrieben. Es wurden 2,0 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub> eingesetzt, die Annealingtemperatur betrug 60°C und die Elongationszeit betrug 30 Sekunden.

### **3.2.6. Isolierung von RNA**

Zur Isolierung von RNA aus Organen und Zellen wurde eine Guanidiniumthiocyanat/Phenol/Chloroform Extraktion mit dem TRIzol Reagenz von Invitrogen durchgeführt. Dazu wurden ca. 75 mg des entsprechenden Gewebes in 1 mL TRIzol homogenisiert oder die Zellen in einer Kavität einer 12-well Mikrotiterplatte mit 500 µL TRIzol Reagenz lysiert. Die RNA wurde anschließend nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die isolierte RNA wurde photometrisch vermessen, die Qualität gelelektrophoretisch überprüft und bei -80°C weggefroren.

### **3.2.7. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR wurde mit einem LightCycler (Roche) durchgeführt. Dafür wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen verwendet. Primer wurden ebenfalls von Qiagen bestellt. Für die humanen Zelllinien wurde für NEP das QuantiTect Primer Assay Hs\_MME\_1\_SG und für das house-keeping Gen GAPDH das QuantiTect Primer Assay Hs\_GAPDH\_2\_SG verwendet. Für die Untersuchungen der Mausorgane die murinen Primer Assays Mm\_Mme\_1\_SG und Mm\_Gapdh\_3\_SG.

Reaktionsansätze wurden zubereitet wie im Handbuch des PCR Kits beschrieben und das dort angegebene PCR-Programm benutzt. Pro Ansatz wurden 10 ng RNA eingesetzt.

## **3.3. Biochemische Methoden**

### **3.3.1. Homogenisation von Gewebe**

Zur Herstellung von Gewebehomogenaten wurde das Gewebe gewogen und das 30-fache Volumen an eiskaltem 50 mM Tris-Puffer zugegeben und das Gewebe mit einem rotierenden Schermesser zerkleinert. Das krude Homogenat wurde anschließend mit einer Ultraschalllanze mit 15 Pulsen weiter zerkleinert und bei -80°C gelagert.

### **3.3.2. Membranpräparation aus Gewebehomogenaten**

Um die Membranfraktion aus dem Homogenat (siehe 3.3.1) zu erhalten, wurde das Homogenat nach der Ultraschallbehandlung für 30 min bei 4°C und 40.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält die cytosolische Fraktion und wurde bei -80°C gelagert. Das Pellet

wurde in 50% des ursprünglichen Volumens an 50 mM Tris-Puffer solubilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde nach der BCA Methode bestimmt. Hierfür wurde das Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet, um die Konzentration in einem Volumen von 25 µL auf 96-well Mikrotiterplatten zu bestimmen. Die Absorptionsmessung wurde mit einem Elx800 Lesegerät (Biotek) durchgeführt.

### **3.3.4. Western Blot Analyse**

#### **3.3.4.1. SDS-Gelelektrophorese**

Zur Analyse von Proteinen und Proteingemischen wurden diese in SDS-Polyacrylamid-Gelen (PAA-Gele) in Mini-PROTEAN Tetra Elektrophoresekammern (BIO-RAD) aufgetrennt. Es wurden Trenngele mit 10% Polyacrylamid, 375 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 1 mg/mL APS und 1 µg/mL TEMED verwendet. Das Sammelgel enthielt 4% Polyacrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 1 mg/mL APS und 1 µg/mL TEMED. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge 6-fach SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min auf 95°C erhitzt und kurz an zentrifugiert. Die Proben wurden entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Es wurde eine Spannung von 120 V angelegt, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, danach wurde die Elektrophorese bei 150 V fortgesetzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die vorgefärbte EZ-Run Prestained Rec Protein Ladder (Fisher Scientific) benutzt.

#### **3.3.4.2. Coomassie-Färbung**

Zur Färbung von PAA-Gelen mit Coomassie Färbung, wurde das Gel zuerst für 1 Stunde in Coomassie Fixierlösung geschwenkt. Dann wurde das Gel für 30 bis 60 min in Coomassie Färbelösung gelegt und anschließend in der Coomassie Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund komplett entfärbt war.

#### **3.3.4.3. Elektrophoretischer Transfer („Blotten“)**

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membranen wurde das *Semidry-Blot-System* Pegasus S (PHASE GmbH) verwendet. Auf die Kathodenplatte wurden zu unterst drei in Kathodenpuffer getränkte Whatman Blotting Papier Stücke geschichtet und darauf das PAA-Gel gelegt. Die PVDF-Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und für einige Sekunden in Methanol geschwenkt um die Membran zu aktivieren. Sie wurde dann in Anodenpuffer I getränkt und über das PAA-Gel gelegt. Es folgten drei in Anodenpuffer I getränkte Blotting Papiere und weitere drei Blotting Papiere die in Anodenpuffer II getränkt worden waren. Darauf wurde die Anodenplatte gelegt und eine Stromstärke von  $0,8 \cdot [\text{Fläche der Membran}]$  mA angelegt. Nach 1 Stunde war der elektrophoretische Transfer abgeschlossen.

#### **3.3.4.4. Ponceaurot-Färbung**

Die Membran wird für 30 min in Ponceau S Lösung geschwenkt. Anschließend wird die Membran mit Ponceau-Entfärbelösung inkubiert um den Hintergrund der Membran zu entfernen. Eine vollständige Entfärbung der Membran ist nicht notwendig um mit der Immunfärbung zu beginnen, dies geschieht während des Blockierungsschrittes (siehe 3.3.4.5).

#### **3.3.4.5. Immunfärbung der Proteine auf Nitrocellulosemembran**

Die Membran wurde mit TBS gewaschen, Blockierungslösung zugegeben und die Membran eine bis zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Anschließend wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C appliziert. Nachdem der ungebundene Primärantikörper durch fünf mal fünf-minütiges Waschen der Membran mit TBST entfernt worden war, wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST wurden die Proteinbanden mit Hilfe verstärkter Chemilumineszenz mit dem „ECL Plus Western Blotting Detection Reagents“-Kit von GE Healthcare nachgewiesen. Die Bilder wurden eingescannt und die Banden mit dem Programm ImageJ quantifiziert.

### **3.3.5. NEP-Aktivitätsmessung**

#### **3.3.5.1. DALEK-Methode**

Bei der DALEK-Methode wurde die zu untersuchende Probe mit 200  $\mu\text{M}$  des NEP-Substrats D-Ala<sup>2</sup>-Leu-enkephalin (DALEK; Bachem) in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$  bei 37°C geschüttelt. Bei Zellkultur Experimenten in 24-well Platten wurde das Substrat direkt in den Kavitäten durchgeführt nachdem die Zellen einmal vorsichtig mit lauwarmem PBS gewaschen wurden. Versuche mit Gewebehomogenaten oder den daraus gewonnenen Fraktionen wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationszeit variierte abhängig von der untersuchten Probe: Nieren- und Dünndarmproben wurden für 30 min, Lungenproben für 60 min, Gehirnproben für 360 min inkubiert. In den Zellkulturexperimenten wurden die Zellen jeweils für 120 min inkubiert. Es wurden parallel zusätzlich Proben mit 10  $\mu\text{M}$  des NEP Inhibitors Candoxatrilat inkubiert, um eventuelle unspezifische Abbauprozesse erkennen und herausrechnen zu können. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$   $\text{HClO}_4$  gestoppt, anschließend wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 13.000 g zentrifugiert und sofort mit der HPLC analysiert (siehe 3.3.5.3) oder bis zur späteren Messung bei -20°C gelagert.

#### **3.3.5.2. Fluoreszenzmethode**

Zur Bestimmung der NEP Aktivität mit einem fluoreszierenden Substrat wurden im Rahmen der Arbeit ausführliche Versuche durchgeführt um ein spezifisches Substrat und die optimalen Reaktionsbedingungen zu finden. Die vier verwendeten Substrate, Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp, Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-OH, Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-D-Arg-Arg-Val-EDDnp und Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp wurden jeweils von der Firma Bachem hergestellt.

Für die Untersuchungen wurden die Substrate, soweit nicht anders angegeben, in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  für 30 min mit 10 ng rekombinanter NEP oder verschiedenen Gewebeproben in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{L}$  bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$   $\text{HClO}_4$  gestoppt und die Proben in der HPLC gemessen (siehe 3.3.5.3). Die Messungen wurden zügig durchgeführt, da nach wenigen Stunden bereits eine Verringerung der zu messenden Fluoreszenz einsetzte.

### **3.3.5.3. High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)-Analysen**

Alle Proben wurden vor der Auftrennung für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Analyse erfolgte an einer HPLC von Shimadzu (CBM-20A, LC-20AD, Shimadzu) mit einer C12 Proteo Säule (90 Å Porengröße, 4 µm Partikelgröße, 250 x 4,60 mm, Phenomenex). Es wurden jeweils 100 µL Probenvolumen injiziert und die Laufgeschwindigkeit betrug 1 mL/min. Es wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet:

Das Substrat DALEK zusammen mit dem NEP spezifischen Produkt TAG zu wurde innerhalb von 30 min in einem Gradient von 5% bis 30% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure eluiert. Die Absorption wurde bei 205 nm gemessen.

Um nur TAG zu eluieren, wurde die Acetonitril-Konzentration für 2 min auf 5% gehalten und anschließend innerhalb von 16 min ein Gradient von 5% bis 15% gefahren. Die Absorption wurde hierbei ebenfalls bei 205 nm gemessen.

Die Fluoreszenzsubstrate und deren Produkte wurden innerhalb von 25 min mit einem Gradienten von 20% bis 40% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure eluiert. Zur Detektion betrug die Wellenlänge der Anregungsstrahlung 320 nm, und die Emissionsstrahlung wurde bei 420 nm gemessen. Wurden Absorptionsspektren aufgezeichnet, so wurden diese bei 205 nm gemessen

## **3.4. Versuche am Mausmodell**

### **3.4.1. Einfluss von GTE auf fettleibige BMFI-Mäuse**

Die Arbeiten an den Tieren wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Wolf Siems am FMP Berlin-Buch, insbesondere mit der Hilfe von Matthias Münzner, durchgeführt. Es wurden zwei Gruppen, bestehend aus jeweils neun männlichen BMFI-Mäusen, gebildet. Pro Käfig wurden zwei bis drei Tiere gehalten. Die Kontrollgruppe bekam normales Trinkwasser, während die zweite Gruppe in Leitungswasser gelösten Grüner Tee Extrakt (GTE; EFLA942, Frutarom) in einer Konzentration von 600 mg/kg pro Tag bekam. Um den bitteren Geschmack des Tee Extraktes zu überdecken, wurde die Lösung mit dem Süßstoff Saccharin versetzt, so dass beide Gruppen pro Tag gleichviel tranken. Alle Tiere konnten frei fressen und trinken. Das Futter wurde drei Mal pro Woche genau ausgewogen, und das Gewicht der Tiere ermittelt. Die Trinkflaschen wurden mindestens alle drei Tage erneuert. Vor Beginn des Versuchs und am Ende des Versuchszeitraumes wurde der Körperfettgehalt der Tiere bestimmt. Dazu wurde das NMR-Gerät „Minispec MQ10 NMR Analyzer“ (Bruker) und die Software von Echo Medical Systems (Houston) verwendet. Der Versuch dauert 51



Tage, danach wurden die Tiere getötet und die Organe für biochemische Analysen entnommen.

### **3.4.2. Einfluss von GTE auf NEP-defiziente Mäuse**

Für den Versuch wurden je zwei Gruppen NEP-defizienter Mäuse und zwei Gruppen ihrer wildtypischen Wurfgeschwister in einem Alter von drei Monaten verwendet. Jede Gruppe bestand aus 12 männlichen Tieren, die jeweils zu dritt in einem Käfig gehalten wurden und zu jeder Zeit frei fressen und trinken konnten. Für NEP-defiziente und wildtypische Tiere hatte jeweils eine Gruppe normales Leitungswasser zu trinken, die anderen beiden Gruppen bekamen in Leitungswasser gelösten GTE in einer Konzentration von 600 mg/kg pro Tag. Um den bitteren Geschmack des Tee Extraktes zu überdecken, wurde die Lösung mit dem Süßstoff Saccharin versetzt. Die Trinkflaschen wurden alle zwei bis drei Tage ausgewechselt, der GTE wurde direkt davor im Trinkwasser gelöst. Die Dauer des Versuchs betrug 42 Tage, danach wurden der Versuch beendet und die Tiere zur Organentnahme getötet.

### **3.4.3. Tötung und Organentnahme**

Die Tiere wurden zur Tötung in einen Behälter gesetzt, in den langsam CO<sub>2</sub> eingeleitet wurde. Nachdem das Tier verstorben war, wurde durch Herzpunktion Blut entnommen. Anschließend wurde das Tier am Bauchraum geöffnet und Nieren, Milz, Lunge und Herz entnommen. Der Dünndarm wurde ebenfalls entfernt und durch vorsichtiges Ausstreichen gereinigt. Das Tier wurde dekapitiert und das Gehirn entnommen. Es wurde unterteilt in Cerebellum, vordere und hintere Großhirnhälfte. Diese Teile wurden ein weiteres Mal in linke und rechte Hälfte geteilt. Alle Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## **3.5. Statistik**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die statistischen Analysen als „students t-test“ mit dem Programm „GraphPad Prism“ Version 5.01 für Windows (GraphPad Software, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) durchgeführt. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±SEM. Für die Signifikanzwerte gilt: \* P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Entwicklung einer fluorimetrischen Methode zur spezifischen Bestimmung der NEP-Aktivität

Um die Reaktivität eines Enzyms zu untersuchen, ist es wichtig, dessen Aktivität bestimmen zu können. Für NEP gibt es bereits einige etablierte Methoden, mit denen die Aktivitätsmessung zuverlässig möglich ist. Häufig Anwendung findet im Rahmen dieser Arbeit die DALEK-Methode nach Winkler (Winkler *et al.*, 1998), bei der das Substrat D-Ala<sup>2</sup>-Leu-Enkephalin eingesetzt wird. Zur Auswertung müssen bei dieser Methode Substrat und Produkt chromatographisch voneinander getrennt werden, bevor die Absorption an der Peptidbindung gemessen werden kann. Durch die Auftrennung mit der HPLC dauert die Messung einer einzelnen Probe etwa 15 Minuten. Für große Ansätze ist diese Methode deshalb ungeeignet.

Bei einer fluorimetrischen Methode ist eine Auftrennung des Reaktionsgemisches nicht notwendig. Fluorimetrische Methoden verwenden häufig ein Substrat, das auf einer Seite eine fluoreszierende, und auf der anderen eine fluoreszenzauslöschende Gruppe trägt. Durch die Hydrolyse des Peptides entstehen zwei Produktmoleküle, von denen eines fluoresziert. Die Fluoreszenz kann dann direkt im Reaktionsansatz gemessen werden. Mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät können eine Vielzahl an Proben zur selben Zeit schnell und unkompliziert ausgelesen werden. Es sind auch bereits fluorimetrische Methoden zur NEP-Aktivitätsmessung beschrieben worden (Florentin *et al.*, 1984; Malfroy und Burnier, 1987). Auf Grundlage des in der Literatur veröffentlichten Substrates Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp (Carvalho *et al.*, 1996) sollte dementsprechend das Substrat auf seine Anwendung für große Ansätze untersucht werden. Interessant erschien dieses Substrat, da es eine hohe Sensitivität und Selektivität haben sollte. Dementsprechend sollte evaluiert werden, ob es den bislang genutzten Methoden überlegen ist.

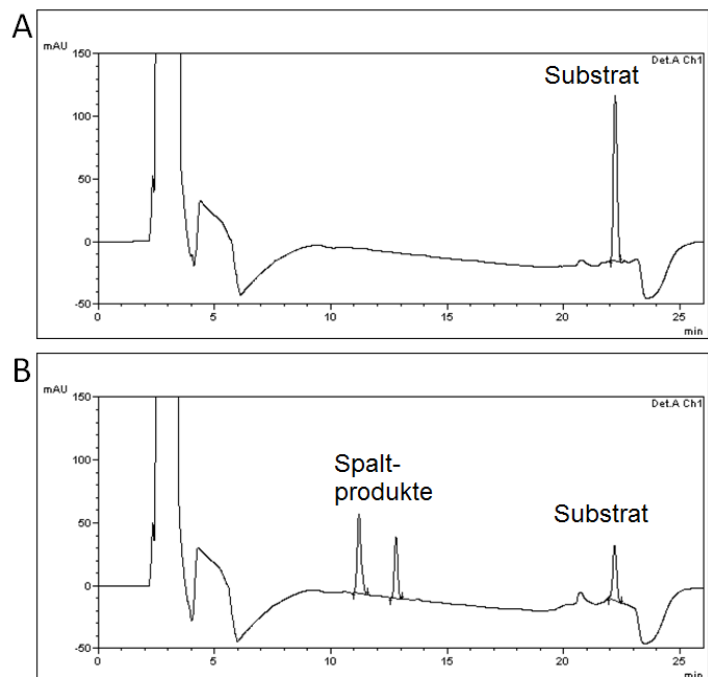
#### 4.1.1. Hydrolyse des Substrates Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp durch NEP

Um zu verifizieren, dass das in der Literatur beschriebene Substrat Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp von NEP umgesetzt werden kann und spezifisch von NEP erkannt wird, sollten die Reaktionsansätze zu Beginn chromatographisch aufgetrennt und untersucht werden. In der Veröffentlichung wurde der Abbau des Substrates mit Homogenaten von Rattennieren untersucht. Da Arbeiten in unserem Labor hauptsächlich in murinen und

humanen Systemen stattfinden, sollten sich die Untersuchungen auf diese Spezies konzentrieren.

Das Substrat wurde zuerst in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  mit 10 ng rekombinanten humanem NEP (rNEP), wie in Kapitel 3.3.5.2 beschrieben, umgesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$   $\text{HClO}_4$  gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde zentrifugiert und der Überstand wurde in der HPLC aufgetrennt. Das in 3.3.5.3. beschriebene Programm für die Fluoreszenzsubstrate wurde für die Messung verwendet, und die Absorption bei 205 nm gemessen.

Wie in Abb. 5 A zu sehen ist, wird das Substrat bei einer Retentionszeit von ca. 22,5 Minuten detektiert. Dies stimmt in etwa mit den Ergebnissen von Carvelho und Kollegen überein. Nach 30-minütiger Inkubation mit dem rekombinanten Enzym (Abb. 5 B), wurden etwa zwei Drittel des Substrates abgebaut. Es sind beide Spaltprodukte deutlich im Absorptionschromatogramm erkennbar; das eine Produktsignal wird bei einer Retentionszeit von ca. 11 Minuten detektiert, das zweite nach etwa 13 Minuten.

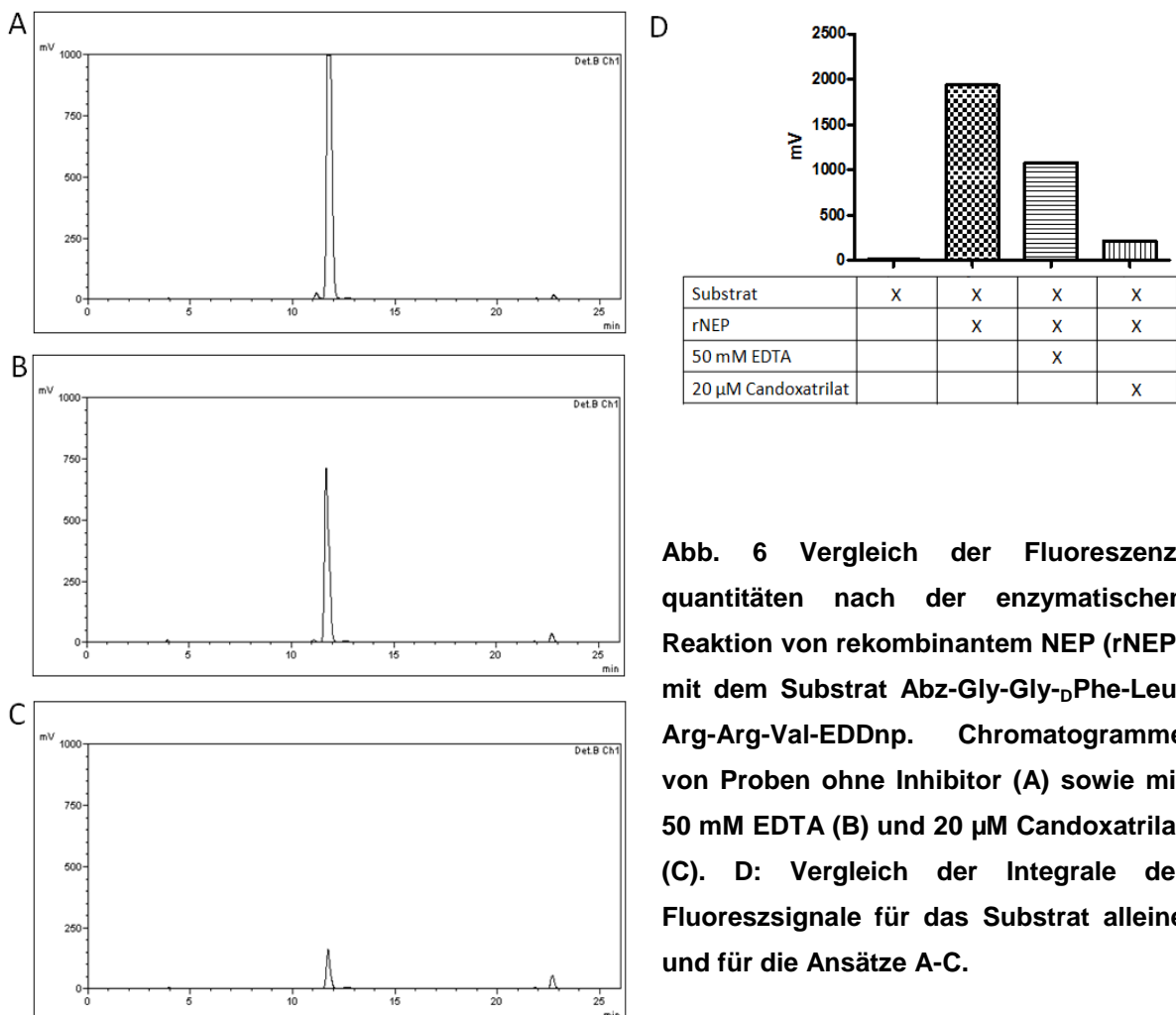


**Abb. 5** Absorption bei 205 nm von 5  $\mu\text{M}$  Abz-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in 50 mM Tris-Puffer nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C ohne (A) und mit rekombinanten humanem NEP (B).

Als nächstes wurden erneut 5  $\mu\text{M}$  des Substrates mit 10 ng rNEP für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, wie in 3.3.5.2. beschrieben. Um zu bestätigen, dass die Produkte tatsächlich durch die enzymatische Reaktion entstehen, wurden in weiteren Ansätzen Inhibitoren eingesetzt, die die Produktbildung verhindern sollten. Es wurde zum einen EDTA, das allgemein Metalloproteasen inhibiert, in einer Konzentration von 50 mM zum Reaktionsansatz zugesetzt und zum anderen der spezifische NEP-Inhibitor Candoxatrilat in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zum Enzym/Substrat-Gemisch gegeben. Nach der chromatographischen Auftrennung wurde diesmal die Fluoreszenz der Substanzen gemessen.

In Abb. 6 A-C sind die Ergebnisse zu sehen, die deutlich machen, dass nur ein starkes Fluoreszenzsignal bei einer Retentionszeit von ca. 11 Minuten detektiert wird, wenn das Substrat mit rekombinantem NEP umgesetzt wird (Abb. 6 A). Im Fluoreszenzspektrum wurde nur ein Signal erwartet, da nur eines der gebildeten Produkte die fluoreszierende Gruppe trägt. Durch die Zugabe von EDTA zum Reaktionsansatz wurde dieses Signal deutlich reduziert (Abb. 6 B), und durch Zugabe des NEP-spezifischen Inhibitors Candoxatrilat kann das Signal fast komplett ausgelöscht werden (Abb. 6 C). Dass die Produktbildung durch die Inhibitoren deutlich verringert werden kann, bestätigt die Annahme, dass das Substrat tatsächlich von NEP umgesetzt wird.

Werden die Flächen der gemessenen Fluoreszenzsignale mit der des Substrates verglichen, wie in Abb. 6 D gezeigt, so wird die sehr geringe Autofluoreszenz des Substrates deutlich, eine Eigenschaft, die sehr wichtig ist für die Verwendung in Hoch-Durchsatzverfahren.

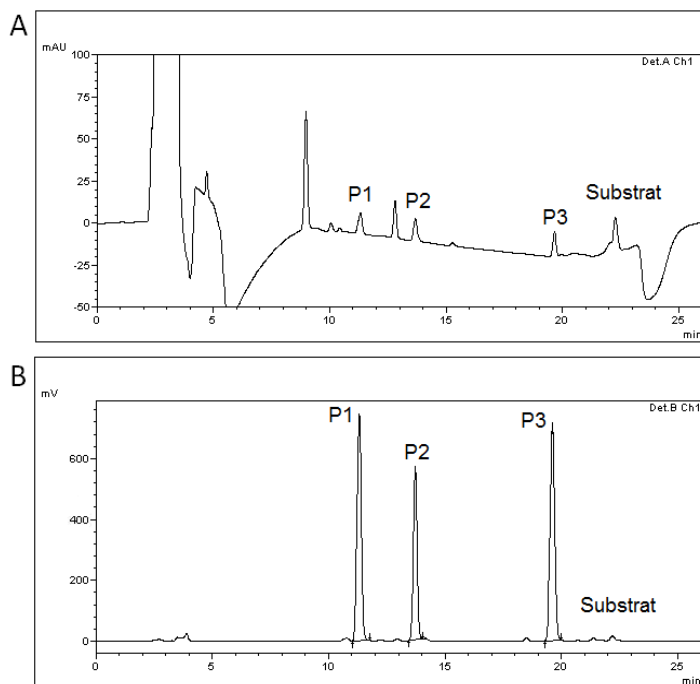


**Abb. 6 Vergleich der Fluoreszenzquantitäten nach der enzymatischen Reaktion von rekombinantem NEP (rNEP) mit dem Substrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp. Chromatogramme von Proben ohne Inhibitor (A) sowie mit 50 mM EDTA (B) und 20  $\mu$ M Candoxatrilat (C). D: Vergleich der Integrale der Fluoreszenzsignale für das Substrat alleine und für die Ansätze A-C.**

#### 4.1.2. Untersuchung des Substratabbaus in Nierenhomogenaten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Substrat von rekombinantem NEP abgebaut wird, sollte untersucht werden, ob auch in Geweben von Mäusen das spezifische NEP-Produkt generiert werden kann. Da in Nieren aufgrund der hohen Expression von NEP eine hohe NEP-Aktivität vorliegt, wurde mit Messungen in Homogenaten aus diesem Organ begonnen. Nieren wildtypischer C57BL/6 wurden homogenisiert (3.3.1) und die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode (siehe 3.3.3.) bestimmt. Es wurden, wie in 3.3.5.2. beschrieben, 5 µg/µL Gesamtprotein mit dem Substrat in einer Konzentration von 5 µM umgesetzt. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten gestoppt und zügig in der HPLC, wie unter 3.3.5.3. beschrieben, aufgetrennt. Es wurden sowohl Absorption, als auch Fluoreszenz aufgezeichnet.

Im Absorptionschromatogramm (Abb. 7 A) sind die beiden Signale bei ca. 11 Minuten und 13 Minuten zu sehen, die von den NEP-Produkten stammen und auch beim Abbau des Substrats durch rekombinantes NEP erhalten wurden (Abb. 5). Auch das Substratsignal mit einer Retentionszeit von etwas über 22 Minuten ist zu sehen. Daneben sind jedoch noch einige weitere Signale sichtbar. Auch im Fluoreszenzchromatogramm wurden, neben dem



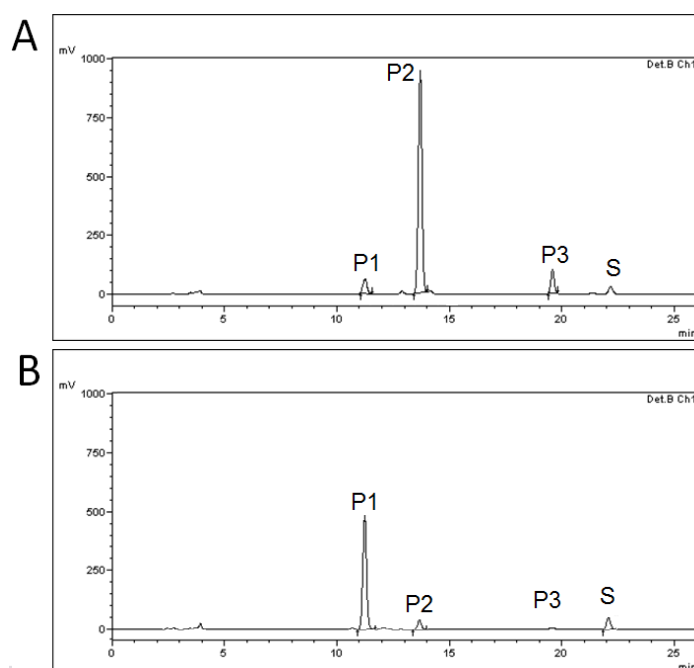
**Abb. 7** Absorptionschromatogramm (A) und Fluoreszenzchromatogramm (B) des Substrats Abz-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp nach 30-minütiger Inkubation mit murinem Nierenhomogenat (P: Produktsignal).

NEP-spezifischen Produktsignal und dem Substratsignal, noch zwei weitere sehr starke Signale sichtbar (Abb. 7 B). Die fluoreszierenden Produkte haben Retentionszeiten von ca. 11 Minuten (P1), ca. 14 Minuten (P2) und ca. 20 Minuten (P3). Da die Produkte P2 und P3 nicht durch das rekombinante NEP erhalten wurden, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass weitere Enzyme das Substrat umsetzen können. Betrachtet man im Absorptionsspektrum die Signale bei 11 Minuten und 13 Minuten, so fällt auf, dass P1 das kleinere Produktsignal von diesen beiden ist. In Abb. 5 war dieses

Signal stärker, als das Signal bei 13 Minuten. Dies kann ein Hinweis sein, dass P1 von einem anderen Enzym weiter umgesetzt wird. Da das Substrat in dieser Art nicht zur Messung der NEP-Aktivität genutzt werden kann, mussten weitere Untersuchungen zur Entstehung der Produktsignale vorgenommen werden.

Da das Substrat von anderen Enzymen als NEP umgesetzt werden kann, sollte überprüft werden, ob P1 auch entsteht, wenn NEP inhibiert wird. Dazu wurde das Substrat nun ebenfalls mit dem Nierenhomogenat und zusätzlich mit 20  $\mu$ M Candoxatrilat umgesetzt. In einem weiteren Ansatz wurden stattdessen 50 mM EDTA eingesetzt (3.3.5.2.). Da NEP von EDTA in der eingesetzten Konzentration nur teilweise gehemmt wird, können eventuell weitere Hinweise auf die Produktbildungsreaktion und auf das oder die bislang unbekannt Enzyme erhalten werden.

Es zeigte sich, dass durch Zugabe des NEP-spezifischen Inhibitors Candoxatrilat, neben dem Signal des NEP-Produktes auch das Signal P3 deutlich reduziert wurde (Abb. 8 A). Die



**Abb. 8 Chromatogramme der Abbaureaktion von Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in Nierenhomogenat mit Zugabe des Inhibitors Candoxatrilat (A) bzw. EDTA (B) (P: Produktsignal, S: Substratsignal).**

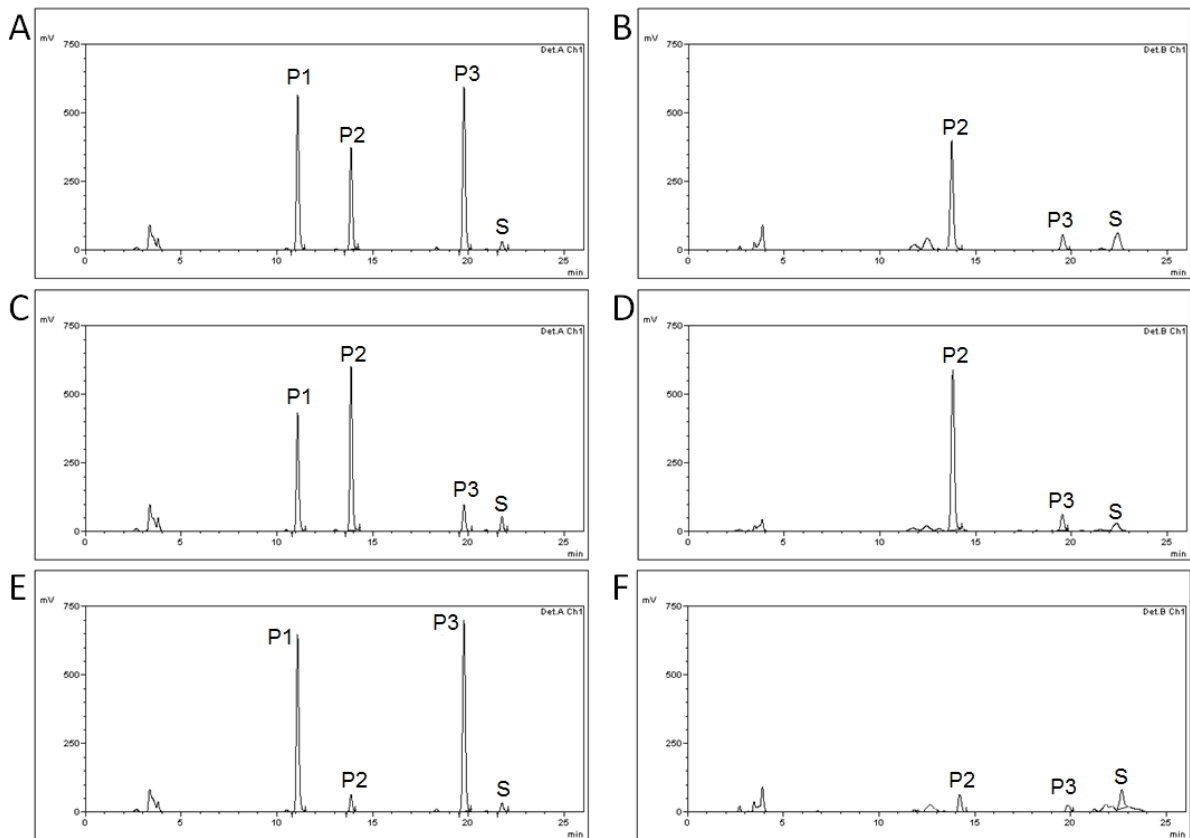
Signalstärke des Signals P2 war hingegen erhöht, was darauf hindeutet, dass P2 nicht, oder nicht ausschließlich, durch den Abbau von P1 entsteht. Der unspezifische Inhibitor EDTA blockte die Signale P2 und P3 komplett (Abb. 8 B). Das Signal des NEP spezifischen Produktes wurde, ebenso wie bereits zuvor in den Inhibitorstudien mit dem rekombinanten NEP (Abb. 6), nur teilweise reduziert. Bei dem Enzym, oder den Enzymen, die Substrat oder Produkte zu den Produkten P2 und P3 umsetzen, scheint es sich also um Metallopeptidasen zu handeln.

Für eine weitergehende Analyse, wurde ein Teil des Homogenates in die cytosolische Fraktion und die Membranfraktion aufgetrennt (siehe 3.3.2.). Da NEP eine membranständige Peptidase ist, sollte die Produktbildung in der cytosolischen Fraktion stark verringert sein. Es

wurden außerdem Nieren von NEP-defizienten Tieren verwendet, um den Substratabbau in Organen gänzlich ohne NEP zu untersuchen. Dadurch konnte einerseits überprüft werden, ob P1 von einem anderen Enzym als NEP in den murinen Nieren gebildet werden kann, und zum anderen, ob die Bildung von P2 und P3 NEP-abhängig ist. Es wurden jeweils 5  $\mu$ M Substrat mit Homogenat, cytosolischer Fraktion oder Membranfraktion, von Nieren wildtypischer oder NEP-defizienter Mäuse, in einer Konzentration von jeweils 5  $\mu$ g/ $\mu$ L Gesamtprotein, umgesetzt (3.3.5.2.). Nach 30 Minuten wurde die Reaktion gestoppt und zügig in der HPLC, wie unter 3.3.5.3. beschrieben, gemessen.

Während im Homogenat der wildtypischen Mäuse (Abb. 9 A) alle drei Produktsignale ausgeprägt sind, ist in der cytosolischen Fraktion (Abb. 9 C) vor allem das Signal bei einer Retentionszeit von 14 Minuten (P2) stark ausgeprägt. Das dritte Signal bei ca. 20 Minuten (P3) ist nur noch schwach detektierbar. In der Membranfraktion (Abb. 9 E) stellt sich die Situation genau umgekehrt dar. Das Signal P2 ist nur noch sehr schwach detektierbar, wohingegen P3 ein starkes Signal gibt. Demnach werden die Produkte P2 und P3 von unterschiedlichen Enzymen gebildet. Das P2-bildende Enzym liegt cytosolisch vor, während das P3-bildende Enzym membrangebunden ist.

In den Proben, die aus den Nieren der NEP-defizienten Tiere erhalten wurden (Abb. 9 B, D, F), war P1 nicht detektierbar, womit eindeutig bewiesen werden konnte, dass es sich bei P1 um ein NEP-spezifisches Signal handelt. Das Signal P2 war auch bei diesen Mäusen sowohl im Homogenat (Abb. 9 B), als auch in der cytosolischen Fraktion (Abb. 9 D) deutlich messbar. Die Entstehung dieses Produktes ist somit NEP-unabhängig. In der Membranfraktion (Abb. 9 F) konnte auch in den NEP-defizienten Tieren nur noch ein sehr schwaches Signal P2 detektiert werden. Da die Signalstärke von P2 in den NEP-defizienten und den wildtypischen Nieren vergleichbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass NEP keinen messbaren Anteil an der Produktbildung hat, und das P2 nicht aus dem NEP-spezifischen Produkt P1 gebildet wird. Das Signal P3 war im Homogenat, der cytosolischen Fraktion und der Membranfraktion der NEP-defizienten Nieren, kaum messbar. Es stellt sich die Frage, ob P3 ein Produkt des murinen membrangebundenen NEP ist, oder aus dem Produkt P1 durch ein weiteres Enzym entsteht. Eine Bildung durch membrangebundenes, murines NEP würde bedeuten, dass dieses eine andere Reaktivität hätte, als das humane rekombinante NEP. Auch wenn diese Möglichkeit unwahrscheinlich ist, sollte sie in Kapitel 4.1.6. genauer betrachtet werden.



**Abb. 9** Untersuchung der Reaktivität des Substrats Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in Homogenat (A, B), cytosolischer Fraktion (C, D) und Membranfraktion (E, F) aus Nieren von wildtypischen Mäusen (A, C, E) und NEP-defizienten Geschwistertieren (B, D, F) (P: Produktsignal, S: Substratsignal).

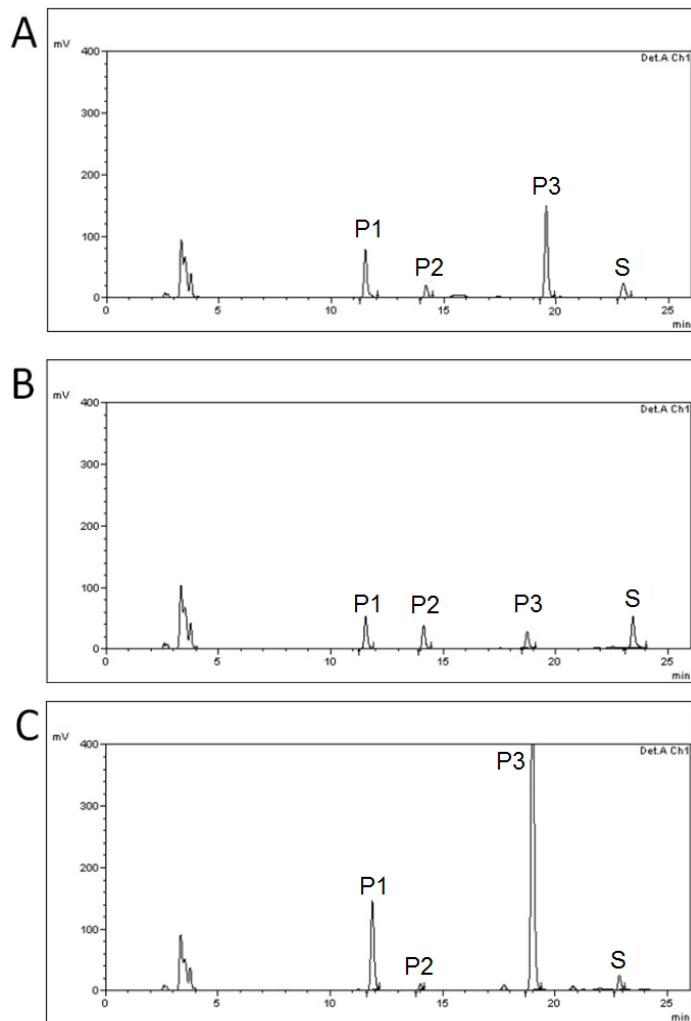
#### 4.1.3. Untersuchung des Substratabbaus in Lungengewebe

Es sollten weitere Organe untersucht werden, um herauszufinden, ob die Enzyme, die das Substrat neben NEP abbauen können, auch in anderen Organen eine Rolle spielen. Da auch Lungengewebe eine hohe NEP-Expression aufweist, wurde dieses als nächstes untersucht. Es wurden Lungen von wildtypischen C57/Bl6 Mäusen in 50 mM Tris Puffer homogenisiert (3.3.1.) und ein Teil weiter in die cytosolische Fraktion und Membranfraktion aufgetrennt (3.3.2.). Es wurden ebenfalls 5 µg/µL Gesamtprotein der jeweiligen Fraktionen mit 5 µM des Substrates für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, und die Reaktion anschließend gestoppt (3.3.5.2.).

Die Ergebnisse der chromatographischen Auswertung (3.3.5.3.) sind in Abb. 10 gezeigt. Auch in den Lungenhomogenaten (Abb. 10 A) sind Signale zu denselben Retentionszeiten wie in den untersuchten Nierenhomogenaten detektiert worden. Überraschenderweise fand eine deutlich verringerte Produktbildung statt, und auch die Verhältnisse in denen die



Produkte gebildet wurden, unterschieden sich von denen in Nierenhomogenaten. Im Vergleich zum NEP-spezifischen Produkt P1, ist das Produktsignal P2 relativ schwach



**Abb. 10 Untersuchung der Reaktivität des Substrats Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in Homogenat (A), cytosolischer Fraktion (B) und Membranfraktion (C) muriner Lungen (P: Produktsignal, S: Substratsignal).**

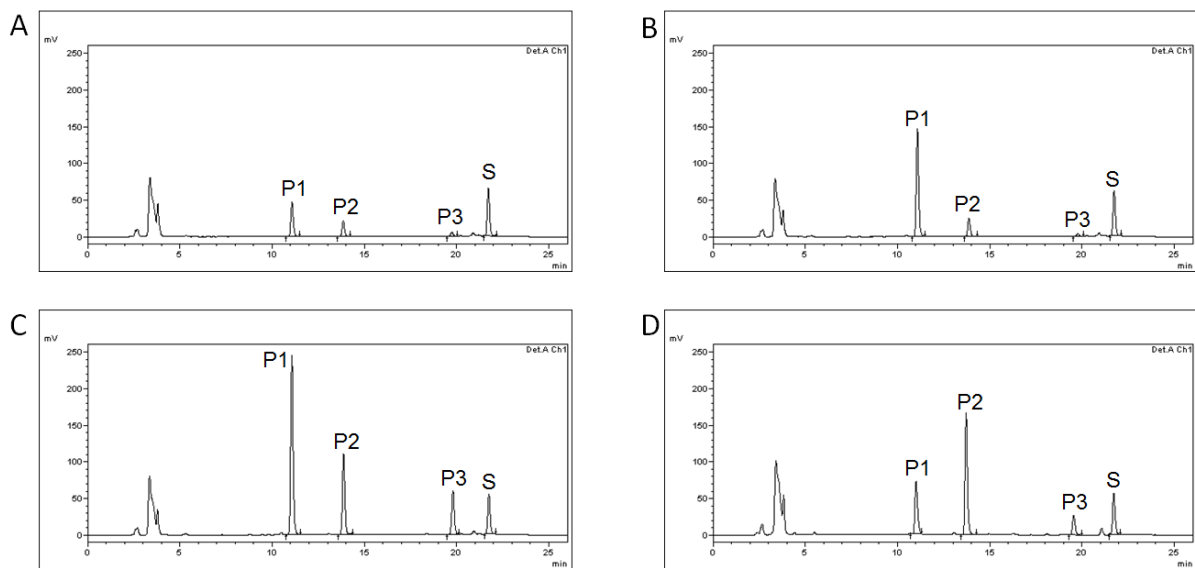
ausgeprägt, P3 ist hingegen wesentlich stärker. Die Untersuchung der cytosolischen Fraktion (Abb. 10 B) zeigt ebenfalls nur ein sehr schwaches Signal für das Produkt P2, ein deutlicher Unterschied zu den Ergebnissen die in den Nieren erhalten wurden. In der Membranfraktion (Abb. 10 C) ist die Signalstärke des Produkts P3 etwa viermal so hoch, wie die des NEP-spezifischen Produktes P1. Auch dies ist ein deutlicher Unterschied zu den Ergebnissen aus den Nierenmembranen, in denen die Signalstärken vergleichbar waren. Das deutet darauf hin, dass ein P3-produzierendes Enzym in den Lungen stärker exprimiert wird, als in den Nieren. Die unerwartet geringe Menge an P1 lässt vermuten, dass weitere unbekannte Abbaureaktionen in diesem Gewebe stattfinden.

#### 4.1.4. Untersuchung des Substratabbaus in weiteren Organen

Auch Herz, Milz, Hoden und Cerebellum der Mäuse wurden homogenisiert (3.3.1) und die Membranen daraus präpariert. Da in den Membranfraktionen die höchste NEP-Aktivität zu erwarten ist, wurde das Substrat nur mit diesen Fraktionen umgesetzt, wie zuvor beschrieben (3.3.5.2.), und in der HPLC gemessen (3.3.5.3.).

Bei der Betrachtung zeigte sich, dass in den Membranfraktionen von Herz (Abb. 11 A) und Milz (Abb. 11 B) nur eine geringe Menge an P2 und P3 gemessen wird. Im Herz ist auch das

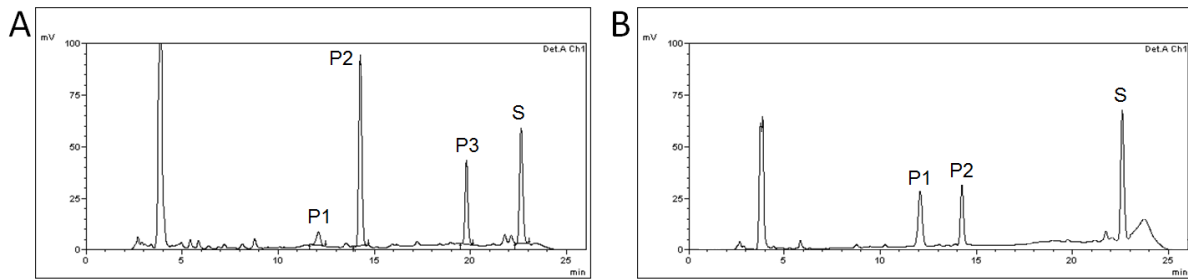
Signal P1 niedrig, in der Milz ist eine mäßige Signalstärke gemessen worden. In den Membranfraktionen, die aus dem Hoden erhalten wurden (Abb. 11 C) und insbesondere in denen aus dem Cerebellum (Abb. 11 D), ist die Signalstärke von P2 deutlich stärker. Dies kann darauf hindeuten, dass das P2-bildende Enzym in einigen Organen in einer membrangebunden Form vorliegt, oder aber, dass weitere Enzyme in der Lage sind das Substrat zum Produkt P2 abzubauen. Das Produkt P3 ist auch in diesen Organen nur in geringen Mengen gebildet worden. Das NEP-spezifische Signal im Hoden ist stärker ausgeprägt als in der Milz. Die Signalstärke für P1 im Cerebellum ist vergleichbar mit der im Herz.



**Abb. 11 Untersuchung der Reaktivität des Substrats Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in murinen Membranfraktionen aus Herz (A), Milz (B), Hoden (C) und Cerebellum (D) (P: Produktsignal, S: Substratsignal).**

Um zu sehen, ob mit dem Substrat die NEP-Aktivität im Blut von Mäusen bestimmt werden kann, wurde Blut sowohl als Serum, als auch als Citratplasma untersucht. EDTA-Plasma fällt aufgrund der NEP-inhibierenden Wirkung von EDTA als weiterer Kandidat aus. Es wurden jeweils 10  $\mu$ L an Serum bzw. Citratplasma mit 5  $\mu$ M des Substrates inkubiert, wie in 3.3.5.2. beschrieben.

Während im Serum (Abb. 12 A) hauptsächlich P3 und insbesondere P2 auftraten und das NEP-spezifische Produkt kaum messbar war, sind im Chromatogramm des Citratplasmas (Abb. 12 B) die Produkte P1 und P2 detektierbar. In beiden Fällen sind jedoch die gebildeten Produktmengen sehr gering.

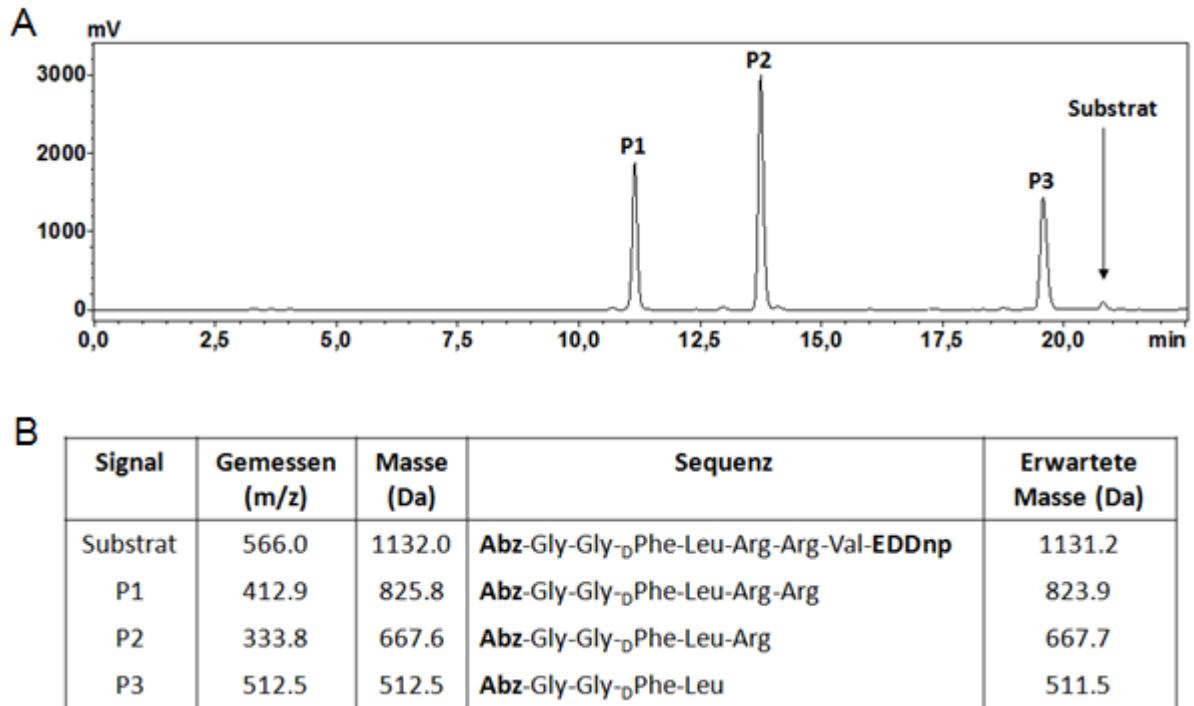


**Abb. 12 Abbau des Substrats Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in murinem Serum (A) und Citratplasma (B) (P: Produktsignal, S: Substratsignal).**

Die Untersuchungen der Abbaureaktionen des Substrates Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in verschiedenen Organen sowie im Blut, zeigten, dass das Substrat abgebaut wird, und ein spezifisches NEP-Produkt gebildet wird. Allerdings sind auch weitere Enzyme in der Lage das Substrat umzusetzen, weshalb das Substrat nicht für Messungen im Plattenlesegerät eingesetzt werden kann. Dabei wird einerseits das Substrat direkt von einem weiteren Enzym abgebaut. Zum anderen wird das NEP-spezifische Produkt zu einem dritten Produkt umgesetzt. Zwar kann durch Verwendung der Membranpräparation in einigen Organen die Bildung des Produktes P2 weitgehend verhindert werden, es sollte aber durch Veränderungen am Substrat versucht werden, die Bildung der beiden störenden Produkte komplett zu unterdrücken.

#### **4.1.5. Identifizierung der Produkte mittels Massenspektrometrie**

Um Veränderungen an der Sequenz des Substrates vornehmen zu können, und es so zu verbessern, sollte aufgeklärt werden, welche Produkte zu den einzelnen Signalen gehören. Dafür wurde das murine Nierenhomogenat, wie unter 3.3.5.2 beschrieben, mit dem Substrat Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp umgesetzt und danach der Reaktionsansatz in der HPLC aufgetrennt (3.3.5.3). Die drei Produkte wurden dann in einem Massenspektrometer vermessen und die erhaltene Masse den entsprechend möglichen Sequenzen zugeordnet. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Carvalho und Kollegen zeigte sich, dass das NEP-spezifische Produkt bei ~11 Minuten (P1) durch Spaltung der Arg-Val-Bindung entsteht. Die beiden nachfolgenden Produkte P2 und P3 sind um jeweils um ein Arginin verkürzt. In Abb. 13 sind die Ergebnisse der Untersuchung zusammengefasst.

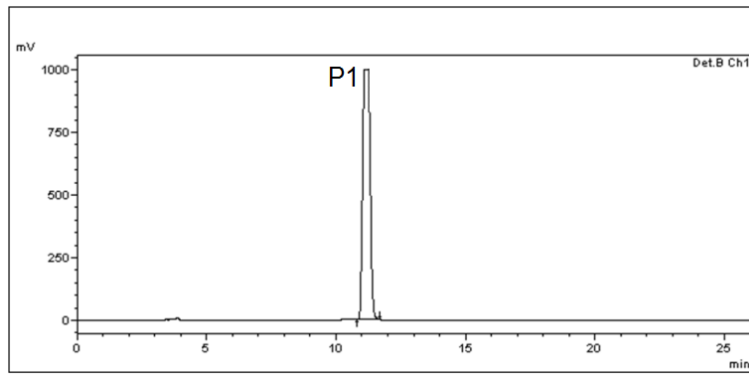


**Abb. 13** Untersuchung der entstehenden Produkte des Substrates Abz-Gly-Gly-D<sub>2</sub>Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in Nierenhomogenaten. **A:** Chromatogramm **B:** Zugeordnete Sequenzen nach der ermittelten Masse (P: Produktsignal).

#### 4.1.6. Untersuchungen des NEP spezifischen Produkts Abz-Gly-Gly-D<sub>2</sub>Phe-Leu-Arg-Arg

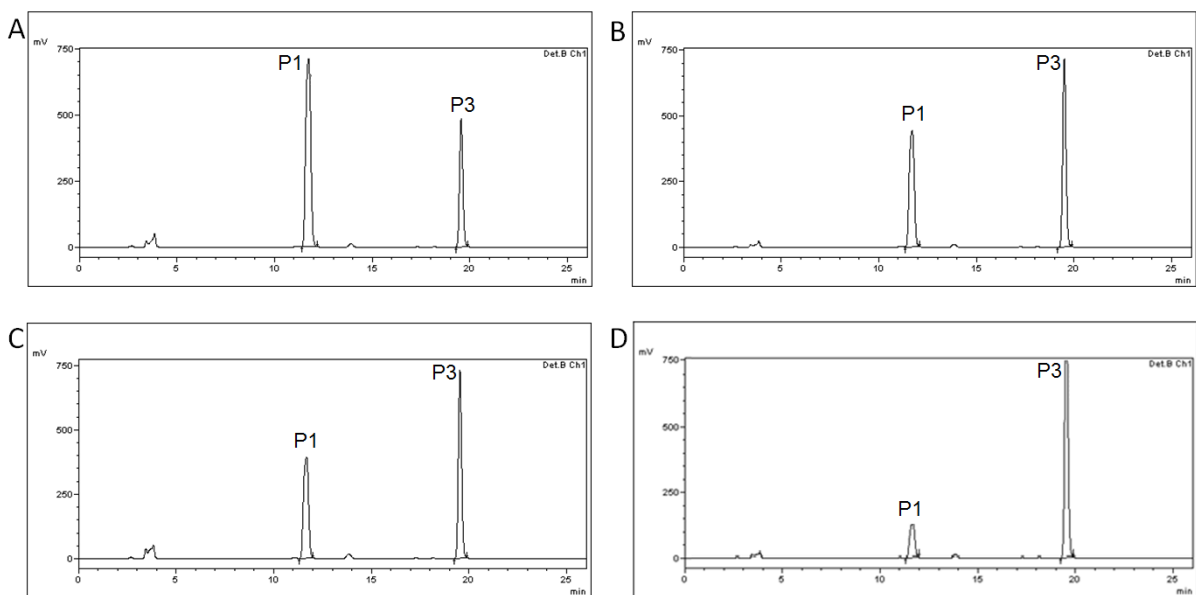
Es hatte sich mittlerweile gezeigt, dass die Bildung von P2 unabhängig von NEP und unabhängig vom NEP-spezifischen Produkt P1 gebildet wurde. Ob die Bildung des Produktes P3 ebenfalls unabhängig von NEP stattfinden konnte, war jedoch noch nicht geklärt, und deshalb sollte das NEP-spezifische Produkt Abz-Gly-Gly-D<sub>2</sub>Phe-Leu-Arg-Arg und seine Reaktion näher betrachtet werden. Es bestand die Möglichkeit, dass natives NEP das Substrat an zwei unterschiedlichen Stellen schneiden kann, und das sich das rekombinante NEP dahingehend vom membrangebundenen NEP unterscheidet.

Dazu wurde als erstes überprüft, ob die synthetisierte Substanz tatsächlich mit dem NEP-Produkt übereinstimmt. In einer Konzentration von 10 µM wurde die Substanz in der HPLC, wie in 3.3.5.3 beschrieben, analysiert. Wie erwartet, wurde nach einer Retentionszeit von ca. 11 Minuten ein starkes Signal detektiert (Abb. 14).



**Abb. 14** Im Chromatogramm von 10  $\mu\text{M}$  Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg tritt ein starkes Signal bei einer Retentionszeit von ca. 11 Minuten auf.

Das Peptid wurde dann in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  mit murinen Nierenhomogenaten von wildtypischen und NEP-defizienten Tieren inkubiert (3.3.5.2.). Die Reaktionen wurden jeweils nach einer Inkubationszeit von 15 und 30 Minuten gestoppt und die Ansätze anschließend in der HPLC aufgetrennt.



**Abb. 15** Untersuchung des NEP spezifischen Produktes P1 (Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg). Inkubation des Substanz mit murinen Nierenhomogenaten wildtypischer Tiere (A, C) und NEP-defizienter Tiere (B, D) für 15 Minuten (A, B) bzw. 30 Minuten (C, D).

Es zeigte sich, dass ein rascher Abbau des Substanz Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg (Produkt P1) stattfindet (Abb. 15 A-D). Bereits nach 15 Minuten ist etwa die Hälfte der Substanz zum Produkt P3 umgesetzt. Der Abbau verläuft in den Homogenaten der NEP-defizienten Tieren sogar noch schneller als in den Homogenaten aus den wildtypischen

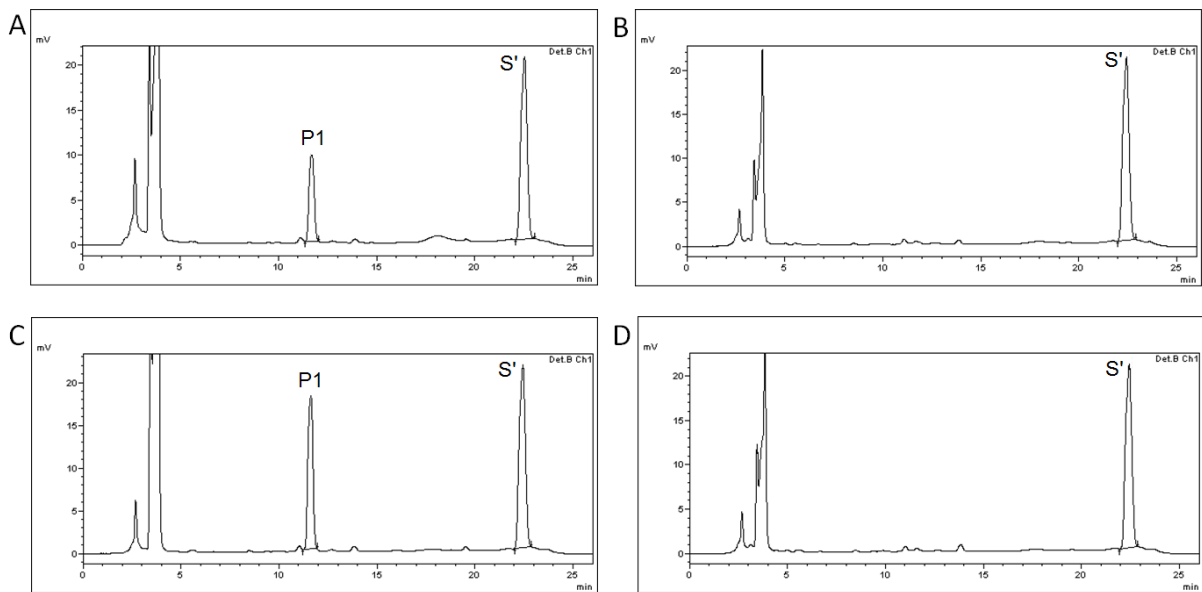
Mäusen. Nach 30 Minuten ist in den Proben der NEP-defizienten Tiere fast das gesamte Signal von P1 umgesetzt, während in den Proben der wildtypischen Tiere noch etwa ein Drittel der ursprünglichen Menge übrig ist. Die Bildung des Produktes P3 aus dem Ursprungssubstrat Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDDnp ist somit nicht NEP-abhängig, wird aber nahezu ausschließlich aus Produkt P1 (Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg) gebildet.

#### **4.1.7. Reaktivität des veränderten Substrats Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-DArg-Arg-Val-EDDnp in Nierenhomogenaten**

Um eine Verbesserung des Substrates zu erreichen, wurde das erste Arginin von der L- in die D-Konfiguration geändert. In dem neuen Substrat Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-DArg-Arg-Val-EDDnp ist die Aminosäure D-Arginin bei der von NEP vermittelten Reaktion nicht unmittelbar an der Hydrolysereaktion beteiligt. Die beiden Produkte P2 und P3 hingegen entstanden durch Spaltung der Peptidbindung auf je einer Seite dieser Aminosäure im Ursprungssubstrat. Durch die Änderung in die D-Form sollte erreicht werden, dass die notwendigen chemischen Wechselwirkungen im Aktiven Zentrum der beteiligten Enzyme, nicht mehr entstehen können.

Die Reaktivität dieses Substrates wurde in Nierenhomogenaten von wildtypischen und von NEP-defizienten Tieren überprüft. Sie wurden in einer Konzentration von 5 µg/µL Gesamtprotein wie unter 3.3.5.2. beschrieben mit dem veränderten Substrat in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Die Reaktion wurde sowohl nach 15 Minuten als auch nach 30 Minuten durch Zugabe von HClO<sub>4</sub> gestoppt und die Reaktionsansätze mittels HPLC aufgetrennt (3.3.5.3.).

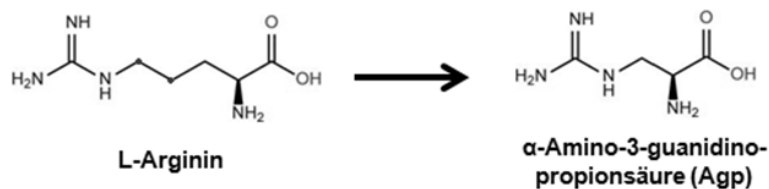
Die Chromatogramme zeigen, dass in den Proben aus den wildtypischen Tieren eine NEP-spezifische Reaktion stattfindet (Abb. 16 A, C), während in den Proben von den NEP-defizienten Mäusen kein Abbau des Substrates über einen Zeitraum von 30 Minuten stattfindet (Abb. 16 B, D). Während durch die Änderung der Konfiguration die Entstehung der ungewünschten Produkte verhindert werden kann, wird jedoch gleichzeitig die Reaktionsgeschwindigkeit der NEP-vermittelten Abbaureaktion sehr stark reduziert. Nach einer Zeit von 30 Minuten ist das Signal des durch NEP gebildeten Produktes noch immer schwächer als das schwache Signal des Substrates selbst.



**Abb. 16 Chromatogramme zur Untersuchung des Substrates Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-DArg-Arg-Val-EDDnp (S') in murinen Nierenhomogenaten wildtypischen Tieren (A, C) und NEP-defizienter Tiere (B, D) bei 15-minütiger (A, B) und 30-minütiger (C, D) Inkubationszeit.**

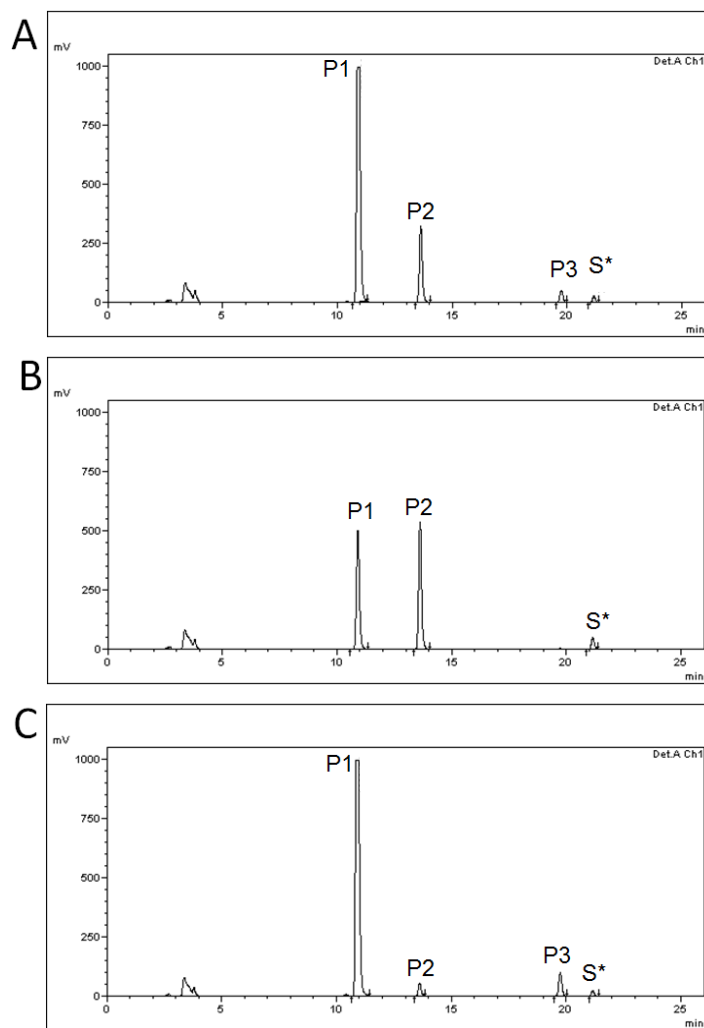
#### 4.1.8. **Reaktivität des veränderten Substrats Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp in murinen Nieren**

Da mit dem Substrat Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-DArg-Arg-Val-EDDnp zwar eine Verbesserung der Spezifität des Substrates erreicht werden konnte, diese aber zu Lasten der Reaktionsgeschwindigkeit ging, wurde ein weiteres Substrat hergestellt und untersucht, bei dem das erste L-Arginin gegen die um eine C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Einheit kürzere artifizielle Aminosäure  $\alpha$ -Amino-3-guanidino-propionsäure (Agp) (Abb. 17) ausgetauscht wurde. Durch den Einsatz dieser Aminosäure, sollte eine starke Strukturänderung des Peptids, wie sie beim Austausch von der L- zur D- Form auftritt, verhindert werden. Gleichzeitig aber sollte die Veränderung dazu führen, dass die beiden unbekanntenen Enzyme nicht mehr in der Lage sind, das Substrat zu hydrolysieren.



**Abb. 17 Strukturformeln von L-Arginin und der verkürzten artifiziellen Aminosäure  $\alpha$ -Amino-3-guanidino-propionsäure.**

Das Substrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp wurde in einer Konzentration von 5  $\mu$ M mit jeweils 5  $\mu$ g/ $\mu$ L Protein des Nierenhomogenats bzw. der daraus erhaltenen cytosolischen oder Membranfraktion inkubiert (3.3.5.2.). Anschließend wurde der Überstand chromatographisch aufgetrennt (3.3.5.2.). Dabei zeigte sich, dass in allen Fraktionen das Produkt P3 nur noch in sehr viel geringen Mengen gebildet werden konnte (Abb. 18) als bei der Umsetzung mit dem Ursprungssubstrat (Abb. 9). Da das NEP-spezifische Produkt nicht



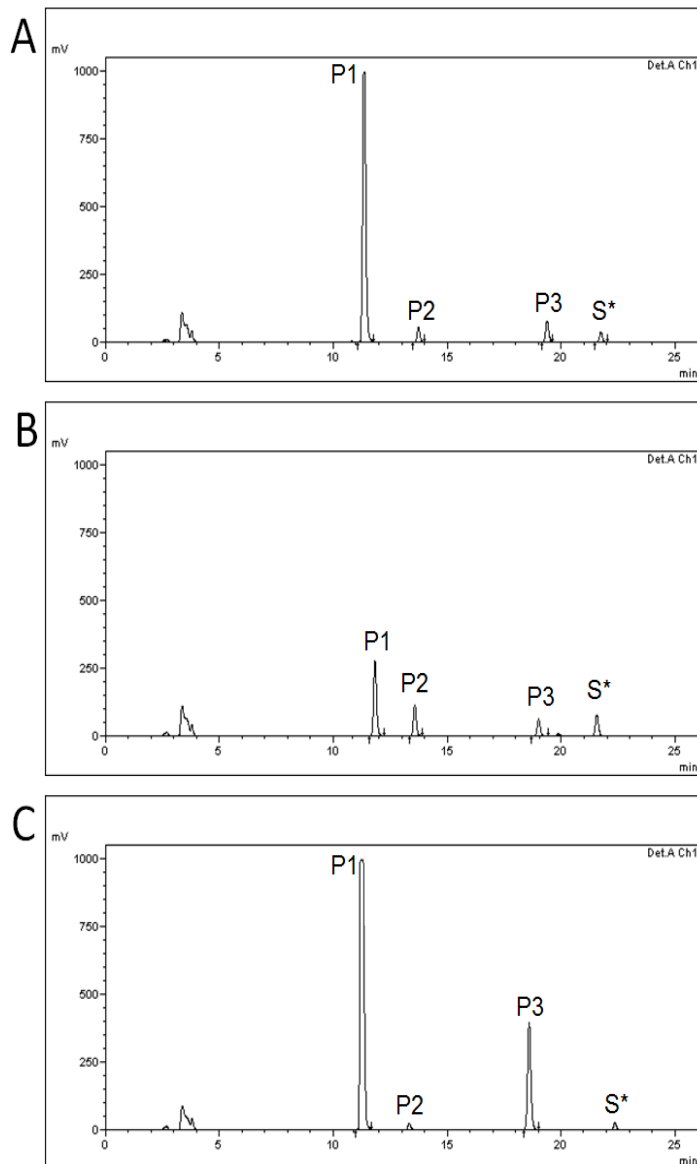
**Abb. 18** Untersuchung der Reaktivität des Substrats Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp in Homogenat (A), cytosolischer Fraktion (B) und Membranfraktion (C) muriner Nieren.

mehr weiter abgebaut wurde, wurde ein deutlich stärkeres Signal dieses Produktes detektiert, als es mit dem Ausgangssubstrat der Fall war. Im Homogenat und der cytosolischen Fraktion (Abb. 18 A, B) wurde allerdings weiterhin das Signal von Produkt P2 gemessen. Während durch die artifizielle Aminosäure die Produktbildung von P3 in der Niere also fast vollständig unterdrückt werden konnte schien das veränderte Substrat auf die Produktbildungsreaktion von P2 keinen signifikanten Einfluss zu haben. Es sollte in weiteren Organen untersucht werden, ob dort ebenfalls die Bildung von P3 verhindert werden konnte, und ob dort ein stärkerer Einfluss auf die Produktbildung von P2 erzielt werden kann.

#### 4.1.9. Untersuchung des Substratabbaus in Lungengewebe

Es wurden ebenfalls Lungenhomogenate und deren cytosolische Fraktion und Membranfraktion unter denselben Bedingungen mit dem Substrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-





**Abb. 19 Untersuchung der Reaktivität des Substrats Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp in Homogenat (A), cytosolischer Fraktion (B) und Membranfraktion (C) muriner Lungen (P: Produktsignal, S\*: Substratsignal).**

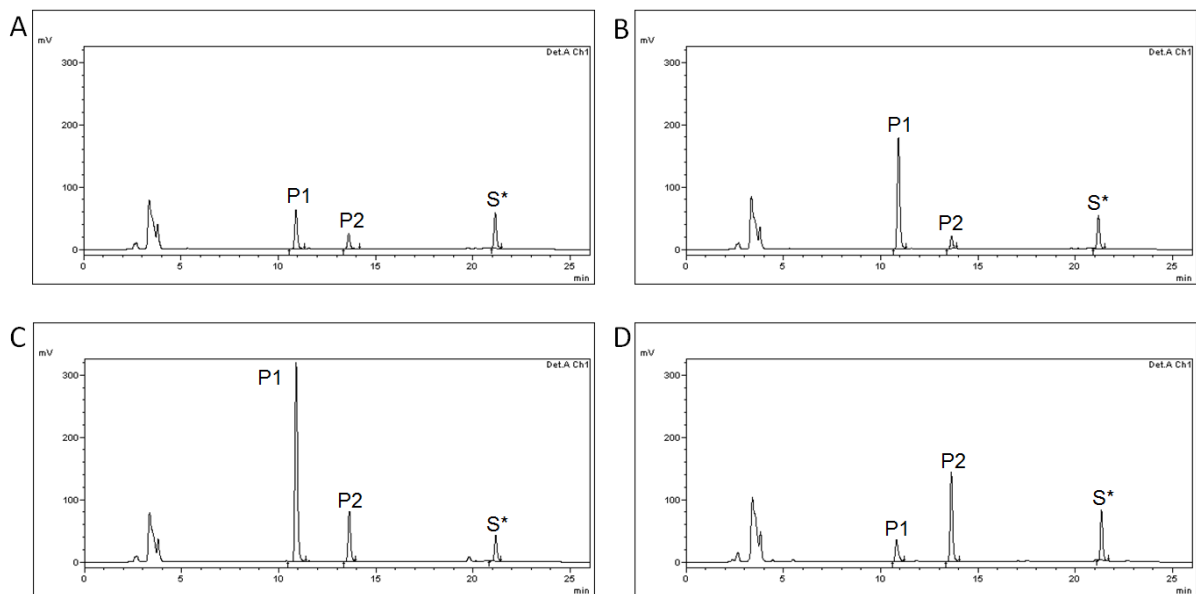
Agp-Arg-Val-EDDnp inkubiert. Auch bei der Untersuchung des Lungenhomogenates und den daraus erhaltenen Fraktionen zeigte sich ein Rückgang in der Signalstärke von P3 (Abb. 19). In der Membranfraktion, in der das Signal dieses Produktes verstärkt ist, kann die Bildung des Produktes offensichtlich nicht gänzlich verhindert werden (Abb. 19 C). Das NEP-spezifische Produktsignal ist auch in den Proben aus der Lunge deutlich stärker als mit dem Ausgangssubstrat (Abb. 10). In der Membranfraktion übertrifft es sogar die Signalstärke die bei gleicher Gesamtproteinmenge in der Niere gemessen wurde. Das Signal von P2 ist erneut kaum verändert. Durch die sehr starke Erhöhung des NEP spezifischen Signals, ist es nun im Verhältnis sogar so schwach, das es möglicherweise bei weiteren Betrachtungen vernachlässigt werden könnte.

#### 4.1.10. Untersuchung des Substratabbaus in weiteren Organen

Das Substrat Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp wurde auch mit den Membranfraktionen aus Herz, Milz, Hoden und Niere umgesetzt. Es wurden ebenfalls

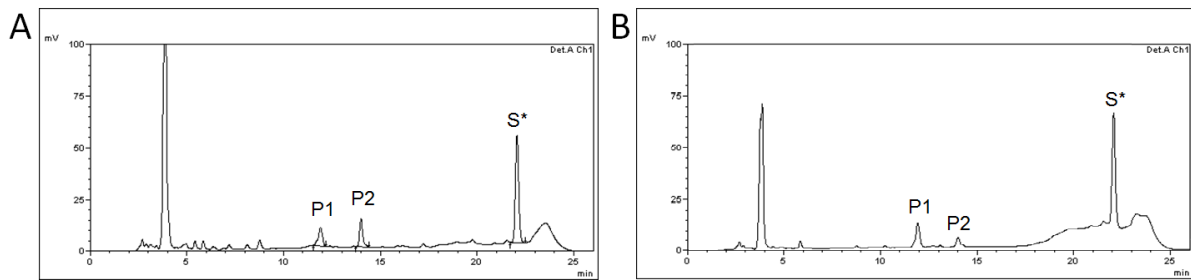
jeweils 5  $\mu\text{M}$  Substrat mit Membranen in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (3.3.5.2.). Die Reaktionsansätze wurden anschließend zentrifugiert und der Überstand in der HPLC aufgetrennt und gemessen.

In keinem der vier Organe waren noch Signale vom Produkt P3 messbar (Abb. 20) und im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem Ursprungssubstrat ergab sich keine Veränderung in der Stärke des Signals P2 (Abb. 11). Das NEP-spezifische Signal P1 war im Hoden etwas erhöht; hier wurde mit dem Ursprungssubstrat auch das stärkste Signal für P3 gemessen. In den anderen Organen ergaben sich keine Änderungen für P1, was aufgrund der sehr geringen Bildung von P3 aus dem Ursprungssubstrat auch den Erwartungen entspricht.



**Abb. 20 Untersuchung der Reaktivität des Substrats  $\text{Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp}$  in murinen Membranfraktionen aus Herz (A), Milz (B), Hoden (C) und Cerebellum (D) (P: Produktsignal, S\*: Substratsignal).**

Zur Untersuchung des Reaktionsprofils des veränderten Substrates im Blut von Mäusen wurde das Substrat mit 10  $\mu\text{L}$  Serum oder Citratplasma inkubiert (3.3.5.2.). Wie in Abb. 21 zu sehen ist, sind die Signale, die nach 30-minütiger Inkubation erhalten wurden, nur sehr schwach ausgeprägt. Im Vergleich zu den Ergebnissen die mit dem Ausgangssubstrat erhalten wurden (Abb. 12) konnte im Serum die Bildung des Produktes P3 verhindert werden, (Abb. 21 A) Sowohl im Serum, als auch im Citratplasma (Abb. 21 B) wurden außerdem geringere Signalstärken für P2 detektiert. Doch war im Citratplasma auch das Signal des NEP-spezifischen Produktes noch schwächer, als es in den Messungen mit dem Ausgangssubstrat der Fall war. Insgesamt war es nicht möglich, Signale zu erhalten, die deutlich über den Hintergrundsignalen lagen. Selbst das eigentlich sehr schwache Substratsignal war noch um ein vielfaches stärker als die Signale der Produkte.



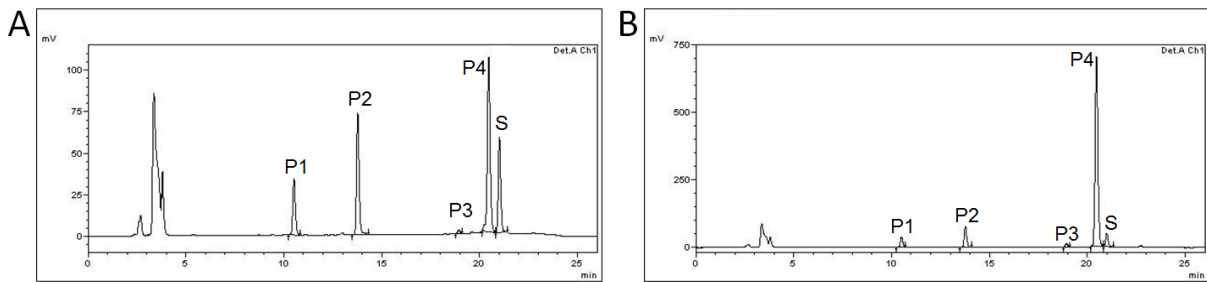
**Abb. 21 Abbau des Substrats Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp in murinem Serum (A) und Citratplasma (B) (P: Produktsignal, S\*: Substratsignal).**

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass auch das verbesserte Substrat Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp noch nicht geeignet ist, um die NEP-Aktivität in Proben aus beliebigem Gewebe im Mikrotiterplatten-Lesegerät zu messen. Nur für Nierenmembranen kann damit begonnen werden, die Versuche auf das Plattenlesegerät zu übertragen. Auch Lungenhomogenate erscheinen vielversprechend, allerdings muss zuerst in einer größeren Anzahl von Proben validiert werden, ob die hohe Aktivität des in den Membranen lokalisierten P3-produzierenden Enzyms stören kann.

#### **4.1.11. Reaktivität der Substrate im Zellkulturversuch**

Da auch im Rahmen von Zellkulturversuchen die Bestimmung der NEP-Aktivität von Interesse für unsere Arbeitsgruppe ist, wurde abschließend die Reaktivität der Substrate in zwei Zelllinien untersucht. Dazu wurden HDMEC-Zellen (3.1.2.2.) und SK-N-SH-Zellen (3.1.1.1.) kultiviert. Es wurden jeweils die Zellen einer kompletten 10 cm Zellkulturschale homogenisiert (3.3.1) und im Anschluss die Membranen daraus präpariert (3.3.2.). Die Proteinmenge wurde im BCA-Test bestimmt und jeweils 10 µg/µL mit 5 µM Substrat für 30 Minuten inkubiert (3.3.5.2.).

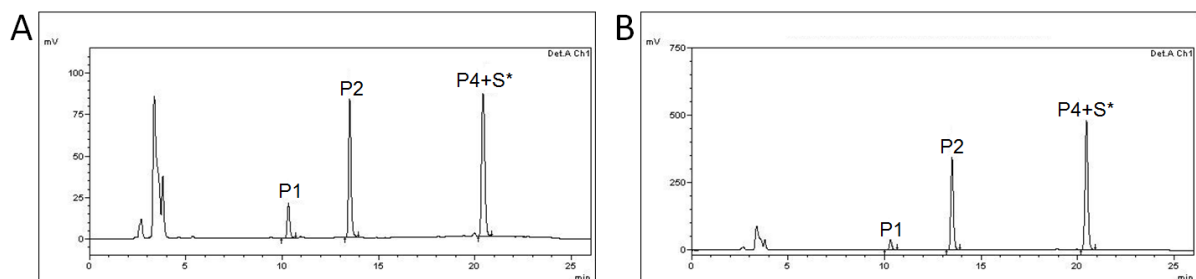
Nach Inkubation der Zellmembranen mit dem Ursprungssubstrat Abz-Gly-Gly-DPhe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp zeigte sich in der HPLC-Analyse, dass in beiden Zelllinien nur sehr geringe Mengen an NEP messbar waren (Abb. 22). Das Produkt P3 wurde in beiden Zelllinien kaum gebildet, und in beiden Zelllinien war von den drei bekannten Produktsignalen, das Signal P2 am stärkste ausgeprägt. Zusätzlich taucht jedoch noch ein neues, stärkeres Signal P4 auf, das insbesondere in den SK-N-SH Zellen sehr ausgeprägt ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das zugehörige Produkt durch ein Enzym gebildet wird, das im Zellkulturmedium war, z. B. Im FCS.



**Abb. 22 Abbau des Substrats Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp in HDMEC-Zellen (A) und SK-N-SH-Zellen(B) (P: Produktsignal, S: Substratsignal).**

Die Membranfraktionen der HDMEC- und SK-N-SH-Zellen wurden ebenfalls mit dem veränderten Substrat Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp umgesetzt. Es wurden 5 µM Substrat mit 10 µg/µL Gesamtprotein der Zellmembranen umgesetzt, wie in 3.3.5.2. beschrieben und in der HPLC analysiert (3.3.5.3.).

Die Bildung des Signals P3 wurde durch das veränderte Substrat vollständig verhindert (Abb. 23). Das Signal P4 wurde in den SK-N-SH-Zellen um etwa 30% reduziert. Das Signal P4 scheint außerdem mit dem Substratsignal des veränderten Substrats zu überlagern, das nicht mehr im Chromatogramm zu erkennen ist. Während die Stärke des Signals P2 in den HDMEC-Zellen vergleichbar ist mit den Ergebnissen die mit dem Ursprungssubstrat erhalten wurden (Abb. 22), ist P2 bei den SK-N-SH Zellen deutlich stärker geworden. Das NEP-spezifische Signal ist jedoch weiterhin in beiden Zelllinien sehr schwach.



**Abb. 23 Abbau des Substrats Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp in HDMEC-Zellen (A) und SK-N-SH Zellen(B) (P: Produktsignal, S\*: Substratsignal).**

Um die NEP-Aktivität in HDMEC- oder SK-N-SH-Zellen zu messen, war keines der beiden Substrate geeignet. Das NEP-spezifische Signal wurde nur zu einem sehr geringen Teil gebildet. In beiden Zelllinien wurde das zuvor unbekannte Produkt P4 detektiert, das durch den Abbau des Substrats oder eines anderen Produkts durch ein weiteres unbekanntes Enzym gebildet wird und somit das System weiter verkompliziert. Für die Aktivitätsmessungen die im Rahmen dieser Arbeit sowohl in murinen Organen, als auch in Zellkulturversuchen durchgeführt wurden, konnte die fluorimetrische Methode demnach nicht verwendet werden. Es wurde stattdessen mit der DALEK-Methode gearbeitet.

## **4.2. Entwicklung neuer transgener Mausmodelle mit gewebe-spezifischer Überexpression von NEP**

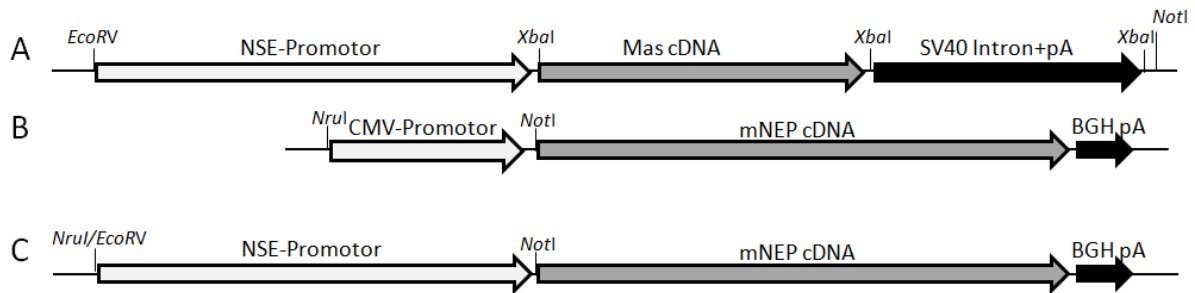
In der biomedizinischen Forschung sind transgene Tiermodelle ein äußerst nützliches Werkzeug um die Funktion eines Proteins zu erforschen und zu beschreiben. Wie in der Einleitung bereits besprochen, wurde schon vor einigen Jahren ein Mausmodell erstellt, bei dem das NEP-kodierende *Mme*-Gen ausgeschaltet wurde, und eine Reihe wichtiger Erkenntnisse konnte damit erhalten werden. Für eine weitergehende Aufklärung ist es jedoch hilfreich, zusätzlich neue Mausmodelle zu schaffen, die eine erhöhte Expression von NEP aufweisen.

In der Veröffentlichung von Becker *et al.* wurde gezeigt, dass bei wildtypischen, 6 Monate alten C57BL/6-Mäusen, die mit Candoxatril behandelt wurden, eine signifikant höhere Gewichtszunahme einsetzt als in den Kontrolltieren (Becker *et al.*, 2010). Candoxatril wird im Körper zum inhibitorisch wirksamen Candoxatrilat metabolisiert. Weder Candoxatril, noch Candoxatrilat können jedoch die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Die Verringerung der NEP-Aktivität, die zur Gewichtszunahme führt, konnte deshalb nur in den peripheren Organen, aber nicht im Gehirn nachgewiesen werden. Um die Effekte von NEP in Bezug auf die Lokalisation des Enzyms genauer untersuchen zu können, sollten zwei neue transgene Mausmodelle geschaffen werden. Im Ersten sollte eine erhöhte NEP-Expression in neuronalen Zellen erzielt werden, im Zweiten eine Überexpression in den peripheren Organen.

### **4.2.1. NEP-Überexpression in neuronalen Zellen**

Um die Überexpression von NEP in neuronalen Zellen zu erreichen, sollte aus dem Vektor pcDNAmNEP der CMV-Promotor, ein Promotor des Cytomegalievirus, der für eine ubiquitäre Expression in Säugetierzellen genutzt wird, gegen den Promotor der Neuron-spezifischen Enolase (NSE-Promotor) ausgetauscht werden, der schon erfolgreich zur Generierung neuronspezifischer Überexpression in Mausmodellen eingesetzt wurde (Forss-Petter *et al.*, 1990). Der Vektor pcDNAmNEP war bereits im Labor vorhanden und wurde erfolgreich zur Expression von NEP in Zelllinien verwendet. Um den NSE-Promotor zu erhalten, konnte der Vektor pNSE Mas genutzt werden, der in unserem Labor bereits für die Erstellung transgener Mäuse zur Überexpression von Mas genutzt wurde (Alenina, 2003). Eine Schematische Darstellung des Klonierungsvorhabens ist in Abb. 24 dargestellt und wird

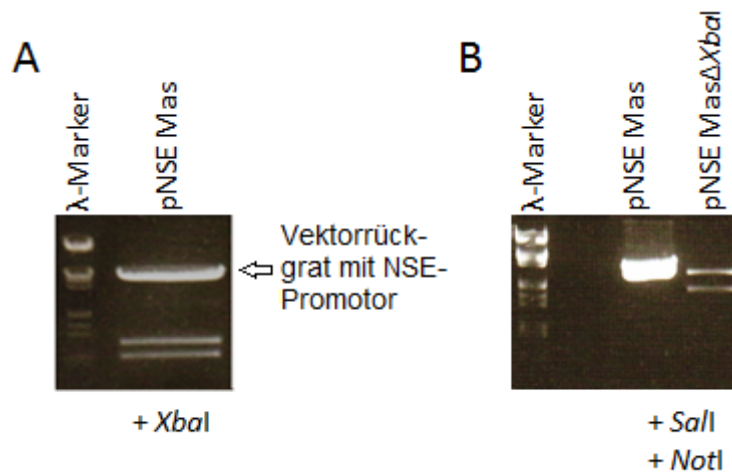
in den weiteren Kapiteln detailliert beschrieben. Die vollständigen Plasmidkarten aller verwendeten Konstrukte befinden sich in Anhang 2.



**Abb. 24 Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide pNSE Mas (A) und pcDNAmNEP (B) sowie des Zielkonstrukts pNSEmNEP (C) Alle für die Klonierungsschritte relevanten Schnittstellen sind eingezeichnet (pA: Polyadenylierungssequenz; SV40: *Simian-Virus* 40; BGH: bovines Wachstumshormon).**

#### 4.2.1.1. Klonierung des pNSEmNEP-Vektors

Um den NSE-Promotor aus dem Vektor pNSE Mas auszuschneiden, wurden die Restriktionsschnittstellen *EcoRV* und *NotI* ausgewählt. Deshalb mussten im ersten Schritt zwei Fragmente, die Mas cDNA und die SV40 Intron+pA-Sequenz, aus dem Vektor entfernt werden. Dafür wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *XbaI* inkubiert (siehe 3.2.1.1.) und damit die beiden Fragmente aus dem Vektor deletiert (Abb. 25 A). Das Vektorrückgrat mit dem NSE-Promotor hatte eine Größe von fast 5 kbp, die Mas cDNA ca. 1,2 kbp und das SV40 Intron+pA-Fragment war etwa 0,9 kbp groß. Die DNA des Plasmidgerüsts wurde nach Auftrennung und Isolierung mittels Agarosegel (siehe 3.2.1.4. und 3.2.1.5.) religiert, wie in 3.2.1.8. beschrieben, und der Ligationsansatz wurde anschließend in *E. coli* transformiert (siehe 3.2.1.10.). Nach Auswahl einiger Kolonien und Mini-Präparation der Plasmid-DNA (siehe 3.2.2.1.) wurde über einen Kontrollverdau mit *SalI* und *NotI* die Klonierung des Plasmids pNSE Mas $\Delta$ *XbaI* bestätigt. Im pNSE Mas-Plasmid sollten zwei Banden, bei 4 kbp und etwas über 3 kbp erscheinen, die sich in Abb. 25 B Bild teilweise überlagern. Die Banden, die durch Verdau des verkürzten Plasmids pNSE Mas $\Delta$ *XbaI* bei ca. 3 kbp und 2 kbp erwartet wurden, sind gut zu erkennen. Der für alle gelelektrophoretischen Untersuchungen verwendete  $\lambda$ -Marker (*EcoRI*/ *HindIII*) ist in Anhang 1 detailliert gezeigt.

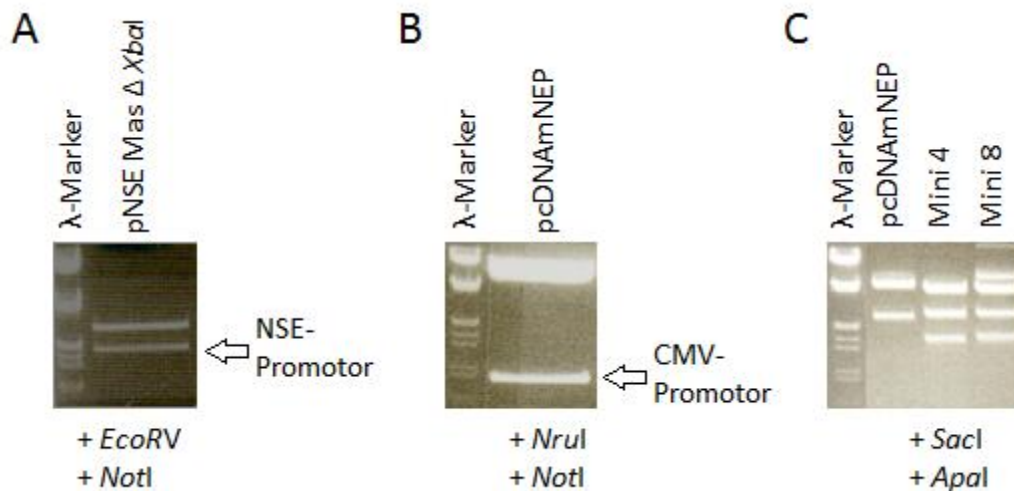


**Abb. 25** Auftrennung des Reaktionsansatzes nach Verdau des Plasmids pNSE Mas mit dem Enzym *XbaI* (A), Testverdau von pNSE Mas und dem neu erhaltenen Plasmid pNSE MasΔ*XbaI* mit *SalI* und *NotI* (B).

Aus diesem Vektor konnte nun der NSE-Promotor durch einen Doppelverdau mit *EcoRV* und *NotI* ausgeschnitten werden (3.2.1.1.). Der Ansatz wurde in einem Agarosegel aufgetrennt (3.2.1.4.) wie in Abb. 26 A gezeigt. Der 1,8 kbp große Promotor wurde ausgeschnitten, aus dem Gel extrahiert (3.2.1.5.) und mit einer Phenol/Chloroform-Reinigung aufgereinigt (3.2.1.6.).

Aus dem pcDNAmNEP-Plasmid wurde der etwa 600 bp große CMV-Promotor mit den Enzymen *NruI* und *NotI* ausgeschnitten (3.2.1.1.) und im Agarosegel aufgetrennt (3.2.1.4.). In Abb. 26 B sind die entstandenen Banden im Gelbild gezeigt. Das ca. 7 kbp große Vektorfragment wurde aus dem Gel isoliert und aufgereinigt (3.2.1.5. und 3.2.1.6.). Da das Restriktionsenzym *NruI* ebenso wie *EcoRV* eine Schnittstelle mit einem *blunt-end* generiert, wurde über diese Schnittstellen und über die *NotI*-Schnittstelle der NSE-Promotor in das pcDNAmNEP-Vektorfragment ligiert (3.2.1.8.). Anschließend wurde der Ligationsansatz in den *E.Coli*-Stamm DH5α transformiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (3.2.1.10.). Am nächsten Tag wurden einige Kolonien ausgewählt und mit einer Mini-Präparation die Plasmid-DNA einzelner Kolonien isoliert. Die Plasmide mit wurden für einen Testverdau mit den Enzymen *SacI* und *ApaI* umgesetzt (3.2.1.1.). Während bei Plasmid pcDNAmNEP zwei großen Banden, bei ca. 2,4 kbp und bei über 5 kbp erwartet wurden, sollten erfolgreich klonierte Plasmide nach dem Verdau drei Banden bei ca. 4,6 kbp, 2,5 kbp und 1,3 kbp zeigen. Weitere Banden, die nur wenige hundert bp groß sind, wurden in der Betrachtung vernachlässigt. In Abb. 26 C sind die Restriktionsmuster von zwei der Mini-Präparationen im Vergleich mit pcDNAmNEP gezeigt. Die Probe „Mini 4“ zeigte das erwartete Bandenmuster

für die erfolgreiche Klonierung und bekam den Namen pNSEmNEP. Es wurde eine Maxi-Präparation (3.2.2.2.) durchgeführt, um ausreichende Mengen des Plasmids für nachfolgende Versuche zu erhalten.



**Abb. 26** Auftrennung der Ansätze nach Verdau von pNSE Mas $\Delta$ XbaI mit *EcoRV* und *NotI* (A) und nach Verdau des Plasmids pcDNAmNEP mit *NruI* und *NotI* (B). Nach Ligation durchgeführter Kontrollverdau mit *SacI* und *ApaI* zur Identifizierung von pNSEmNEP (C).

#### 4.2.1.2. Überprüfung der zellspezifischen Aktivität von pNSEmNEP

In Zellkulturversuchen sollte das neu klonierte Plasmid pNSEmNEP auf seine zellspezifische Wirkung hin untersucht werden. Dafür wurde es in neuronale und nicht-neuronale Zellen transfiziert, wie unter 3.1.6. erläutert. Nach 24 Stunden wurde zur NEP-Aktivitätsbestimmung der Nachweis mit der DALEK-Methode durchgeführt (siehe 3.3.5.1.) und die Proben in der HPLC analysiert (siehe 3.3.5.3).

Um zu überprüfen, ob das Plasmid pNSEmNEP unspezifische NEP-Aktivität aufweist, wurden auf einer 24-well-Platte pro Kavität 100.000 COS7-Zellen ausgesät und bis zum nächsten Tag im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden dann mit PolyFect Transfektionsreagenz transfiziert wie unter 3.1.6.1. beschrieben, und für weitere 24 Stunden inkubiert. Als Plasmide für die Transfektion wurden das Plasmid pNSEmNEP, pcDNAmNEP als Positivkontrolle, sowie der leere Expressionsvektor pcDNA3.1(+) und pNSE Mas als Negativkontrollen verwendet. Es wurden außerdem auch Zellen in einigen Kavitäten nicht transfiziert, um die gemessenen NEP-Aktivitäten mit denen untransfizierter Zellen vergleichen zu können. Nach 24 Stunden wurde jeweils eine Hälfte der jeweiligen Transfektionsgruppe mit DALEK alleine und die andere mit DALEK und Candoxatrilat inkubiert. Im Überstand wurde anschließend die NEP-Aktivität über die Messung der



Absorption des gebildeten Produktes Tyr-DAla-Gly (TAG), ermittelt (siehe 3.3.5.2.). Die Absorption ist abhängig von der gebildeten Menge des Produktes und proportional zur Aktivität des Enzyms.

Wie erwartet, wurde in den Zellen, die mit pcDNAmNEP transfiziert wurden, im Vergleich zu den untransfizierten Zellen eine stark erhöhte NEP-Aktivität gemessen (siehe Abb. 27). Da in diesem Plasmid NEP hinter dem ubiquitär exprimierenden CMV-Promotor liegt, sollte in jeder Zelllinie eine erhöhte NEP-Aktivität messbar sein. Durch den Inhibitor konnte die gemessene Aktivität fast gänzlich gehemmt werden. Kein Unterschied in der Aktivität war zwischen untransfizierten Zellen und den mit den Vektoren pcDNA3.1(+) (auf dem das neu erstellte Konstrukt basiert) und pNSE Mas transfizierten Zellen zu sehen, was ebenfalls den Erwartungen entsprach. Auch bei diesen Transfektionsgruppen ließ sich die gemessene Aktivität durch Zugabe von Candoxatrilat reduzieren. Diese Differenz in der NEP-Aktivität entspricht der endogenen NEP-Aktivität der verwendeten Zelllinie. Die mit dem neuen Konstrukt pNSEmNEP transfizierten Zellen zeigten ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression, sowohl im Vergleich zu den untransfizierten Zellen, als auch zu den mit pNSEmNEP transfizierten und mit Candoxatrilat inhibierten Zellen. Die Aktivität betrug zwar nur etwa ein Siebtel der Expression, die mit dem Konstrukt pcDNAmNEP erzielt wurde, deutete aber auf eine leichte unspezifische Aktivität des Plasmids hin.

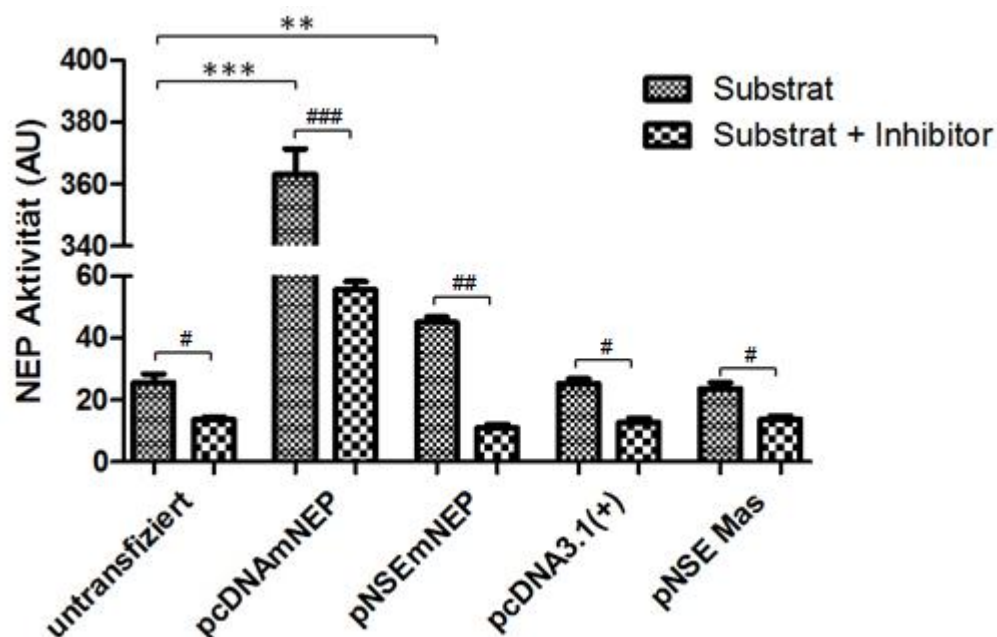


Abb. 27 NEP-Aktivitäten in COS7-Zellen, gemessen 24 Stunden nach Transfektion mit unterschiedlichen Konstrukten, jeweils mit und ohne NEP-Inhibition durch Candoxatrilat.

Zur Untersuchung der neuronalen Zelllinien mussten im Vorversuch die Transfektionsbedingungen ermittelt werden, unter denen eine effiziente Transfektion möglich ist. Dafür

wurden die Zellen in 24-well Platten mit den Transfektionsreagenzien PolyFect, Lipofectamine®2000 und FuGene unter unterschiedlichen, vom Hersteller vorgeschlagenen, Bedingungen mit dem Plasmid pLacZ transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden dann, wie in 3.1.7. beschrieben, angefärbt und ausgezählt. Eine Übersicht über die Transfektionseffizienzen der Zelllinien bei unterschiedlichen Bedingungen mit den jeweiligen Reagenzien ist in Abb. 28 gezeigt. Die zuerst verwendete humane Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-SH zeigte bei keinem der drei Reagenzien eine hohe Transfektionseffizienz und wurde deshalb nicht für die Transfektionsexperimente verwendet. Bei der murinen Neuroblastoma-Zelllinie Neuro-2a hingegen waren deutliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz in Abhängigkeit vom verwendeten Transfektionsreagenz zu sehen. Während mit Lipofectamine®2000 nur ca. 10% bis 20% der Zellen angefärbt werden konnten, stieg der Anteil gefärbter Zellen bei Transfektion mit FuGene auf ca. 30% bis 50% an. Die besten Ergebnisse wurden aber bei Verwendung von PolyFect erzielt. Hier konnten bis zu 80% der Zellen angefärbt werden. Dementsprechend sollten die Neuro-2a Zellen mit PolyFect für die Transfektionsexperimente verwendet werden. In den weiteren Experimenten wurden pro Kavität 0,5 µg Plasmid DNA und 4 µL PolyFect eingesetzt (siehe auch 3.1.6.1.).

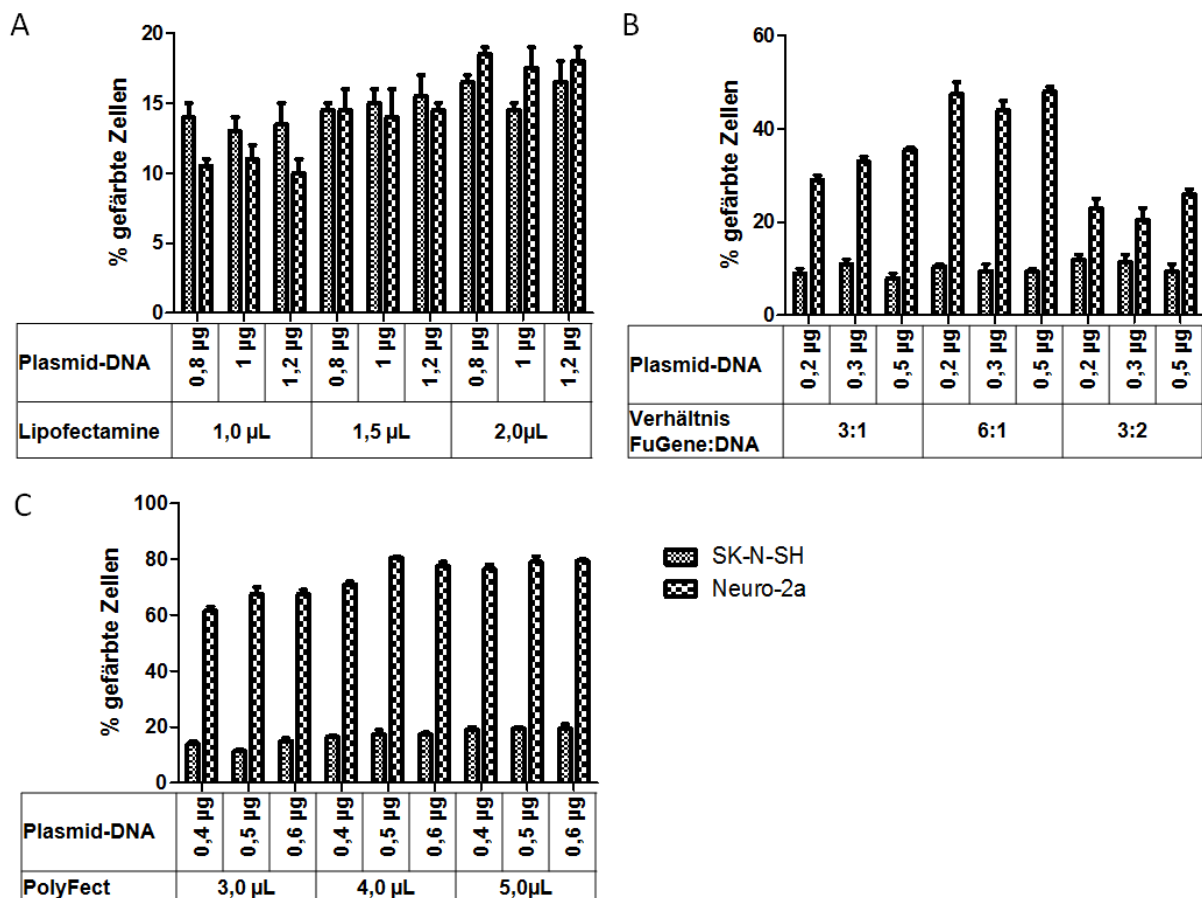


Abb. 28 Vergleich der Transfektionseffizienzen der Zelllinien SK-N-SH und Neuro-2a mit den Transfektionsreagenzien Lipofectamine®2000 (A), FuGene (B), und PolyFect (C) bei verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Entsprechend dem Vorversuch wurden auf einer 24-well-Platte 100.000 Neuro-2a Zellen pro Kavität ausgesät und am nächsten Tag mit den ermittelten Transfektionsbedingungen mit pNSEmNEP, der Positivkontrolle pcDNAmNEP, oder mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3.1(+), bzw. pNSE Mas als Negativkontrolle transfiziert (3.1.6.1.), und über Nacht im Inkubator kultiviert. Auch in diesem Fall wurden untransfizierte Zellen mitgeführt, um die endogene Aktivität der Neuro-2a-Zellen als Vergleichswert zu erhalten. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, und die NEP-Aktivität mit der DALEK-Methode ermittelt wie im Methodenteil beschrieben (3.3.5.).

Wie in Abb. 29 zu sehen ist, war auch in den Neuro-2a eine deutlich erhöhte NEP-Aktivität in den mit pcDNAmNEP transfizierten Zellen messbar. Jedoch konnte im Vergleich zu untransfizierten Zellen keine Erhöhung der Aktivität in den Zellen, die mit pcDNA3.1(+), mit pNSE Mas oder mit pNSEmNEP transfiziert wurden, gefunden werden. Nur in den untransfizierten Zellen, und in den mit pcDNAmNEP transfizierten Zellen, war durch Zugabe von Candoxatrilat eine Reduktion der NEP-Aktivität messbar. Dies deutet auf eine sehr geringe endogene NEP-Aktivität hin.

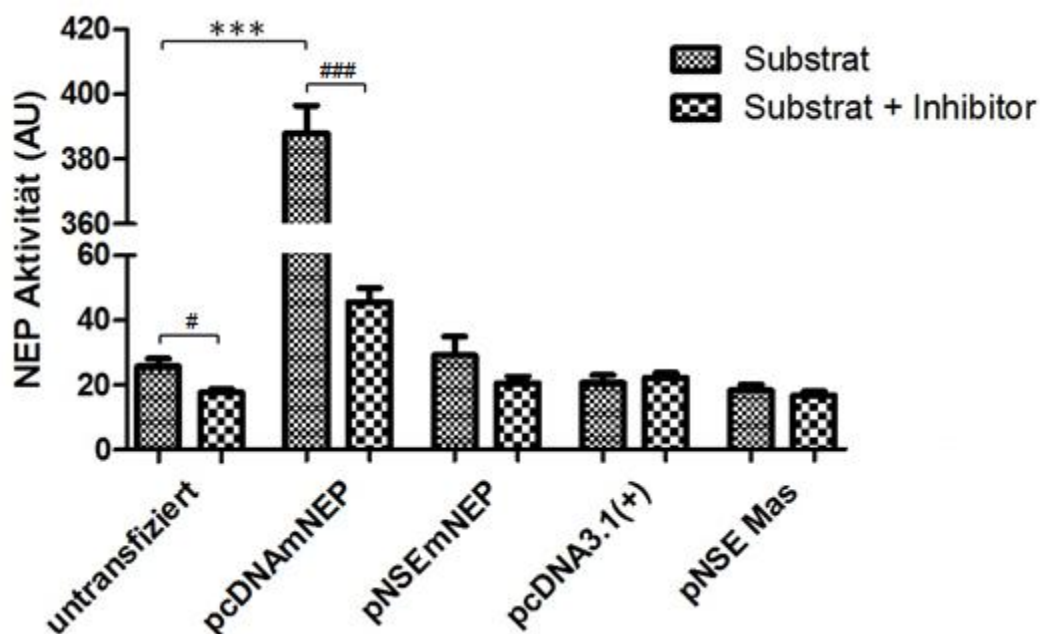
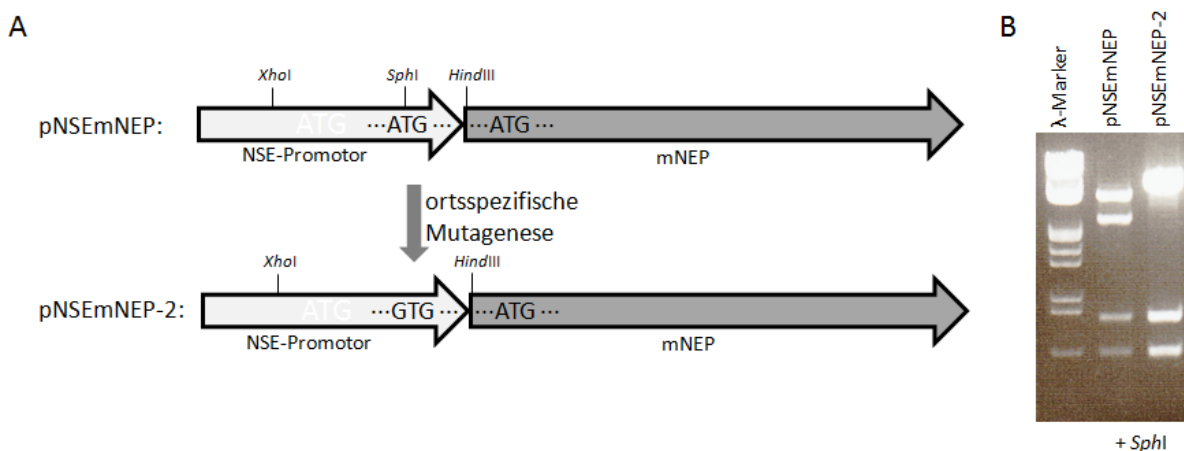


Abb. 29 NEP-Aktivitäten in Neuro-2a-Zellen, gemessen 24 Stunden nach Transfektion mit unterschiedlichen Konstrukten, jeweils mit und ohne NEP-Inhibition durch Candoxatrilat

Die Zellkulturversuche zeigten, dass der Vektor pNSEmNEP nicht die gewünschte zellspezifische Aktivität aufwies. Um die Ursache herauszufinden, warum in der neuronalen Zelllinie mit pNSEmNEP keine erhöhte NEP-Aktivität gemessen werden konnte, wurde das Konstrukt zur Sequenzierung gegeben.

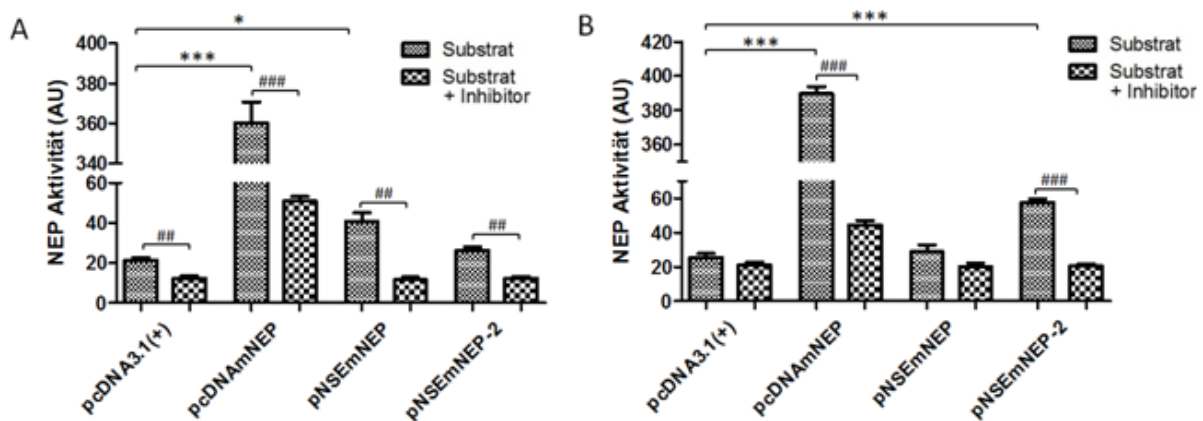
#### 4.2.1.3. Klonierung von pNSEmNEP-2 und Überprüfung der zellspezifischen Aktivität

Bei der Auswertung der Sequenzierungsdaten zeigte sich, dass nur wenige Basen vor dem Startcodon des murinen NEP ein weiteres ATG lokalisiert war (siehe Abb. 30 A). Dieses ATG war bereits in der NSE-Sequenz des Ursprungsplasmids vorhanden und führte zu einer Leserasterverschiebung. Um zu verhindern, dass dieses Codon zu einer Störung der Transkription führt, sollte die Sequenz verändert werden. Dazu wurde ein Primerpaar geschaffen, mit dem eine ca. 300 bp lange Sequenz von der Position des unerwünschten ATG in den NSE-Promotor hinein amplifiziert wurde. Die PCR wurde, wie in 3.2.5. beschrieben, mit den Primern NSE52 und NSEMu3 durchgeführt und das amplifizierte Fragment, in dem das Adenosin durch ein Guanidin ersetzt wurde, wurde anschließend in den T-Easy-Vektor kloniert (3.2.1.9.). Das Fragment wurde aus dem Vektor mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Hind*III ausgeschnitten (3.2.1.1.) und auch der Vektor pNSEmNEP wurde mit denselben Enzymen verdaut. Das PCR-Fragment und das Vektorrückgrat wurden elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.1.4.) aus dem Gel eluiert (3.2.1.5.) und aufgereinigt (3.2.1.6.). Dann wurde das PCR-Fragment mit der veränderten Sequenz in den Vektor ligiert, wie in 3.2.1.8. beschrieben, und in Dh5 $\alpha$ -Bakterien transformiert (3.2.1.10). Der Erfolg der Klonierung konnte durch einen Restriktionsverdau mit *Sph*I überprüft werden (3.2.1.1.), dessen Restriktionsschnittstelle durch den Basenaustausch ebenfalls zerstört wurde. Ein 4,8 kbp großes, und ein 2,5 kbp Fragment im Plasmid pNSEmNEP wurden dadurch zu einem über 7 kbp großen Fragment im neu erhaltenen Plasmid pNSEmNEP-2 vereinigt, wie in Abb. 30 B gut zu erkennen ist. Zusätzlich wurde das Plasmid jedoch auch zur Sequenzanalyse geschickt, um die veränderte Sequenz zu bestätigen.



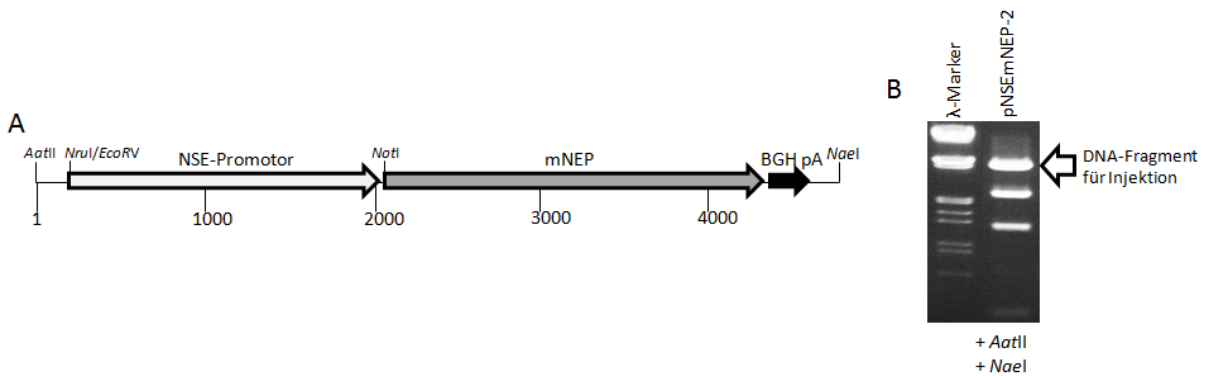
**Abb. 30** Schematische Darstellung der Konstrukte pNSEmNEP und pNSEmNEP-2 mit eingezeichneten Restriktionsstellen und Basenbezeichnungen(A). Restriktionsverdau beider Konstrukte mit dem Enzym *Sph*I (B)

Mit dem neuen Plasmid wurden anschließend, unter denselben Bedingungen wie vorher für das Plasmid pNSEmNEP, COS7- und Neuro-2a-Zellen transfiziert (3.1.6.) und die NEP-Aktivität mit der DALEK-Methode ermittelt (3.3.5.). In Abb. 31 A ist zu sehen, dass in COS7-Zellen keine Erhöhung der NEP-Aktivität mehr erzielt werden konnte. In den neuronalen Neuro-2A-Zellen trat jedoch mit dem Konstrukt pNSEmNEP-2 in etwa eine Verdoppelung der Aktivität gegenüber den untransfizierten Zellen auf (Abb. 31) B. Die Erhöhung der Aktivität war zwar noch immer wesentlich geringer, als in den mit dem Plasmid pcDNAmNEP transfizierten Positivkontrollen, sollte aber aufgrund der neuronspezifischen Aktivität für die Generierung des neuen Mausmodells verwendet werden.



**Abb. 31 Vergleich der NEP-Aktivitäten der unterschiedlichen Plasmide in COS7- (A) und Neuro-2a-Zellen (B)**

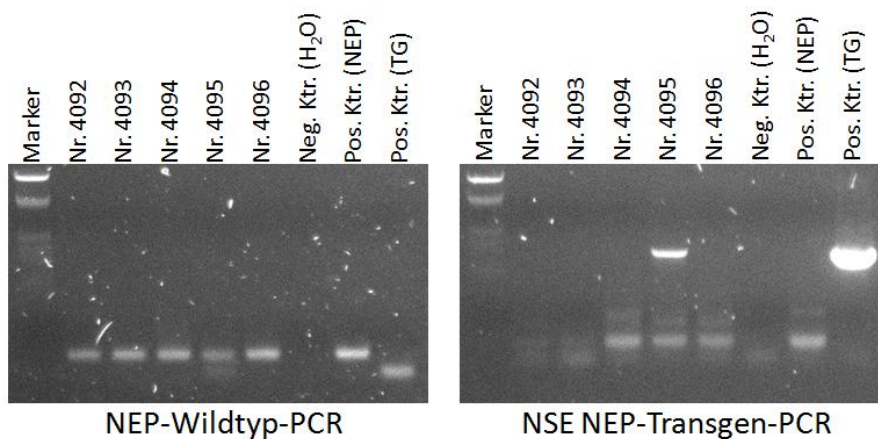
Um die DNA für die Injektion in die befruchtete Eizelle zur Schaffung der neuen transgenen Tiere vorzubereiten, wurde aus dem Plasmid pNSEmNEP-2 das Neprilysin-Gen ausgeschnitten. Das isolierte Fragment enthielt den NSE-Promotor, die kodierende Sequenz des murinen NEP und das Polyadenylierungsende des Rinder-Somatotropin (Rinder Wachstumshormon, *bovine growth hormone* BGH), das im pcDNA3.1(+) Vektor vorhanden ist. In Abb. 32 ist eine schematische Darstellung des ausgeschnittenen Fragmentes, das für die Injektion verwendet wurde, und die gelelektrophoretische Auftrennung des Plasmids nach dem Restriktionsverdau zu sehen. Um jeweils die kompletten Strukturen funktionsfähig zu erhalten, wurde das Plasmid in einigem Abstand zu den genannten Strukturen, mit den Restriktionsenzymen *AatII* und *NaeI* geschnitten (3.2.1.1.). Die verdaute DNA wurde an das MDC Berlin-Buch gegeben, um die transgenen Tiere herzustellen.



**Abb. 32** Schematische Darstellung der für die Injektion verwendeten DNA (A) und Bild der Plasmid-DNA nach der Restriktion mit den Enzymen AatII und NaeI (B). Das in A gezeigte Fragment ist mit einem Pfeil markiert (BGH: bovine Wachstumshormon; pA: Polyadenylierungssequenz).

#### 4.2.1.4. Genotypisierung der Mäuse zur Identifizierung transgener Tiere

Um herauszufinden, ob die DNA in das Genom der Mäuse integriert wurde, wurden von den neu geborenen Tieren am MDC Ohrbiopsien genommen. Die Ohrstücke wurden bei uns aufgearbeitet (3.2.3.) und mittels PCR genotypisiert (3.2.4.). Als Primerpaar für die Transgen-PCR wurde in Richtung des 3'-Endes der NEP-Primer NEP125 eingesetzt und in die Gegenrichtung der Primer POBGH3, der im BGH-Terminator bindet, um ein 1300 bp großes Fragment zu erhalten. Um die erfolgreiche Aufarbeitung der DNA zu überprüfen, wurde zusätzlich eine NEP-Wildtyp-PCR mit den Primern NEP125 und NEP133 durchgeführt. Ein Beispiel der Ergebnisse ist in Abb. 33 gezeigt.



**Abb. 33** Beispiel der Genotypisierung mittels PCR (Neg. Ktr.: Negativkontrolle, Pos. Ktr.: Positivkontrolle, TG: transgen)

Die Mäuse, bei denen hierüber nachgewiesen werden konnte, dass sie das Transgen trugen, wurden erneut verpaart. Die Nachkommen wurden erneut genotypisiert, um die potentiellen Gründertiere zu identifizieren, bei denen die DNA stabil in die DNA integriert worden war.

#### 4.2.1.5. Bestimmung der NEP-Aktivität in transgenen Tieren

Durch die Genotypisierung der F1-Tiere konnten zehn Gründertiere identifiziert werden, bei denen die DNA stabil integriert worden war. Um erste Untersuchungen zu beginnen, wurden die F1-Tiere geschlachtet und zur Kontrolle ebenfalls einige Wurfgeschwister, die das Transgen nicht trugen. Es wurden Niere, Darm, Leber, weißes Fettgewebe, Milz, Lunge, Herz und Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde in die linke und die rechte Hemisphäre geteilt, und dann weiter unterteilt in den frontalen und okzipitalen Bereich des Großhirns, sowie Cerebellum mit Hirnstamm.

Es wurden dann die linken frontalen Hirnbereiche homogenisiert (3.3.1.) und mit der DALEK-Methode die NEP-Aktivität bestimmt (3.3.5.), um auf Unterschiede der NEP-Expression in den Nervenzellen zu prüfen. In Abb. 34 sind die NEP-Aktivitäten, die in den Homogenaten aus den F1-Tieren ermittelt wurden gezeigt. Die angegebene Nummer steht für die Bezeichnung des transgenen Elterntieres. Die transgenen Mäuse wiesen im Gehirn keine erhöhte NEP-Aktivität auf. Im Gegenteil zeigten die Nachkommen des Tieres 4050 sogar eine niedrigere Aktivität, wobei die Verringerung nur bei den weiblichen Nachkommen signifikant war.

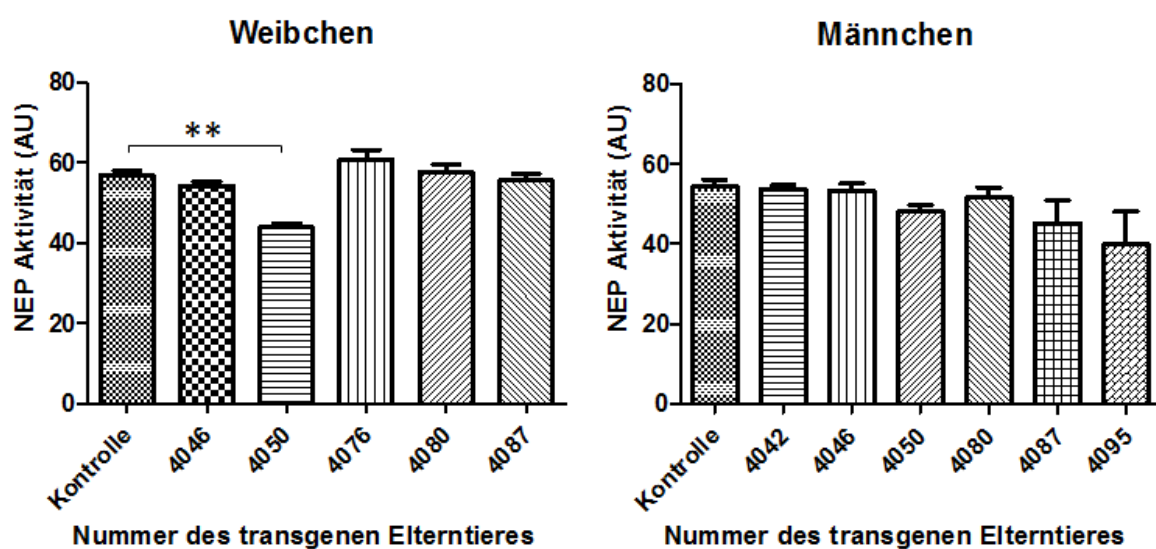


Abb. 34 NEP-Aktivität in Gehirnhomogenaten der transgenen Tiere im Vergleich zur Aktivität wildtypischer Wurfgeschwister gleichen Alters.

Es wurden zusätzlich die Nieren der Tiere homogenisiert (3.3.1.) und ebenfalls auf die NEP-Aktivität hin überprüft (3.3.5.). Die NEP-Aktivität in den Nieren der Tiere wurde bestimmt, um zu sehen, ob es Änderungen in der Aktivität des peripher exprimierten NEP auftraten. Da in den Zellkulturversuchen eine neuronspezifische Überexpression mit dem Konstrukt pNSEmNEP-2 erzielt worden war, wurde keine erhöhte NEP-Aktivität in den Nieren erwartet. Wie in Abb. 35 zu sehen ist, konnte tatsächlich keine Veränderung in den Nierenhomogenaten nachgewiesen werden. Einzig die weiblichen Nachkommen des transgenen Tieres mit der Nummer 4076 zeigten eine leichte Erhöhung, die jedoch nicht signifikant war.

Somit zeigten die Untersuchungen der NEP-Aktivität, dass in keiner der erhaltenen Mauslinien, die das transgen trugen, eine Erhöhung der NEP-Aktivität induziert werden konnte.

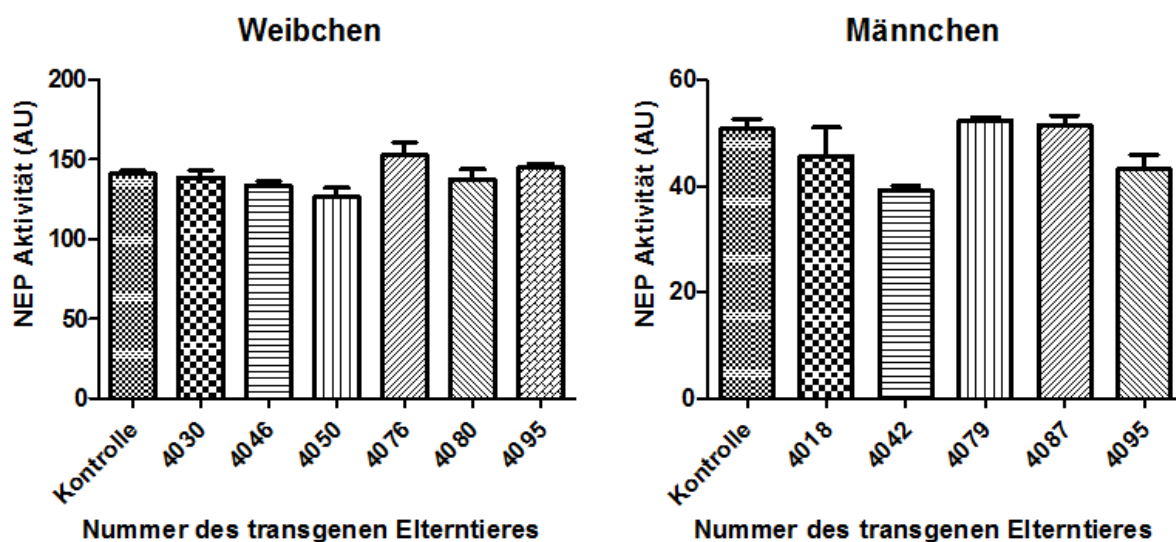


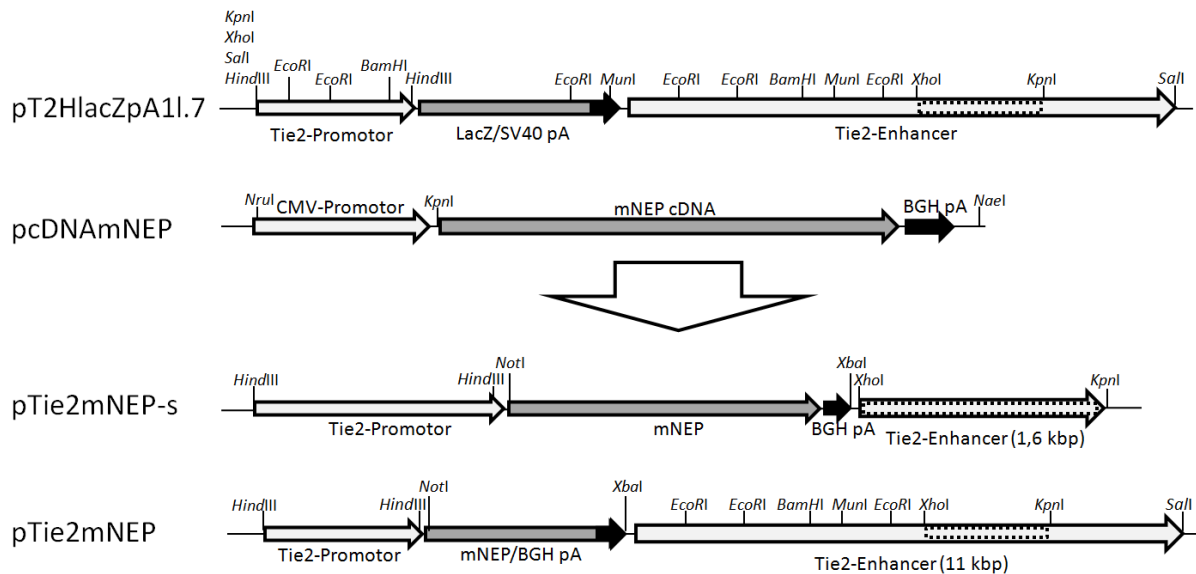
Abb. 35 NEP-Aktivität gemessen in Nierenhomogenaten der transgenen Tiere im Vergleich zur Aktivität wildtypischer Wurfgeschwister gleichen Alters.

#### 4.2.2. NEP-Überexpression in endothelialen Zellen

Als zweites Mausmodell sollte eine transgene Linie generiert werden, die NEP im peripheren System überexprimiert. Der NEP-abhängige Effekt auf die Reduktion des Körpergewichts konnte bislang nur auf die Peripherie, nicht aber auf ein bestimmtes Organ oder Gewebe eingegrenzt werden. Um also ein möglichst wenig limitiertes System zur Verfügung zu haben, sollte Nephilysin in Endothelzellen überexprimiert werden. TIE2 ist ein Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, der ausschließlich in Endothelzellen exprimiert wird. Promotor und Enhancer des Gens wurden bereits erfolgreich eingesetzt, um ein Protein spezifisch in Endothelzellen von Mäusen zu exprimieren (Schlaeger *et al.*, 1997) und das dafür genutzt



Plasmid (pT2HlacZpA11.7) wurde uns freundlicherweise von Prof. Sato zur Verfügung gestellt. Da ein einfaches Austauschen der kodierenden Proteinsequenzen nicht möglich war, sollten zwei Plasmide mit dem pcDNA3.1(+) Vektor erstellt werden: Ein Plasmid mit einer verkürzten Enhancersequenz (pTie2mNEP-s), das dadurch allerdings eine verringerte Endothelzellspezifität aufweist, und, falls möglich, ein Plasmid mit dem kompletten Enhancer (pTie2mNEP). Die Ursprungs- und Zielplasmide sind schematisch in Abb. 36 gezeigt, die kompletten Vektorkarten aller Konstrukte, die im Zuge des Klonierungsvorhabens entstanden sind und genutzt wurden, sind im Anhang 2 zu finden.



**Abb. 36 Schematische Darstellung der Ursprungsvektoren für die Generierung der Plasmide zur endothelspezifischen Überexpression von NEP und der Zielvektoren.**

#### 4.2.2.1. Generierung des Plasmids pTie2P

Da sich die beiden Zielkonstrukte pTie2mNEP-s und pTie2mNEP nur durch verschieden lange Fragmente des Tie2-Enhancers unterschieden, war es zu Anfang nicht nötig, unterschiedliche Klonierungswege zu beschreiten. Da das Konstrukt im Vektor pcDNA3.1(+) erstellt werden sollte, wurde im ersten Schritt der Tie2-Promotor in die Polylinkerregion des Vektors kloniert. Der Promotor wurde dazu mit dem Restriktionsenzym *HindIII* aus dem Plasmid pT2HlacZpA11.7 ausgeschnitten wie unter 3.2.1.1. beschrieben (Abb. 37 A). Der Vektor pcDNA3.1(+) wurde mit *HindIII* geöffnet (siehe 3.2.1.1.) und die Enden, wie in 3.2.1.2. erläutert, dephosphoryliert um Selbstligation zu verhindern (Abb. 37 A). Anschließend wurde der Tie2-Promotor hineinkloniert. Nach der Ligation (3.2.1.8.) und Transformation, (3.2.1.10.) wurden Kolonien selektiert, und für eine Mini-Präparation kultiviert (siehe 3.2.2.1.). Über einen Restriktionsverdau mit *BamHI* (3.2.1.1.) wurden

diejenigen Plasmide bestimmt, in denen der Tie2-Promotor in der korrekten Ausrichtung integriert war. Bei Integration des Fragments in der falschen Ausrichtung wurde ein 1,6 kbp großes Segment ausgeschnitten, während bei korrekter Ausrichtung eine Bande bei 500 bp detektiert werden konnte (Abb. 37 B). Dieses gewünschte Plasmid wurde pcDNA Tie2P genannt.

Es wurde im nächsten Schritt mit den Enzymen *NheI* und *NruI* inkubiert (3.2.1.1.) um den CMV-Promotor herauszuschneiden. Der durch *NheI* entstandene Überhang wurde dann mit Klenow-Fragment aufgefüllt (3.2.1.3.) und des Plasmid durch Ligation wieder geschlossen (3.2.1.8.). Nach Transformation (3.2.1.10.) und Minipräparation der Plasmide einiger Kolonien (3.2.2.1.) wurde im Restriktionsverdau mit *NdeI* auf die erfolgreiche Generierung des Plasmids pTie2P geprüft. Eine Restriktionsstelle des Enzyms wurde zusammen mit dem CMV-Promotor entfernt, so dass sich bei Umsetzung mit dem Enzym nur noch eine Bande des linearisierten Plasmids pTie2P im Gel zeigte (Abb. 37 C).

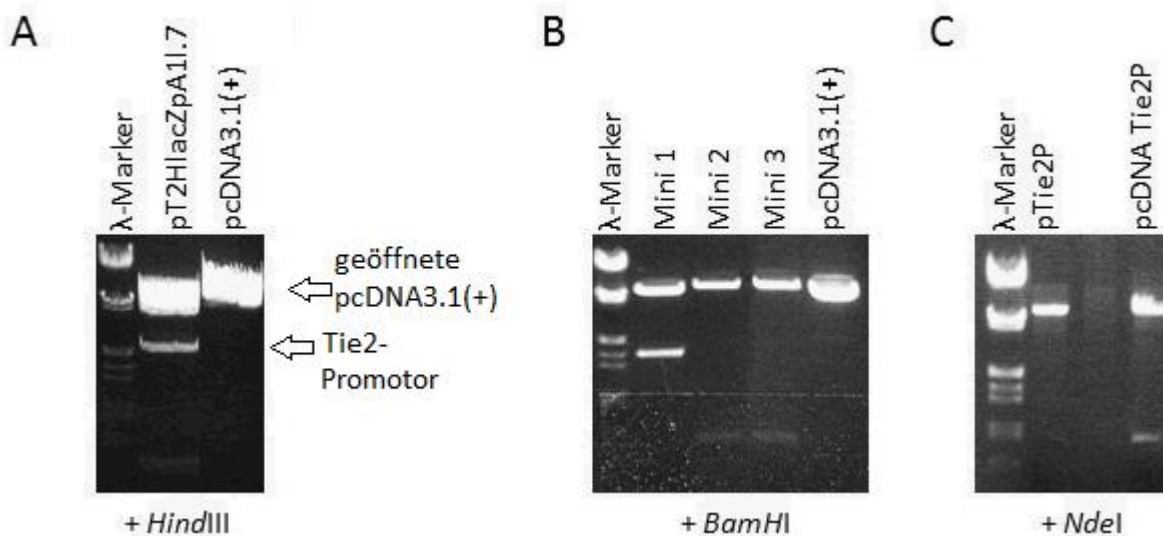


Abb. 37 Die Ursprungsvektoren nach Verdau mit *HindIII* (A). Kontrollverdau mit *BamHI* zur Identifizierung von pcDNATie2P (B). Kontrollverdau mit *NdeI* zum Nachweis der Generierung von pTie2P (C).

#### 4.2.2.2. Generierung des Plasmids pT2mNEP

Im nächsten Schritt sollte die NEP-kodierende Sequenz zusammen mit dem BGH-Terminator in den neuen Vektor zu kloniert werden. Dazu wurde der Vektor pcDNAmNEP mit den Enzymen *NaeI* und *KpnI* inkubiert (3.2.1.1.), um NEP zusammen mit dem BGH-Terminator auszuschneiden (Abb. 38 A). Dieses NEP/BGH-Fragment wurde zuerst in den Klonierungsvektor pBS KS(+) zwischenkloniert. Dieser Schritt war notwendig, um für den weiteren Klonierungsverlauf benötigte Schnittstellen zu erhalten. Dafür wurde pBS KS(+) mit

*EcoRV* und *KpnI* geöffnet (3.2.1.1.) und das NEP/BGH-Fragment einkloniert. Bei einem Testverdau mit *PstI* wurden für das Plasmid pcDNAmNEP drei Banden, bei jeweils 4 kbp, 2,7 kbp und 1 kbp, erwartet. Das Plasmid pBS KS(+) sollte nur linearisiert vorliegen und bei 3 kbp eine Bande zeigen. Die Banden für das neue Konstrukt pBSKS(+)mNEP+BGHpA sollten bei 3 kbp, 1,8 kbp und 1kbp liegen. Diese Restriktionsmuster konnten gefunden werden, wie auch Abb. 38 B zu sehen ist.

Aus diesem neuen Plasmid, wurde das NEP/BGH-Fragment anschließend mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *NotI* wieder ausgeschnitten. Da bei Verwendung dieser beiden Enzyme zwei gleich große Fragmente entstehen, wurde als drittes Enzym *PvuI* zum Reaktionsansatz gegeben (3.2.1.1.), um das Vektorrückgrat weiter zu zerteilen. Das Plasmid pTie2P wurde ebenfalls mit *XbaI* und *NotI* inkubiert (3.2.1.1.) (Abb. 38 C), und das NEP/BGH-Fragment anschließend in den geöffneten Vektor eingefügt (3.2.1.8). Dadurch wurde das Plasmid pT2mNEP erhalten. Im Testverdau mit *KpnI* und *XbaI* sollte der pT2mNEP eine Bande bei 2,8 kbp und eine bei 6,7 kbp zeigen, während pTie2P nur eine Bande bei 6,8 kbp, und pBSKS(+)mNEP+BGHpA zwei gleich große Banden bei 2,8 kbp aufweisen sollten. Die erwarteten Restriktionsmuster sind in Abb. 38 D zu sehen.

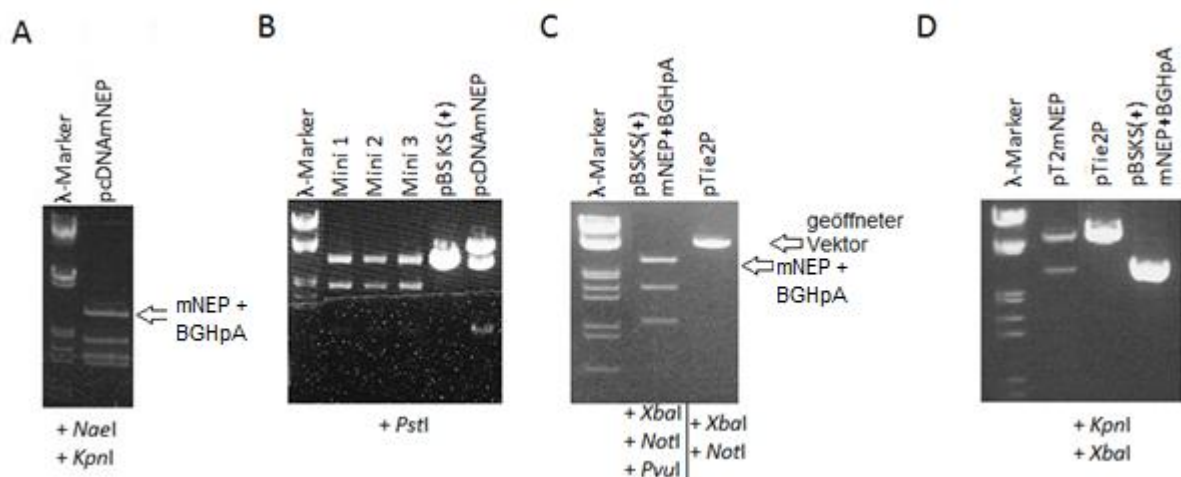
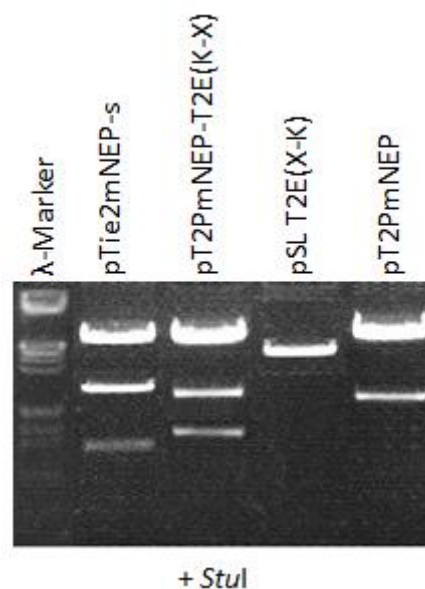


Abb. 38 Verdau von pcDNAmNEP mit *NaeI* und *KpnI* (A) und Kontrollverdau mit *PstI* zur Identifizierung von pBSKS(+)mNEP+BGHpA (B). Verdau von pBSKS(+)mNEP+BGHpA und pTie2P zur Klonierung von pT2mNEP(C) und späterer Kontrollverdau (D).

#### 4.2.2.3. Generierung des Plasmids pTie2mNEP-s

Um das Produkt spezifisch in endothelialen Zellen exprimieren zu können, musste zusätzlich noch der Enhancer hinter den NEP-kodierenden Bereich kloniert werden. Es wurde zuerst ein Plasmid mit einem verkürzten Enhancerfragment hergestellt. Dazu wurde aus dem Plasmid pT2HlacZpA11.7 mit den Enzymen *XhoI* und *KpnI* das ca. 1,6 kbp große

Enhancerfragment geschnitten (3.2.1.1.) und der Klonierungsvektor pSL301 mit denselben Restriktionsenzymen umgesetzt. Das Fragment wurde im Agarosegel aufgetrennt (3.2.1.4.), aus dem Gel isoliert und eluiert (3.2.1.5.), und in den Klonierungsvektor ligiert (3.2.1.8.) um das Plasmid pSL T2E(X-K) zu erhalten. Aus diesem Zwischenprodukt wurde das Enhancerfragment T2E(X-K) über die Restriktionsstellen *NheI* und *SpeI* wieder herausgeschnitten (3.2.1.1.). Der Vektor pT2PmNEP wurde mit *XbaI* geöffnet (3.2.1.1.) und dephosphoryliert (3.2.1.2.). Da die Enden von *NheI*, *SpeI* und *XbaI* untereinander kompatibel sind, konnte das Enhancerfragment in den geöffneten Vektor pT2PmNEP ligiert werden (3.2.1.8.). Nach der Transformation (3.2.1.10.) wurden die Plasmide einiger Kolonien isoliert (3.2.2.1.). Im Testverdau mit *StuI* wurde überprüft, in welcher Ausrichtung das T2E(X-K)-Fragment im Plasmid integriert war. Das Gelbild in Abb. 39 zeigt die beiden möglichen Konstrukte, im Vergleich mit pSL T2E(X-K) und pT2pmNEP. In pSL T2E(X-K) wurde, wie erwartet, nur der linearisierte, 4,8 kbp große Vektor gefunden. Aus dem Plasmid pT2mNEP sollte ein 2,3 kbp großes Fragment ausgeschnitten werden, die Bande für das restliche Plasmidfragment sollte ca. 7,2 kbp betragen. Für den Zielvektor pTie2mNEP-s wurden drei Banden erwartet, mit den Größen 7,2 kbp, 2,7kbp und 1,3 kbp. Plasmide in denen das Enhancerfragment in der falschen Ausrichtung integriert wurde, erhielten die Bezeichnung pT2mNEP-T2(K-X). wurden Banden der Größe 7,2 kbp, 2,5 kbp und 1,5 kbp erwartet. Diese Muster konnten alle im Testverdau mit *StuI* bestätigt werden.



**Abb. 39** Kontrollverdau mit *StuI* für pTie2mNEP-s im Vergleich mit den Plasmiden pT2mNEP-T2E(K-X), pSL T2E(X-K) und pT2PmNEP

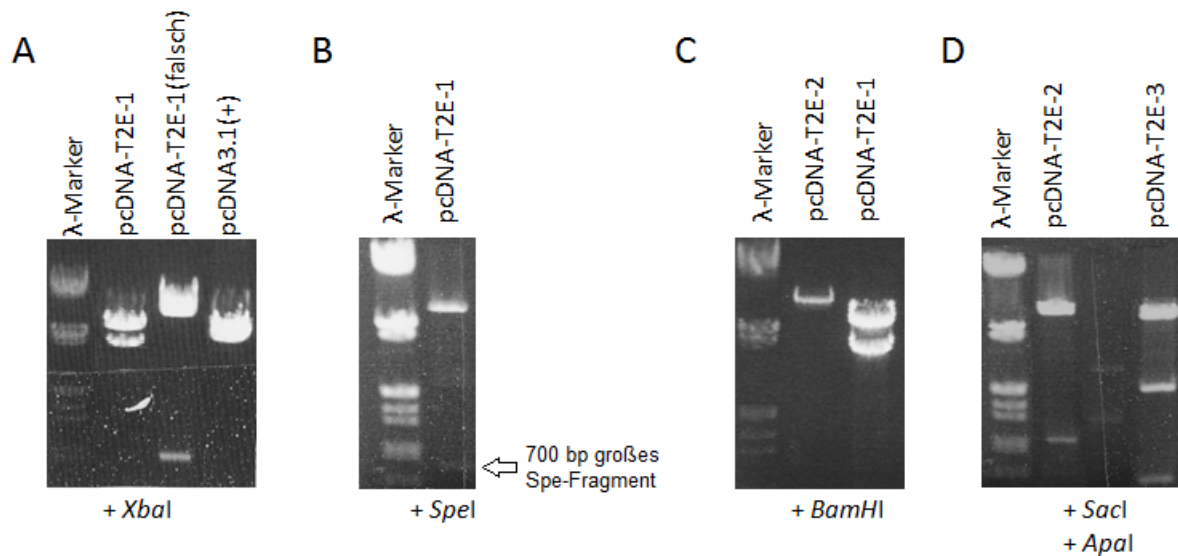
#### 4.2.2.4. Generierung des Plasmids pTie2mNEP

Da für Plasmide mit dem kompletten, ca. 11 kbp großen Enhancer eine höhere Spezifität von Prof. Satos Gruppe nachgewiesen wurde (Schlaeger *et al.*, 1997), sollte versucht werden, auch ein Konstrukt mit dem kompletten Enhancer zu generieren. Da sich der Enhancer allerdings nicht in einem Stück in das Plasmid ligieren lies, mussten mehrere Konstrukte als Zwischenprodukte hergestellt werden.

Als erstes wurde dazu das Ursprungsplasmid pT2HlacZpA11.7 mit dem Enzym *MunI* umgesetzt (3.2.1.1.) um ein ca. 4 kbp großes Fragment des Enhancers herauszuschneiden. Das zerschnittene Ursprungsplasmid wurden elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.1.4.) und aus dem Gel eluiert (3.2.1.5.). Das Plasmid pcDNA3.1(+) wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geöffnet (3.2.1.1.) und die Enden dephosphoryliert (3.2.1.2.). Da die Enden von *MunI* und *EcoRI* kompatibel zueinander sind, wurde das Fragment hierüber in den Vektor ligiert (3.2.1.8.). Durch einen Restriktionsverdau mit *XbaI* wurden Plasmide mit dem Fragment in der gewünschten Ausrichtung identifiziert. Dabei sollte ein 6,3 kbp großes Fragment, und ein weiteres mit einer Größe von 3,4 kbp auf dem Gel zu sehen sein. Bei umgekehrter Ausrichtung wurde ein 8,8 kbp und ein 0,9 kbp großes Fragment erwartet. Die 5,4 kbp große pcDNA wird durch *XbaI* linearisiert (Abb. 40 A). Das neue Plasmid wurde pcDNA-T2E-1 genannt.

Aus diesem Plasmid wurde mit dem Enzym *SpeI* der Promotor herausgeschnitten (3.2.1.1.). Dieses ca. 700 bp große Fragment (Abb. 40 B) wurde alleine deshalb entfernt, um eine *BamHI*-Schnittstelle zu eliminieren die im weiteren Klonierungsverlauf gestört hätte. Das Plasmid wurde anschließend wieder geschlossen (3.2.1.8.) und der Erfolg des Schrittes durch einen Testverdau der Plasmide mit dem Enzym *BamHI* überprüft, bei dem anstatt der ursprünglichen zwei Banden, nur noch eine erwartet wurde (Abb. 40 C). Das Konstrukt bekam den Namen pcDNA-T2E-2.

Dieses Konstrukt wurde im nächsten Schritt mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XhoI* geöffnet (3.2.1.1.). Aus dem Ursprungsvektor pT2HlacZpA11.7 wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XhoI* ein ca. 1,8 kbp großes Enhancerfragment geschnitten (3.2.1.1.), das im Gel aufgetrennt (3.2.1.4.) und daraus eluiert worden war (3.2.1.5.). Das Fragment wurde in den Vektor pcDNA-T2E-2 ligiert (3.2.1.8.). Im Testverdau mit *SacI* und *Apal* wurden im Plasmid pcDNA-T2E-2 zwei Banden, bei 8 kbp und 1 kbp erwartet, während im neuen Plasmid, das den Namen pcDNA-T2E-3 bekam, drei Banden mit den Größen 8 kbp, 2 kbp und 0,5 kbp erwartet und auch gefunden wurden (Abb. 40 D).

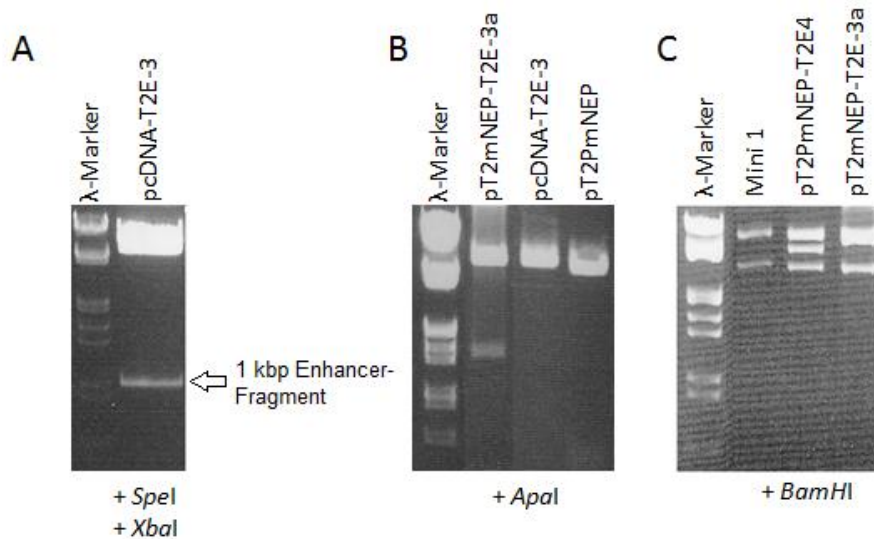


**Abb. 40 Testverdau mit *XbaI* zur Identifizierung von pcDNA-T2E-1 (A). Verdau von pcDNA-T2E-1 mit dem Enzym *SpeI* (B), Kontrollverdau mit *BamHI* nach Religation zur Identifizierung von pcDNA-T2E-2 (C). Kontrollverdau mit den Enzymen *SacI* und *ApaI* zum Nachweis der Klonierung von pcDNA-T2E-3**

Um die erste Hälfte des Tie2-Enhancers in das Plasmid pT2PmNEP zu klonieren, wurde das Plasmid mit dem Enzym *XbaI* geöffnet (3.2.1.1.) und wurde dephosphoryliert (3.2.1.2.). Aus dem Plasmid pcDNA-T2E-3 wurde dann mit den Enzymen *SpeI* und *XbaI* ein ca. 1 kbp großes Fragment der Tie2-Enhancerhälfte herausgeschnitten (3.2.1.1.). Das 1kb-Fragment wurde im Gel aufgetrennt (3.2.1.4.) und daraus aufgereinigt (3.2.1.5.) (Abb. 41 A). Anschließend wurde das 1kb-Fragment in das geöffnete Plasmid pT2PmNEP ligiert (3.2.1.8.) und durch einen Testverdau mit *ApaI* wurden die Plasmide, in denen das Fragment in der gewünschten Ausrichtung integriert war, identifiziert. Beim Verdau des gewünschten Plasmid pT2PmNEP-T2E-3a mit *ApaI* sollte eine Bande mit einer Größe von 9 kbp, und eine zweite bei 1,5 kbp zu sehen sein. Aus dem Plasmid pT2PmNEP wurde von dem Enzym ein 500 bp großes Fragment herausgeschnitten, und pcDNA-T2E-3 wurde lediglich linearisiert (Abb. 41 B).

Dann wurden aus dem Plasmid pcDNA-T2E-3 mit dem Restriktionsenzym *XbaI* die anderen 5 kbp des Enhancersfragments ausgeschnitten (3.2.1.1.) und aufgereinigt (3.2.1.4. und 3.2.1.5.). Das Plasmid pT2PmNEP-T2E-3a wurde ebenfalls mit dem Enzym *XbaI* geöffnet (3.2.1.1.) und die Enden dephosphoryliert (3.2.1.2.). Das Fragment wurde durch Ligation in das Konstrukt integriert (3.2.1.8.) und anschließend wurden die Plasmide im Testverdau auf richtige Ausrichtung des Inserts überprüft. Bei richtiger Ausrichtung wurden vier Banden bei den Größen 8,1 kbp, 4 kbp, 2,8 kbp und 0,5 kbp erwartet. Das Plasmid pT2PmNEP-T2E-3a

sollte drei Banden bei jeweils 7,2 kbp, 2,8 kbp und 0,5 kbp zeigen. Die erwarteten Banden wurden nach der Auftrennung gefunden, wie in Abb. 41 C zu sehen ist. Mini 1 in dieser Abbildung stammt vermutlich von einem Plasmid in dem das Fragment in umgekehrter Ausrichtung integriert wurde. In diesem Fall überlagern sich zwei Banden bei 2,8 kbp, zusätzlich gibt es eine Bande bei 9,3 kbp und 0,5 kbp. Als Name für das gewünschte Zwischenprodukt wurde pT2PmNEP-T2E4 verwendet.



**Abb. 41** Verdau von pcDNA-T2E-3 mit *SpeI* und *XbaI* (A). Kontrollverdau mit *ApaI* zur Identifizierung von pT2PmNEP-T2E-3a (B). Kontrollverdau mit *BamHI* zur Identifizierung von pT2PmNEP-T2E-4 (C).

Um die zweite Hälfte des Enhancers aus dem Ursungsplasmid pT2HlacZpA11.7 an das Enhancerfragment im Plasmid pT2PmNEP-T2E4 anzuschließen, wurde das Ursungsplasmid mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* umgesetzt (3.2.1.1.). Damit wurde das ca. 5,5 kbp große Enhancerfragment ausgeschnitten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente (3.2.1.4.) und Elution und Aufreinigung (3.2.1.5. und 3.2.1.6.) wurde das Fragment in den Vektor pcDNA3.1(+) ligiert (3.2.1.8.), der vorher mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* geöffnet worden war. (3.2.1.1.). Dabei wurden die kompatiblen Enden der *XhoI*- und der *SalI*-Schnittstelle zerstört. Die erhaltenen Plasmide wurden in einem Kontrollverdau mit den Enzymen *XhoI* und *NdeI* inkubiert. Nach erfolgreicher Klonierung wurden für das neue Plasmid pcDNA-T2E5 zwei Banden bei 9,3 kbp und 1,3 kbp erwartet. Das Plasmid pT2HlacZpA11.7 sollte in fünf Fragmente zerteilt werden, von denen eines eine Größe von 7,3 kbp, zwei weitere von ca. 4,8 kbp, ein anderes 1,3 kbp und das kleinste etwa 200 bp groß sein sollte. Aus dem Vektor pcDNA3.1(+) sollte ein 500 bp großes Fragment entfernt werden. Die erwarteten Banden konnten im Gel identifiziert werden (Abb. 42 A)

Aus dem Konstrukt pcDNA-T2E5 wurde mit dem Enzym *DraIII* das Enhancerfragment erneut ausgeschnitten. Da dieser Verdau zu zwei Fragmenten gleicher Größe führt, wurde das Vektorrückgrat durch *SaII* weiter zerschnitten (3.2.1.1.). Die Fragmente wurden im Gel aufgetrennt, das 5,3 kbp große Enhancerfragment wurde isoliert und aufgereinigt (3.2.1.4. und 3.2.1.5.). Das Plasmid pT2EmNEP-T2E4 wurde ebenfalls mit *DraIII* geöffnet (3.2.1.1.) und die Enden dephosphoryliert (3.2.1.2.). Das Enhancerfragment wurde durch Ligation integriert (3.2.1.8.), wodurch der gesamte Enhancer wieder vollständig zusammengesetzt werden konnte. Nachdem die Insertion in der gewünschten Ausrichtung im Testverdau bestätigt wurde, wurde dem Plasmid der Name pTie2mNEP gegeben. Dazu wurden zwei unterschiedliche Restriktionsreaktionen durchgeführt: Für die erste wurden die neuen Plasmide, zusammen mit pcDNA-T2E5 und pT2PmNEP-T2E4 als Kontrollen, mit dem Enzym *DraIII* verdaut. Aus dem Plasmid pT2PmNEP-T2E4 wird dadurch ein ca. 950 bp großes Fragment entfernt, das im Gel leicht zu identifizieren ist (Abb. 42 B). Da eine Unterscheidung zwischen pcDNA-T2E5 bei diesem Verdau nicht möglich ist, wurden die Plasmide außerdem mit den Enzymen *XhoI* und *NruI* verdaut. Eine Schnittstelle für *NruI* sollte nur das Plasmid pcDNA-T2E5 aufweisen, und somit sollte nur aus diesem Plasmid ein Fragment herausgeschnitten werden (Abb. 42 C). Dies konnte ebenfalls gezeigt werden. Dieses Ausschlussverfahren als indirekte Beweisführung war notwendig, da keine kleineren Fragmente aus den Plasmiden ausgeschnitten und verglichen werden konnten, und bei hohen Fragmentgrößen eine genaue Auftrennung der Banden nicht möglich war.

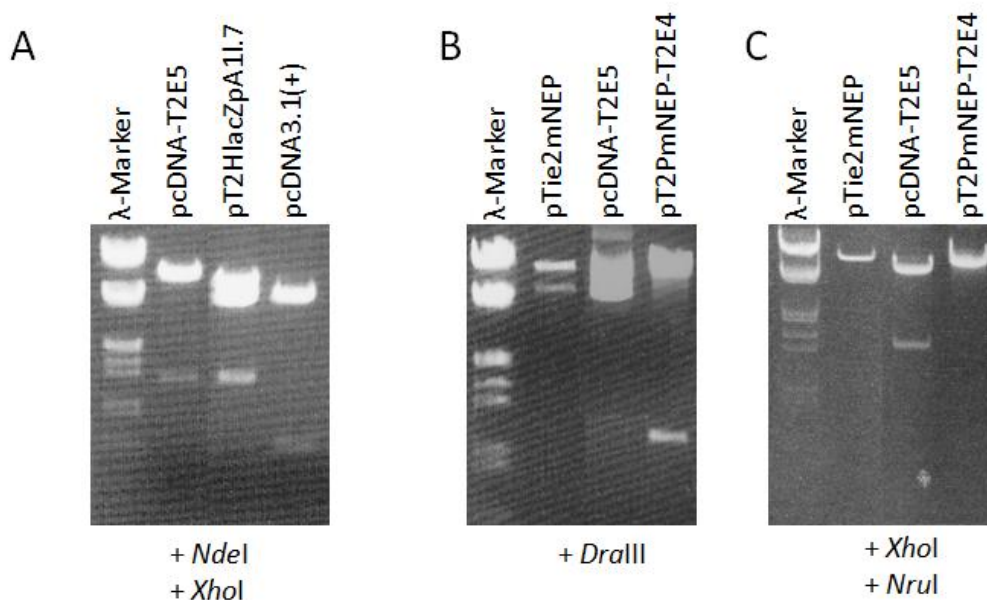


Abb. 42 Kontrollverdau mit *NdeI* und *XhoI* zur Identifizierung von pcDNA-T2E5 (A). Kontrollverdaue zur Identifizierung von pTie2mNEP mit *DraIII* (B) sowie *XhoI* und *NruI* (C).



#### 4.2.2.5. Untersuchung der NEP-Aktivität der Plasmide in COS7-Zellen

Nachdem die beiden Zielplasmide pTie2mNEP-s und pTie2mNEP generiert worden waren, sollten sie in unterschiedliche Zelltypen transfiziert werden, um ihre zellspezifische Expression zu untersuchen. Um die Konstrukte auf unspezifische Expression zu prüfen, wurden auch diese Plasmide in COS7-Zellen getestet. Die Zellen wurden dazu, wie in 3.1.6.1. beschrieben, mit den Plasmiden pTie2mNEP und pTie2mNEP-s mit PolyFect-Transfektionsreagenz transfiziert. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pcDNAmNEP verwendet, und als Negativkontrolle der Vektor pcDNA3.1(+). Nach 24 Stunden wurde die NEP-Aktivität mit der DALEK-Methode direkt in den Kavitäten der 24-well-Platte ermittelt (3.3.5.).

Gegenüber den Zellen, die mit pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren, konnte dabei keine signifikante Erhöhung der NEP Aktivität in den Zellen, die mit pTie2mNEP oder pTie2mNEP-s transfiziert wurden, gefunden werden (Abb. 43). Da die Plasmide endothelzellspezifische Aktivität besitzen sollten, deckte sich dieses Ergebnis mit den Erwartungen. Messungen mit Candoxatrilat zeigten bei Tie2mNEP-s transfizierten Zellen eine NEP-Aktivität, die nicht höher war, als in den mit pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass dies die endogene NEP-Aktivität ist. Mit pcDNAmNEP wurde, wie erwartet, erneut eine deutlich erhöhte NEP-Aktivität gemessen.

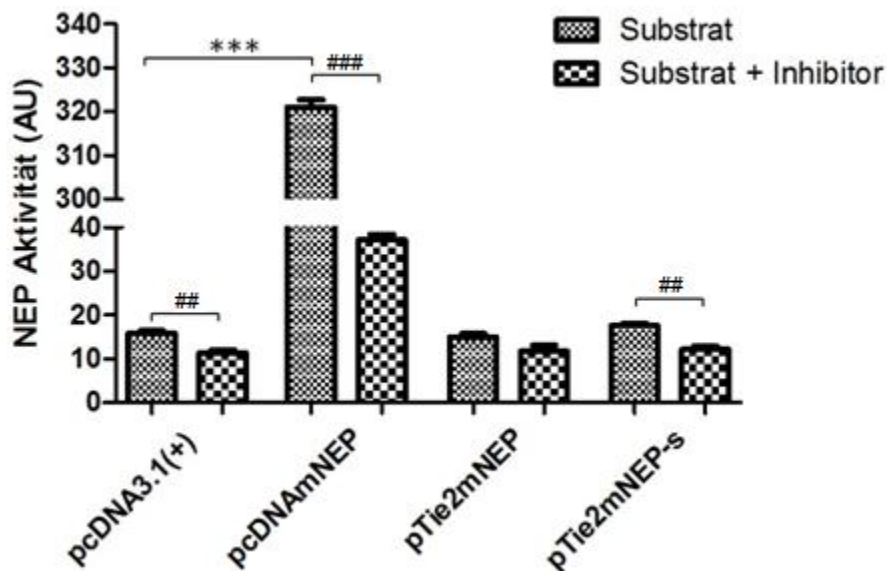
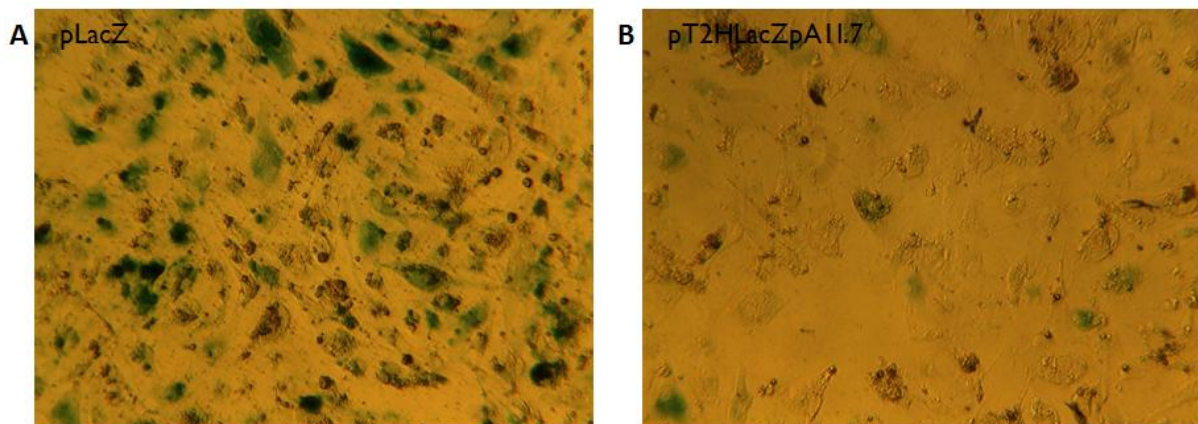


Abb. 43 NEP-Aktivität in COS7-Zellen nach Transfektion mit unterschiedlichen Plasmiden. Messung nach der DALEK-Methode mit und ohne Zugabe des NEP-Inhibitors Candoxatrilat

#### 4.2.2.6. Untersuchung der NEP-Aktivität der Plasmide in Endothelzellen

Bei der Messung der Aktivität der Tie2-Konstrukte in Endothelzellen ergaben sich anfänglich Schwierigkeiten, weshalb die Transfektionseffizienzen in den Zelllinien HDMEC, BAEC und PAEC mit den Konstrukten pLacZ und pT2HLacZpAII.7 validiert wurden. Beide Konstrukte exprimieren das Enzym  $\beta$ -Galactosidase; während sich das Enzym jedoch im Plasmid pLacZ unter der Kontrolle eines ubiquitär exprimierenden Promotors befindet, sollte es bei Verwendung von pT2HLacZpAII.7 in gleicher Art exprimiert werden, wie die neu erstellten Tie2-Konstrukte. In allen drei Zelllinien die mit dem Vektor pLacZ transfiziert wurden, ließen sich Transfektionsbedingungen finden, bei denen hinterher 75% der Zellen und mehr angefärbt werden konnten (3.1.8.). Mit dem endothelzellspezifischen Vektor pT2HLacZpAII.7 ließen sich jedoch die HDMEC-Zellen nach der Transfektion überhaupt nicht färben, und nur etwa 5% der BAEC-Zellen. Bei den PAEC-Zellen konnte die höchste Ausbeute erhalten werden, doch auch hier wurden nur etwa 25% der Zellen gefärbt, im Gegensatz zu ca. 75% gefärbter Zellen nach Transfektion mit pLacZ unter gleichen Transfektionsbedingungen (Abb. 44). Die Zelllinie PAEC wurde deshalb für die Verwendung in weiteren Versuchen ausgewählt, um die höchstmögliche Expression mit den Tie2-Konstrukten erzielen zu können.



**Abb. 44 Vergleich der Transfektionen von PAEC-Zellen mit dem universellen Konstrukt pLacZ (A) und dem endothelspezifischen Konstrukt pT2HLacZpAII.7 (B). Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit X-Gal angefärbt, um transfizierte Zellen zu identifizieren.**

Für die Untersuchung der endothelzellspezifischen Aktivität der Tie2-Konstrukte, wurden PAEC-Zellen auf 24-well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit Lipofectamine®2000 transfiziert (3.1.6.2.). Es wurden die Plasmide pTie2mNEP und pTie2mNEP-s verwendet, und zusätzlich die Negativkontrolle pcDNA3.1(+) und die Positivkontrolle pcDNAmNEP. Am nächsten Tag wurde die NEP-Aktivität mit der DALEK-Methode bestimmt (3.3.5.). Wie

erwartet führte die Transfektion mit pcDNAmNEP zu einer vielfachen Erhöhung der Aktivität, verglichen mit den Zellen, die mit pcDNA3.1(+) transfiziert wurden. Mit den beiden Plasmiden pTie2mNEP und pTie2mNEP-s konnten ebenfalls signifikant höhere Aktivitäten gemessen werden. Die Erhöhung war in beiden Konstrukten vergleichbar, betrug aber nur einen Bruchteil der Aktivität die in den pcDNAmNEP transfizierten Zellen gemessen werden konnte (Abb. 45). Mit Candoxatrilat wurde die erhöhte NEP-Aktivität in den Zellen, die mit pcDNAmNEP, pTie2mNEP oder pTie2mNEP-s transfiziert worden waren, gehemmt.

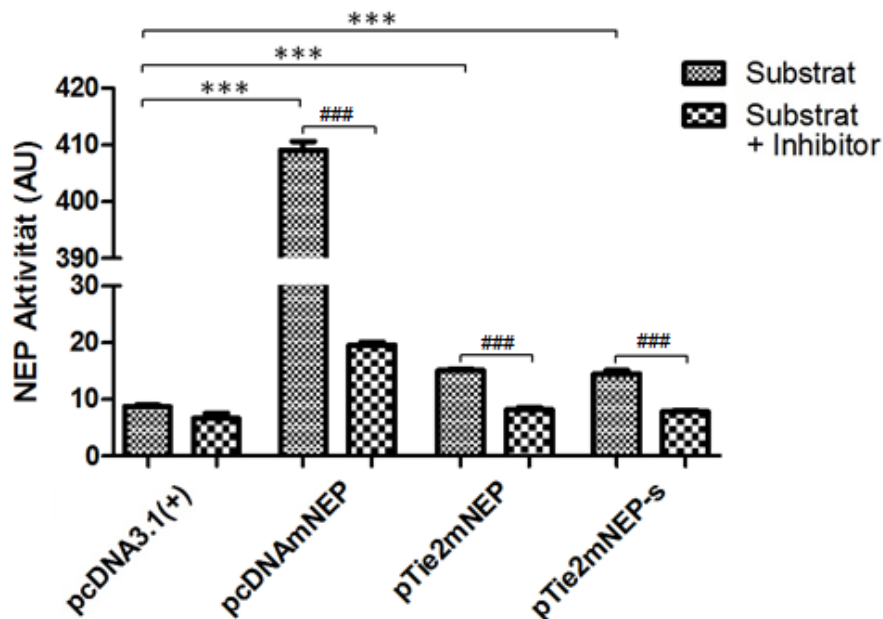


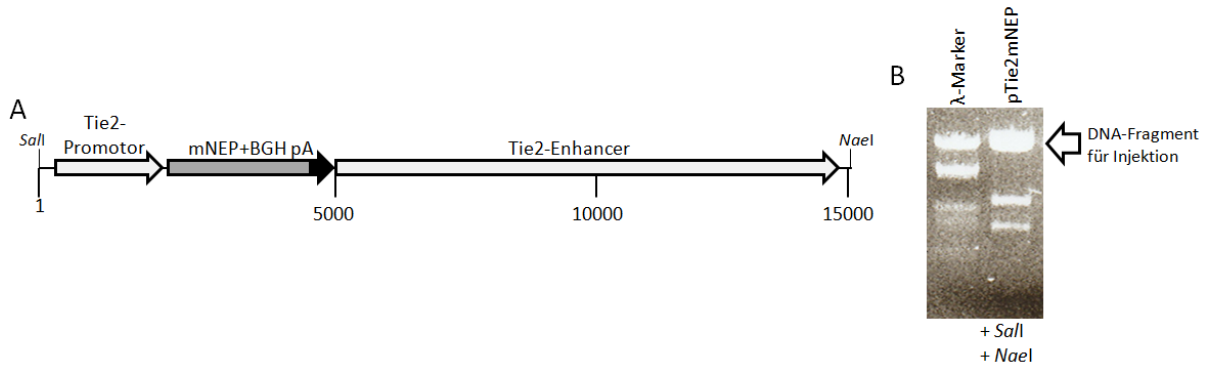
Abb. 45 NEP-Aktivität in PAEC-Zellen nach Transfektion mit den verschiedenen Plasmiden. Messung nach der DALEK-Methode mit und ohne Zugabe des NEP-Inhibitors Candoxatrilat

Im Zellkulturversuch konnte gezeigt werden, dass beide Tie2-Konstrukte spezifisch in der Endothelzelllinie PAEC die NEP-Aktivität erhöhen konnten, während in COS7-Zellen keine Änderung auftrat. Die in den PAEC-Zellen gemessene Aktivitätssteigerung ist vergleichsweise gering, jedoch zeigten die vorhergehenden Versuche zur Expression von  $\beta$ -Galactosidase, dass mit den Tie2-Konstrukten nur in einem kleinen Teil der Zellpopulation eine Expression erzielt werden kann. Nach den Ergebnissen waren somit beide Konstrukte geeignet, um sie für die Generierung der transgenen Tiere zu verwenden.

#### 4.2.2.7. Erstellung und Identifizierung transgener Tiere

Da Plasmide mit dem vollständigen Enhancer zu einer höheren Zellspezifität führen sollen als Plasmide mit dem verkürzten Fragment, wurde das Plasmid pTie2mNEP zur Gene-

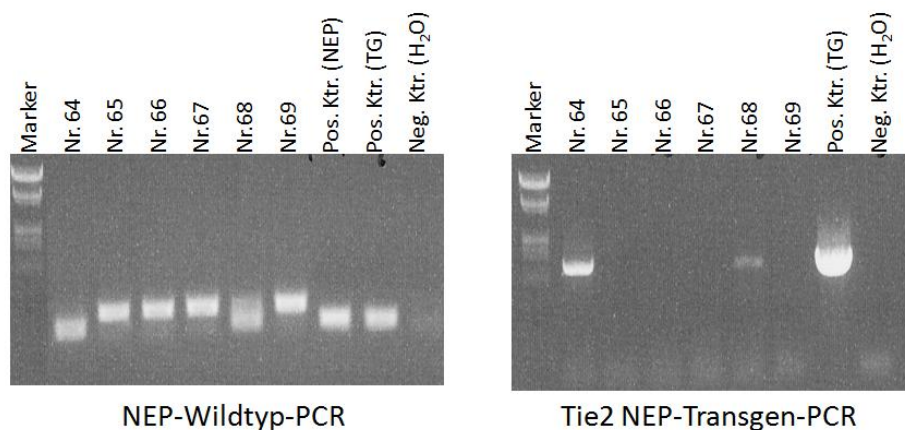
rierung der transgenen Tiere ausgewählt. Es wurden der Tie2-Promotor, die kodierende Sequenz für murines NEP gefolgt vom BGH-Terminator und dem kompletten Tie2-Enhancer mit den Enzymen *SalI* und *NaeI* ausgeschnitten, wie in Abb. 46 dargestellt. Die DNA wurde zur Generierung der Tiere an das MDC Berlin-Buch verschickt.



**Abb. 46 Schematische Darstellung der für die Injektion verwendeten DNA (A) und Verdau von pTie2mNEP mit den Enzymen *SalI* und *NaeI* (B). Das in A gezeigte Fragment ist mit einem Pfeil markiert (BGH: bovine Wachstumshormon; pA: Polyadenylierungssequenz).**

#### 4.2.2.8. Genotypisierung der Tiere

Die Ohrbiospien der generierten Tiere wurden bei uns aufgearbeitet (3.2.3.) und mittels PCR genotypisiert (3.2.5.). Auch für diese Tiere wurde als Primerpaar für die Transgen-PCR NEP125 und POBGH3 verwendet und eine zusätzliche NEP-Wildtyp PCR durchgeführt. Ein Beispiel der Ergebnisse ist in Abb. 47 gezeigt.



**Abb. 47 Beispiel der Genotypisierung mittels PCR (Neg. Ktr.: Negativkontrolle, Pos. Ktr.: Positivkontrolle, TG: transgen)**

Für diese Mauslinie konnten insgesamt nur vier transgene Tiere identifiziert werden. Es handelte sich dabei um jeweils zwei Männchen und zwei Weibchen. Eines der Weibchen verstarb bereits im Alter von etwa vier Wochen im Tierstall des MDC Berlin-Buch. Die anderen Tiere wurden so früh wie möglich verpaart. In einem Alter von ca. 15 Wochen verstarb eines der beiden Männchen, ohne das es Nachwuchs gezeugt hatte.

Die anderen beiden Tiere waren ebenfalls nicht in der Lage Nachwuchs zu zeugen, obwohl sie mehrmals mit neuen andersgeschlechtlichen wildtypischen Tieren zusammen gesetzt wurden. Das zweite Weibchen starb kurz nachdem es ein Alter von etwa einem Jahr erreicht hatte. Das letzte verbliebene Männchen erreichte bislang ein Alter von 1½ Jahren, hat jedoch in dieser Zeit keinen Nachwuchs zeugen können. Es wurden etwa alle 2 Monate die wildtypischen Weibchen, mit denen das transgene Tier zusammen saß, ausgewechselt.

Die bereits verstorbenen transgenen Tiere zeigten äußerlich keine Auffälligkeiten gegenüber wildtypischen Kontrolltieren. Sie wurden nicht näher Charakterisiert. Das noch lebende Männchen hat im hohen Alter einen starken adipösen Phänotypen, zeigt aber keine Verhaltensauffälligkeiten. Da nicht davon auszugehen ist, dass von diesem Tier noch Nachwuchs erhalten werden wird, ist davon auszugehen, dass die Mauslinie mit endothelialer Überexpression unter Kontrolle des Tie2-Promoters nicht gehalten werden kann.

### **4.3. Stimulation von NEP mit verschiedenen Substanzen in Zellkulturversuchen**

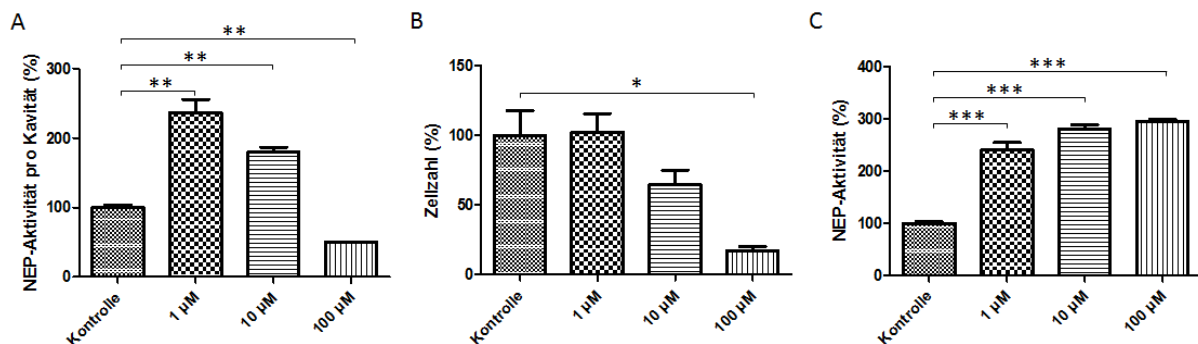
Der Hypothese folgend, dass eine erhöhte NEP-Aktivität in den peripheren Organen zu einer Verringerung des Körpergewichts führt, sollten im Rahmen dieser Arbeit Substanzen identifiziert werden, die zu einer solchen Erhöhung führen können. Dazu wurden zum einen Substanzen verwendet, die in der Literatur als aktivitätssteigernd beschrieben worden sind. Zum anderen wurden in einer Hochdurchsatzsuche mit der Substanzbibliothek des FMP Berlin weitere potentielle Substanzen ermittelt, und anschließend untersucht. Für die Validierung der Substanzen wurde jeweils eine neuronale und eine endotheliale Zelllinie genutzt. Die NEP-Aktivität wurde entweder sofort nach Zugabe der Substanzen, nach 24-stündiger Stimulation oder nach 96-stündiger Stimulation ermittelt. Außerdem wurde nach 24-stündiger Stimulation eine Echtzeit-PCR durchgeführt, um zu sehen, ob die Änderungen in der Aktivität auf Änderungen der mRNA-Expression beruhen, oder hiervon unabhängig sind. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Werte ausschließlich mit den jeweiligen Kontrollen mittels student's t-Test verglichen.

#### **4.3.1. Einfluss von GW0742 auf die NEP-Aktivität**

Von Kalinin wurde beschrieben, dass der PPAR $\delta$ -Agonist GW0742 im Tierversuch bei oraler Gabe im Futter, zu einer Verringerung von Amyloid-Plaques im Gehirn führte. Dies geht mit einer erhöhten NEP-mRNA-Expression im Hippocampus einher (Kalinin *et al.*, 2009). Es sollte untersucht werden, ob eine Stimulation von NEP im Zellkulturversuch an der neuronalen Zelllinie SK-N-SH reproduziert werden kann. Dazu wurden auf einer 24-well-Mikrotiterplatte je Kavität 100.000 Zellen ausgesät und mit GW0742 in den Konzentrationen 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M für 48 Std. stimuliert (3.1.9.2.). Die NEP-Aktivität wurde mit der DALEK-Methode ermittelt (3.3.5.1.) und zusätzlich wurde in weiteren Kavitäten die Anzahl der Zellen bestimmt.

Die NEP-Aktivität in den Kavitäten zeigte deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 48 A). Während bei einer GW0742-Konzentration von 1  $\mu$ M die Absorption mehr als doppelt so hoch war, fiel sie bei Erhöhung der Konzentration wieder ab, und war bei 100  $\mu$ M signifikant verringert. Bei der Quantifizierung der Zellen wurde deutlich, dass die Anzahl der Zellen mit steigender Konzentrationen von GW0742 deutlich abnimmt (Abb. 48 B). Die NEP-Aktivität unter Einbeziehung der Zellzahl zeigte, dass GW0742 zu einer außerordentlich starken Erhöhung der Aktivität führte. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M war

die NEP-Aktivität bereits 2,5 mal höher, als in den Kontrollzellen. Durch weitere Steigerung der Konzentration konnte die NEP-Aktivität allerdings nur noch leicht weiter erhöht werden (Abb. 48 C).



**Abb. 48 Einfluss von GW0742 nach 48-stündiger Stimulation von SK-N-SH-Zellen auf die gemessene NEP-Aktivität pro Kavität (A), die Zellzahl (B) und die NEP-Aktivität pro Zelle (C). Die in den Kontrollen erhaltenen Werte wurden auf 100% normiert.**

#### **4.3.2. Einfluss von Grünem Tee-Extrakt und Fraktionen des Grünen Tee- Extrakts auf die NEP-Aktivität**

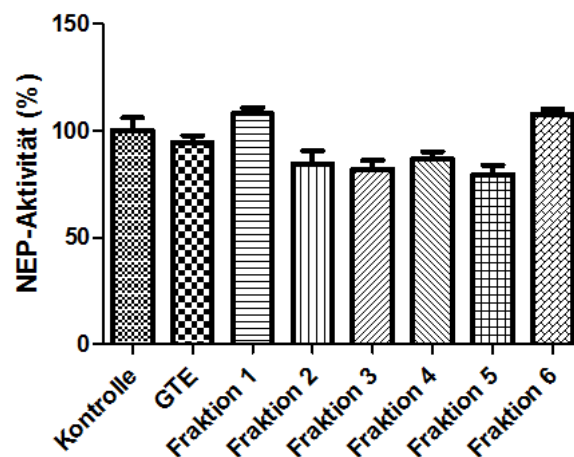
Bezug nehmend auf die *in-vitro*-Befunde von Melzig, der zeigte, dass in der neuronalen Zelllinie SK-N-SH durch Grünen Tee-Extrakt die Aktivität von NEP gesteigert werden konnte (Melzig und Janka, 2003), sollte die NEP-stimulierende Wirkung des Grünen Tees genauer untersucht werden. Dazu wurde Grüner Tee-Extrakt (GTE) EFLA942 von Frutarom verwendet. Außerdem wurde der Extrakt in einer Kooperation mit Dr. Fraser Courts (University Hull, England) mit einer quantitativen HPLC fraktioniert. Es wurden sechs Fraktionen gewonnen, die jeweils auch zur Stimulation verwendet wurden. Die Identität der einzelnen Substanzen wurde bislang noch nicht aufgeklärt, weshalb sie in den Versuchen nicht in gleichen Molaritäten eingesetzt werden konnten, sondern nur in gleicher Massenkonzentration.

##### **4.3.2.1. Stimulation von SK-N-SH-Zellen**

Als erstes wurde untersucht, ob der GTE oder die aus ihm gewonnenen Fraktionen durch eine direkte Beeinflussung des Enzyms, zu einer Erhöhung der NEP-Aktivität führen können. Es wurden jeweils 200.000 Zellen pro Ansatz verwendet, wie unter 3.1.9.1 beschrieben. Die Zellen wurden mit GTE oder einzelnen der sechs daraus erhaltenen Fraktionen stimuliert.

Fraktionen und GTE wurden in DMSO gelöst und anschließend mit Wasser verdünnt. Die zur Kontrolle verwendeten Zellen wurden mit der gleichen Menge verdünntem DMSO behandelt.

Bei der Messung der NEP-Aktivität zeigte sich, dass bei den SK-N-SH-Zellen weder durch die Behandlung mit GTE, noch durch eine der einzelnen Fraktionen eine Erhöhung erzielt werden konnte (Abb. 49). Dies deutet darauf hin, dass der in der Literatur beschriebene Effekt nicht durch eine direkte Beeinflussung (z.B. allosterisch) von NEP zurückgeführt werden kann.



**Abb. 49 Akuter Einfluss von GTE und den daraus erhaltenen Fraktionen auf die NEP-Aktivität der neuronalen Zelllinie SK-N-SH.**

Die Zellen sollten nun für einen längeren Zeitraum inkubiert werden, um herauszufinden, ob und ab wann eine erhöhte NEP-Aktivität gemessen werden kann. Die Stimulationsexperimente wurden auf 24-well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden 100.000 Zellen pro Kavität ausgesät, und über Nacht im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium gewechselt und die Stimulantien zugegeben (3.1.9.2.). Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und die NEP-Aktivität direkt in den Kavitäten mit der DALEK-Methode ermittelt (3.1.5.). Da ein Einfluss von GTE auf die Zellproliferation beschrieben wurde, wurde außerdem in separaten Kavitäten die Anzahl der Zellen ermittelt (3.1.5.).

Dabei zeigte sich, dass nur bei den Zellen, die mit GTE und mit Fraktion 3 behandelt wurden, keine Änderung der NEP-Aktivität auftrat (Abb. 50 A). Allerdings wurde das Wachstum der Zellen sowohl durch GTE, als auch durch die meisten der Fraktionen, mit Ausnahme von Fraktion 4 und Fraktion 6 deutlich beeinflusst (Abb. 50 B). Dabei führte Fraktion 5 zu einer ca. 75%igen Erhöhung des Zellwachstums, alle anderen Substanzen verringerten das Wachstum um ca. 30%. Wurde die veränderte Anzahl der Zellen berücksichtigt, um die



NEP-Aktivität der Zellen zu erhalten, so zeigte sich eine deutliche Erhöhung der NEP-Aktivität bereits nach einer 24-stündigen Stimulation mit GTE (Abb. 50 C). Fraktion 4 erhöhte ebenfalls die NEP-Aktivität der Zellen, allerdings war diese Erhöhung weniger stark ausgeprägt als die GTE-induzierte Erhöhung. Fraktion 5 führte hingegen zu einer starken Verringerung der NEP-Aktivität.

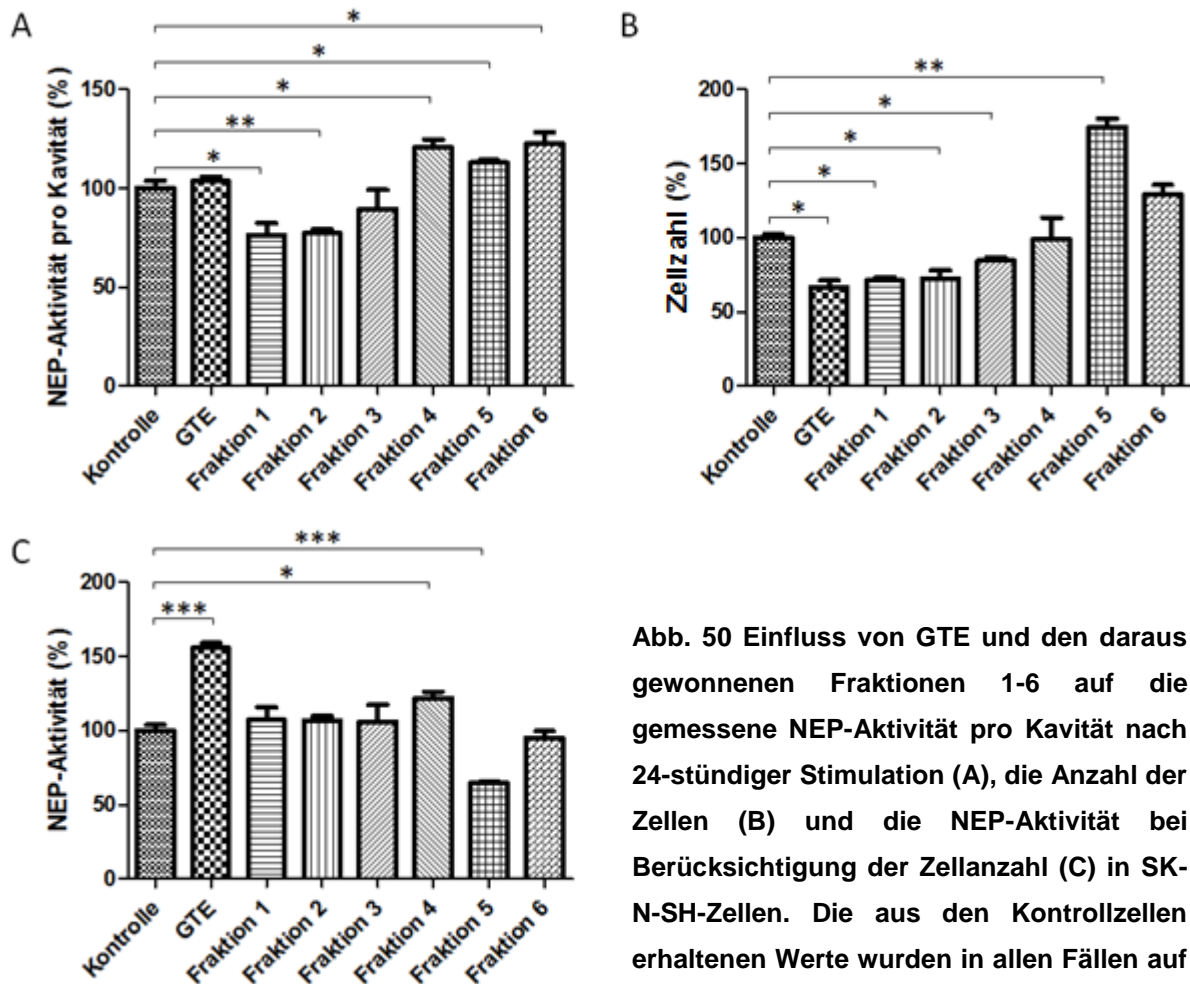
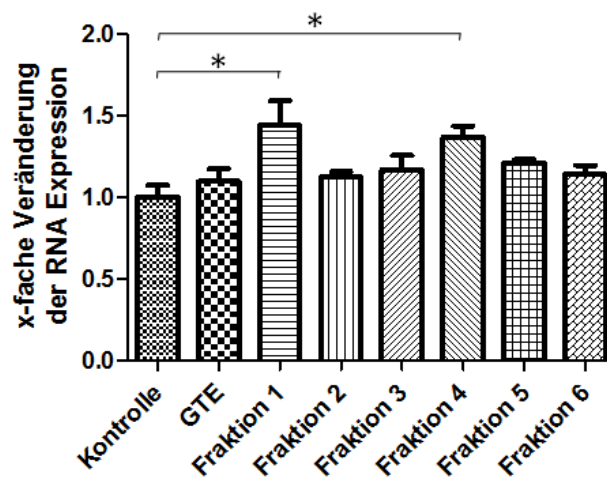


Abb. 50 Einfluss von GTE und den daraus gewonnenen Fraktionen 1-6 auf die gemessene NEP-Aktivität pro Kavität nach 24-stündiger Stimulation (A), die Anzahl der Zellen (B) und die NEP-Aktivität bei Berücksichtigung der Zellanzahl (C) in SK-N-SH-Zellen. Die aus den Kontrollzellen erhaltenen Werte wurden in allen Fällen auf 100% normiert.

Um zu untersuchen, ob sich die Veränderungen der NEP-Aktivität auf veränderte RNA-Expression zurückführen lassen, sollte die Expression mit einer Echtzeit-PCR bestimmt werden. Es wurden SK-N-SH Zellen kultiviert und mit GTE und den erhaltenen Fraktionen aus dem Extrakt stimuliert (siehe 3.1.9.3.). In einem parallelen Ansatz zur Aktivitätsbestimmung, wurden nach 24 Stunden die RNA der Zellen isoliert, wie in 3.2.6. beschrieben. Es wurde eine PCR für NEP durchgeführt, eine zweite PCR wurde für das nicht-regulierte Gen GAPDH durchgeführt, um die Messwerte zu normieren.

Dabei zeigte sich, dass durch Stimulation mit 10 µg/mL GTE keine signifikante Änderung der RNA-Expression auftritt. Eine erhöhte Expression von ca. 30% konnte durch Stimulation mit Fraktion 4 erreicht werden. Durch Stimulation mit Fraktion 1 konnte eine signifikant erhöhte Expression von ca. 45% erzielt werden. Mit den anderen Fraktionen wurden keine signifikanten Veränderungen gemessen (Abb. 51). Die Erhöhung der NEP-Aktivität nach 24-stündiger Stimulation mit GTE ist somit nicht auf eine höhere NEP-Expression zurückzuführen. Behandlung der Zellen mit Fraktion 4, erhöhte jedoch sowohl die NEP-Expression, als auch die NEP-Aktivität.



**Abb. 51 RNA-Expression von SK-N-SH-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit GTE und den daraus erhaltenen Fraktionen im Vergleich zu Kontrollzellen.**

Um zu sehen, ob die Erhöhung der NEP-Aktivität bei einer längeren Behandlung noch weiter zunimmt, auf gleich hohem Niveau bleibt, oder durch eventuelle Gegenregulation wieder abnimmt, wurden die Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen mit GTE oder den Fraktionen des Extraktes behandelt. Das Wachstumsmedium der Zellen wurde jeden Tag gegen frisches Medium ausgetauscht und die Stimulanzien erneut zugegeben (3.1.9.2.). Nach 96 Stunden wurde die NEP-Aktivität gemessen.

Nach der 4-tägigen Stimulation der SK-N-SH-Zellen wurde in den Kavitäten für keine der Gruppen eine erhöhte NEP-Aktivität gemessen, für die Fraktionen 3 bis 6 waren die gemessenen Werte jedoch signifikant verringert (Abb. 52 A). Die Betrachtung der Zellzahl zeigte geringere Unterschiede, als es nach 24-stündiger Stimulation der Fall gewesen war (Abb. 52 B). Nur die mit Fraktion 1 stimulierten Zellen zeigten eine leicht verringerte Proliferation. In den Zellen die mit Fraktion 6 stimuliert worden waren, zeigte sich hingegen eine deutlich erhöhte Proliferation. Bei den Fraktionen 2 und 3, sowie bei den Zellen die mit GTE stimuliert worden waren, traten hohe Schwankungen in der Zellzahl auf. Die um den

Faktor der Proliferation bereinigte NEP-Aktivität, zeigte auch nach 4-tägiger Stimulation mit GTE eine Erhöhung. Diese war jedoch geringer, als nach 24-stündiger Stimulation (Abb. 50). In den Zellen, die mit den Fraktionen 2, 3, 5, oder 6 stimuliert worden waren, zeigte sich eine Verringerung der Aktivitäten. Keine der einzelnen Fraktionen führte zu einer Erhöhung der NEP-Aktivität (Abb. 52 C).

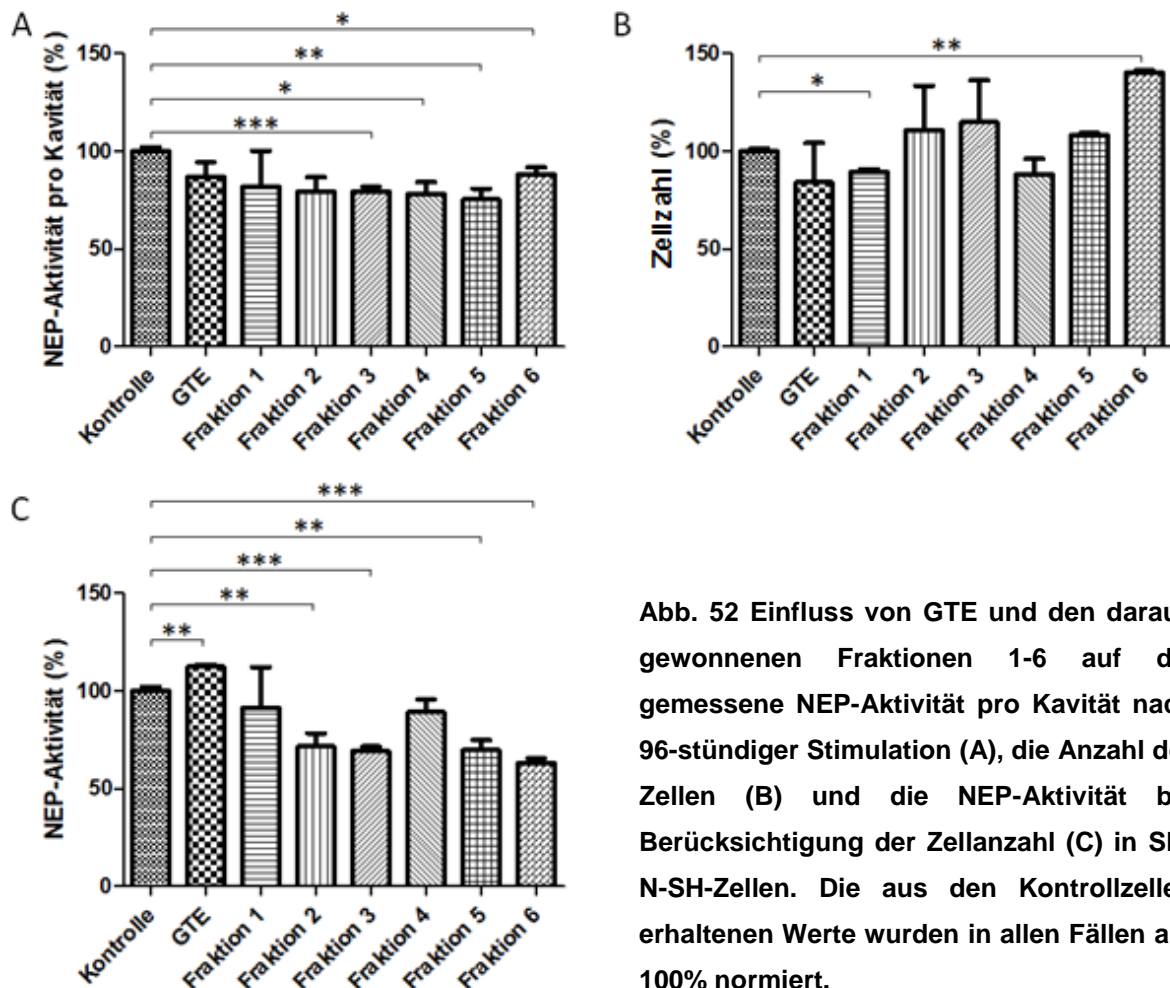
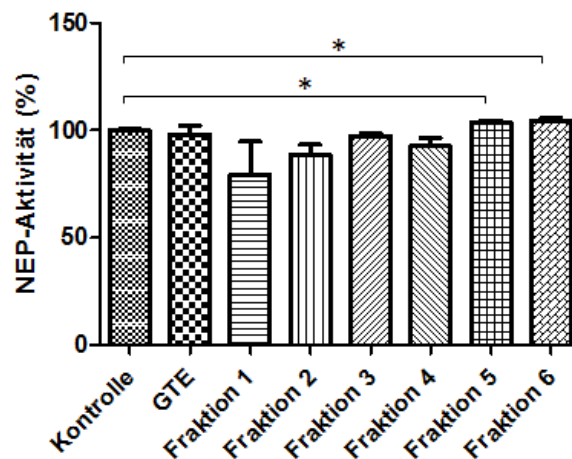


Abb. 52 Einfluss von GTE und den daraus gewonnenen Fraktionen 1-6 auf die gemessene NEP-Aktivität pro Kavität nach 96-stündiger Stimulation (A), die Anzahl der Zellen (B) und die NEP-Aktivität bei Berücksichtigung der Zellanzahl (C) in SK-N-SH-Zellen. Die aus den Kontrollzellen erhaltenen Werte wurden in allen Fällen auf 100% normiert.

#### 4.3.2.2. Stimulation von Endothelzellen

Da für NEP verschiedene RNA-Isoformen bekannt sind, deren Promotorregionen gewebespezifisch unterschiedlich reguliert werden können, sollte der Einfluss der von GTE und den daraus gewonnenen Fraktionen weiter untersucht werden. Nachdem die Erhöhung der NEP-Aktivität durch GTE in neuronalen SK-N-SH-Zellen bestätigt werden konnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob in Endothelzellen ebenfalls eine Erhöhung erzielt werden kann. Als erstes wurde dafür die humane Zelllinie HDMEC

untersucht. Auch für diese Zelllinie wurde als erstes die akute Stimulation der Zellen mit GTE und den daraus erhaltenen Fraktionen untersucht, wie zuvor beschrieben (3.1.9.1.) Während auch in dieser Zelllinie keine akute Veränderung der NEP-Aktivität durch die Stimulation mit GTE gemessen werden konnte, führten die Fraktionen 5 und 6 zu einer signifikanten Erhöhungen der Aktivität, im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen. Sie betrug in beiden Fällen allerdings nur etwa 5% (Abb. 53).



**Abb. 53 Akuter Einfluss von GTE und den daraus erhaltenen Fraktionen auf HDMEC-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen.**

Ebenso wie bei der neuronalen Zelllinie wurde auch bei den HDMEC als nächstes die NEP-Aktivität der Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit GTE bzw. den daraus erhaltenen Fraktionen untersucht. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen, wie sie auch bei den SK-N-SH-Zellen verwendet wurden (3.1.9.2.; 4.3.1.1.)

Die Auswertung der Daten zeigte für die HDMEC ein völlig anderes Ergebnis, als es in den SK-N-SH-Zellen gefunden wurde. Die gemessenen NEP-Aktivitäten waren in den mit Fraktion 2, 4, 5 und 6 behandelten Zellen signifikant niedriger als in den Kontrollzellen (Abb. 54 A). Die mit Fraktion 3 behandelten Zellen, zeigten als einzige Gruppe eine signifikante Veränderung der Zellzahl, die im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht war (Abb. 54 B). Die um den Faktor der Zellzahl bereinigte NEP-Aktivität der Zellen war sowohl durch GTE, als auch durch alle Fraktionen, mit Ausnahme der Zellen, die mit Fraktion 1 behandelt wurden, deutlich reduziert (Abb. 54 C). Während durch GTE die Aktivität um ca. 25% reduziert wurde, verminderten die einzelnen Fraktionen sogar die NEP-Aktivität noch weiter. Die stärkste Reduktion von ca. 50% trat nach der Behandlung mit Fraktion 2 auf.

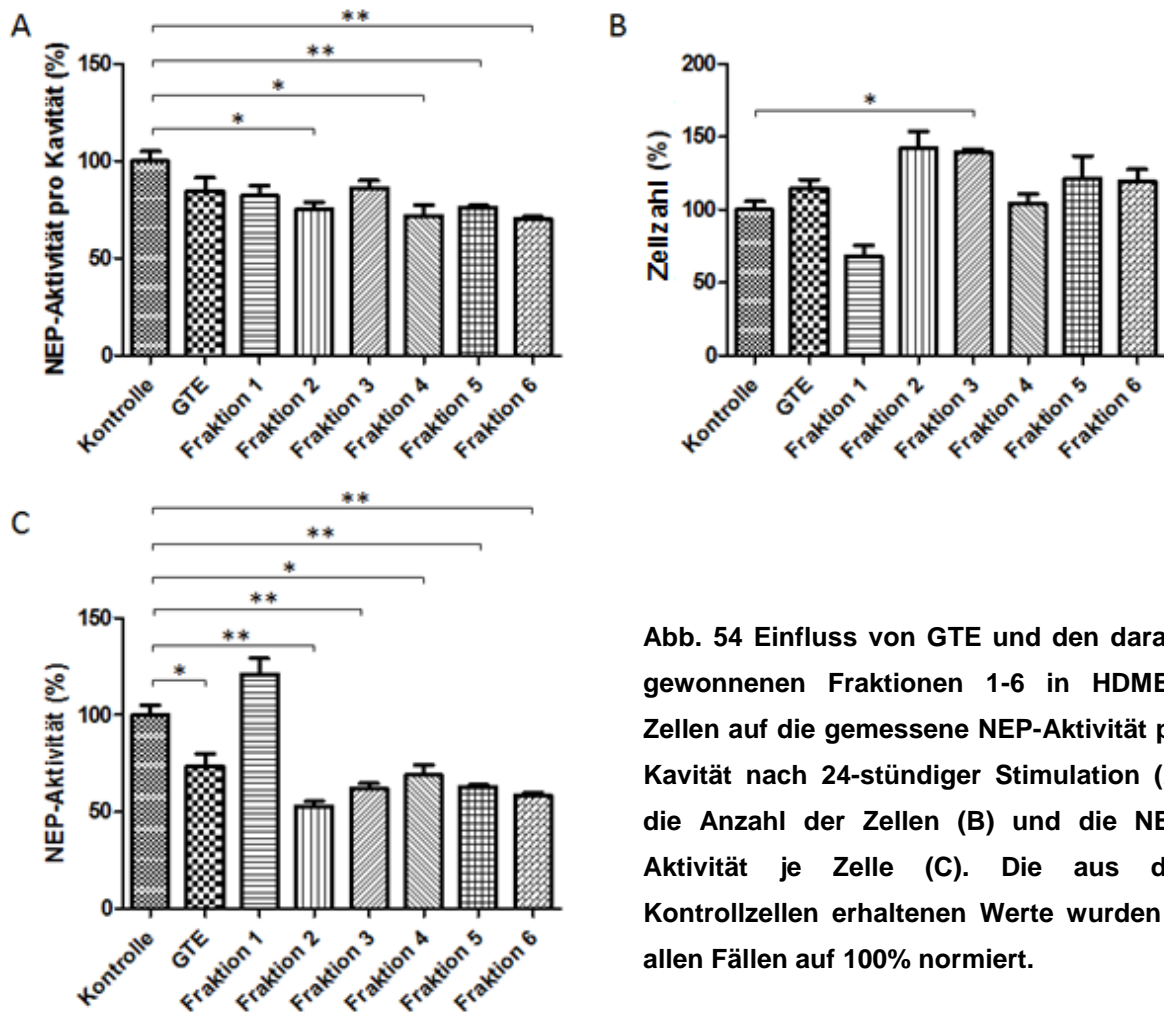
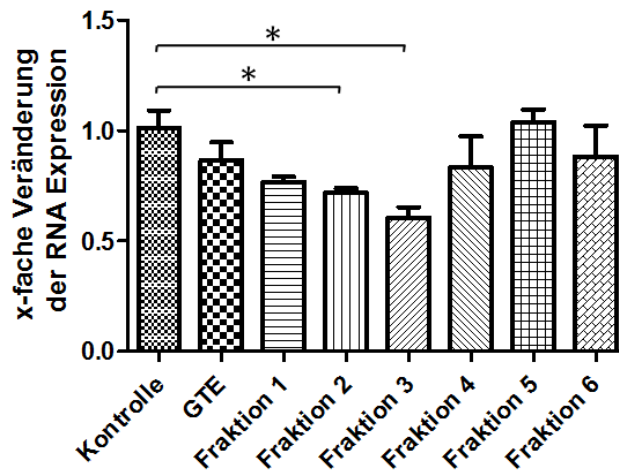


Abb. 54 Einfluss von GTE und den daraus gewonnenen Fraktionen 1-6 in HDMEC-Zellen auf die gemessene NEP-Aktivität pro Kavität nach 24-stündiger Stimulation (A), die Anzahl der Zellen (B) und die NEP-Aktivität je Zelle (C). Die aus den Kontrollzellen erhaltenen Werte wurden in allen Fällen auf 100% normiert.

Für NEP sind unterschiedliche Promotoren bekannt, die das Enzym in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich regulieren. Es sollte dementsprechend untersucht werden, ob die NEP-mRNA-Expression in dieser Zelllinie anders als in den SK-N-SH-Zellen reguliert wird. Die Versuche wurden erneut in parallelen Ansätzen zu den Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. Aus den Zellen wurde nach 24-stündiger Stimulation (3.1.9.3.) die RNA isoliert (3.2.6.) und eine qRT-PCR durchgeführt (3.2.7.). Erneut wurde GAPDH als Haushaltsgen verwendet.

Dabei stellte sich heraus, dass nach einer 24-stündigen Stimulation, die mit Fraktion 2 und 3 behandelten Zellen eine verringerte NEP-Expression aufwiesen als die Kontrollzellen (Abb. 55). Die Zellen die mit einer anderen Fraktion, oder mit GTE behandelt wurden, zeigen hingegen keine Veränderung. In keinem Fall wurde eine Erhöhung der NEP-mRNA-Expression erzielt.

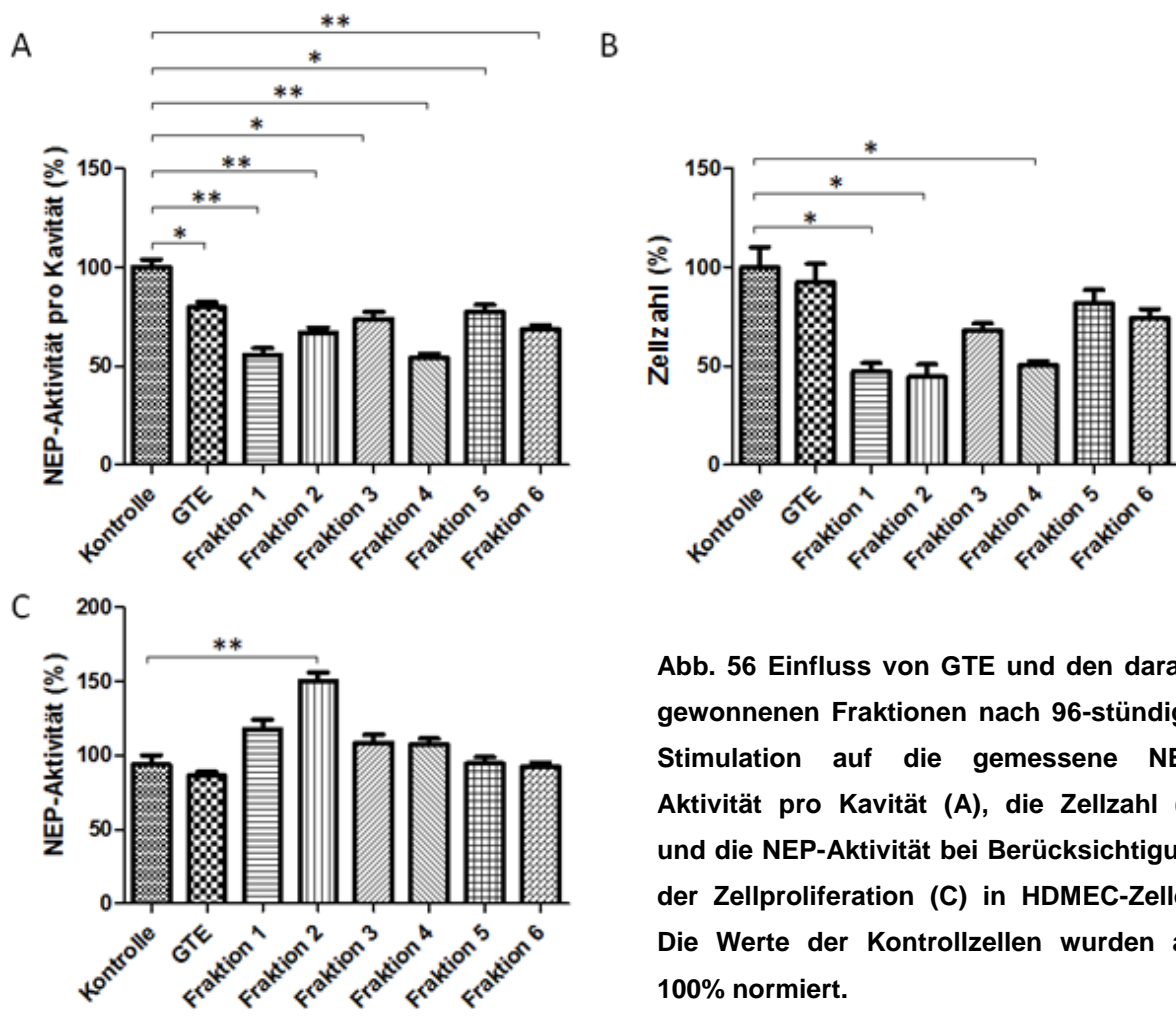


**Abb. 55 RNA-Expression von HDMEC-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit GTE und den daraus erhaltenen Fraktionen im Vergleich zu den Kontrollzellen.**

Auch für die HDMEC sollte die Entwicklung der NEP-Aktivität über einen längeren Zeitraum weiter verfolgt werden. Die Zellen wurden deshalb unter den gleichen Versuchsbedingungen wie die SK-N-SH-Zellen für insgesamt vier Tage stimuliert, bevor die NEP-Aktivität ermittelt wurde (3.1.9.2.; 4.3.1.1.).

Bei den Messungen wurde mit der DALEK-Methode auf den Zellen aller Behandlungsgruppen eine geringere NEP-Aktivität gemessen als in den Kontrollzellen (Abb. 56 A). Die Auswertung der Zellproliferation zeigte, dass in den Kavitäten, die für 96 Stunden mit einer der Fraktion 1, 2 oder 4 behandelt wurden, eine geringere Anzahl an Zellen gezählt wurde (Abb. 56 B). Unter Berücksichtigung des Zellwachstums war die NEP-Aktivität nur noch bei den Zellen verändert, die mit Fraktion 2 stimuliert worden waren (Abb. 56 C). Überraschenderweise zeigte sich dabei nach 96-stündiger Behandlung eine erhöhte NEP-Aktivität. Dies überrascht insbesondere, weil diese Fraktion nach 24-stündiger Behandlung noch die stärkste Verringerung der NEP-Aktivität aufwies, und auch die NEP-Expression nach 24 Stunden von dieser Fraktion verringert gewesen ist.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass das Verhalten in den beiden betrachteten Zelllinien sehr unterschiedlich ist. Die Erhöhung der NEP-Aktivität durch GTE in den neuronalen SK-N-SH-Zellen konnte in den endothelialen HDMEC nicht reproduziert werden. Während in den SK-N-SH-Zellen erst durch eine länger andauernde Stimulation mit den Fraktionen, die NEP-Aktivität durch die meisten Fraktionen reduziert wurde, führte bei den HDMEC bereits eine 24-stündige Stimulation zu stark reduzierten NEP-Aktivitäten. Durch eine Verlängerung des Zeitraumes der Stimulation ging diese Reduktion wieder zurück und nach 96 Stunden zeigten die meisten Fraktionen keine Veränderung mehr zu den Kontrollzellen, während Fraktion 2 sogar eine erhöhte Aktivität zeigte.



**Abb. 56 Einfluss von GTE und den daraus gewonnenen Fraktionen nach 96-stündiger Stimulation auf die gemessene NEP-Aktivität pro Kavität (A), die Zellzahl (B) und die NEP-Aktivität bei Berücksichtigung der Zellproliferation (C) in HDMEC-Zellen. Die Werte der Kontrollzellen wurden auf 100% normiert.**

Eine zweite endotheliale Zelllinie sollte untersucht werden, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der HDMEC-Zellen stellvertretend für beide Endothelzelllinien stehen können. Es wurde dafür die bovine Zelllinie BAEC gewählt. Da in den beiden bislang betrachteten Zelllinien die stärksten Veränderung durch die Stimulation mit GTE nach 24 Stunden gefunden wurde, wurden auch die BAEC-Zellen für 24 Stunden mit GTE bzw. den daraus erhaltenen Fraktionen stimuliert, wie zuvor beschrieben (3.1.9.2).

In den BAEC-Zellen war die direkt auf den Zellen gemessene, unbereinigte NEP-Aktivität in den mit Kavitäten, die für 24 Stunden mit den Fraktionen 3 und 4 behandelt wurden, nicht verändert. Fraktionen 1 und 2 führten zu einer verringerten, GTE und die Fraktionen 5 und 6 zu einer erhöhten NEP-Aktivität (Abb. 57 A). Die Zellproliferation der BAEC war durch keines der Stimulantien signifikant verändert worden (Abb. 57 B). Die um das Zellwachstum korrigierte NEP-Aktivität zeigte dementsprechend eine Erhöhung der NEP-Aktivität durch Stimulation mit GTE, als auch mit den Fraktionen 1, 4 und 6, und insbesondere mit der

Fraktion 5. Fraktion 2 führte zu einer sehr geringen, aber signifikanten, Reduktion der NEP-Aktivität, und nur die mit Fraktion 3 behandelten Zellen zeigten keine Veränderung im Vergleich mit den Kontrollzellen (Abb. 57 C).

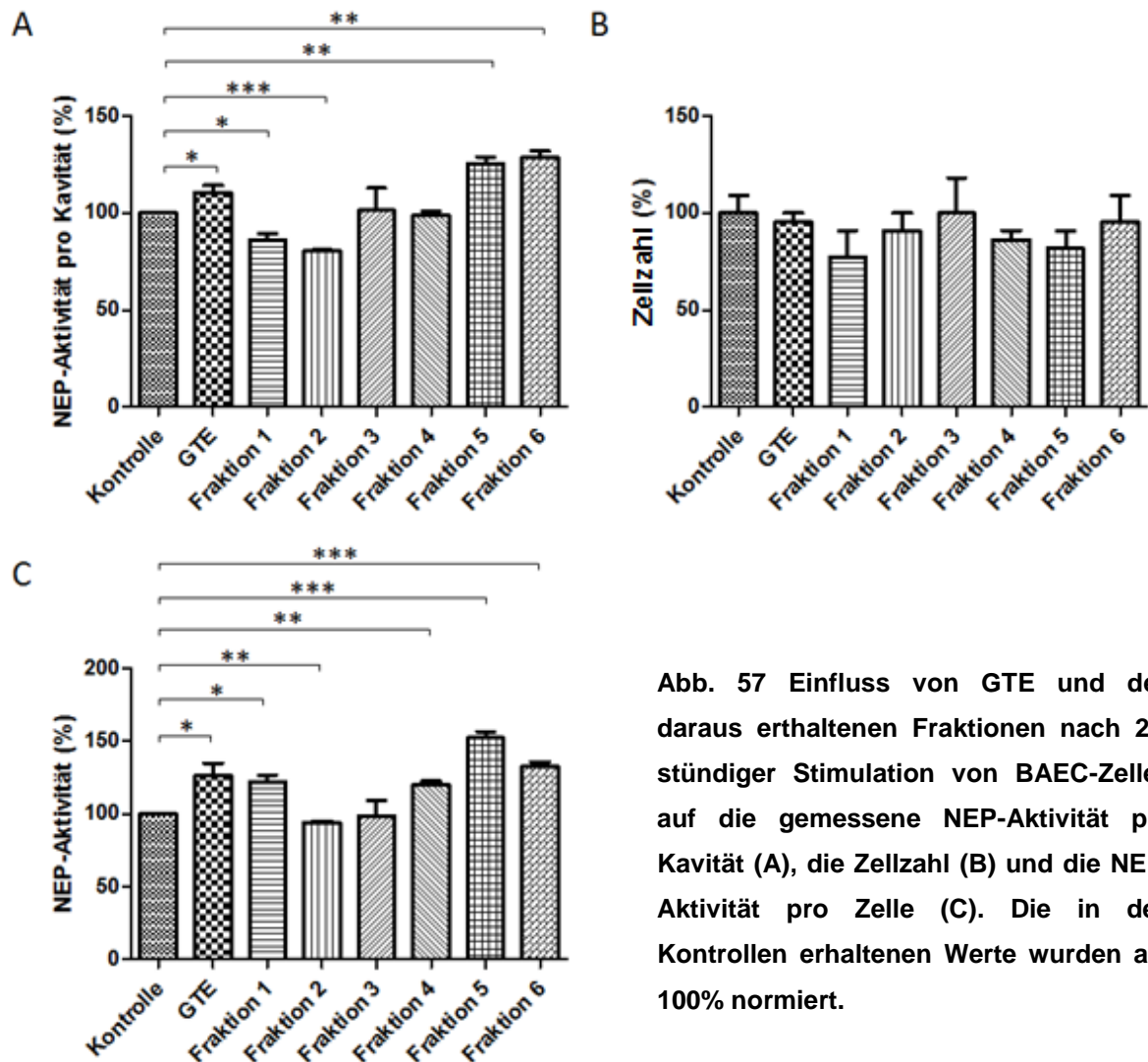


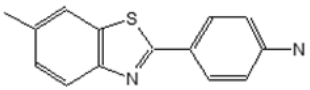
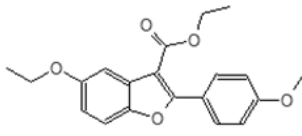
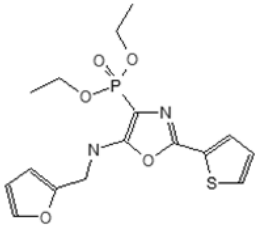
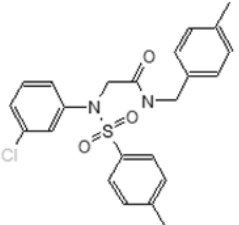
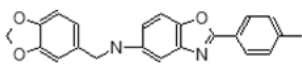
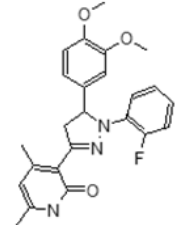
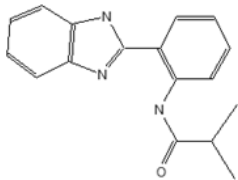
Abb. 57 Einfluss von GTE und den daraus erhaltenen Fraktionen nach 24-stündiger Stimulation von BAEC-Zellen auf die gemessene NEP-Aktivität pro Kavität (A), die Zellzahl (B) und die NEP-Aktivität pro Zelle (C). Die in den Kontrollen erhaltenen Werte wurden auf 100% normiert.

In allen drei Zelllinien unterschieden sich die erhaltenen Ergebnisse zum Teil sehr deutlich, voneinander. Die Ergebnisse in den BAEC-Zellen zeigten, dass auch in endothelialen Zellen eine Erhöhung der NEP-Aktivität möglich ist. Die bisherigen Untersuchungen der NEP-mRNA zeigten, dass die erhöhte Aktivität in den überwiegenden Fällen nicht auf direkte Änderungen der Regulation der NEP-Expression zurückgeführt werden kann.



### 4.3.3. Hochdurchsatz-Suche zur Identifizierung NEP stimulieren-der Substanzen

Ein weiterer Ansatz um potentielle NEP-Aktivatoren zu identifizieren, wurde in sehr enger Zusammenarbeit mit Dr. Wolf Siems vom FMP Berlin durchgeführt. Dort wurde, basierend auf dem gequenchten NEP-Substrat N-Dansyl-D-Ala-Gly-p-Nitro-Phe-Gly (Florentin *et al.*, 1984), ein automatisierter NEP-Assay etabliert. Der Test wurde optimiert um in 384-well-Mikrotiterplatten durchgeführt werden zu können und sich somit für eine Hochdurchsatz-Suche (engl.: *highthroughput screening*, HTS) eignete. Als Substanzpool diente die Substanzbibliothek des FMP, die 19.839 Substanzen enthielt.

<p>Substanz 1</p>  <p>4-(6-Methyl-1,3-benzothiazol-2-yl)phenylamin</p>	<p>Substanz 2</p>  <p>Ethyl 5-ethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-1-benzofuran-3-carboxylat</p>	<p>Substanz 3</p>  <p>Diethyl 5-[(2-furylmethyl)amino]-2-(2-thienyl)-1,3-oxazol-4-ylphosphonat</p>
<p>Substanz 4</p>  <p>2-[3-chloro[4-methylphenyl]sulfonyl]anilino-N-(4-methylbenzyl)acetamid</p>	<p>Substanz 5</p>  <p>N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-2-(4-methylphenyl)-1,3-benzoxazol-5-amin</p>	<p>Substanz 6</p>  <p>3-[5-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(2-fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrozol-3-yl]-4,6-dimethyl-2(1H)-pyridinon</p>
<p>Substanz 7</p>  <p>N-[2-(1H-benzimidazol-2-yl)phenyl]-2-methylpropanamid</p>		

**Abb. 58** In HTS Ansätzen identifizierte Substanzen mit potentiell NEP-aktivierender Wirkung

Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Im ersten Versuch, wurde die NEP-Aktivität durch Stimulation von lebenden SK-N-SH Zellen untersucht. Die in diesem Ansatz identifizierten Substanzen sollten die Regulation von NEP auf Gen- und Proteinebene beeinflussen. Im zweiten Ansatz wurden Nierenmembranen eingesetzt, um Veränderungen der NEP-Aktivität über allosterische Effekte effizienter suchen zu können. Insgesamt wurden

dabei 21 Substanzen gefunden, die die Aktivität des Enzyms um mindestens 30% erhöht haben. Von diesen Substanzen wurden die sieben Substanzen, die im HTS zur stärksten NEP-Aktivitätserhöhung geführt haben (siehe Abb. 58), zur weiteren Evaluierung bestellt und in Zellkulturversuchen evaluiert. Die Substanzen werden im Folgenden als Substanz 1, 2, 3,... bis 7 bezeichnet, wie in der Abb. 58 zugeordnet. Die Substanzen 1 bis 3 wurden aus der Suche mit Nierenmembranen erhalten, die Substanzen 4 bis 7 sind die effektivsten Kandidaten aus der Suche auf den lebenden SK-N-SH-Zellen.

#### 4.3.3.1. Stimulation von SK-N-SH-Zellen

Die Versuche zur Stimulation mit den Substanzen aus dem HTS wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie im Kapitel zur Stimulation mit Grünem Tee-Extrakt und den daraus gewonnenen Fraktionen beschrieben (4.3.1.). Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt. Es wurde ebenfalls als erstes eine mögliche akute Stimulation der NEP-Aktivität in SK-N-SH-Zellen nach den in 3.1.9.1. beschriebenen Bedingungen untersucht.

Dabei zeigte sich, dass einzig Substanz 1 zu einer signifikanten Veränderung der NEP-Aktivität führte (Abb. 59). Die Substanzen 1 bis 3 wurden über den HTS-Ansatz mit Nierenmembranen identifiziert, und sind somit Substanzen, die in der Lage sein könnten NEP posttranslational zu verändern und darüber die Aktivität zu erhöhen. Die Erhöhung der NEP-Aktivität um ca. 25% durch Substanz 1 deckt sich mit dem Ergebnis des HTS, wohingegen die Ergebnisse für die Substanzen 2 und 3 nicht reproduziert werden konnten.

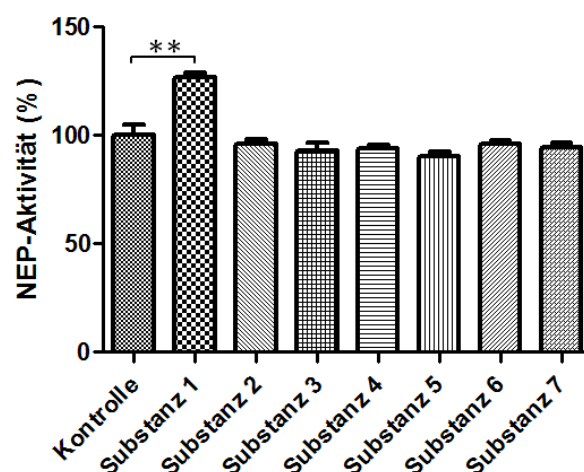


Abb. 59 Akuter Einfluss der sieben im HTS identifizierten Substanzen auf die NEP-Aktivität in SK-N-SH-Zellen.

In einem weiteren Ansatz, wurden die SK-N-SH-Zellen für 24 Stunden mit den jeweiligen Substanzen in 24-well-Mikrotiterplatten inkubiert (3.1.9.2.). Anschließend wurde der Test zu NEP-Aktivitätsbestimmung direkt in den Kavitäten durchgeführt (3.3.5.). Parallel dazu wurde in weitem Kavitäten die Zellzahl nach 24-stündiger Stimulation ermittelt.

Die gemessene NEP-Aktivität der Kavitäten war durch die Stimulation mit jeder der getesteten Substanzen signifikant höher, als die der Kontrollen (Abb. 60 A). Bei der Ermittlung der Zellzahl zeigten die Substanzen 4, 5 und 6 keine Veränderung. Die Zellzahl nach Stimulation mit den Substanzen 1, 2, 3 und 7 hingegen war stark erhöht. Es trat in etwa eine Verdoppelung der Zellzahl auf (Abb. 60 B). Dadurch betrug nach Einbeziehung der Zellzahl zur Ermittlung der NEP-Aktivität der Zellen die mit den Substanzen 1, 2, 3 und 7 stimuliert worden waren, nur noch ca. 50% der Aktivität der Kontrollansätze. In den mit Substanz 4 stimulierten Zellen war die NEP-Aktivität um ca. 50% erhöht (Abb. 60 C).

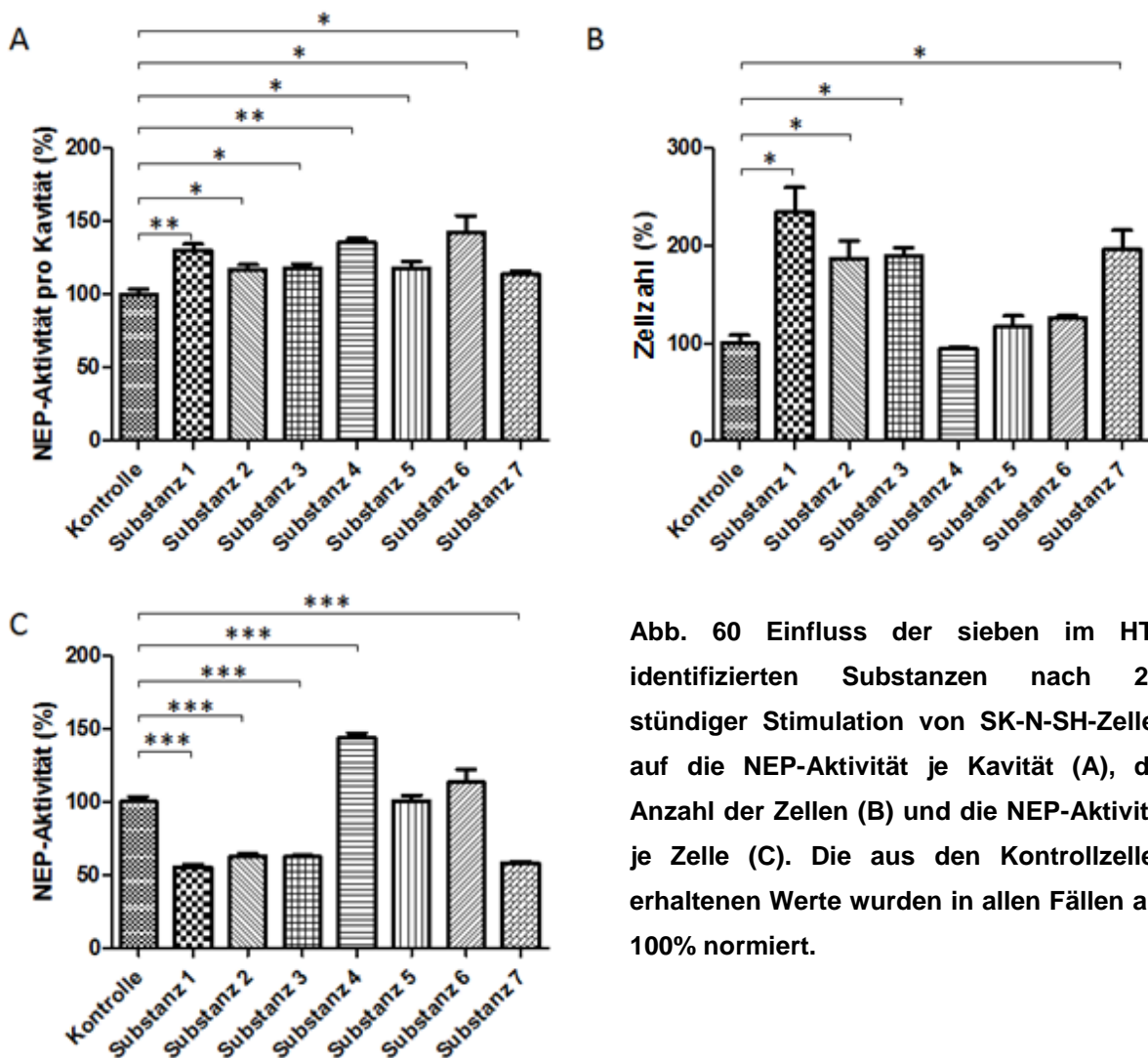
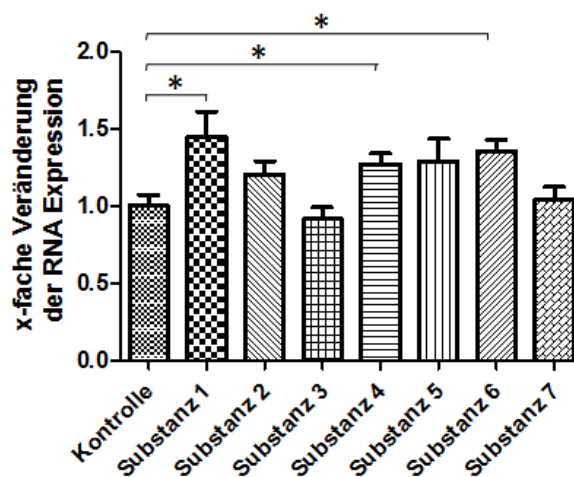


Abb. 60 Einfluss der sieben im HTS identifizierten Substanzen nach 24-stündiger Stimulation von SK-N-SH-Zellen auf die NEP-Aktivität je Kavität (A), die Anzahl der Zellen (B) und die NEP-Aktivität je Zelle (C). Die aus den Kontrollzellen erhaltenen Werte wurden in allen Fällen auf 100% normiert.

Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der NEP-Aktivitäten nach 24-stündiger Stimulation der SK-N-SH-Zellen auf Veränderungen der NEP-mRNA-Expression beruhen, wurde von den Zellen zusätzlicher Ansätze in 12-well-Mikrotiterplatten (3.1.9.3.) die RNA isoliert (3.2.6.) und mittels qRT-PCR analysiert (3.2.7.).

Dabei zeigte sich, dass die RNA-Expression nach 24-stündiger Stimulation mit den Substanzen 1, 4 und 6 signifikant erhöht ist (Abb. 61). Für Substanz 4 konnte demnach sowohl auf RNA-Ebene als auch für die NEP-Aktivität eine Erhöhung gefunden werden. Die erhöhte RNA-Expression durch die Stimulation von Substanz 6 hingegen, führte nicht zu einer erhöhten NEP-Aktivität (Abb. 60 C). Das durch die Stimulation mit Substanz 1 eine erhöhte RNA-Expression gefunden wurde, jedoch auch eine Verringerung der NEP-Aktivität um 50%, erscheint hingegen sehr widersprüchlich.



**Abb. 61 RNA-Expression von NEP in SK-N-SH-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit den Substanzen 1 bis 7.**

In weiteren Ansätzen wurden SK-N-SH-Zellen für 96 Stunden mit den Substanzen 1 bis 7 inkubiert (3.1.9.2.), um die Auswirkungen einer länger andauernden Stimulation zu beschreiben.

Bei der Messung der NEP-Aktivität der Kavitäten zeigte sich für die Zellen, die mit den Substanzen 1, 2, 5, 6 und 7 stimuliert worden waren, eine Verringerung der Aktivität (Abb. 62 A). Die Zellzahl war in den unterschiedlichen Gruppen nicht signifikant verändert. Allerdings traten innerhalb einer Gruppe teilweise hohe Abweichungen auf, wodurch signifikante Abweichungen der Zellzahlen überdeckt sein könnten (Abb. 62 B). Die NEP-Aktivität der Zellen, unter Berücksichtigung der Zellzahl, zeigte für die Substanzen 1 bis 4 eine deutliche Verringerung der Aktivität um etwa 40%. Stimulation mit Substanz 5 führte hingegen zu einer Erhöhung der NEP-Aktivität um etwa 40% (Abb. 62 C). Für die Substanzen 1-3 zeigte sich somit eine vergleichbare Verringerung der NEP-Aktivität nach 24

Stunden und nach 96 Stunden. Substanz 4 hingegen hatte nach 24-stündiger Stimulation die NEP-Aktivität noch um ca. 50% erhöht (vergleiche Abb. 60).

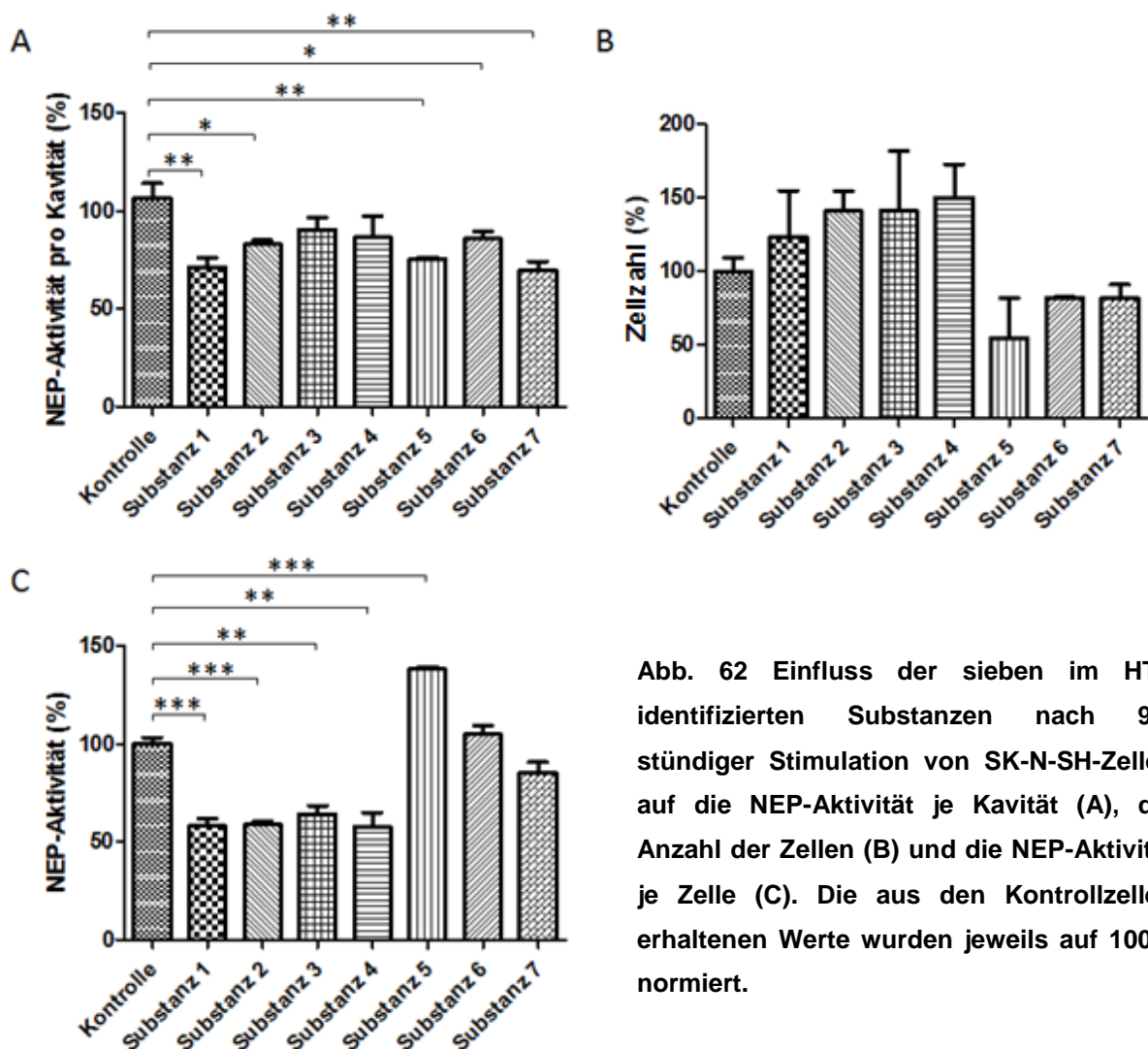


Abb. 62 Einfluss der sieben im HTS identifizierten Substanzen nach 96-stündiger Stimulation von SK-N-SH-Zellen auf die NEP-Aktivität je Kavität (A), die Anzahl der Zellen (B) und die NEP-Aktivität je Zelle (C). Die aus den Kontrollzellen erhaltenen Werte wurden jeweils auf 100% normiert.

#### 4.3.3.2. Stimulation von endothelialen Zellen

Als nächstes wurde die Stimulation der NEP-Aktivität in HDMEC-Zellen durch die sieben Substanzen untersucht, um den Einfluss auf die periphere NEP betrachten. Für die akute Stimulation wurden die Zellen, wie in 3.1.9.1. beschrieben, behandelt.

Keine der eingesetzten Substanzen führte hierbei zu einer Veränderung der NEP-Aktivität, wie in Abb. 63 gezeigt ist. Es ist überraschend, dass Substanz 1 in dieser Zelllinie zu keiner Änderung führt, obwohl eine Änderung bei der Stimulation der SK-N-SH-Zellen auftrat (vergleiche Abb. 59). Da nur eine Form von NEP bekannt ist, sollten posttranslationale Veränderungen unabhängig von den verwendeten Zelllinien auftreten.

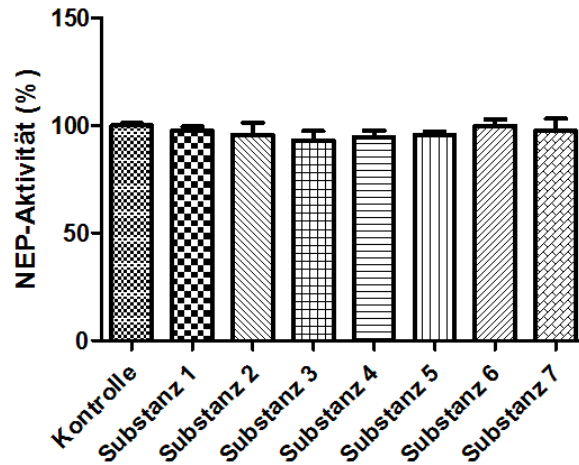


Abb. 63 Akute Stimulation von HDMEC-Zellen mit den sieben im HTS identifizierten Substanzen.

Wie auch bei den neuronalen Zellen, sind die HDMEC-Zellen für 24 Stunden mit den sieben Substanzen inkubiert, wie in 3.1.9.2. beschrieben, um den Einfluss einer längerfristigen Stimulation zu untersuchen.

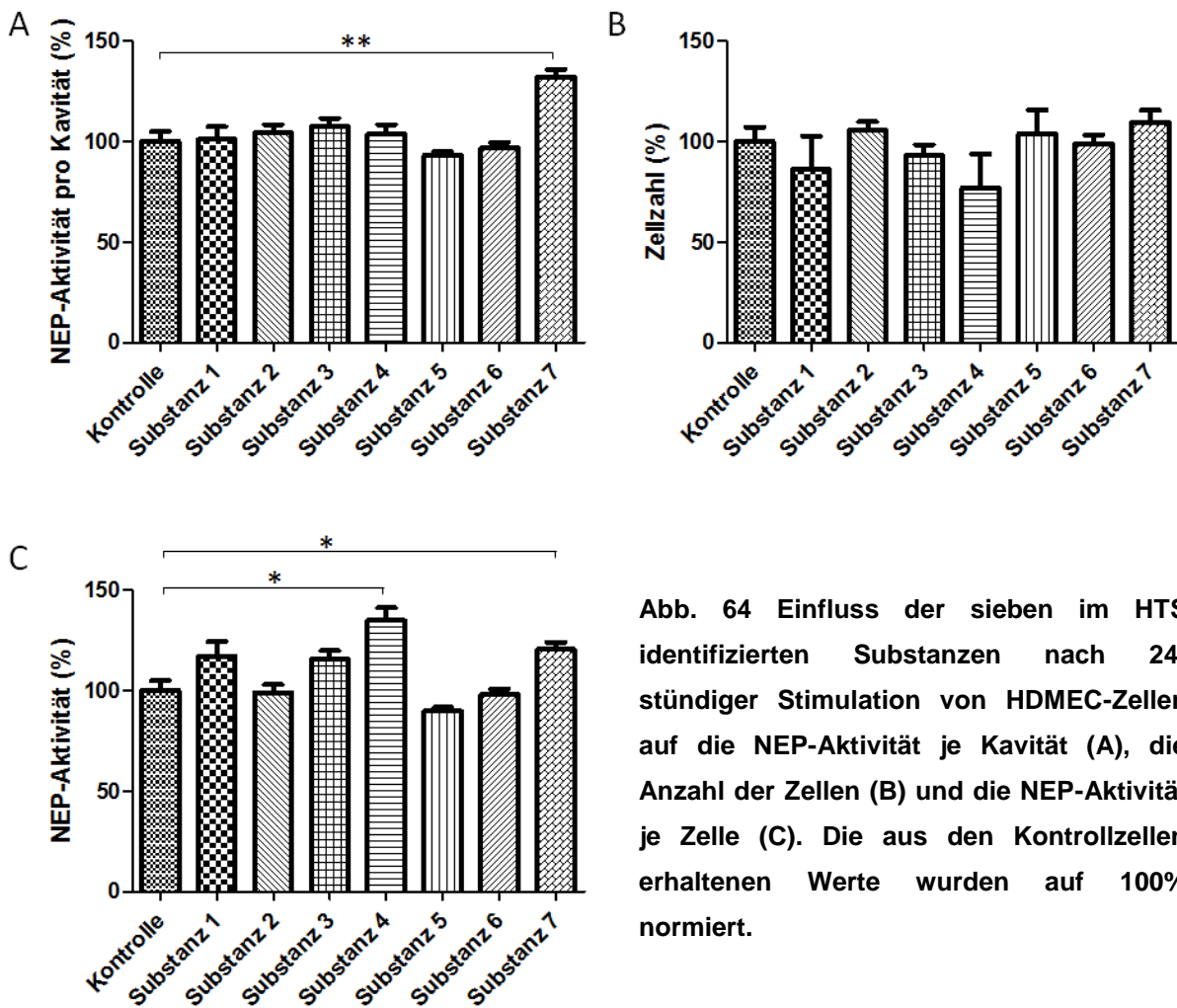
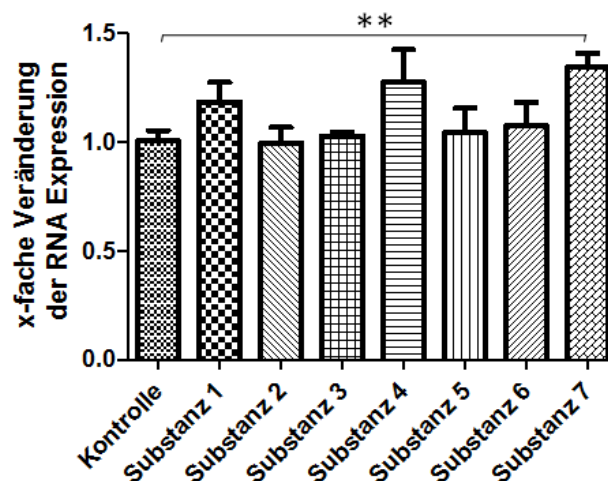


Abb. 64 Einfluss der sieben im HTS identifizierten Substanzen nach 24-stündiger Stimulation von HDMEC-Zellen auf die NEP-Aktivität je Kavität (A), die Anzahl der Zellen (B) und die NEP-Aktivität je Zelle (C). Die aus den Kontrollzellen erhaltenen Werte wurden auf 100% normiert.

Die Messung der NEP-Aktivität in den Kavitäten zeigte dabei eine Erhöhung der Aktivität nur für die mit der Substanz 7 stimulierten Zellen (Abb. 64 A). Die Zellzahl wurde durch die Stimulation mit den Substanzen in keiner Gruppe signifikant verändert (Abb. 64 B). Dadurch ergab sich für die um die Zellzahl korrigierte NEP-Aktivität, dass durch Stimulation mit den Substanzen 4 und 7 eine Erhöhung erzielt werden kann. Die Aktivitäten der anderen untersuchten Gruppen zeigten keine Veränderung gegenüber der NEP-Aktivität der Kontrollzellen (Abb. 64 C). Substanz 4 führte auch in den SK-N-SH-Zellen zu einer Erhöhung der NEP-Aktivität, wohingegen Substanz 7 in den neuronalen Zellen zu einer signifikant verringerten Aktivität führte (vergleiche Abb. 60).

Auch die HDMEC-Zellen wurden in parallelen Ansätzen in 12-well-Mikrotiterplatten für 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert, um zu untersuchen, ob die veränderten NEP-Aktivitäten auf Veränderungen in den NEP-mRNA-Expressionen beruhen (3.1.9.3.).

Bei der Messung der mRNA ergab sich eine erhöhte NEP-Expression nach 24-stündiger Stimulation mit Substanz 7. Die anderen Substanzen führten zu keiner signifikanten Veränderung der NEP-Expression (Abb. 65). Für Substanz 7 wurde somit in den HDMEC-Zellen nach 24-stündiger Stimulation sowohl eine erhöhte NEP-mRNA-Expression, als auch eine erhöhte NEP-Aktivität gefunden. Substanz 4 schien ebenfalls zu einer Erhöhung der RNA-Expression zu führen, die Änderung ist jedoch aufgrund einer zu hohen Standardabweichung nicht signifikant.



**Abb. 65 Einfluss der sieben Substanzen auf die NEP-mRNA-Expression in HDMEC-Zellen nach 24-stündiger Stimulation.**

Um den Einfluss einer länger andauernden Stimulation der HDMEC-Zellen mit den Substanzen zu untersuchen, wurden die Zellen in 24-well-Mikrotiterplatten in einem weiteren

Ansatz für 96 Stunden mit den Substanzen inkubiert, wie zuvor beschrieben (3.1.9.2.). Anschließend wurde die NEP-Aktivität bestimmt (3.5.1.).

Dabei zeigte sich, dass nach 96-stündiger Stimulation die NEP-Aktivität mit Ausnahme von Substanz 1 und 7 in allen Gruppen signifikant verringert war (Abb. 66 A). Die Zellzahl war nur in der Gruppe der mit Substanz 3 stimulierten Zellen leicht, aber signifikant erhöht. Stimulation mit Substanz 6 und 7 führte hingegen zu einer Verringerung der Zellzahl (Abb. 66 B). Die NEP-Aktivität, die um die Anzahl der Zellen korrigiert worden war, wurde durch Stimulation mit den Substanzen 2, 3, und 4 signifikant reduziert, während Stimulation mit den übrigen Substanzen zu keiner Veränderung führte (Abb. 66 C). Die nach 24-stündiger Stimulation gefundene Aktivitätserhöhung konnte also weder für Substanz 4, noch für Substanz 7 bei lang anhaltender Stimulation beibehalten werden (vergleich Abb. 64).

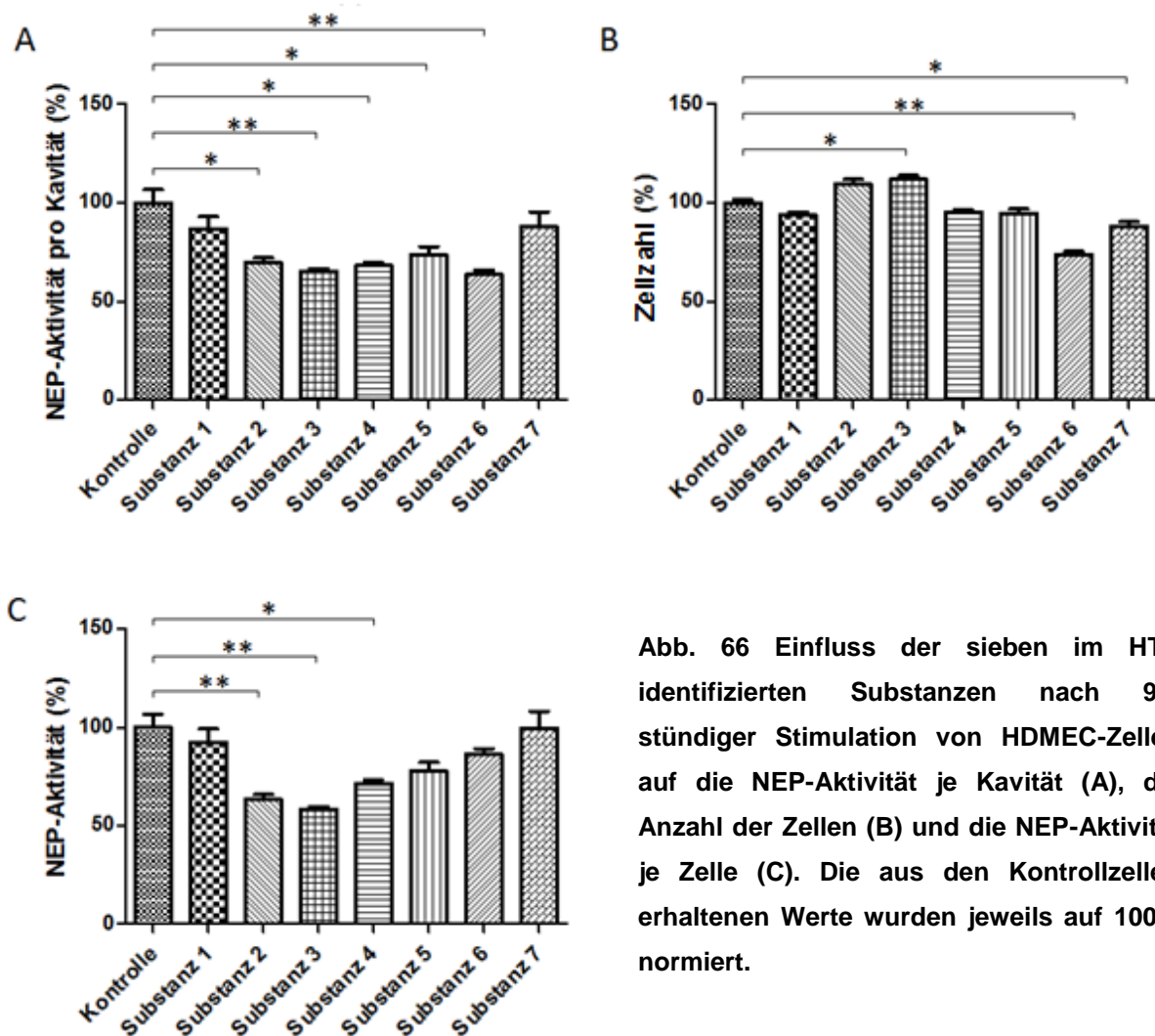


Abb. 66 Einfluss der sieben im HTS identifizierten Substanzen nach 96-stündiger Stimulation von HDMEC-Zellen auf die NEP-Aktivität je Kavität (A), die Anzahl der Zellen (B) und die NEP-Aktivität je Zelle (C). Die aus den Kontrollzellen erhaltenen Werte wurden jeweils auf 100% normiert.

Als zweite endotheliale Zelllinie wurden BAEC-Zellen ebenfalls für 24 Stunden mit den Substanzen stimuliert (3.1.9.2.).



Wie in Abb. 67 A zu sehen ist, führte die Stimulation mit den Substanzen 1 und 6 zu leichter, aber signifikanter, Verringerung der NEP-Aktivitäten, die in den Kavitäten gemessen wurden. Stimulation mit Substanz 7 hingegen, führte zu einer Erhöhung. Für die Zellzahlen der verschiedenen Gruppen traten untereinander keine signifikanten Änderungen auf (Abb. 67 B). Wie bereits nach der 96-stündigen Stimulation der SK-N-SH-Zellen traten jedoch auch bei den BAEC-Zellen teilweise innerhalb einer Gruppe starke Schwankungen auf (vergleiche Abb. 62 B). Die NEP-Aktivität, die um den Faktor der Zellzahl korrigiert wurde, war in den mit Substanz 5 stimulierten Zellen verringert während die Stimulation mit Substanz 4 zu keiner Veränderung in der NEP-Aktivität führte. Die Stimulationen mit den restlichen Substanzen führten zu einer Erhöhung der NEP-Aktivität. Am deutlichsten ist diese bei Substanz 7 ausgeprägt (Abb. 67 C). Auch bei den HDMEC-Zellen, konnte mit Substanz die stärkste Veränderung erzielt werden. Dort führte nach 24-stündiger Stimulation nur Substanz 4 ebenfalls zu einer Erhöhung, welche in den BAEC jedoch als einzige unverändert war (vergleiche Abb. 64).

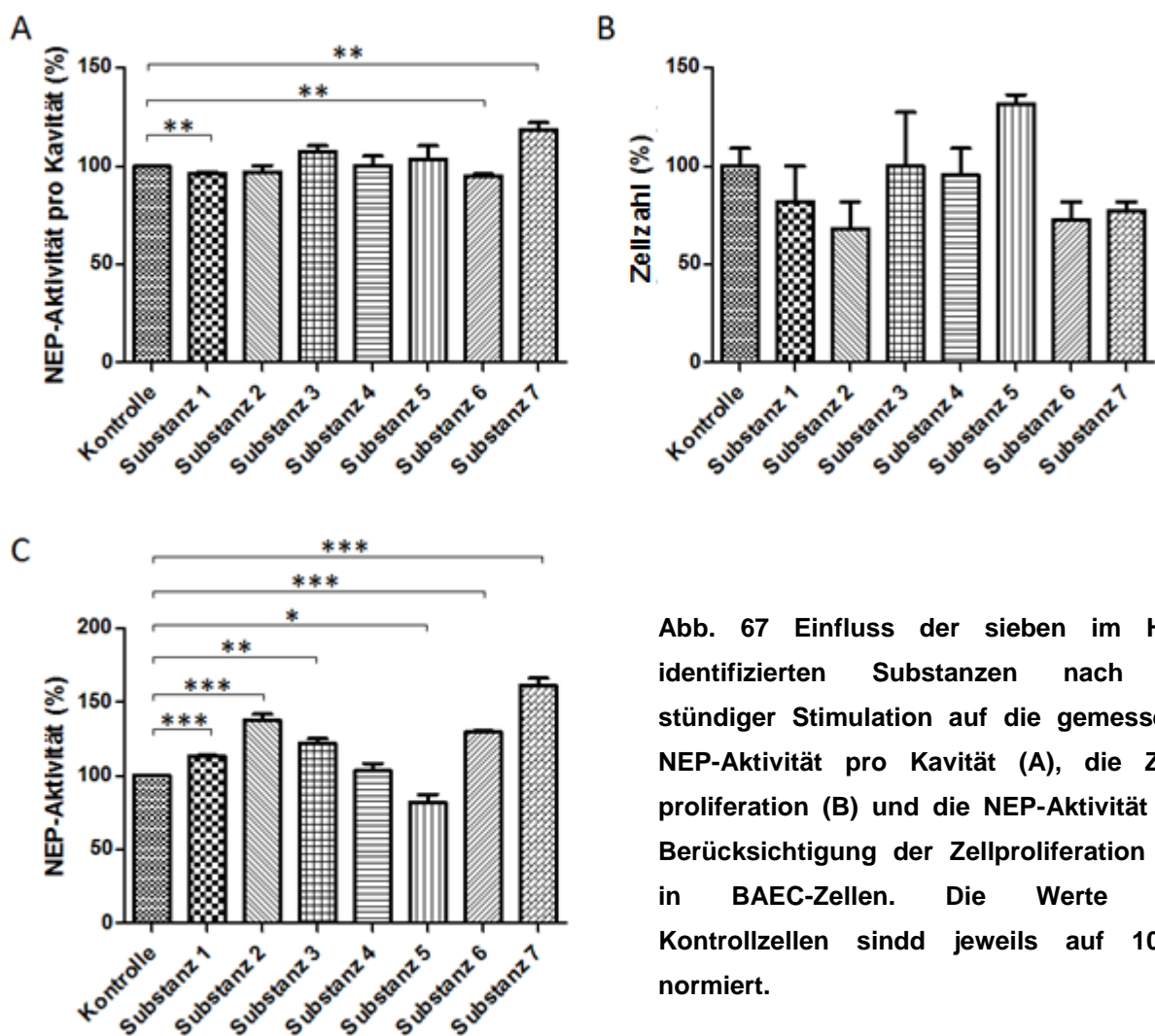


Abb. 67 Einfluss der sieben im HTS identifizierten Substanzen nach 24 stündiger Stimulation auf die gemessene NEP-Aktivität pro Kavität (A), die Zellproliferation (B) und die NEP-Aktivität bei Berücksichtigung der Zellproliferation (C) in BAEC-Zellen. Die Werte der Kontrollzellen sind jeweils auf 100% normiert.

## 4.4. Einfluss von GTE auf die Gewichtsentwicklung in Mäusen

### 4.4.1. Einfluss von GTE auf fettleibige BMFI-Mäuse

Der Gewichtsreduzierende Effekt von Grünem Tee wurde bereits mehrfach im Tiermodell und auch im Menschen beschrieben (Wolfram *et al.*, 2006; Rains *et al.*, 2011). Der zugrunde liegende Mechanismus konnte bislang jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Da von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, dass NEP die Regulation der Nahrungsaufnahme beeinflusst (Becker *et al.*, 2010), sollte untersucht werden, ob der in der Literatur beschriebene NEP-stimulierende Effekt von GTE (Melzig und Janka, 2003; Ayoub und Melzig, 2006), der im Rahmen dieser Arbeit teilweise bestätigt werden konnte (siehe 4.3.2.), *in vivo* reproduziert werden und den möglichen gewichtsreduzierenden Effekt von GTE erklären kann. Da die Möglichkeit geprüft werden sollte, ob GTE zur Behandlung der Fettleibigkeit eingesetzt werden kann, wurden die Versuche an den fettleibigen BMFI-Mäusen (Wagener *et al.*, 2006) durchgeführt, die uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Gudrun Brockmann (HU Berlin) zur Verfügung gestellt wurden. Die Arbeiten wurden mit der Unterstützung von Dr. Wolf Siems und Matthias Münzner (FMP Berlin-Buch) durchgeführt. Der Versuch wurde durchgeführt, wie in Kapitel 3.4.1. beschrieben.

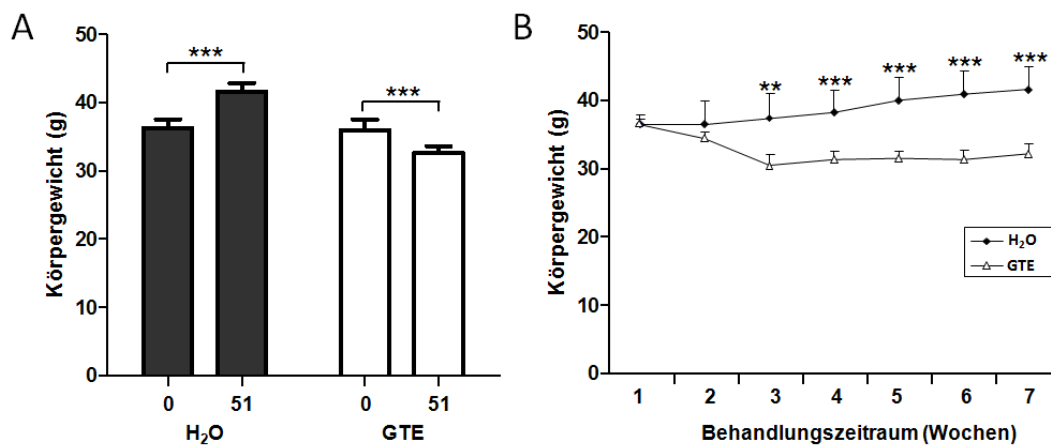


Abb. 68 Vergleich des Körpergewichts der BMFI-Mäuse unmittelbar vor Versuchsbeginn und nach 51-tägiger Behandlung mit GTE im Trinkwasser (A) Gewichtsentwicklung innerhalb der beiden Versuchsgruppen während des Behandlungszeitraums (B).

Erwartungsgemäß zeigte sich, dass das Körpergewicht der BMFI-Mäuse die nur Wasser tranken, am Ende des Versuchs signifikant höher war als zu Versuchsbeginn. In der Gruppe, die GTE in ihrem Trinkwasser hatte, war das Körpergewicht der Tiere am Ende der Versuchsdauer hingegen signifikant reduziert (Abb. 68 A). Ein Vergleich der Gewichtsentwicklung innerhalb der beiden Gruppen über die Zeit, zeigt eine Gewichtsabnahme in der Gruppe der GTE-behandelten Tiere, insbesondere während der ersten drei

Wochen des Behandlungszeitraumes. Danach kam es in dieser Gruppe nur zu einer geringen Gewichtszunahme. Ab der dritten Behandlungswoche erreichte der Gewichtsunterschied zwischen den beiden Gruppen Signifikanz, die bis zum Ende des Versuchs erhalten blieb (Abb. 68 B).

Die Tiere wurden zu Beginn und am Ende des Versuchs für eine Körperkompositionsanalyse in einem NMR-Gerät vermessen, um die Ursache der Gewichtsveränderung zu untersuchen. Während die Fettmenge in den Wasser trinkenden BMFI-Mäusen innerhalb der 51 Tage signifikant zunahm, konnte sie durch die Aufnahme von GTE im selben Zeitraum deutlich verringert werden (Abb. 69 A). Das Verhältnis der Fettmasse zum Körpergewicht der GTE-behandelten Tiere konnte dadurch signifikant verringert werden, während es in der Gruppe der unbehandelten Tiere nahezu unverändert blieb (Abb. 69 B). Ein Vergleich der Fressmengen zeigte, dass besonders im ersten Drittel des Behandlungszeitraums mit GTE, die Futtermenge signifikant geringer war. Nach der anfänglichen Gewichtsreduktion wurde der Unterschied in der Futtermenge über die Zeit immer geringer (Abb. 69 C).

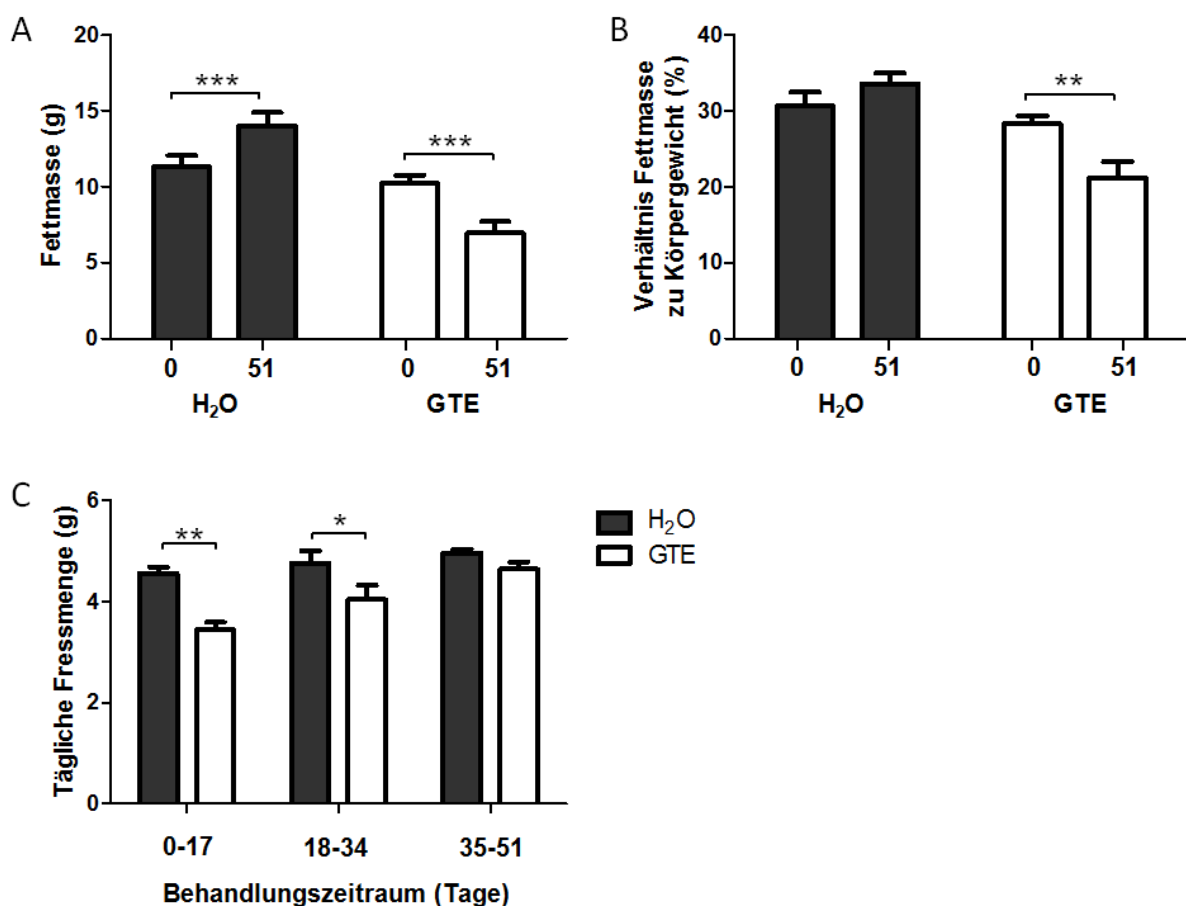
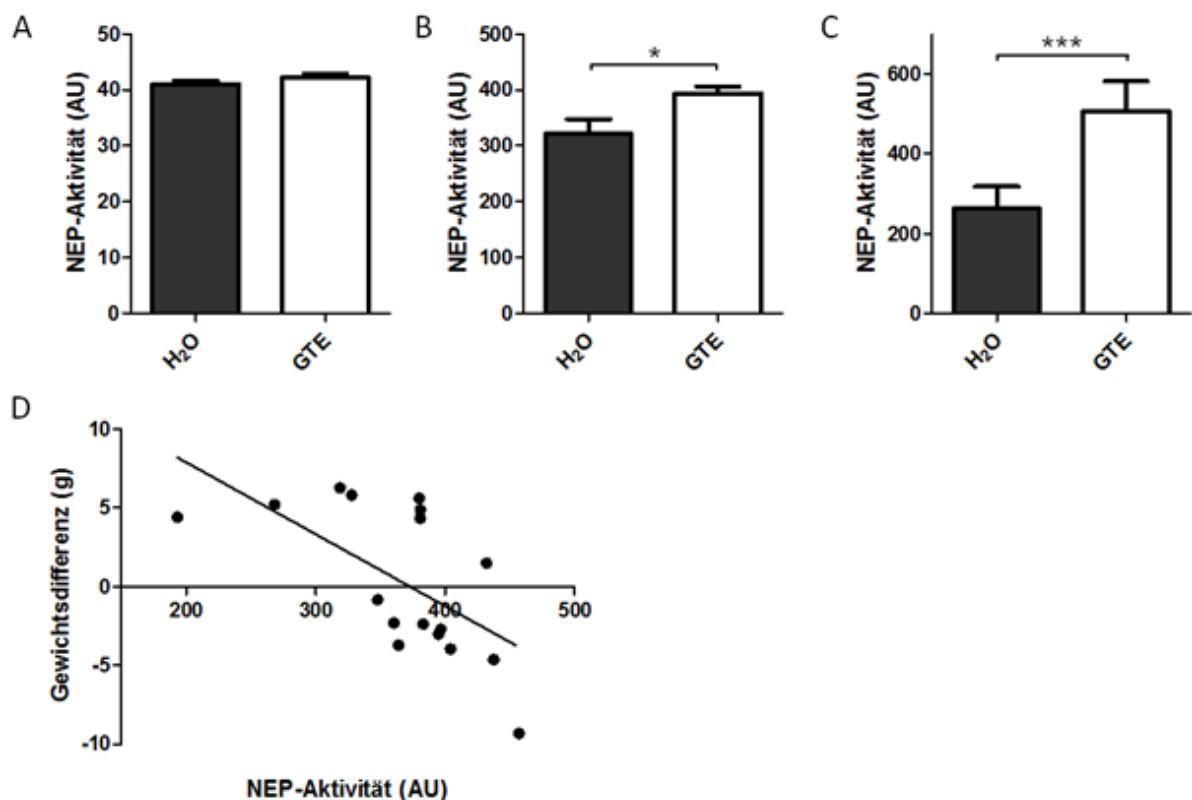


Abb. 69 Vergleich der durch NMR-Körperkompositionsanalyse bestimmten Fettmasse der BMFI-Mäuse vor Beginn und am Ende des Versuches in den beiden Behandlungsgruppen (A) und Vergleich des Fettanteils an der Gesamtkörpermasse der Tiere (B). Vergleich der täglich aufgenommenen Futtermenge während der Behandlung, aufgeteilt in drei Zeiträume (C).

Damit konnte gezeigt werden, dass die BMFI-Mäuse durch GTE im Trinkwasser signifikant ihr Gewicht verringern. Diese Gewichtsreduktion ist auf eine Reduktion der Fettmasse zurückzuführen, die einsetzt, weil die Tiere weniger fressen. Um festzustellen, ob dieser Effekt durch NEP vermittelt wird, wurden zuerst Homogenate verschiedener Organe auf ihre NEP-Aktivität untersucht.

Im Gehirn konnte dabei kein Unterschied in der NEP-Aktivität zwischen den beiden Gruppen gefunden werden (Abb. 70 A). In den untersuchten Nierenhomogenaten der Tiere, zeigte sich hingegen eine signifikant höhere NEP-Aktivität in den mit GTE behandelten BMFI-Mäusen (Abb. 70 B). Eine noch stärkere Erhöhung der NEP-Aktivität konnte im Dünndarm nachgewiesen werden (Abb. 70 C). Eine Korrelationsanalyse, bei der die Gewichtsreduktion gegen die NEP-Aktivität aufgetragen wurde, zeigte eine signifikante negative Korrelation der beiden Parameter (Pearson Koeffizient = -0,6146,  $R^2 = 0,3778$ ,  $P < 0,01$ ).

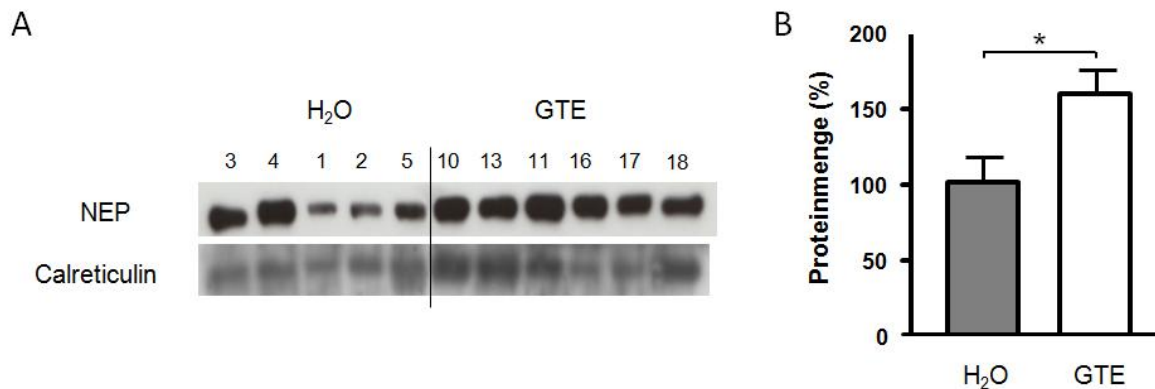


**Abb. 70 Einfluss der Behandlung mit GTE auf die NEP-Aktivität in Homogenaten von Gehirn (A), Niere (B) und Dünndarm (C) der BMFI-Mäuse. Eine negative Korrelation besteht zwischen der Gewichtsreduktion und der NEP-Aktivität.**

Es sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Erhöhung der NEP-Aktivität auf Veränderungen in der Proteinmenge zurückgeführt werden kann. Da der Aktivitätsunterschied in den Dünndarmproben am stärksten ausgeprägt war, wurden die

Membranen der Proben isoliert, und damit eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Für die Normierung der Werte wurden auf einer Membran sowohl NEP als auch Calreticulin detektiert.

Wie in Abb. 71 A zu sehen ist, waren die NEP-Banden in der GTE-Gruppe stärker ausgeprägt, als in der H<sub>2</sub>O-Gruppe. Dies wurde durch der Quantifizierung bestätigt, die eine signifikant höhere NEP-Menge in den mit GTE behandelten Tieren aufzeigt (Abb. 71 B).



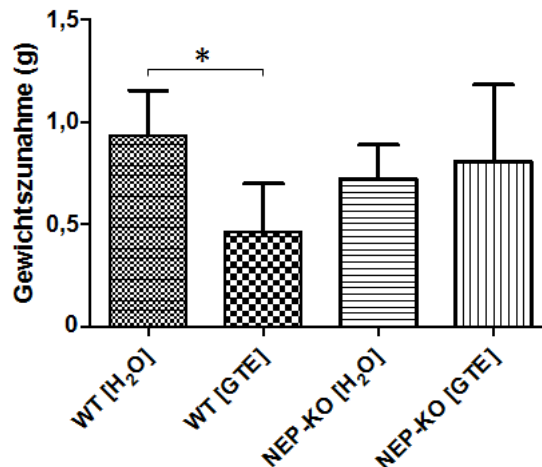
**Abb. 71 Western Blot-Analyse zur Detektion von NEP und Calreticulin (A) in Dünndarm-Proben; Quantifizierung der Banden (B).**

Die durchgeführten Versuche zeigten deutlich, dass in fettleibigen Mäusen durch GTE eine Gewichtsreduktion erzielt werden konnte. Gleichzeitig war in diesen Tieren die NEP-Aktivität in den peripheren Organen erhöht, was ist auf eine höhere Konzentration des Enzyms in den Organen zurückgeführt werden konnte.

#### 4.4.2. Einfluss von GTE auf NEP-defiziente Mäuse

Um den Einfluss von NEP auf die GTE-vermittelte Gewichtsreduktion zweifelsfrei zu belegen, wurden in einem weiteren Versuch NEP-defiziente Tiere untersucht. Dazu wurde Mäusen für einen Zeitraum von 42 Tagen mit GTE versetztes Trinkwasser verabreicht, so dass sie täglich eine Menge von ca. 600 mg/kg GTE zu sich nahmen (3.4.2.). Unserer Hypothese zufolge sollte in den wildtypischen Tieren der gewichtsreduzierende Effekt von GTE reproduziert werden können, in den NEP-defizienten Tieren hingegen keine Veränderung auftreten. Da in den NEP-defizienten Mäuse ab einem Alter von ca. 7 Monaten eine Erhöhung des Körpergewichts auftritt (Becker *et al.*, 2010), wurden für den Versuch Mäuse in einem Alter von 3 Monaten ausgewählt, in denen noch kein Unterschied im Körpergewicht zwischen NEP-defizienten Tieren und ihren wildtypischen Geschwistertieren auftritt.

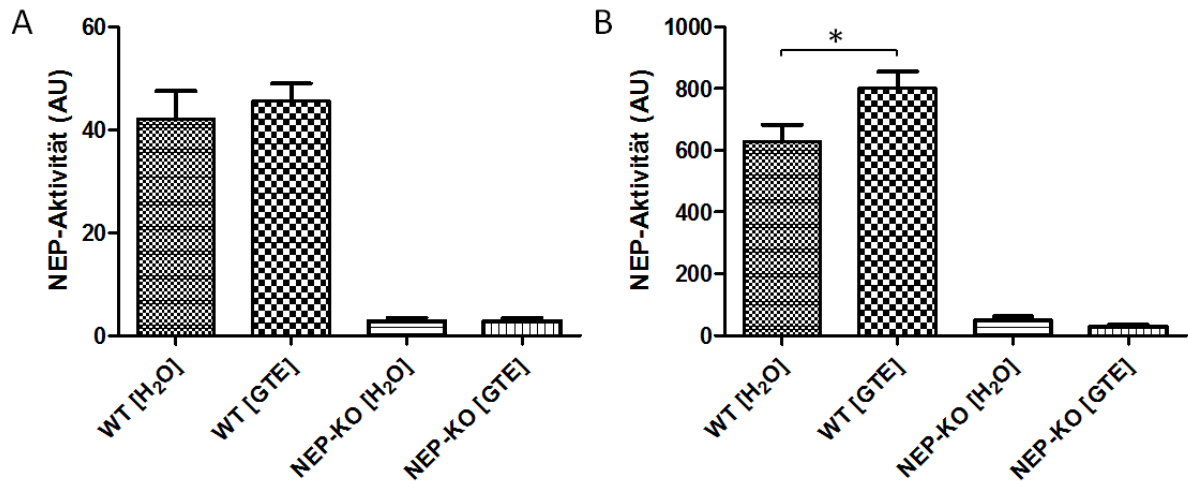
Durch die Gabe des GTE konnte in diesen Tieren keine Gewichtsreduktion induziert werden. Da die Tiere normalgewichtig waren, und auch aufgrund des jungen Alters keinen erhöhten Anteil an Körperfett aufwiesen das reduziert werden konnte, entsprach diese Beobachtung den Erwartungen. Im Versuch konnte allerdings gezeigt werden, dass die Gewichtszunahme in den wildtypischen Tieren durch die Behandlung mit GTE verringert werden konnte (Abb. 72). In den NEP-defizienten Tieren trat hingegen keine Veränderung auf.



**Abb. 72 Gewichtszunahme 3 Monate alter NEP-defizienter Mäuse (KO) und wildtypischer Geschwistertiere (WT) nach 42-tägiger Behandlung mit GTE oder H<sub>2</sub>O.**

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden die Tiere getötet und die Organe entnommen (3.4.3.). Gehirn und Dünndarm wurden homogenisiert (3.3.2.) und in den Homogenaten wurde mit der DALEK-Methode die NEP-Aktivität ermittelt (3.3.5.).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die bei der Auswertung der Proben der BMFI-Mäuse erhalten wurden (Abb. 70), wurde auch in den Gehirnhomogenaten der wildtypischen Tieren keine Veränderung in der NEP-Aktivität nach der Behandlung mit GTE gefunden (Abb. 73 A). In den Dünndarm-Proben der wildtypischen Tieren konnte hingegen erneut eine erhöhte NEP-Aktivität gemessen werden, nachdem die Tiere mit GTE behandelt wurden (Abb. 73 B). In den NEP-defizienten Tieren sind die gemessenen NEP-Werte sowohl im Gehirn, als auch im Dünndarm nur im Bereich des Hintergrundrauschens. Das bestätigt noch einmal die fehlende NEP-Expression in diesen Tieren.



**Abb. 73** Nach 42-tägiger Aufnahme von GTE bleibt die NEP-Aktivität im ZNS bei NEP-defizienten Tiere und wildtypische Kontrollen unverändert (A), ist jedoch im Dünndarm der wildtypischen Tiere signifikant erhöht (B).

Die Ergebnisse dieses Versuches bestätigen damit endgültig die Hypothese, dass das periphere NEP für die Gewichtsreduzierung durch den GTE essentiell ist. Nur wenn im Organismus der Mäuse NEP vorhanden war, trat eine signifikante Reduktion des Gewichtes, bzw. eine signifikant verringert Gewichtszunahme auf. Dies belegt, dass NEP als wichtigstes Schlüsselenzym diese Reaktion vermittelt, und das eine Erhöhung der NEP-Aktivität in Mäusen zu einer Verringerung des Körpergewichts führt.

## 5. Diskussion

Aufgrund der Beteiligung der Peptidase NEP am Metabolismus vieler Peptidhormone steht das Enzym in enger Beziehung zu vielen physiologischen und pathologischen Zuständen eines Organismus. Eine Beeinflussung von NEP zur Therapie bestimmter Erkrankungen muss deshalb genauestens untersucht werden, um negative Nebeneffekte zu erkennen, zu minimieren oder auszuschließen. Nachdem erkannt wurde, dass die Inhibition von NEP zu einer Erhöhung von endogenem ANP, und darüber zu einer Senkung des Blutdrucks führt (Gros *et al.*, 1989), wurde die NEP-Inhibition vielfach erforscht. Da die Hemmung von NEP alleine nur geringe Wirkung zeigte, wurden kombinierte Inhibitoren für NEP und ACE erforscht (Favrat *et al.*, 1995), bei denen sich jedoch ein erhöhtes Risiko zeigte, ein Angioödem zu entwickeln (Campbell, 2003). Dies wird auf einer erhöhten Menge des Peptids Bradykinin zurückgeführt, das ein Substrat beider Enzyme ist (Fryer *et al.*, 2008). Doch auch die Inhibition von NEP alleine kann bereits zu unerwünschten Effekten führen. In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass die Inhibition von NEP mit dem Inhibitor Thiorphan zu einer Erhöhung des  $\beta$ -Amyloid führt, das als Auslöser der Alzheimer-Krankheit diskutiert wird (Newell *et al.*, 2003). Zur Beeinflussung der Regulation der Nahrungsaufnahme, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, sollte nur auf peripherer Ebene eine Erhöhung der NEP-Aktivität hervorgerufen werden. Im Tierversuch wurde jedoch bereits gezeigt, dass auch bei Veränderungen von NEP in der Peripherie unerwartete Effekte auftreten können: Bei Verwendung des Inhibitors Candoxatril, der die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, wurde in Mäusen ein erhöhtes Suchtverhalten für Alkohol festgestellt (Maul *et al.*, 2012). Auch bei Veränderungen der NEP-Aktivität in spezifischem Gewebe muss deshalb sorgfältig evaluiert werden, ob schädliche Nebeneffekte auftreten können. Dies gilt nicht nur für die Hemmung von NEP, sondern ist sicherlich genauso bei einer Stimulation der Peptidase zu beachten. Es ist deshalb notwendig, nicht nur die Suche nach NEP-stimulierenden Substanzen voranzutreiben, sondern gleichzeitig die Methoden zu entwickeln und zu verbessern, mit denen eine umfassende Untersuchung von Organismen mit hoher NEP-Aktivität erreicht werden kann.

### 5.1. Entwicklung einer fluorimetrischen Methode zur Messung der NEP-Aktivität

Die Aktivität eines Enzymes beschreibt die Geschwindigkeit, mit der ein Enzym ein bestimmtes Substrat umsetzen kann. In der Enzymkinetik werden zur vollständigen



Beschreibung dieser wichtigen Eigenschaft drei Größen verwendet: Die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$ , die angibt, wie viele Moleküle pro Zeiteinheit umgesetzt werden können, die Michaelis-Menten Konstante  $K_M$ , welche die Affinität des Enzyms zum Substrat beschreibt, und der Quotient  $k_{\text{cat}}/K_M$ . Dieser beschreibt die katalytische Effizienz des Systems, wobei ein hoher Wert auch einer hohen Effizienz entspricht. Kann die Aktivität eines Enzym/Substrat-Systems ermittelt werden, lässt sich dies in der Forschung für zwei unterschiedliche Anwendungen nutzen. Einerseits lässt sich aus der gemessenen Aktivität ein Rückschluss auf die vorhandene Enzymmenge in einer zu untersuchenden Probe ziehen. Zum anderen lässt sich die Veränderung der Enzymaktivität bei bekannter Enzymmenge nachweisen. Es ist in vielen Fällen notwendig, eine bestimmte enzymatische Reaktion zu unterdrücken und für die Suche nach Inhibitoren, die dies zu leisten vermögen, werden Aktivitätsmessungen eingesetzt (Danilewicz *et al.*, 1989; Sahli *et al.*, 2005). Über die Aktivitätsmessung kann aber ebenso eine Steigerung der Enzymaktivität durch Aktivatoren ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das von Carvalho beschriebene Substrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp auf seine Überlegenheit gegenüber anderen fluoreszierenden NEP-Substraten untersucht und gegebenenfalls optimiert werden. In der Literatur werden im Vergleich zu dem von Florentin beschriebenen Substrat N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNitro-Phe-Gly (Florentin *et al.*, 1984) eine Reihe an Vorteilen aufgeführt: Die Kinetischen Parameter des neueren Substrates seien besser ( $K_M = 3 \mu\text{M}$  anstatt  $K_M = 45 \mu\text{M}$ ;  $k_{\text{cat}} = 127 \text{ min}^{-1}$  anstatt  $k_{\text{cat}} = 59 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_M = 42 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  anstatt  $k_{\text{cat}}/K_M = 1,3 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ). Der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten von Produkt und Substrat seien wesentlich größer, was zu einem verringerten Hintergrund des neueren Substrates führt. Das neuere Substrat wurde zusätzlich mit geringeren Enzymmengen untersucht und ist eventuell sensitiver als das von Florentin beschriebene Substrat (Carvalho *et al.*, 1996).

### **5.1.1. Validierung der NEP-Spezifität von Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp**

Mit unsere eigenen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass NEP das Substrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp rasch hydrolysiert, und ein starkes Fluoreszenzsignal bei der Umsetzung entsteht. Bei einer vergleichbaren Signalstärke von Substrat und Produkten im Absorptionsspektrum wurde ein etwa hundert Mal stärkeres Fluoreszenzsignal des fluoreszierenden Produktes detektiert (Abb. 6). Die Entstehung des NEP-spezifischen Signals P1 konnte durch den Einsatz des NEP-spezifischen Inhibitors Candoxatrilat, sowohl bei Untersuchungen mit rekombinantem NEP (4.1.1.), als auch bei

Untersuchungen in murinem Gewebe (4.1.2.), nahezu vollständig unterdrückt werden. In Gewebe von NEP-defizienten Mäusen konnte das NEP-spezifische Signal nicht nachgewiesen werden (Abb. 9). Dies belegt, dass NEP das Substrat hydrolysieren konnte, und ein NEP-spezifisches Produkt bildete.

Bei Untersuchungen im murinen Gewebe zeigte sich jedoch auch, dass noch weitere Enzyme in der Lage sind, das Substrat abzubauen. Es wurden Nieren (4.1.2.), Lungen (4.1.3.) sowie Hoden, Milze, Herzen und Cerebella (4.1.4.) wildtypischer Mäuse untersucht, und in allen diesen Organen wurden ebenso wie im Blut, das sowohl als Citratplasma, als auch als Serum untersucht wurde (4.1.4.), zwei unerwünschte Produkte detektiert. Es handelt sich also offenbar um zwei häufig vorkommende Enzyme, die diese Produkte bilden. Das keines der Enzyme in den untersuchten Homogenaten aus den Rattennieren vorhanden gewesen sein soll, die Carvalho beschrieben hat (Carvalho *et al.*, 1996), ist zumindest erstaunlich. Eventuell wurden die Enzyme durch verwendete Puffer oder Proteaseinhibitoren, die möglicherweise für die Homogenisierung verwendet wurden, gehemmt. Dies ist jedoch reine Spekulation, da in der Literatur Bedingungen dieser Art nicht genannt wurden.

Auf die Identität der unbekannt Enzyme gibt es bislang nur wenige Hinweise. Beide ließen sich durch den Chelator EDTA vollständig inhibieren (Abb. 8), was auf Metallopeptidasen hindeutet. Es konnte gezeigt werden, dass ein hauptsächlich cytosolisch lokalisiertes Enzym (Abb. 9) das Substrat durch Hydrolysieren der Arg-Arg-Bindung zu Produkt P2 abbauen kann (4.1.5.). Das zweite unbekannt Enzym ist membranständig (Abb. 9) und baut das NEP-spezifische Produkt P1 durch Spaltung der Leu-Arg-Bindung (4.1.5.) weiter, zum Produkt P3 ab (4.1.6.). Die Produkte wurden in den verschiedenen Organen in unterschiedlichen Verhältnissen gebildet, wahrscheinlich aufgrund der unterschiedlich starken Expressionen der produktbildenden Enzyme in den jeweiligen Organen. In den Nierenhomogenaten wurden für alle drei Produkte starke Signale erhalten, von denen das Produkt P2 am schwächsten war. Das NEP-spezifische Produkt wurde im Homogenat und sowohl in der cytosolischen Fraktion, als auch in der Membranfraktion detektiert (4.1.2.). In den untersuchten Lungenproben wurden hingegen insgesamt sehr geringe Signale detektiert (4.1.3.). Das Produkt P2 wurde in der Lunge selbst in der cytosolischen Fraktion kaum gebildet (Abb. 10). Es scheint deshalb, dass das P2-produzierende Enzym in der Lunge nur in geringem Maße exprimiert wird. Die detektierte Menge von P1 in der Lunge (Abb. 10) betrug nur etwa ein Sechstel von dem, was in der Niere gemessen wurde (Abb. 9). Dieses Ergebnis war überraschend, da in den Lungen, ebenso wie in den Nieren, eine hohe NEP-Aktivität vorliegen sollte (Walther *et al.*, 2004). Die Signalstärke für P3 war hingegen doppelt so stark ausgeprägt, wie für P1 (Abb. 10). Dies deutet darauf hin, dass das P3-produzierende Enzym in der Lunge stark exprimiert wird. Da durch hohe Mengen des P3-

bildenen Enzyms ein schneller Abbau des NEP-spezifischen Produktes P1 stattfindet, erklärte dies die geringen Mengen an P1, die in den Proben aus der Lunge detektiert wurden. Dass auch P3 absolut gesehen nicht in hohen Mengen detektiert wurde, könnte auf ein weiteres Enzym hindeuten, das P3 abbauen kann. Da im untersuchten Bereich keine weiteren Produktsignale gefunden wurden, sollte der zu untersuchende Bereich vergrößert werden, um diese Hypothese zu überprüfen. Zusätzlich sollte der Abbau des Substratsignals im Absorptionschromatogramm gemessen und mit dem Abbau in der Niere verglichen werden.

Im Gegensatz zu den Proben aus Niere und Lunge wurden bei der Untersuchung der Membranfraktionen von Hoden und Cerebellum erhöhte Mengen an P2 gefunden (Abb. 11). Insbesondere das Cerebellum ist ein sehr fettreiches Gewebe. Da keine Seifen bei der Herstellung der Membranfraktion verwendet wurden, um die Membranfragmente vor der Trennung nicht zu solubilisieren, war eine vollständige Abtrennung schwierig. In weiteren Versuchen könnten weitere Waschschriffe eingeführt werden, um zu überprüfen, ob die Menge an P2 dadurch verringert werden kann. Es ist jedoch auch möglich, dass das P2-bildende Enzym in einigen Gewebearten auch in einer membrangebundenen Form vorliegt, oder dass ein weiteres membrangebundenes Enzym, das in Cerebellum und Hoden exprimiert wird, die Produktbildungsreaktion von P2 ebenfalls katalysieren kann. Die genaue Ursache sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.

Die generierten Ergebnisse zeigen, dass das in der Literatur beschriebene Substrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp aufgrund der unerwünschten Produktbildungsreaktionen nicht verwendet werden kann. Der Abbau des Substrates durch ein unbekanntes Enzym, schließt den Einsatz im Mikrotiterplatten-Lesegerät aus, da eine hohe Hintergrundfluoreszenz erhalten würde. Durch diese könnten Abweichungen in der Bildung des NEP-spezifischen Produktes verdeckt werden. Da zusätzlich das NEP-spezifische Produkt von einem weiteren Enzym abgebaut wird, ist auch eine Quantifizierung nach chromatographischer Auftrennung des Probengemisches nicht ohne weiteres möglich. Es ist nicht bekannt, ob das Produkt P3 weiter abgebaut wird, die in der Lunge erhaltenen Ergebnisse deuteten jedoch zumindest darauf hin, dass es in diesem Organ ein rascher Abbau stattfinden könnte. Eine Quantifizierung der Produkte wäre damit nicht möglich.

Es sollte deshalb versucht werden, ob Veränderungen des Substrates, die die Angriffspunkte der unbekanntes Enzyme ausschalten, zu einem verbesserten Substrat führen, das für fluorimetrische Messungen im Mikrotiterplatten-Lesegerät verwendet werden kann. Durch die Aufklärung der Strukturen der gebildeten Produkte (4.1.5.) konnte ein geeigneter Angriffspunkt identifiziert werden. Das erste Arginin in C-terminaler Richtung, befindet sich für NEP in der P2-Position, für die beiden unbekanntes Enzyme jedoch in P1- bzw. - P1'-Position – ist bei diesen also direkt an der Hydrolyseungsreaktion beteiligt. Eine

Veränderung an diesem Punkt erschien vielversprechend, um die Reaktivität der unbekanntenen Enzyme negativ zu beeinflussen, gleichzeitig aber nur einen geringen Einfluss auf die Reaktivität von NEP auszuüben.

### **5.1.2. Validierung der Reaktivitäten der veränderten Substrate**

Die erste Veränderung die vorgenommen wurde, war eine Konfigurationsänderung der besagten Aminosäure von der L- in die D-Form. Da die meisten Enzyme nicht in der Lage sind Aminosäuren in der D-Konfiguration zu erkennen, war dies der offensichtlichste Weg, um die unerwünschten Reaktionen zu unterdrücken. Die Untersuchungen der Reaktivität des veränderten Substrates deuteten darauf hin, dass die beiden Nebenreaktionen unterdrückt wurden und nur NEP das veränderte Substrat abbauen konnte (4.1.7.). Allerdings war die Reaktionsgeschwindigkeit sehr stark vermindert (Abb. 16), was vermutlich darauf zurückgeführt werden kann, dass die gesamte Struktur des Peptids durch die Konfigurationsänderung ebenfalls verändert wurde. Dadurch könnten z.B. stabilisierende Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und NEP mit dem veränderten Substrat schwächer ausgeprägt, oder gar nicht mehr vorhanden gewesen sein. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse des Substrats mit D-Arginin durch NEP war dadurch so stark vermindert, dass es für die NEP-Aktivitätsmessung nicht geeignet ist.

Um starke strukturelle Änderungen des Substratmoleküls zu vermeiden, wurde ein weniger drastischer Ansatz gewählt, bei dem ein Arg gegen Agp ausgetauscht wurde (4.1.8.), eine nicht natürlich vorkommende Aminosäure, die dem Arginin ähnlich ist (Abb. 17). Bei dieser Änderung wird keine Strukturänderung des Substratmoleküls erwartet, die Enzyme können jedoch durch die veränderte Aminosäure möglicherweise für die Hydrolyse benötigte Wechselwirkungen nicht mehr aufbauen. Die Versuche zeigten, dass es durch diese Veränderung möglich war, die Produktbildung von P3 durch den Abbau des NEP-spezifischen Produktes P1 deutlich zu stören. In den Membranfraktionen fast aller untersuchten Organen wurde die Bildung von P3 komplett verhindert (4.1.8., 4.1.10), einzig in den Proben aus der Lunge konnte auch mit diesem Substrat noch immer ein Produktsignal detektiert werden (4.1.9.). Die Bildung des Produktes P2 wurde durch die Modifikation des Substratmoleküls hingegen nicht merklich beeinflusst. In allen untersuchten Organen, und ebenso in den Blutproben (4.1.10.), waren die gemessenen Produktkonzentrationen an P2 vergleichbar mit den Ergebnissen, die mit dem unveränderten Substrat erhalten wurden, oder nur wenig verringert. Das P2-produzierende Enzym ist also in der Lage, Agp genauso gut zu erkennen wie Arg. Es handelt sich vermutlich um ein Enzym, das ein breiteres Substratspektrum erkennen kann.

Da in der Niere P3 nicht mehr gebildet wurde, war das NEP-spezifische Produktsignal im Homogenat und in der Membranfraktion um den entsprechenden Betrag erhöht. In der cytosolischen Fraktion kam es hingegen zu keiner Veränderung, da das P3-bildende Enzym dort nicht vorliegt (4.1.8.). Die stärkste Veränderung trat in den Proben aus der Lunge auf. Hier entsprach die Signalfäche des NEP-spezifischen Signals P1, das aus dem neuen Substrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp erhalten wurde, nicht der Summe der Signalfächen P1 und P3, die aus dem Ursprungssubstrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp entstanden waren. Dies war in allen anderen Organen der Fall (4.1.8., 4.1.10.). In den Proben der Lunge war die Signalfäche mit dem neuen Substrat um ein vielfaches höher (4.1.9.). Daraus konnte nun abgeleitet werden, dass in den Lungen, ebenso wie in den Nieren, eine sehr hohe NEP-Aktivität vorliegt, was den Erwartungen entspricht (Walther *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass in den Lungen das NEP-spezifische Produkt P1, das aus dem Ursprungssubstrat erhalten wurde, rasch durch das in hohen Mengen vorliegende P3-produzierende Enzym abgebaut wurde (4.1.3.). Aufgrund der hohen Menge des P3-produzierenden Enzyms in der Lunge, wurde das Produkt P3 in der Membranfraktion, in der das Enzym konzentriert vorliegt, noch immer gebildet (Abb. 19 C). Es spricht auch dafür, dass in den Lungen das aus dem Ursprungssubstrat entstandene Produkt P3 eventuell noch weiter umgesetzt wird. Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass in den Lungen ein weiteres Enzym in der Lage ist, P1 zu einem unbekanntem Produkt abzubauen, das durch die Änderung von Arg in Agp ebenfalls gehemmt wurde. In der Lunge sollten weitere Studien mit den Substraten und mit dem NEP-spezifischen Produkt durchgeführt werden, um die Reaktionswege weiter aufzuklären. Dazu sollten auch längere Retentionszeiten und größere Acetonitril-Gradienten eingesetzt und Absorptionschromatogramme in die Betrachtung mit einbezogen werden.

Da für die Suche nach NEP-Aktivierenden Substanzen Versuche in Zellkulturansätzen durchgeführt werden sollten, wurden die beiden Substrate außerdem mit den Zellmembranen der Zelllinien HDMEC und SK-N-SH umgesetzt (4.1.11.). Bei der Inkubation mit dem Ursprungssubstrat wurden in beiden Zelllinien die Produkte P1, P2 und P3 gefunden (Abb. 22). Wie in den Organen, mit Ausnahme der Lunge, konnte die Bildung des Produkts P3 durch das neue Substrat verhindert werden (Abb. 23). Es entstand jedoch mit beiden Substraten ein viertes Produkt, das in keiner der untersuchten Gewebearten detektiert worden war (4.1.11.). Es ist bislang unklar, ob das Enzym, das für diese Produktbildung zuständig ist, in den Zellen gebildet wird, oder aus dem Medium stammt. Zukünftige Versuche, bei denen die Substrate mit dem Medium und FCS inkubiert werden, sollten diese Frage beantworten können.

Das modifizierte Substrat mit der artifiziellen Aminosäure ist somit noch immer nicht universell für die Messung der NEP-Aktivität einsetzbar. Eine Bestimmung der NEP-Aktivität

im Blut ist aufgrund der sehr geringen Produktbildung und der Bildung des unerwünschten Produkts P2 nicht möglich (Abb. 21). Es sollte jedoch möglich sein, in Membranpräparationen verschiedener Organe die Aktivität zu bestimmen. Dabei ist jedoch eine sehr sorgfältige Abtrennung der cytosolischen Fraktion notwendig, um das P2-produzierende Enzym zu entfernen. Die Membranfraktion sollte am besten mit 50 mM Tris gewaschen werden, um sicherzustellen, dass keine Reste der cytosolischen Fraktion verbleiben. Es dürfen außerdem nur die Organe verwendet werden, die keine hohen Konzentrationen des P3-bildenden Enzyms aufweisen, was die Lunge ausschließt. Jede Probe sollte dreifach bestimmt werden, und mit Candoxatrilat-gehemmten Proben verglichen werden. Um das Substrat aber universell nutzen zu können, wäre es notwendig, die Identität der unbekanntem Enzyme durch weitere Inhibitorstudien zu identifizieren. Es könnten dann die entsprechenden spezifischen Inhibitoren im Testsystem eingesetzt werden. Solche Inhibitorstudien sind zwar sehr aufwändig, erscheinen aber lohnenswert, um das Substrat für große Versuchsansätze verwenden zu können.

## **5.2. Generierung neuer transgener Mausmodelle**

Von unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe des NEP-Inhibitors Candoxatril, der nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, in Mäusen eine Gewichtszunahme induziert werden kann (Becker *et al.*, 2010). Um den Einfluss von NEP auf die Regulation der Nahrungsaufnahme und der Gewichtsentwicklung weiter untersuchen zu können, sollten transgene Mausmodelle geschaffen werden, die NEP regional überexprimieren können. Ebenso wie in dem pharmakologischen Ansatz zur Inhibition, sollte auch in den transgenen Mausmodellen zwischen neuronal lokalisiertem NEP und peripherem NEP diskriminiert werden. Da nicht bekannt ist, welcher Bereich der Peripherie entscheidend für den Einfluss von NEP auf die Nahrungsaufnahme ist, wurde ein möglichst weit gefasster Ansatz gewählt, indem die Überexpression in Endothelzellen erreicht werden sollte.

Um die transgenen Tiere generieren zu lassen, wurde ein DNA-Konstrukt benötigt, das aus dem gewünschten Promotor zur gewebespezifischen Expression, der kodierenden Sequenz, und einer Polyadenylierungssequenz bestehen muss. Im Fall des Konstrukts zur endothel-spezifischen Überexpression war zusätzlich ein transkriptionsverstärkendes „Enhancer“-Fragment notwendig. Über eine DNA-Mikroinjektion des Genkonstrukts in den Vorkern einer befruchteten Eizelle wurden die transgenen Tiere hergestellt (Gordon *et al.*, 1980).

### 5.2.1. Generierung des Mausmodells mit neuronaler Überexpression

Die Klonierung des neuronspezifischen Konstrukts konnte durch einen Austausch des universellen CMV-Promotors gegen den neuronspezifischen NSE-Promotor (Forss-Petter *et al.*, 1990) erzielt werden (4.2.1.1.). Genutzt wurde ein bereits im Labor vorhandenes Plasmid zur Expression von NEP, das auf dem pcDNA3.1(+)-Vektor basierte. Nach der Fertigstellung des Konstrukts wurde dessen Spezifität in der Zelllinie Neuro-2a überprüft, da in dieser Zelllinie eine hohe Transfektionseffizienz erzielt werden konnte (4.2.1.2.). Ein erstes Konstrukt zeigte nicht die erwünschte Spezifität, was vermutlich an einem bei der Klonierung entstandenen zusätzlichen Startsignals lag, das kurz vor dem eigentlichen NEP-Startsignal lokalisiert war (Abb. 30). Dieses konnte durch eine zielgerichtete Mutation zerstört werden (4.2.1.3.). Im Zellkulturversuch konnte mit dem veränderten Konstrukt neuronspezifische NEP-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 31). Es wurde allerdings nur eine geringe Erhöhung der NEP-Aktivität erreicht. Da aber NEP ein Enzym mit sehr vielen Substraten ist, kann eine Überexpression zu Veränderungen in vielen Regulationssystemen des Organismus führen. In NEP-defizienten Mäusen wurde z.B. gezeigt, dass diese Tiere ein besseres Lern- und Erinnerungsvermögen aufwiesen als ihre wildtypischen Geschwistertiere (Walther *et al.*, 2009). Auch verringerte Mengen diverser Neuropeptide wie z.B. der Enkephaline und Substanz P (Skidgel *et al.*, 1984), die das Schmerzempfinden beeinflussen, könnten sich bei einer Überexpression negativ auswirken. Da eine Überexpression von NEP im Gehirn demnach vielfältige Konsequenzen nach sich ziehen könnte, war eine eher schwache Überexpression erwünscht. So sollten Veränderungen, die bei hoher Überexpression möglicherweise sogar die Lebensfähigkeit der Tiere beeinträchtigen könnten, minimiert werden.

Nach der DNA-Injektion zur Generierung der transgenen Tiere konnten mehrere Founder beiderlei Geschlechts mittels PCR-Genotypisierung identifiziert werden (4.2.1.4.), deren Nachwuchs das Transgen ebenfalls aufwies. Die Untersuchung der NEP-Aktivität in Gehirnen und Nieren der F1-Tiere (4.2.1.5.) zeigte sich jedoch, dass trotz der Integration der Konstrukt-DNA, keiner der potentiellen Founder eine erhöhte NEP-Aktivität aufwies, weder im Gehirn (Abb. 34), noch in der Niere (Abb. 35). Die Gründe hierfür sind unklar. Möglicherweise war die mit dem Konstrukt zu erzeugende Überexpression schlicht zu gering, um detektiert werden zu können. Da das Gehirn nicht nur aus Neuronen, sondern z.B. auch aus Gliazellen besteht, wurde die Anzahl der überexprimierenden Zellen weiter verringert. Es ist auch möglich, dass die Expression des Transgens in den Neuronen durch diese anderen Zelltypen negativ beeinflusst wurde. In der Erstbeschreibung zur NSE-

kontrollierten Überexpression von Forss-Petter und Kollegen konnte eine Überexpression nur erzielt werden, wenn das Transgen in einer geringen Kopienzahl ins Chromosom integriert war (Forss-Petter *et al.*, 1990). Es wäre möglich, dass bei den erhaltenen Tieren die DNA oft integriert war, und dies, wie bei Forss-Peter, eine Expression des Transgens verhindert hat. Die Häufigkeit der Integration der DNA in den Tieren wurde im Rahmen der Arbeit jedoch nicht überprüft. Aufgrund der nicht nachweisbaren Erhöhung der NEP-Aktivität waren die Tiere für weitere Versuche nicht zu gebrauchen.

Es wurde mittlerweile eine kommerziell erhältliche Mauslinie von Jackson Laboratories bezogen (Leissring *et al.*, 2003), die für zukünftige Untersuchungen zur Verfügung stehen werden. Da die Tiere bislang nur gezüchtet werden konnten, um eine ausreichende Menge an Tieren für spätere Versuche zur Verfügung zu haben, konnten mit diesen Tieren bislang noch keine Versuche gestartet werden. Äußerlich zeigten die Tiere jedoch keine Auffälligkeiten. Das Körpergewicht zwischen den bereits vorhandenen transgenen Tieren und ihren wildtypischen Geschwistern wurde mehrmals verglichen, und dabei zeigte sich bei Tieren bis zu einem Alter von 14 Monaten weder bei den Männchen, noch bei den Weibchen ein Gewichtsunterschied.

### **5.2.2. Generierung des Mausmodells mit endothelialer Überexpression**

Die Klonierung des Konstrukts für die endotheliale Überexpression war wesentlich aufwendiger. Es sollten dazu der Promotor und Enhancer von Tie2 verwendet werden (Schlaeger *et al.*, 1997). Um dies zu ermöglichen, mussten Fragmente des Enhancers, teilweise mehrfach, zwischenkloniert werden, bis das gesamte Konstrukt, bestehend aus Tie2-Promotor, der NEP-kodierenden Sequenz, der Polyadenylierungssequenz und dem Tie2-Enhancer erstellt werden konnte (4.2.2.1, 4.2.2.2., 4.2.2.4). Da die Klonierung des Konstrukts mit dem vollständigen Enhancer sich als sehr schwierig erwies, wurde zuerst ein Konstrukt mit einem kürzeren Tie2-Enhancerfragment erstellt (4.2.2.3), das nach Schlaeger und Kollegen jedoch zu einer etwas weniger spezifischen Überexpression in Endothelzellen führt als mit dem vollständigen Enhancer erzielt werden kann (Schlaeger *et al.*, 1997). Letztlich konnten jedoch beide Konstrukte erfolgreich generiert werden.

In den Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass in COS-Zellen mit beiden Konstrukten keine unspezifische NEP-Aktivität auftrat (Abb. 43). Bei der Transfektion von Endothelzellen mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Ursprungssubstrat von Prof. Sato stellte sich heraus, dass die in unserem Labor genutzten Zelllinien entweder gar nicht oder



nur zu einem geringen Teil in der Lage waren, das Enzym unter der Kontrolle des Tie2-Promotors und Enhancers zu exprimieren (4.2.2.6). Nur in den PAEC-Zellen konnte eine akzeptable Transfektionrate erzielt werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die von uns verwendeten Zelllinien keine reinen Endothelzelllinien mehr sind. Vielmehr scheint nur noch ein geringer Anteil reiner Endothelzellen vorhanden zu sein, während die restlichen Zellen ihre Spezifität in der Zellkultur verändert haben.

Die NEP-Aktivitätsmessung in den PAEC-Zellen, die mit den beiden neu generierten DNA-Plasmiden transfiziert worden waren, um deren Spezifität zu evaluieren, zeigte sowohl für das Konstrukt mit dem kompletten, als auch mit dem verkürzten Enhancer eine Erhöhung der NEP-Aktivität (Abb. 45). Die geringe Aktivitätssteigerung die detektiert wurde, war in diesem Fall auch auf die oben genannte geringe Expression Tie2-kontrollierter Proteine in der Mischkultur der transfizierten Zelllinie zurückzuführen. Da die beiden erstellten Konstrukte zu einer etwa gleich starken NEP-Expression führten, wurde das Konstrukt mit dem kompletten Enhancer ausgewählt um die Tiere generieren zu lassen (4.2.2.7.), da es eine höhere Spezifität aufweisen sollte als das Konstrukt mit dem verkürzten Enhancer (Schlaeger *et al.*, 1997).

Bei diesem Projekt konnten nur sehr wenige Founder-Tiere erhalten werden (4.2.2.8.), die anschließend umgehend verpaart wurden. Von den insgesamt jeweils zwei transgenen Männchen und Weibchen, verstarb bereits ein Weibchen nach wenigen Wochen und ein Männchen nach ca. 4 Monaten, bevor von diesem Tier Nachkommen erhalten werden konnte. Auch die anderen beiden Tiere waren nach über einem Jahr nicht in der Lage Nachwuchs zu zeugen.

Der frühe Tod zweier transgener Tiere deutet darauf hin, dass sich die endotheliale Überexpression während der Entwicklung der Tiere schädlich auf diese auswirkt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass durch die erhöhte NEP-Aktivität die vasodilatatorisch wirkenden NEP-Substrate ANP (Kanazawa *et al.*, 1992; Thompson und Morice, 1996) und Bradykinin (Campbell, 2000) verstärkt abgebaut werden. Dies kann zu einem stark erhöhten Blutdruck führen, der in fatalen Endorganschädigungen enden kann. Verringerte Mengen an Bradykinin könnten sich auch negativ auf die Fertilität der Männchen auswirken (Schill und Miska, 1992) und könnte durch die veränderten Signalwege zu weiteren pathologischen Phänotypen, wie beispielsweise Schädigungen an der Niere führen. Bei Mäusen denen der Bradykinin-Rezeptor B2 fehlt, wurde z.B. eine verstärkte diabetische Nephropathie beschrieben (Kakoki *et al.*, 2004). Ob die Schädigung geschlechtsspezifisch unterschiedlich stark ausfällt ist aufgrund der geringen Anzahl der beobachteten transgenen Tiere ungewiss. Es sollte zukünftig ein Mausmodell mit induzierbarer NEP-Überexpression generiert werden. Bei induzierbaren Systemen können die Promotoren zu einem beliebigen Zeitpunkt durch chemische Substanzen aktiviert werden. Bekannte Beispiele sind das Tetracyclin-

induzierbare (tet-)System (Gossen und Bujard, 1992) und das Cre/loxP-System, das z.B. mit Tamoxifen aktiviert wird (Nagy, 2000). Durch die steuerbare Überexpression können Schädigungen in der Entwicklungsphase der Tiere vermieden werden. In einem solchen Modell kann untersucht werden, ob eine Erhöhung der Aktivität in einem späteren Lebensabschnitt ebenfalls schädliche Auswirkungen auf den Organismus haben kann.

### **5.3. Versuche zur Stimulation von NEP**

Die Modulation von NEP ist in den vergangenen Jahren zu einem intensiv bearbeiteten Thema und NEP zu einem wichtigen therapeutischen Target geworden. Hauptursache für das enorme Interesse an der NEP-Modulation ist die katabolische Wirkung der NEP auf das Alzheimerpeptid  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ,  $A\beta$ 1-42 und  $A\beta$ 1-40) (Iwata *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2001; Iwata *et al.*, 2005). Modulationen über die Beeinflussung der RNA-Expression sind zweifellos bei allen Peptidasen in beide Richtungen (Aktivierungen und Hemmungen) möglich. Auf der posttranslationalen Ebene der Proteine gibt es zwar prinzipiell für jedes Enzym Möglichkeiten zur Hemmung (kompetitive-, nichtkompetitive- und allosterische Hemmungen), aber es sind bisher nur relativ wenige Fälle von direkten Enzymaktivierungen bekannt. Alle derartigen Fälle sind allosterische Aktivierungen, d.h. die Interaktion des Wirkstoffes erfolgt nicht am aktiven Zentrum, sondern an einer anderen Stelle des Enzyms (dem allosterischen Zentrum). Dabei wird die Konformation des Enzyms so verändert, dass die Bindung des Substrats am aktiven Zentrum erleichtert wird (allosterische Förderung). In den letzten Jahren konnte das Verständnis der Allosterie stark erweitert werden, doch eine zielgerichtete Suche nach allosterischen Modulatoren ist bislang nicht möglich (Goodey und Benkovic, 2008). Die Nutzung von Hochdurchsatz-Ansätzen („High-Throughput-Screenings“ = HTS) in der Peptidase-Forschung wurde bisher fast ausschließlich zur Auffindung von Enzym-Inhibitoren genutzt (Liu *et al.*, 2005; Coppola *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2008; Tatham und Hay, 2009). Eine sehr prominente Ausnahme von dieser Regel ist die Auffindung von allosterisch wirkenden, aktivierenden kleinen Molekülen (= „Small-Molecules“) für das  $A\beta$ -abbauende „Insulin-Degrading Enzyme“ (IDE) durch ein Screening mit 32.000 Verbindungen (Cabrol *et al.*, 2009). HTS-Experimente zur Auffindung von NEP-Aktivatoren sind bisher nicht bekannt und wurden deshalb in Kooperation mit Dr. Wolf Siems am FMP, Berlin-Buch durchgeführt. Dabei wurde zum einen ein Ansatz gewählt, bei dem Nierenmembranen mit den Substanzen der Substanzbibliothek stimuliert wurden. Durch diesen Ansatz kann man ausschließlich allosterisch wirksame NEP-Aktivatoren identifizieren. Im zweiten Ansatz wurden SK-N-SH-Zellen für 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert, bevor die NEP-

Aktivitäten ermittelt wurden, um Substanzen zu identifizieren, die die Quantitäten von NEP auf mRNA oder Proteinebene erhöhen. Vor Beginn jener Screening-Experimente wurde der qualitätsbestimmende „Z-Faktor“ für HTS-Experimente bestimmt (Zhang *et al.*, 1999) und darüber aus den jeweils 19.839 getesteten Substanzen insgesamt 21 Substanzen aus beiden Ansätzen identifiziert, die zu einem um mindestens 30% erhöhten Anstieg der NEP-Aktivität führten. Auffallend viele der identifizierten Substanzen aus beiden Ansätzen wiesen dabei den in Abb. 74 gezeigten Strukturbaustein auf, der möglicherweise als grobe Leitstruktur für NEP-aktivierende Substanzen angesehen werden kann.

**Abb. 74 Gemeinsamer Strukturbaustein vieler im HTS gefundenen Substanzen.**

Entscheidend für die Wirksamkeit einer Verbindung mit NEP-aktivierender Funktion kann jedoch nicht alleine das Ergebnis des HTS sein, denn dieser Ansatz ist ausschließlich darauf ausgerichtet, aus einer extrem großen Zahl von Verbindungen Kandidaten für eine

weitere Evaluierung und Optimierung zu selektieren. Dementsprechend wurden in einem ersten Schritt die sieben Substanzen mit dem höchsten Aktivierungspotential im HTS ausgesucht, um mit ihnen Zellkulturexperimente durchzuführen. Von diesen sieben Substanzen wurden drei aus dem Ansatz mit den Nierenmembranen und vier aus dem Ansatz auf den lebenden Zellen erhalten.

Zusätzlich wurden Substanzen untersucht, die in der Literatur als NEP-aktivierend beschrieben wurden. Das war zum Einen GTE (Melzig und Janka, 2003), dessen Wirkung ebenso evaluiert wurde, wie die seiner Bestandteile, die bei einer chromatographischen Auftrennung des GTE erhalten wurden. Zum anderen der PPAR $\delta$ -Agonist GW0742, für den im Hippocampus eine Erhöhung der NEP-mRNA-Expression beschrieben wurde (Kalinin *et al.*, 2009).

Während die Stimulation von GW0742 bislang nur in SK-N-SH-Zellen evaluiert wurde, wurden die Stimulationsexperimente der anderen Substanzen in verschiedenen Zelllinien durchgeführt, um die unterschiedlichen Isoformen der NEP-mRNA zu berücksichtigen, die in den jeweiligen Zelllinien gebildet werden und der Kontrolle jeweils eigener Promotoren unterliegen (Belyaev *et al.*, 2009). Es wurde deshalb die Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-SH gewählt, die eine relativ hohe endogene NEP-Aktivität aufweist, und bereits von anderen Arbeitsgruppen bei der Suche NEP-aktivierender Substanzen verwendet wurde (Melzig und Escher, 2002; Yang *et al.*, 2008). Die verwendete Endothelzelllinie HDMEC hingegen exprimiert NEP nur in geringem Maße (Scholzen *et al.*, 2007). Erste Versuche wurden mit einer zweiten endothelialen Zelllinie begonnen. Dabei handelte es sich um BAEC-Zellen, die NEP ebenfalls schwach exprimieren.

### **5.3.1. Einfluss akuter Stimulation auf die NEP-Aktivität**

Da allosterische Effekte, die durch diesen Ansatz akuter Stimulation identifiziert werden sollten, unabhängig von der mRNA sind, sollten die Effekte bei akuter Stimulation jedoch unabhängig von der verwendeten Zelllinie auftreten.

In den Experimenten zur akuten Stimulation der neuronalen Zellen mit GTE wurden keine Änderungen der NEP-Aktivität gefunden. Weder der vollständige Extrakt, noch eine der daraus erhaltenen Fraktionen war in der Lage, die Aktivität in den SK-N-SH-Zellen zu steigern (Abb. 49). In den HDMEC-Zellen führten die Fraktionen 5 und 6 zu einer erhöhten Aktivität. Dies widerspricht der Annahme, dass ein allosterischer Effekt unabhängig von der verwendeten Zelllinie auftritt. Jedoch sind die Standardabweichungen der stimulierten SK-N-SH-Zellen stärker als in den HDMEC-Zellen. Da der Effekt nur wenige Prozent betrug (Abb. 53), könnte eine Stimulation der SK-N-SH-Zellen dadurch verdeckt sein. Es sollte überprüft werden, ob die Signifikanz bzw. Die fehlende Signifikanz auch bei weiteren Wiederholungen des Versuchs mit beiden Zelllinien bestätigt werden kann. Doch auch wenn dies der Fall sein sollte, wäre die erzielte Veränderung vermutlich zu gering, um einen therapeutischen Nutzen zu haben.

Für die im HTS identifizierten Substanzen hingegen wurde in den neuronalen Zellen mit Substanz 1 eine Erhöhung der NEP-Aktivität von ca. 25% erzielt (Abb. 59). Diese Substanz wurde aus dem Screening zur Identifikation allosterischer Aktivatoren erhalten. Erstaunlicherweise konnte der Effekt nicht in den HDMEC-Zellen reproduziert werden (Abb. 63). Das ist deshalb unerwartet, da für NEP auf Proteinebene nur eine mögliche Form des Enzyms bekannt ist. Für eine allosterische Modulation sollte deshalb kein Unterschied zwischen den verschiedenen Zelllinien auftreten. Das dies wider Erwarten eingetreten ist, könnte möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass in den HDMEC-Zellen andere Moleküle die Anlagerung an das allosterische Zentrum verhindern. Dies kann entweder durch eine direkte Blockierung des allosterischen Zentrums geschehen, oder dadurch, dass Substanz 1 eine höhere Affinität zu einem Molekül hat, das in den neuronalen Zellen nicht, oder in deutlich geringerer Konzentration auftritt. Weitere Versuche mit rekombinantem NEP und NEP-transfizierten Zellen oder primären Zellen könnten diese Frage klären.

### **5.3.2. Einfluss von GW0742 auf die NEP-Aktivität**

Der PPAR $\delta$ -Agonist GW0742 wurde zur Stimulation von SK-N-SH-Zellen verwendet, und führte nach 48 Stunden zu einer sehr hohen Aktivierung der NEP-Aktivität (4.3.1.). Die

Erhöhung war dabei wesentlich stärker, als die von Kalinin und Koautoren im Tierversuch beobachtete Veränderung (Kalinin *et al.*, 2009). Der dort beschriebene Effekt war jedoch bereits ausreichend, um eine Verringerung des Alzheimerpeptids A $\beta$  im Gehirn der Tiere zu bewirken. Mögliche Erklärungen für die unterschiedlich in den Befunden sind, dass nur ein kleiner Teil der eingesetzten Menge in den beschriebenen *in vivo*-Versuchen über den Magen-Darm-Trakt in den Blutkreislauf gelangen konnte und/oder dass die Substanz nur in geringen Mengen in den in der Lage war, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Untersuchungen des peripher exprimierten NEP wurden von Kalinin leider nicht beschrieben. In Zellkulturversuchen mit weiteren, insbesondere endothelialen Zelllinien, sollte diese Substanz weiter untersucht werden, die mRNA- und Proteinmengen sollten ebenfalls bestimmt werden. Falls auch in anderen Zelllinien starke Änderungen der Aktivität auftreten, könnte es interessant sein, die Auswirkungen der Stimulation mit GW0742 auf die Gewichtsentwicklung im Tierversuch zu beobachten.

### **5.3.3. Einfluss längerfristiger Stimulation von GTE und den daraus erhaltenen Fraktionen auf die NEP-Aktivität**

Bei den Experimenten zur längerfristigen Stimulation mit GTE konnte in den SK-N-SH-Zellen die von Melzig und Janka beschriebene Aktivitätssteigerung (Melzig und Janka, 2003) bestätigt werden (4.3.2.1). Es konnte eine Erhöhung der NEP-Aktivität erzielt werden, die nach 24 Stunden ca. 50% betrug (Abb. 50). Nach 96 Stunden war die Erhöhung allerdings bereits nicht mehr so stark ausgeprägt und betrug nur noch ca. 15% (Abb. 52). Die Untersuchung der NEP-mRNA zeigte nach 24-stündiger Stimulation mit GTE keine Veränderung. Die Erhöhung der Enzymaktivität kann damit nur auf posttranslationale Veränderungen zurückgeführt werden da allosterische Änderungen des Enzyms durch die Ergebnisse der akuten Stimulation (5.3.1.) ebenfalls ausgeschlossen werden können. Es wäre z.B. möglich, dass der Abbau von NEP durch GTE reduziert wurde und/oder der Transport in die Zellmembranen verbessert wird. Um zu überprüfen, ob die erhöhte NEP-Aktivität mit einer Erhöhung der Proteinmenge einhergeht, sollte eine Western Blot-Analyse durchgeführt werden. Durch die Behandlung mit GTE wurde zusätzlich die Zahl der neuronalen Zellen beeinflusst. Es kam dabei zu einer Verringerung der Zellzahl, wobei auch dieser Effekt nach 24 Stunden stärker ausgeprägt war als nach 96 Stunden (4.3.2.1.). Die beobachtete Verringerung der Zellzahl kann beim Einsatz von GTE zur Therapie problematisch sein. Es sollte evaluiert werden, ob das Wachstum der Zellen verlangsamt wird, oder ob GTE toxisch auf bestimmte Zellen wirkt. Dass die Reduktion der Zellzahl nach

96 Stunden weniger stark ausgeprägt ist, deutet allerdings darauf hin dass GTE nicht toxisch ist. Nach einiger Zeit scheint eine Gegenregulation zum GTE-vermittelten Effekt einzusetzen. Es kann überprüft ob der GTE-Effekt der in der Verringerung der Zellzahl resultiert, länger als 24 Stunden anhält oder in diesem Zeitraum durch gegenregulatorische Effekte komplett aufgehoben wird. Dazu könnten Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GTE in zwei Ansätze aufgeteilt werden, wobei in einem Ansatz die Zellen weiter mit GTE stimuliert werden, während im zweiten Ansatz die Zellen in normalem Wachstumsmedium kultiviert werden. In einem dritten Ansatz wird die gleiche Anzahl an Zellen ausgesät wie in den beiden Ansätzen zuvor, diese Zellen wurden jedoch zuvor nicht mit GTE stimuliert.

Bei der Untersuchung der Endothelzellen zeigten die beiden Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse. In den BAEC-Zellen konnte nach 24 Stunden eine Erhöhung der NEP-Aktivität erzielt werden (Abb. 57), die mit 30% jedoch ein wenig geringer ausfiel als die Erhöhung in den SK-N-SH-Zellen (Abb. 50). Möglicherweise kann dies mit der geringeren endogenen NEP-Menge erklärt werden. Die beteiligten Reaktionspartner, die für die zu der Erhöhung der NEP-Aktivität führen treffen weniger häufig aufeinander, und können demnach seltener zum stimulierenden Effekt führen. Da noch keine Ergebnisse zur Aktivität nach 96 Stunden oder für die NEP-mRNA-Mengen vorliegen, sollte dies bald untersucht werden. In den HDMEC-Zellen hingegen war die Aktivität nach 24 Stunden signifikant verringert (Abb. 54). Die mRNA-Expression von NEP war nach 24-stündiger Stimulation nicht verändert (Abb. 55). Diese posttranslationale Dysregulation kommt möglicherweise durch Störungen von Transportprozessen oder Prozessen bei der Reifung des Enzyms zustande. Auch eine Aktivierung Nephilysin-abbauender Enzyme kann nicht ausgeschlossen werden. Nach 96 Stunden war die NEP-Aktivität der HDMEC-Zellen wieder im Bereich der Kontrollzellen (Abb. 56), was erneut darauf hindeutet, dass zumindest einige Effekte des GTE durch gegenregulatorische Prozesse innerhalb der Zellen langfristig neutralisiert werden können. In Endothelzelllinien wurde, im Gegensatz zu den neuronalen SK-N-SH-Zellen, weder nach 24 noch nach 96 Stunden ein signifikanter Einfluss auf die Anzahl der Zellen festgestellt. Die Prozesse, die in den HDMEC-Zellen zur Reduktion der NEP-Aktivität führen, sind demnach einigermaßen zielgerichtet und vermindern posttranslationale Modifikationen nicht im Allgemeinen.

Bei der Stimulation mit den Fraktionen aus dem GTE, zeigte Fraktion 1 in den SK-N-SH Zellen weder nach 24 Stunden noch nach 96 Stunden eine erhöhte NEP-Aktivität, obwohl eine erhöhte NEP-mRNA-Expression gemessen wurde (4.3.2.1.). Anscheinend führt die erhöhte mRNA-Expression jedoch nicht zu einer verstärkten Translation. Es ist auch möglich, dass mehr NEP translatiert wird, aber in den folgenden Prozessen, also der Proteinreifung und dem Transport zu den Membranen Störungen auftreten.

In den HDMEC-Zellen führte die Fraktionen 2 und 3 nach 24-stündiger Stimulationen sowohl zu einer Verringerung der NEP-Aktivität (Abb. 54), als auch zu einer Verringerung der mRNA-Expression (Abb. 55). Fraktion 2 verringerte nach 24 Stunden auch die NEP-Aktivität in BAEC-Zellen. Die Substanzen könnten in der Zelle Signalwege initiieren, die zu einer verringerten Transkription führt, oder selbst in den Zellkern vordringen und die Synthese der RNA blockieren.

Mit Fraktion 4 konnte nach 24 Stunden sowohl in den SK-N-SH-Zellen, als auch in den BAEC-Zellen eine erhöhte NEP-Aktivität gemessen werden. Auch die mRNA war in SK-N-SH-Zellen erhöht. Nach 96 Stunden, ließ sich jedoch keine Erhöhung der NEP-Aktivität in den SK-N-SH-Zellen mehr finden. Diese Fraktion könnte damit an der Erhöhung durch den GTE beteiligt sein. Eine Gegenregulation scheint eine langandauernde Stimulation mit dieser Substanz jedoch zu verhindern.

In den anderen Fraktionen treten gegensätzliche Effekte in den einzelnen Zelllinien auf. Um außer Fraktion 4 weitere Fraktionen zu ermitteln, die an der Aktivitätserhöhung durch GTE beteiligt sind, könnten weitere Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen der Fraktionen durchgeführt werden. Möglicherweise ist es aber auch notwendig, Substanzen die im Grünen Tee enthalten sind, miteinander zu kombinieren, um den aktivierenden Effekt zu erhalten. Es ist allerdings davon auszugehen, dass auch die Fraktionen keine Reinsubstanzen enthalten, sondern bei der chromatographischen Auftrennung Stoffgemische entstanden sind. Ebenso wie verschiedene Substanzen gemeinsam zu einer Aktivierung führen können, ist es auch denkbar, dass bei Kombination anderer Substanzen, wie sie in den Fraktionen vorhanden sein könnten, aktivierende Effekte verringert werden. Es könnte deshalb sinnvoll sein, aufzuklären welche Substanz hauptsächlich in den jeweiligen Fraktionen vorliegt, um die Reinsubstanzen zur Zellstimulation einzusetzen und die Stimulation mit der jeweiligen Fraktion zu vergleichen.

#### **5.3.4. Einfluss längerfristiger Stimulation mit den Substanzen aus dem HTS auf die NEP-Aktivität**

Bei den Stimulationsexperimenten mit den in den HTS ermittelten Substanzen (4.3.3.), zeigten die Substanzen 1 bis 3, die als potentielle allosterische Aktivatoren ermittelt wurden, in den BAEC-Zellen nach 24-stündiger Stimulation einen NEP-aktivierenden Effekt (Abb. 67). In den SK-N-SH-Zellen hingegen war die Aktivität nach 24 und auch nach 96 Stunden stark verringert (Abb. 60). Bei den SK-N-SH-Zellen ging die Behandlung mit den Substanzen 1 bis 3 nach 24 Stunden mit einer Verdoppelung der Zellzahl einher, während in den

Endothelzelllinien keine Veränderungen auftraten. Nur Substanz 1 führte in den SK-N-SH-Zellen zu einer Erhöhung der NEP-mRNA (Abb. 61). Aufgrund des Ergebnisses der qRT-PCR, scheint es möglich, dass die als allosterischer Aktivator identifizierte Substanz 1, NEP zusätzlich auf RNA-Ebene regulieren kann. Dementsprechend sollte die Wirkung von Substanz 1 in zukünftigen Untersuchungen weiter evaluiert werden.

Bei den Substanzen 4 bis 7, die im HTS mit lebenden Zellen nach 24-stündiger Stimulation ermittelt wurden, erscheint insbesondere Substanz 7 interessant zu sein. Zwar zeigte sich in den SK-N-SH-Zellen eine Verringerung der NEP-Aktivität nach 24 Stunden (Abb. 60), dafür konnte jedoch in den BAEC-Zellen (Abb. 67) eine signifikante Aktivitätserhöhung gemessen werden. In den HDMEC-Zellen deutet sich sowohl eine erhöhte NEP-Aktivität (Abb. 64) als auch eine erhöhte NEP-mRNA-Expression an, beide sind jedoch nicht signifikant (Abb. 65). In den Endothelzellen war die Zellzahl nicht verändert. Bei der Aktivierung von NEP zu Therapie Zwecken ist es sinnvoll zwischen der Aktivierung von neuronalem und peripherem NEP zu unterscheiden um bestimmte Erkrankungen gezielt zu behandeln. Da peripheres NEP an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt ist (Becker *et al.*, 2010) erscheint durch die Stimulation von peripherem NEP eine gezielte Behandlung der Adipositas möglich (siehe auch 5.4). Unerwünschte Nebeneffekte durch den Abbau von Signalpeptiden im Gehirn, wie z.B. Galanin und GLP-1 (Walther *et al.*, 2009) können dabei mit selektiv wirksamen Aktivatoren ausgeschlossen werden. Deswegen erscheint diese Substanz spannend und sollte weiter untersucht werden.

Sowohl Substanz 1, als auch Substanz 7 besitzen die in Abb. 74 gezeigte Grundstruktur. Beide haben zu einer Erhöhung der NEP-mRNA geführt, allerdings jeweils nur in einer Zelllinie. Die beiden anderen Substanzen mit dieser Struktur, Substanz 2 und 5, zeigten hingegen bisher widersprüchliche Resultate. Auch wenn die Strukturübereinstimmung durchaus eine zufällige sein könnte, sollte die Struktur bei der Identifizierung weiterer NEP-aktivierender Substanzen berücksichtigt werden.

Sowohl bei den Versuchen zum GTE, als auch mit den im HTS identifizierten Substanzen, zeigten sich sehr große Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Es kann offensichtlich nicht aus den Ergebnissen einer einzelnen Zelllinie, auf die Auswirkungen eines bestimmten Zelltypen oder gar eines ganzen Organismus geschlossen werden. Andere Arbeitsgruppen beschrieben ebenfalls sehr unterschiedliche Effekte bei der Stimulation von NEP in Abhängigkeit von der endogenen NEP-Expression der untersuchten Zelllinien (Belyaev *et al.*, 2009). Es erscheint sinnvoll, weitere Zelllinien zu untersuchen und letztlich mit aussichtsreichen Kandidaten Versuche am Tiermodell durchzuführen. Besonders geeignet wären primäre Nieren- und Dünndarmzelllinien, da eine Erhöhung der NEP-Aktivität in diesen Geweben mit einer Verringerung des Körpergewichts im Tierversuch einher gingen (siehe 4.4 und 5.4) Die Methode an sich könnte verbessert werden, wenn es



gelänge die Zellzahl in den selben Kavitäten zu ermitteln, in denen die NEP-Aktivität gemessen wird und, im Idealfall, auch noch die mRNA- und Proteinmenge.

#### **5.4. Einfluss von GTE auf die Gewichtsentwicklung in Mäusen**

Übergewicht und Adipositas sind in den letzten Jahrzehnten weltweit stark angestiegen, und betrafen im Jahr 2008 schätzungsweise 35% der Weltbevölkerung. Übermäßige Fettakkumulation gilt somit als eines der bedeutendsten Gesundheitsprobleme mit pandemischem Ausmaß (Swinburn *et al.*, 2011). Für die Bevölkerung in Europa wurde die Prävalenz für Adipositas bis zum Jahr 2015 mit 20-30% vorhergesagt (von Ruesten *et al.*, 2011). Der rapide Anstieg wird hauptsächlich auf die weltweiten Veränderungen der Ernährungs- und Lebensweise zurückgeführt (Prentice und Jebb, 1995). Allerdings besitzt die Krankheit auch eine genetische Komponente, die Menschen unterschiedlich anfällig machen, an Adipositas zu erkranken (Bell *et al.*, 2005). Durch die intensive Forschung konnte eine Vielzahl von Risikogenen identifiziert werden, die mit Adipositas in Verbindung gebracht wurden (Speliotes *et al.*, 2010; Bradfield *et al.*, 2012). Dennoch verlief die Suche nach pharmakologischen Behandlungsmethoden bislang nicht sehr erfolgreich. Eine Reihe von Medikamenten musste aufgrund starker Nebeneffekte wieder vom Markt genommen werden (Kang und Park, 2012). Zwar konnten in Deutschland mit Präventionsprogrammen erste Erfolge bei der Bekämpfung der Adipositas bei Kindern erzielt werden (Moss *et al.*, 2012), dennoch bleiben die Zahlen alarmierend, und die Suche nach geeigneten Behandlungsmethoden ein wichtiges Forschungsziel.

Nachdem durch Arbeiten in unserem Labor der Einfluss von peripherer NEP auf die Nahrungsaufnahme gezeigt werden konnte (Becker *et al.*, 2010), stellte sich die Frage, ob die Aktivierung von NEP zur Therapie für eine Verringerung des Körpergewichts genutzt werden kann. Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den vergangenen Jahren Substanzen beschrieben, die zu einer Erhöhung der NEP-Aktivität führen. Das Interesse an diesen Substanzen beruhte dabei jedoch nicht auf dem Wunsch einer Regulation der Gewichtsentwicklung, sondern sollte zur Behandlung von Alzheimer eingesetzt werden, für das eine Aktivierung von NEP im Gehirn untersucht wird (Hüll *et al.*, 2006). Insbesondere sind hier die Arbeiten von Melzig, in denen ein Extrakt des Grünen Tees beschrieben wurde (Melzig und Janka, 2003; Ayoub und Melzig, 2006) zu erwähnen, ebenso wie die Beschreibung der NEP-Aktivierung durch den PPAR $\delta$ -Agonist GW0742 (Kalinin *et al.*, 2009). Diese beiden Substanzen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch in Zellkulturansätzen validiert, und ihre Fähigkeit zur NEP-Aktivierung bestätigt (4.3.1., 4.3.2.).

Als weitere potentielle Aktivatoren werden z.B. 17 $\beta$ -Östradiol (Liang *et al.*, 2010), das Ginsenosid Rg3 (Yang *et al.*, 2009) und Inhibitoren der Histondeacetylase, wie Trichostatin und die Valporinsäure bzw. deren wasserlösliche Salze (Valporate) (Belyaev *et al.*, 2009), diskutiert.

Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit war die NEP-Aktivierung durch Grünen Tee. Grüner Tee und seine Bestandteile werden mit einer Vielzahl an gesundheitsfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht. Sie sollen zum Beispiel das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen und das Krebsrisiko verringern und die Insulinsensitivität erhöhen (Jochmann *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2012). Auch eine Gewichtsreduzierende Wirkung von Grünem Tee wird bereits seit längerem diskutiert, und konnte auch im Tiermodell nachgewiesen werden (Murase *et al.*, 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus für den gewichtsreduzierenden Effekt konnte jedoch bislang nicht aufgeklärt werden.

Es sollte deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht werden die beschriebenen Resultate zu verknüpfen, und zu überprüfen, ob die für den Grünen Tee beschriebene Gewichtsreduktion über eine Erhöhung der NEP-Aktivität vermittelt wird.

#### **5.4.1. Einfluss von GTE auf fettleibige BMFI-Mäuse**

In einem ersten Versuch, bekamen fettleibige BMFI-Mäuse für mehrere Wochen Trinkwasser, das mit GTE versetzt worden war (4.4.1.). Die Konzentration des GTE war in diesem Versuch mit 600 mg/kg/Tag sehr hoch angesetzt. Schon in den ersten drei Wochen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen der Kontrollgruppe und der Teegruppe, bei der das Körpergewicht der Tiere der Teegruppe deutlich abnahm. Ab diesem Zeitpunkt endete die Verringerung des Körpergewichts der Tiere der Teegruppe, der Gewichtsunterschied zwischen der Grünteegruppe und der Wassergruppe blieb aber bis zum Ende des Versuchs durchgehend signifikant (Abb. 68). Um eine Erklärung für diesen Befund zu erhalten, wurde eine NMR-Körperkomposition zu Beginn und am Ende des Versuchszeitraums durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Tiere durch die Behandlung mit GTE eine deutlich verringerte Menge an Körperfett aufwiesen (Abb. 69). Dadurch wurde auch das Verhältnis zwischen Fettmasse und Körpergewicht signifikant verringert. Dass die Gewichtsabnahme nach etwa drei Wochen der Behandlung aufhörte, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ab diesem Zeitpunkt kein überflüssiges Körperfett mehr abgebaut werden konnte. Andere Kontrollmechanismen überlagerten vermutlich den gewichtsreduzierenden Effekt des GTE, um den Organismus durch den weiteren Abbau von Körperfett nicht zu gefährden. Bei der Bestimmung der Fressmengen der Tiere zeigte sich,

dass die Tiere der GTE-Gruppe anfänglich signifikant weniger fraßen als die Kontrolltiere. Wie aufgrund der Gewichtsentwicklung erwartet, näherten sich die Fressmengen der Gruppen aber während des Versuchszeitraums wieder einander an. In den ersten drei Wochen fraßen die Mäuse der GTE-Gruppe ca. 1 g weniger als die Kontrolltiere. Das Tierfutter hatte eine Energiemenge von ca. 13 MJ/kg, was etwa 55 kcal/g entspricht. Im selben Zeitraum reduzierte sich das Körpergewicht der Tiere der Teegruppe um etwa 7 g. Berechnet man die entsprechende Energiemenge aufgrund der Annahme, dass eine Differenz im Körpergewicht von 0,9 kg einer Veränderung der aufgenommenen Energiemenge von 7000 kcal entspricht (Hill *et al.*, 2003), so ergeben sich ebenfalls ca. 55 kcal. Die Gewichtsreduktion der Tiere der GTE-gruppe kann also vollständig durch die verminderte Nahrungsaufnahme erklärt werden. Da die Tiere nach der 3-wöchigen Anfangsphase kein Gewicht mehr verloren, sondern die Gewichtsentwicklung beider Gruppen nun vergleichbar war, musste sich auch die Fressmenge zwischen den Gruppen annähern.

Um zu überprüfen, ob der Hypothese entsprechend NEP an der Gewichtsreduktion beteiligt war, wurden am Ende des Behandlungszeitraums Gehirn, Nieren und Dünndarm auf ihre NEP-Aktivitäten untersucht (Abb. 70). Dabei wurde die stärkste Erhöhung der NEP-Aktivität im Dünndarm der Tiere detektiert, die mit GTE behandelt worden waren. Auch in den Nieren wurde eine signifikant erhöhte NEP-Aktivität nachgewiesen und eine Korrelationsanalyse bestätigte, dass eine höhere periphere NEP-Aktivität mit einer stärkeren Gewichtsreduktion korrelierte. Messungen der NEP-Aktivität im Gehirn der Tiere zeigte hingegen keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen (Abb. 70 A). Dies zeigt, dass im Gehirn lokalisiertes NEP nicht an den Signalwegen beteiligt ist, die zur Gewichtsreduktion führte. Dieses Ergebnis deckt sich mit den vorangegangenen Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, bei denen mit dem NEP-Inhibitor Candoxatril eine Gewichtszunahme induziert werden konnte (Becker *et al.*, 2010). Dieser Inhibitor kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und ist deshalb nur in der Lage peripheres NEP zu hemmen.

Um festzustellen, ob die veränderte NEP-Aktivität auf einer erhöhten Menge des Enzyms in den peripheren Organen beruht, oder eine allosterische Veränderung des Enzyms die Ursache ist, wurde ein Western Blot durchgeführt. In den Dünndarmproben der Tiere aus der Teegruppe wurden dabei signifikant erhöhte NEP-Mengen detektiert (Abb. 71). Das stimmt mit den *in vitro* Ergebnissen der Zellkultur-Stimulationsexperimente (4.3.2.) überein, bei denen ebenfalls keine allosterischen Effekte gefunden wurden. Die Ergebnisse der Zellkulturversuche deuten darauf hin, dass der NEP-aktivierende Effekt von GTE nicht aus einer erhöhten NEP-mRNA-Expression resultiert. Für die Erhöhung der NEP-Quantitäten könnten dann nur noch posttranslationale Veränderungen verantwortlich sein. Beispielsweise könnte eine verminderte Abbaugeschwindigkeit des Enzyms der Grund sein.

Mit diesem Versuch konnte die durch GTE-vermittelte Gewichtsreduktion im Mausmodell bestätigt werden, die auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Shimotoyodome *et al.*, 2005). Der NEP-aktivierende Effekt von GTE wurde in diesem Versuch erstmalig *in vivo* bestätigt, und zum ersten Mal konnte somit gezeigt werden, dass die durch GTE erzielte Gewichtsreduktion mit einer Erhöhung der NEP-Aktivität einhergeht. Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die durch GTE ausgelöste Gewichtsreduktion ausschließlich auf NEP zurückzuführen ist, oder ob auch in Abwesenheit des Enzyms eine Gewichtsreduktion stattfinden kann.

#### **5.4.2. Einfluss von GTE auf NEP-defiziente Mäuse**

Um die Frage zu beantworten, ob auch in Abwesenheit von NEP eine Gewichtsreduktion mit GTE erzielt werden kann, wurden NEP-defiziente Mäuse und ihre wildtypischen Geschwister mit GTE behandelt (4.4.2.). Da die NEP-Defizienz in Mäusen ab einem Alter von ca. 6 Monaten zu einer Erhöhung des Körpergewichts führt (Becker *et al.*, 2010), wurden die Versuche an 3 Monate alten Tieren durchgeführt. In diesem Alter treten noch keine Unterschiede im Gewicht von NEP-defizienten Tieren und ihren wildtypischen Geschwistertieren auf, und mögliche Effekte durch die NEP-Defizienz auf die Regulation der Nahrungsaufnahme konnten ausgeschlossen werden.

Bei drei Monate alten Tieren wird eine Gewichtsentwicklung erwartet, die sowohl auf eine Erhöhung der Fett, wie auch der Muskelmasse zurückgeht. Außerdem handelte es sich nicht um Mäuse mit einem übermäßig hohen Fettanteil, sondern um normalgewichtige Tiere. Deshalb konnte in diesem Versuchsansatz keine starke Verringerung des Körpergewichts durch den Abbau von Körperfett erwartet werden. Dennoch zeigte sich in den wildtypischen Tieren durch die Behandlung mit GTE, ebenso wie im vorangegangenen Experiment mit den BMFI-Mäusen, ein Unterschied in der Gewichtsentwicklung der Tiere. Durch die Behandlung mit GTE konnte die Gewichtszunahme der Tiere verringert werden (Abb. 72). In den NEP-defizienten Tiere trat hingegen keine Veränderung in der Gewichtszunahme zwischen der GTE- und der Wassergruppe auf. Die Zunahme der Tiere beider Gruppen war vergleichbar mit der Zunahme der Tiere aus der wildtypischen Wassergruppe. Dies bestätigte die Annahme, dass NEP als wichtiges Schlüsselenzym bei der Vermittlung der Gewichtsreduktion durch GTE auftritt, dessen Rolle von anderen Enzymen nicht übernommen werden kann.

Die Ergebnisse der Messung der NEP-Aktivitäten der wildtypischen Tiere deckten sich mit den zuvor bei den BMFI-Mäusen erhaltenen Ergebnissen. Es konnte keine Veränderung der Enzymaktivität in den Gehirnen der Tiere durch GTE induziert werden, während im

Dünndarm eine signifikant höhere NEP-Aktivität durch die Behandlung mit GTE erhalten wurde (Abb. 73). Die Messung der NEP-Aktivität der NEP-defizienten Tiere ergab, wie erwartet, keine Ergebnisse. Die gemessenen Werte gingen nicht über das Hintergrundrauschen hinaus, und bestätigten somit nur noch einmal die NEP-Defizienz dieser Tiere.

Mit diesem Versuch konnten die vorherigen Ergebnisse eindrucksvoll bestätigt werden. Durch Behandlung mit GTE kann eine Gewichtsreduktion erzielt werden, die von NEP vermittelt wird. Wie in den NEP-defizienten Tieren gezeigt werden konnte, kann die Gewichtsreduktion nicht durch andere Substanzen vermittelt werden, wenn im Organismus kein NEP vorhanden ist. Erneut zeigten die NEP-Aktivitätsmessungen, dass alleine peripheres NEP in der Lage ist diesen Effekt zu vermitteln. Gerade auch im zweiten Tierversuch mit den jungen Tieren konnte festgestellt werden, dass die über NEP vermittelte Gewichtsreduktion nur anhält solange überschüssiges Körperfett abgebaut werden konnte. Dies ist für eine mögliche zukünftige Therapie sehr vorteilhaft, weil Patienten nicht in Gefahr geraten, sich durch eine zu starke Gewichtsabnahme selbst zu gefährden.

Erste Experimente zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der zur Gewichtsreduktion führt, lassen vermuten, dass durch die erhöhte Menge an NEP ein vermehrter Abbau orexigene Peptide im Gastrointestinalsystem stattfindet, und die Tiere deshalb weniger Nahrung aufnehmen. Für die orexigenen Peptide NPY und Galanin wurden bereits in ersten Versuchen verringerte Peptidmengen gefunden. Aufgrund des sehr großen Substratspektrums von NEP ist es wahrscheinlich, dass nach der Behandlung mit GTE noch eine Vielzahl weiterer Peptide in veränderten Konzentrationen vorliegen. In Zukunft sollten weitere Substrate des Enzyms untersucht werden, auch in Bezug auf mögliche Gefahren die eine Aktivierung von NEP bergen könnte, wie z.B. einer Erhöhung des Blutdrucks durch den Abbau vasodilatatorisch wirksamer Peptide (Stephenson und Kenny, 1987a; Stephenson und Kenny, 1987b).

In einem weiteren Tierversuch sollte außerdem untersucht werden, ob auch Tiere die durch eine fettreiche Ernährung eine Adipositas entwickelt haben mit GTE behandelt werden können, und ob auch in diesen Tieren bei einer NEP-Defizienz die zu erwartende Gewichtsreduktion ausbleibt. Ein solcher Versuch ist der nächste Schritt bei der Erforschung von GTE zur Adipositas therapie, da viele Menschen aufgrund einer ungesunden Ernährungsweise eine erhöhte Fettakkumulation aufweisen (Prentice und Jebb, 1995).

Es muss außerdem untersucht werden, ob GTE zu einer verstärkten mRNA-Expression des Enzyms führt, oder ob posttranslationale Änderungen, wie beispielsweise eine verringerte Abbaurate von NEP, vorliegen. Solange die RNA-Mengen nicht überprüft wurden, und eine Erhöhung der mRNA durch GTE nicht ausgeschlossen wurde, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die ausschließlich im peripheren System gefundene NEP-

Aktivitätsänderung, durch die Beeinflussung spezifischer NEP-Promotoren erfolgen kann. Würde die NEP-Expression im Gehirn nicht über diesen Promotor gesteuert, würde dies zu der spezifischen Erhöhung im peripheren System führen. Aktivatoren dieser Art wären äußerst nützliche Medikamente, da sie eine gezielte Beeinflussung der NEP-Aktivität ermöglichen würden. Allerdings deuten die Ergebnisse der Stimulationsversuche (4.3.2.) bislang nicht darauf hin. In diesen Experimenten wurde in den neuronalen SK-N-SH-Zellen eine starke Aktivitätserhöhung erzielt, die nicht mit einer Änderung der mRNA-Expression einherging. Sollte bei Untersuchungen von Zellen aus dem Dünndarm, in denen eine starke Erhöhung der NEP-Aktivität auftrat, ebenfalls keine Änderung der mRNA gefunden werden, würde dies darauf hin deuten, dass die Substanzen aus dem GTE die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können und es darum zu einer spezifischen Aktivierung von peripherem NEP kommt.

Mit weiteren NEP-aktivierenden Substanzen sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse reproduziert werden können. Mit hohen Dosen an GTE könnten bereits Versuche an adipösen Patienten begonnen werden. Auch im Menschen wurden bereits Studien veröffentlicht, die einen positiven Einfluss von GTE auf die Gewichtsentwicklung zeigten. Allerdings konnte eine kürzlich erschienene Meta-Analyse der Cochrane Collaboration keine signifikante Reduktion des Körpergewichts in übergewichtigen und adipösen Patienten durch Grünen Tee bestätigen (Jurgens *et al.*, 2012). Die Übertragung der gezeigten Versuchsergebnisse auf den Menschen ist demnach eventuell nicht ohne weiteres möglich. In den Tierversuchen wurden jedoch sehr hohe Konzentrationen des GTE eingesetzt, die deutlich über dem liegen, was ein Mensch durch einen normalen Genuss von Grünem Tee am Tag zu sich nimmt. Umgerechnet würde die Menge in etwa 120 Tassen Tee pro Tag entsprechen. Es ist möglich, dass bei diesen hohen Konzentrationen ein gewichtsreduzierender Effekt auch im Menschen zu erreichen ist. Dennoch muss auch die Suche nach NEP-aktivierenden Substanzen intensiviert werden, um Substanzen zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen über diesen neu entdeckten Mechanismus der NEP-Aktivierung eine zukünftige Ausbreitung der Pandemie Adipositas aufzuhalten und die Krankheit in Zukunft effektiv bekämpfen zu können.

## 6. Zusammenfassung

Das Enzym Nephrylsin (NEP, EC 3.4.24.11.) ist eine Zn(II)-abhängige, membranständige Metallopeptidase, die im Organismus weit verbreitet exprimiert wird. Es ist in der Lage eine große Anzahl an Substraten zu hydrolysieren und ist an vielen biologischen Vorgängen beteiligt. Dadurch beeinflusst NEP ebenfalls viele pathophysiologische Vorgänge, wie z.B. Hypertonie oder die Alzheimer Krankheit. Erst kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Einfluss des Enzyms auf die Regulation der Nahrungsaufnahme nachgewiesen, was NEP zu einem interessanten Zielmolekül für die Adipositasbehandlung macht. Adipositas wird als Krankheit pandemischen Ausmaßes bezeichnet, für deren Prävalenz weltweit weiterhin ein dramatischer Anstieg prognostiziert wird. Pharmakologische Behandlungsmethoden gibt es bislang jedoch nur wenige. Es wurden deshalb in dieser Arbeit zum einen Methoden zur Untersuchung von NEP weiterentwickelt, zum zweiten wurde der Einfluss unterschiedlicher Substanzen auf die NEP-Aktivität und NEP-Expression untersucht, und zum dritten wurde der Frage nachgegangen, ob Veränderungen an NEP zur Adipositasbehandlung genutzt werden können.

Auf der Grundlage des in der Literatur beschriebene Fluoreszenzsubstrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp sollte im Rahmen der Arbeit die Möglichkeit zur Etablierung einer neuen fluorimetrische Methode zur Messung der NEP-Aktivität untersucht werden. Die Reaktivität des Substrates wurde dazu in unterschiedlichen Gewebearten validiert. Dabei zeigte sich, dass das Substrat von einem weiteren Enzym, das cytosolisch lokalisiert ist, abgebaut wurde. Außerdem wurde das NEP-spezifische Produkt von einem dritten Enzym abgebaut, das in den Zellmembranen lokalisiert ist. Das NEP-spezifische Produkt wurde sowohl in der cytosolischen-, als auch der Membranfraktion detektiert. Durch eine Veränderung des Substrates sollten die unerwünschten Reaktionen unterdrückt werden. Die Optimierung des Substrats wurde dabei durch den Austausch einer Aminosäure vorgenommen, und das neue Substrat Abz-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp wurde ebenfalls auf seine Reaktivität hin untersucht. Mit diesem Substrat konnte der Abbau des NEP-spezifischen Produktes durch das membranständige Enzym weitgehend gehemmt werden, das cytosolische Enzym konnte jedoch auch das optimierte Substrat abbauen. In Membranfraktionen der meisten untersuchten Gewebearten erscheint eine zukünftige Optimierung für Messungen im Mikrotiterplatten-Lesegerät möglich.

Um NEP *in vivo* zukünftig in bestimmten Bereichen des Organismus besser untersuchen zu können, sollten zwei transgene Mauslinien generiert werden, die das Enzym spezifisch in neuronalen bzw. endothelialen Zellen überexprimieren. Dabei zeigte sich, dass eine endotheliale Überexpression der Peptidase problematisch sein kann. Die Tiere generierten

transgenen verstarben in sehr jungem Alter, oder verloren ihre Fortpflanzungsfähigkeit. Hingegen konnten nach der Generierung von Tieren mit neuronaler NEP-Überexpression trotz Integration der DNA keine Tiere identifiziert werden, die in den untersuchten Gehirnbereichen eine Erhöhung der NEP-Aktivität aufwiesen. Für zukünftige Versuche konnte nun eine kommerziell erhältliche Mauslinie mit neuronaler Überexpression erworben werden.

Der Einfluss des PPAR $\delta$ -Agonist GW0742 und von Grünem Tee-Extrakt auf, die in der Literatur beide als NEP-aktivierend beschrieben wurden, ist in eigenen Zellkulturversuchen validiert worden. GW0742 führte in neuronalen SK-N-SH-Zellen zu einer bemerkenswert starken Erhöhung der NEP-Aktivität. Grüner Tee-Extrakt und daraus gewonnene Fraktionen wurden in Stimulations-experimenten ebenfalls eingesetzt. Eine Erhöhung der NEP-Aktivität durch den vollständigen Extrakt konnte in SK-N-SH-Zellen und BAEC-Zellen festgestellt werden, nicht aber in HDMEC-Zellen. Stimulation mit den einzelnen Fraktionen, die aus dem Extrakt erhalten wurden, führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen in den verschiedenen Zelllinien. Es konnte keine Fraktion identifiziert werden, die für die Erhöhung der NEP-Aktivität durch den Grünen Tee-Extrakt hauptsächlich verantwortlich ist. Es wurden zusätzlich potentielle NEP-Aktivatoren, die in einer Hochdurchsatzsuche identifiziert wurden, auf ihre die NEP-aktivierende Wirkung hin in Zellkulturversuchen validiert. Die erhaltenen Ergebnisse waren in den verschiedenen Zelllinien jedoch sehr unterschiedlich weshalb die Untersuchungen in Zukunft noch weiter vorangetrieben werden müssen. Bislang konnte noch keine Substanz aus der Hochdurchsatzsuche identifiziert werden, die sicher zu einer NEP-Aktivitätserhöhung führt.

Der Extrakt des Grünen Tees wurde in einem Tierexperiment eingesetzt, um die Hypothese zu überprüfen, dass eine Erhöhung der NEP-Aktivität zur Verringerung des Körpergewichts führt. In einer fettleibigen Mauslinie konnte durch den Extrakt eine Gewichtsreduktion induziert werden, der eine Verringerung des Körperfettanteils zugrunde lag. Dies wurde durch eine verminderte Nahrungsaufnahme ausgelöst. In den Tieren war die NEP-Aktivität in den peripheren Organen erhöht, im Gehirn jedoch unverändert. In einem zweiten Ansatz mit NEP-defizienten Tieren konnte die NEP-vermittelte Gewichtsreduktion durch Grünen Tee in wildtypischen Mäusen bestätigt werden, nicht aber in ihren NEP-defizienten Geschwister-tieren. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die durch Grünen Tee induzierte Gewichtsreduktion durch NEP vermittelt wird. Außerdem konnte bewiesen werden, dass durch eine Aktivierung der NEP-Aktivität eine Reduktion des Körpergewichts erzielt werden kann. Damit legt diese Arbeit wichtige Grundlagen für die Erforschung neuartiger Therapiemöglichkeiten zur Behandlung einer der mittlerweile am stärksten verbreiteten Volkskrankheiten der Welt, der Adipositas.



## 7. Abstract

The enzyme Nephilysin (NEP, EC 3.4.24.11.) is a Zn(II)-dependent, membrane-bound metallopeptidase which is widely expressed in the organism. It is able to hydrolyze a wide variety of substrates and is involved in many biological processes. Therefore, NEP also affects many pathophysiological processes, such as Hypertension or Alzheimer's disease. Recently it could be shown by our research group, that NEP has an influence on the regulation of food intake. This makes the enzyme an interesting target for the treatment of obesity. Obesity is a disease with pandemic extent, for which a dramatic increase all over the world is expected in the coming years - but only few pharmacological treatment options are available by now. In this work methods for future investigations of NEP have been further developed, effects of a variety of different substances on NEP-activity and NEP-expression have been examined, and it was evaluated whether changes in NEP-activity can be used for the treatment of obesity.

The fluorescent substrate Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Arg-Arg-Val-EDDnp, which was described in the literature, was used as a starting molecule to develop a new fluorimetric method for the measurement of NEP-activity. The reactivity of the substrate had to be validated in different tissue types. It was found that the substrate could be degraded not only by NEP, but also by a further enzyme which was localized in the cytosol. In addition, the NEP-specific product was digested by a third enzyme which was localized in the membranes. The NEP-specific product was detected in both the cytosolic, as well as the membrane fraction. To inhibit the undesired side-reactions we tried to optimize the substrate. For the optimization of the substrate one amino acid of the substrate was replaced by an artificial one, and the new substrate Abz-Gly-Gly-D<sub>3</sub>Phe-Leu-Agp-Arg-Val-EDDnp was also tested for its reactivity. With this new substrate the degradation of the NEP-specific product by the membrane-bound enzyme could be inhibited. However, the reactivity of cytosolic enzyme was not affected by the modification. In lung samples, even with the new substrate a significant activity of the membrane-bound enzyme could still be detected. The reason for this could be a very high expression of the unknown enzyme in this specific type of tissue. In the other investigated tissues future optimization for measurements of membrane-fractions in the micro plate reader seems promising.

To improve the possibilities to study NEP under *in vivo* conditions in the future, two transgenic mouse lines were generated, that overexpress the enzyme specifically in neuronal and endothelial cells respectively. The results showed that overexpression of endothelial NEP can be problematic as the generated transgenic animals died at a young age or lost their fertility. In the future a new approach with inducible NEP-overexpression has

to be started. The transgenic animals that were generated to overexpress NEP in neuronal cells did not show any increase of NEP-activity in the examined areas of the brain despite the integration of the DNA-construct. A commercially available NEP-overexpressing mouse line was now purchased, which can be used in future experiments.

The effects of the PPAR $\delta$ -agonist GW0742 and Green Tea extract on NEP, which both have been described in the literature as NEP-activating substances, has been validated in cell culture experiments. Stimulation with GW0742 in neuronal SK-N-SH cells resulted in a remarkable increase of NEP-activity. By stimulation with Green Tea extract an increase in NEP-activity could be achieved in SK-N-SH cells and BAEC cells, but not in HDMEC cells. Stimulation with the individual fractions obtained from the Green Tea extract, led to very diverse results in the different cell lines. It was not possible to identify the fraction that is mainly responsible for the increase in NEP-activity, which was achieved by stimulation with complete Green Tea extract. In a different approach new potential NEP-activators were identified in a high-throughput screening. The NEP-activating effect of the seven most promising substances was validated in cell culture experiments. However, the results obtained in the different cell lines were not conclusive and should be pursued in the future. None of the seven substances identified in the high-throughput screening could be said to increase the NEP-activity with certainty.

The Green Tea extract has been used in animal experiments to test the hypothesis that an increase in NEP-activity leads to a reduction in body weight. In an obese mouse line a reduction in body weight could be induced by drinking Green Tea. The cause was a reduction of body fat in the animals due to reduced food intake. Measurements of NEP-activity showed an increase of NEP-activity in peripheral tissues of Green Tea drinking mice, but not in the brain. In a second approach with NEP-deficient mice a reduction of body weight could be confirmed in wild-type control animals drinking Green Tea, but not in NEP-knockout animals. The results show for the first time that the beneficial effect of Green Tea on body weight is mediated by the peptidase NEP. In addition, it could also be shown for the first time that an increase of NEP-activity in peripheral tissues leads to a reduction in body weight. Therefore, this work sets an important basis for the exploration of novel therapies for the treatment of one of the world's most common diseases, obesity.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abu-Hamdah, R., A. Rabiee, G. S. Meneilly, R. P. Shannon, D. K. Andersen and D. Elahi (2009). "Clinical review: The extrapancreatic effects of glucagon-like peptide-1 and related peptides." J Clin Endocrinol Metab **94**(6): 1843-52.
- Alenina, N. (2003). Der G-Protein gekoppelte Rezeptor Mas - Regulation des Gens und physiologische Funktion , (Dissertation), Freie Universität Berlin: 158 Bl.
- Ashwell, M., P. Gunn and S. Gibson (2012). "Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis." Obes Rev **13**(3): 275-86.
- Ayoub, S. and M. F. Melzig (2006). "Induction of neutral endopeptidase (NEP) activity of SK-N-SH cells by natural compounds from green tea." J Pharm Pharmacol **58**(4): 495-501.
- Baggio, L. L. and D. J. Drucker (2007). "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." Gastroenterology **132**(6): 2131-57.
- Barbara, G., R. De Giorgio, V. Stanghellini, R. Corinaldesi, C. Cremon, N. Gerard, C. Gerard, E. F. Grady, N. W. Bunnett, P. A. Blennerhassett and S. M. Collins (2003). "Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) downregulates the onset of intestinal inflammation in the nematode infected mouse." Gut **52**(10): 1457-64.
- Barber, M. N., M. Kanagasundaram, C. R. Anderson, L. M. Burrell and R. L. Woods (2006). "Vascular neutral endopeptidase inhibition improves endothelial function and reduces intimal hyperplasia." Cardiovasc Res **71**(1): 179-88.
- Barker, P. E., M. A. Shipp, L. D'Adamio, E. L. Masteller and E. L. Reinherz (1989). "The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27)." J Immunol **142**(1): 283-7.
- Batterham, R. L., M. A. Cohen, S. M. Ellis, C. W. Le Roux, D. J. Withers, G. S. Frost, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (2003). "Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36." N Engl J Med **349**(10): 941-8.
- Becker, M., W. E. Siems, R. Kluge, F. Gembardt, H. P. Schultheiss, M. Schirner and T. Walther (2010). "New function for an old enzyme: NEP deficient mice develop late-onset obesity." PLoS One **5**(9).
- Bell, C. G., A. J. Walley and P. Froguel (2005). "The genetics of human obesity." Nat Rev Genet **6**(3): 221-34.
- Belyaev, N. D., N. N. Nalivaeva, N. Z. Makova and A. J. Turner (2009). "Nepriylisin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease." EMBO Rep **10**(1): 94-100.
- Berthoud, H. R. and C. Morrison (2008). "The brain, appetite, and obesity." Annu Rev Psychol **59**: 55-92.
- Bicket, D. P. (2002). "Using ACE inhibitors appropriately." Am Fam Physician **66**(3): 461-8.

- Borson, D. B., J. J. Brokaw, K. Sekizawa, D. M. McDonald and J. A. Nadel (1989). "Neutral endopeptidase and neurogenic inflammation in rats with respiratory infections." J Appl Physiol **66**(6): 2653-8.
- Bradfield, J. P., H. R. Taal, N. J. Timpson, A. Scherag, C. Lecoeur, N. M. Warrington, E. Hypponen, C. Holst, B. Valcarcel, E. Thiering, R. M. Salem, F. R. Schumacher, D. L. Cousminer, P. M. Sleiman, J. Zhao, R. I. Berkowitz, K. S. Vimalaswaran, I. Jarick, C. E. Pennell, D. M. Evans, B. St Pourcain, D. J. Berry, D. O. Mook-Kanamori, A. Hofman, F. Rivadeneira, A. G. Uitterlinden, C. M. van Duijn, R. J. van der Valk, J. C. de Jongste, D. S. Postma, D. I. Boomsma, W. J. Gauderman, M. T. Hassanein, C. M. Lindgren, R. Magi, C. A. Boreham, C. E. Neville, L. A. Moreno, P. Elliott, A. Pouta, A. L. Hartikainen, M. Li, O. Raitakari, T. Lehtimaki, J. G. Eriksson, A. Palotie, J. Dallongeville, S. Das, P. Deloukas, G. McMahan, S. M. Ring, J. P. Kemp, J. L. Buxton, A. I. Blakemore, M. Bustamante, M. Guxens, J. N. Hirschhorn, M. W. Gillman, E. Kreiner-Moller, H. Bisgaard, F. D. Gilliland, J. Heinrich, E. Wheeler, I. Barroso, S. O'Rahilly, A. Meirhaeghe, T. I. Sorensen, C. Power, L. J. Palmer, A. Hinney, E. Widen, I. S. Farooqi, M. I. McCarthy, P. Froguel, D. Meyre, J. Hebebrand, M. R. Jarvelin, V. W. Jaddoe, G. D. Smith, H. Hakonarson, S. F. Grant and C. Early Growth Genetics (2012). "A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci." Nat Genet **44**(5): 526-31.
- Brokaw, J. J. and G. W. White (1994). "Differential effects of phosphoramidon and captopril on NK1 receptor-mediated plasma extravasation in the rat trachea." Agents Actions **42**(1-2): 34-9.
- Brugts, J. J., R. Ferrari and M. L. Simoons (2009). "Angiotensin-converting enzyme inhibition by perindopril in the treatment of cardiovascular disease." Expert Rev Cardiovasc Ther **7**(4): 345-60.
- Bunnett, N. W., R. Kobayashi, M. S. Orloff, J. R. Reeve, A. J. Turner and J. H. Walsh (1985). "Catabolism of gastrin releasing peptide and substance P by gastric membrane-bound peptidases." Peptides **6**(2): 277-83.
- Cabrol, C., M. A. Huzarska, C. Dinolfo, M. C. Rodriguez, L. Reinstatler, J. Ni, L. A. Yeh, G. D. Cuny, R. L. Stein, D. J. Selkoe and M. A. Leisring (2009). "Small-molecule activators of insulin-degrading enzyme discovered through high-throughput compound screening." PLoS One **4**(4): e5274.
- Campbell, D. J. (2000). "Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides." Braz J Med Biol Res **33**(6): 665-77.
- Campbell, D. J. (2003). "Vasopeptidase inhibition: a double-edged sword?" Hypertension **41**(3): 383-9.
- Capecchi, M. R. (1989). "Altering the genome by homologous recombination." Science **244**(4910): 1288-92.
- Carvalho, K. M., G. Boileau, A. C. Camargo and L. Juliano (1996). "A highly selective assay for neutral endopeptidase based on the cleavage of a fluorogenic substrate related to Leu-enkephalin." Anal Biochem **237**(2): 167-73.

- Checler, F., P. Dauch, H. Barelli, J. L. Nahon and J. P. Vincent (1992). "Hydrolysis of rat melanin-concentrating hormone by endopeptidase 24.11 (neutral endopeptidase)." Biochem J **286** ( Pt 1): 217-21.
- Chen, C. Y., G. Salles, M. F. Seldin, A. E. Kister, E. L. Reinherz and M. A. Shipp (1992). "Murine common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10 neutral endopeptidase 24.11). Molecular characterization, chromosomal localization, and modeling of the active site." J Immunol **148**(9): 2817-25.
- Chu, P. and D. A. Arber (2000). "Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma." Am J Clin Pathol **113**(3): 374-82.
- Cohen, A. J., P. A. Bunn, W. Franklin, C. Magill-Solc, C. Hartmann, B. Helfrich, L. Gilman, J. Folkvord, K. Helm and Y. E. Miller (1996). "Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux." Cancer Res **56**(4): 831-9.
- Cohen, M. A., S. M. Ellis, C. W. Le Roux, R. L. Batterham, A. Park, M. Patterson, G. S. Frost, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (2003). "Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans." J Clin Endocrinol Metab **88**(10): 4696-701.
- Coleman, D. L. (1973). "Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice." Diabetologia **9**(4): 294-8.
- Coleman, D. L. and K. P. Hummel (1967). "Studies with the mutation, diabetes, in the mouse." Diabetologia **3**(2): 238-48.
- Coleman, D. L. and K. P. Hummel (1973). "The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse." Diabetologia **9**(4): 287-93.
- Cone, R. D. (2005). "Anatomy and regulation of the central melanocortin system." Nat Neurosci **8**(5): 571-8.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer and et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." N Engl J Med **334**(5): 292-5.
- Coppola, J. M., M. S. Bhojani, B. D. Ross and A. Rehemtulla (2008). "A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness." Neoplasia **10**(4): 363-70.
- D'Adamio, L., M. A. Shipp, E. L. Masteller and E. L. Reinherz (1989). "Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple minixons and separate 5' untranslated regions." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 7103-7.
- Daniels, S. R., D. K. Arnett, R. H. Eckel, S. S. Gidding, L. L. Hayman, S. Kumanyika, T. N. Robinson, B. J. Scott, S. St Jeor and C. L. Williams (2005). "Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment." Circulation **111**(15): 1999-2012.
- Danilewicz, J. C., P. L. Barclay, I. T. Barnish, D. Brown, S. F. Campbell, K. James, G. M. Samuels, N. K. Terrett and M. J. Wythes (1989). "UK-69,578, a novel inhibitor of EC

3.4.24.11 which increases endogenous ANF levels and is natriuretic and diuretic." Biochem Biophys Res Commun **164**(1): 58-65.

- Deschodt-Lanckman, M. and A. D. Strosberg (1983). "In vitro degradation of the C-terminal octapeptide of cholecystokinin by 'enkephalinase A'." FEBS Lett **152**(1): 109-13.
- Devault, A., C. Lazure, C. Nault, H. Le Moual, N. G. Seidah, M. Chretien, P. Kahn, J. Powell, J. Mallet, A. Beaumont and et al. (1987). "Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA." EMBO J **6**(5): 1317-22.
- Di Maria, G. U., S. Bellofiore and P. Geppetti (1998). "Regulation of airway neurogenic inflammation by neutral endopeptidase." Eur Respir J **12**(6): 1454-62.
- Dockray, G. J. (2009). "Cholecystokinin and gut-brain signalling." Regul Pept **155**(1-3): 6-10.
- Edwards, C. R. and P. L. Padfield (1985). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors: past, present, and bright future." Lancet **1**(8419): 30-4.
- Erdös, E. G. and R. A. Skidgel (1989). "Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones." FASEB J **3**(2): 145-51.
- Fang, P., M. Yu, L. Guo, P. Bo, Z. Zhang and M. Shi (2012). "Galanin and its receptors: A novel strategy for appetite control and obesity therapy." Peptides **36**(2): 331-9.
- Favrat, B., M. Burnier, J. Nussberger, J. M. Lecomte, R. Brouard, B. Waeber and H. R. Brunner (1995). "Neutral endopeptidase versus angiotensin converting enzyme inhibition in essential hypertension." J Hypertens **13**(7): 797-804.
- Flint, A., A. Raben, A. Astrup and J. J. Holst (1998). "Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans." J Clin Invest **101**(3): 515-20.
- Florentin, D., A. Sassi and B. P. Roques (1984). "A highly sensitive fluorometric assay for "enkephalinase," a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine-glycine-glycine from enkephalins." Anal Biochem **141**(1): 62-9.
- Forss-Petter, S., P. E. Danielson, S. Catsicas, E. Battenberg, J. Price, M. Nerenberg and J. G. Sutcliffe (1990). "Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control." Neuron **5**(2): 187-97.
- Fryer, R. M., J. Segreti, P. N. Banfor, D. L. Widomski, B. J. Backes, C. W. Lin, S. J. Ballaron, B. F. Cox, J. M. Trevillyan, G. A. Reinhart and T. W. von Geldern (2008). "Effect of bradykinin metabolism inhibitors on evoked hypotension in rats: rank efficacy of enzymes associated with bradykinin-mediated angioedema." Br J Pharmacol **153**(5): 947-55.
- Fulcher, I. S., R. Matsas, A. J. Turner and A. J. Kenny (1982). "Kidney neutral endopeptidase and the hydrolysis of enkephalin by synaptic membranes show similar sensitivity to inhibitors." Biochem J **203**(2): 519-22.
- Furth, P. A., L. Hennighausen, C. Baker, B. Beatty and R. Woychick (1991). "The variability in activity of the universally expressed human cytomegalovirus immediate early gene 1 enhancer/promoter in transgenic mice." Nucleic Acids Res **19**(22): 6205-8.
- Gao, Q. and T. L. Horvath (2007). "Neurobiology of feeding and energy expenditure." Annu Rev Neurosci **30**: 367-98.

- Gee, N. S., M. A. Bowes, P. Buck and A. J. Kenny (1985). "An immunoradiometric assay for endopeptidase-24.11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues." Biochem J **228**(1): 119-26.
- George, S. G. and J. Kenny (1973). "Studies on the enzymology of purified preparations of brush border from rabbit kidney." Biochem J **134**(1): 43-57.
- Gibbs, J., R. C. Young and G. P. Smith (1973). "Cholecystokinin decreases food intake in rats." J Comp Physiol Psychol **84**(3): 488-95.
- Goodey, N. M. and S. J. Benkovic (2008). "Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route." Nat Chem Biol **4**(8): 474-82.
- Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Ruddle (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7380-4.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-51.
- Greaves, M. F. (1975). "Proceedings: Surface antigens of leukaemic cells." Br J Cancer **32**(2): 280-1.
- Grimsby, J., R. Sarabu, W. L. Corbett, N. E. Haynes, F. T. Bizzarro, J. W. Coffey, K. R. Guertin, D. W. Hilliard, R. F. Kester, P. E. Mahaney, L. Marcus, L. Qi, C. L. Spence, J. Teng, M. A. Magnuson, C. A. Chu, M. T. Dvorozniak, F. M. Matschinsky and J. F. Grippo (2003). "Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy." Science **301**(5631): 370-3.
- Gros, C., A. Souque, J. C. Schwartz, J. Duchier, A. Cournot, P. Baumer and J. M. Lecomte (1989). "Protection of atrial natriuretic factor against degradation: diuretic and natriuretic responses after in vivo inhibition of enkephalinase (EC 3.4.24.11) by acetorphan." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7580-4.
- Hashimoto, S., F. Amaya, K. Oh-Hashi and K. Kiuchi (2010). "Expression of neutral endopeptidase activity during clinical and experimental acute lung injury." Respir Res **11**: 164.
- Hebert, S. S., L. Serneels, A. Tolia, K. Craessaerts, C. Derks, M. A. Filippov, U. Muller and B. De Strooper (2006). "Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes." EMBO Rep **7**(7): 739-45.
- Hervey, G. R. (1959). "The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats." J Physiol **145**(2): 336-52.
- Hetherington, A. W. and S. W. Ranson (1942). "Effect of early hypophysectomy on hypothalamic obesity." Endocrinology **31**(1): 30-34.
- Hill, J. O., H. R. Wyatt, G. W. Reed and J. C. Peters (2003). "Obesity and the environment: where do we go from here?" Science **299**(5608): 853-5.
- Hjelmberg, J. B., C. Fagnani, K. Silventoinen, M. McGue, M. Korkeila, K. Christensen, A. Rissanen and J. Kaprio (2008). "Genetic influences on growth traits of BMI: a longitudinal study of adult twins." Obesity (Silver Spring) **16**(4): 847-52.

- Hong, C. S., W. F. Goins, J. R. Goss, E. A. Burton and J. C. Glorioso (2006). "Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide in vivo." Gene Ther **13**(14): 1068-79.
- Hooper, N. M., A. J. Kenny and A. J. Turner (1985). "The metabolism of neuropeptides. Neurokinin A (substance K) is a substrate for endopeptidase-24.11 but not for peptidyl dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme)." Biochem J **231**(2): 357-61.
- Howell, S., H. Murray, C. S. Scott, A. J. Turner and A. J. Kenny (1991). "A highly sensitive E.L.I.S.A. for endopeptidase-24.11, the common acute-lymphoblastic-leukaemia antigen (CALLA, CD-10), applicable to material of porcine and human origin." Biochem J **278 ( Pt 2)**: 417-21.
- Howell, S., J. Nalbantoglu and P. Crine (1995). "Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism." Peptides **16**(4): 647-52.
- Huang, W. B., X. J. Zhou, J. Y. Chen, L. H. Zhang, K. Meng, H. H. Ma and Z. F. Lu (2005). "CD10-positive stromal cells in gastric carcinoma: correlation with invasion and metastasis." Jpn J Clin Oncol **35**(5): 245-50.
- Hüll, M., M. Berger and M. Heneka (2006). "Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease: how far have we come?" Drugs **66**(16): 2075-93.
- Hummel, K. P., D. L. Coleman and P. W. Lane (1972). "The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL-KsJ and C57BL-6J strains." Biochem Genet **7**(1): 1-13.
- Hwang, L., R. Leichter, A. Okamoto, D. Payan, S. M. Collins and N. W. Bunnett (1993). "Downregulation of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in the inflamed rat intestine." Am J Physiol **264**(4 Pt 1): G735-43.
- Ingalls, A. M., M. M. Dickie and G. D. Snell (1950). "Obese, a new mutation in the house mouse." J Hered **41**(12): 317-8.
- Irwin, N. and P. R. Flatt (2009). "Therapeutic potential for GIP receptor agonists and antagonists." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **23**(4): 499-512.
- Ishimaru, F. and M. A. Shipp (1995). "Analysis of the human CD10/neutral endopeptidase 24.11 promoter region: two separate regulatory elements." Blood **85**(11): 3199-207.
- Iwata, N., M. Higuchi and T. C. Saido (2005). "Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease." Pharmacol Ther **108**(2): 129-48.
- Iwata, N., S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H. J. Lee and T. C. Saido (2001). "Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin." Science **292**(5521): 1550-2.
- Iwata, N., S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Watanabe, M. Sekiguchi, E. Hosoki, M. Kawashima-Morishima, H. J. Lee, E. Hama, Y. Sekine-Aizawa and T. C. Saido (2000). "Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition." Nat Med **6**(2): 143-50.



- Iwaya, K., H. Ogawa, M. Izumi, M. Kuroda and K. Mukai (2002). "Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome." Virchows Arch **440**(6): 589-93.
- Jaisser, F. (2000). "Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice." J Am Soc Nephrol **11 Suppl 16**: S95-S100.
- Jochmann, N., G. Baumann and V. Stangl (2008). "Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **11**(6): 758-65.
- Johnson, A. R., J. Ashton, W. W. Schulz and E. G. Erdos (1985). "Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells." Am Rev Respir Dis **132**(3): 564-8.
- Jurgens, H., W. Haass, T. R. Castaneda, A. Schurmann, C. Koebnick, F. Dombrowski, B. Otto, A. R. Nawrocki, P. E. Scherer, J. Spranger, M. Ristow, H. G. Joost, P. J. Havel and M. H. Tschop (2005). "Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice." Obes Res **13**(7): 1146-56.
- Jurgens, T. M., A. M. Whelan, L. Killian, S. Doucette, S. Kirk and E. Foy (2012). "Green tea for weight loss and weight maintenance in overweight or obese adults." Cochrane Database Syst Rev **12**: CD008650.
- Kakoki, M., N. Takahashi, J. C. Jennette and O. Smithies (2004). "Diabetic nephropathy is markedly enhanced in mice lacking the bradykinin B2 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13302-5.
- Kalinin, S., J. C. Richardson and D. L. Feinstein (2009). "A PPARdelta agonist reduces amyloid burden and brain inflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **6**(5): 431-7.
- Kanazawa, M., D. J. Casley, E. J. Sybertz, M. F. Haslanger and C. I. Johnston (1992). "Localization and characterization of neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11), the degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in rat kidney using a radioiodinated neutral metalloendopeptidase inhibitor." J Pharmacol Exp Ther **261**(3): 1231-7.
- Kanemitsu, H., T. Tomiyama and H. Mori (2003). "Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form." Neurosci Lett **350**(2): 113-6.
- Kang, J. G. and C. Y. Park (2012). "Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety." Diabetes Metab J **36**(1): 13-25.
- Karra, E. and R. L. Batterham (2010). "The role of gut hormones in the regulation of body weight and energy homeostasis." Mol Cell Endocrinol **316**(2): 120-8.
- Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." Proc R Soc Lond B Biol Sci **140**(901): 578-96.
- Kerr, M. A. and A. J. Kenny (1974). "The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border." Biochem J **137**(3): 489-95.
- Kim, G. W., J. E. Lin, M. A. Valentino, F. Colon-Gonzalez and S. A. Waldman (2011). "Regulation of appetite to treat obesity." Expert Rev Clin Pharmacol **4**(2): 243-59.

- Kissileff, H. R., F. X. Pi-Sunyer, J. Thornton and G. P. Smith (1981). "C-terminal octapeptide of cholecystinin decreases food intake in man." Am J Clin Nutr **34**(2): 154-60.
- Kristensen, P., M. E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K. N. Christjansen, B. S. Wulff, J. T. Clausen, P. B. Jensen, O. D. Madsen, N. Vrang, P. J. Larsen and S. Hastrup (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." Nature **393**(6680): 72-6.
- Kushner, R. F. (2012). "Pharmacologic management of obesity." Pediatr Blood Cancer **58**(1): 140-3.
- Lean, M. E. (2001). "How does sibutramine work?" Int J Obes Relat Metab Disord **25 Suppl 4**: S8-11.
- Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee and J. M. Friedman (1996). "Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice." Nature **379**(6566): 632-5.
- Leissring, M. A., W. Farris, A. Y. Chang, D. M. Walsh, X. Wu, X. Sun, M. P. Frosch and D. J. Selkoe (2003). "Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death." Neuron **40**(6): 1087-93.
- Letarte, M., S. Vera, R. Tran, J. B. Addis, R. J. Onizuka, E. J. Quackenbush, C. V. Jongeneel and R. R. McInnes (1988). "Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase." J Exp Med **168**(4): 1247-53.
- Li, C., R. M. Booze and L. B. Hersh (1995). "Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs." J Biol Chem **270**(11): 5723-8.
- Li, Z., M. Maglione, W. Tu, W. Mojica, D. Arterburn, L. R. Shugarman, L. Hilton, M. Suttorp, V. Solomon, P. G. Shekelle and S. C. Morton (2005). "Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity." Ann Intern Med **142**(7): 532-46.
- Liang, K., L. Yang, C. Yin, Z. Xiao, J. Zhang, Y. Liu and J. Huang (2010). "Estrogen stimulates degradation of beta-amyloid peptide by up-regulating neprilysin." J Biol Chem **285**(2): 935-42.
- Liu, Y. C., V. Huang, T. C. Chao, C. D. Hsiao, A. Lin, M. F. Chang and L. P. Chow (2005). "Screening of drugs by FRET analysis identifies inhibitors of SARS-CoV 3CL protease." Biochem Biophys Res Commun **333**(1): 194-9.
- Lu, B., N. P. Gerard, L. F. Kolakowski, Jr., M. Bozza, D. Zurakowski, O. Finco, M. C. Carroll and C. Gerard (1995). "Neutral endopeptidase modulation of septic shock." J Exp Med **181**(6): 2271-5.
- Maes, H. H., M. C. Neale and L. J. Eaves (1997). "Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity." Behav Genet **27**(4): 325-51.
- Malfroy, B. and J. Burnier (1987). "New substrates for enkephalinase (neutral endopeptidase) based on fluorescence energy transfer." Biochem Biophys Res Commun **143**(1): 58-66.
- Malfroy, B., J. P. Swerts, A. Guyon, B. P. Roques and J. C. Schwartz (1978). "High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine." Nature **276**(5687): 523-6.

- Marcel, D., H. Pollard, P. Verroust, J. C. Schwartz and A. Beaudet (1990). "Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (EC 3.4.24.11) in the neostriatum of the rat." J Neurosci **10**(8): 2804-17.
- Matsas, R., A. J. Kenny and A. J. Turner (1986). "An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system." Neuroscience **18**(4): 991-1012.
- Maul, B., M. Becker, F. Gembardt, A. Becker, H. P. Schultheiss, W. E. Siems and T. Walther (2012). "Genetic deficiency in neprilysin or its pharmacological inhibition initiate excessive stress-induced alcohol consumption in mice." PLoS One **7**(11): e50187.
- Medeiros, M. D. and A. J. Turner (1994). "Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11." Endocrinology **134**(5): 2088-94.
- Melzig, M. F. and F. Escher (2002). "Induction of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme activity of SK-N-SH cells in vitro by quercetin and resveratrol." Pharmazie **57**(8): 556-8.
- Melzig, M. F. and M. Janka (2003). "Enhancement of neutral endopeptidase activity in SK-N-SH cells by green tea extract." Phytomedicine **10**(6-7): 494-8.
- Morisaki, N., S. Moriwaki, Y. Sugiyama-Nakagiri, K. Haketa, Y. Takema and G. Imokawa (2010). "Neprilysin is identical to skin fibroblast elastase: its role in skin aging and UV responses." J Biol Chem **285**(51): 39819-27.
- Morley, J. E., E. N. Hernandez and J. F. Flood (1987). "Neuropeptide Y increases food intake in mice." Am J Physiol **253**(3 Pt 2): R516-22.
- Moss, A., J. Klenk, K. Simon, H. Thaiss, T. Reinehr and M. Wabitsch (2012). "Declining prevalence rates for overweight and obesity in German children starting school." Eur J Pediatr **171**(2): 289-99.
- Mumford, R. A., P. A. Pierzchala, A. W. Strauss and M. Zimmerman (1981). "Purification of a membrane-bound metalloendopeptidase from porcine kidney that degrades peptide hormones." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(11): 6623-7.
- Murase, T., A. Nagasawa, J. Suzuki, T. Hase and I. Tokimitsu (2002). "Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(11): 1459-64.
- Myers, M. G., M. A. Cowley and H. Munzberg (2008). "Mechanisms of leptin action and leptin resistance." Annu Rev Physiol **70**: 537-56.
- Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis **26**(2): 99-109.
- Nair, R. R., H. Avila, X. Ma, Z. Wang, M. Lennartz, B. G. Darnay, D. D. Boyd and C. Yan (2008). "A novel high-throughput screening system identifies a small molecule repressive for matrix metalloproteinase-9 expression." Mol Pharmacol **73**(3): 919-29.
- Newell, A. J., L. I. Sue, S. Scott, P. K. Rauschkolb, D. G. Walker, P. E. Potter and T. G. Beach (2003). "Thiorphan-induced neprilysin inhibition raises amyloid beta levels in rabbit cortex and cerebrospinal fluid." Neurosci Lett **350**(3): 178-80.

- Nilsson, P., N. Iwata, S. Muramatsu, L. O. Tjernberg, B. Winblad and T. C. Saido (2010). "Gene therapy in Alzheimer's disease - potential for disease modification." J Cell Mol Med **14**(4): 741-57.
- Oefner, C., A. D'Arcy, M. Hennig, F. K. Winkler and G. E. Dale (2000). "Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon." J Mol Biol **296**(2): 341-9.
- Ogawa, H., K. Iwaya, M. Izumi, M. Kuroda, H. Serizawa, Y. Koyanagi and K. Mukai (2002). "Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development." Hum Pathol **33**(8): 806-11.
- Pankow, K., A. Schwiebs, M. Becker, W. E. Siems, G. Krause and T. Walther (2009). "Structural substrate conditions required for neutral endopeptidase-mediated natriuretic Peptide degradation." J Mol Biol **393**(2): 496-503.
- Pankow, K., Y. Wang, F. Gembardt, E. Krause, X. Sun, G. Krause, H. P. Schultheiss, W. E. Siems and T. Walther (2007). "Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide." Circ Res **101**(9): 875-82.
- Peters, J. H., B. M. McKay, S. M. Simasko and R. C. Ritter (2005). "Leptin-induced satiation mediated by abdominal vagal afferents." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(4): R879-84.
- Picot, J., J. Jones, J. L. Colquitt, E. Gospodarevskaya, E. Loveman, L. Baxter and A. J. Clegg (2009). "The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation." Health Technol Assess **13**(41): 1-190, 215-357, iii-iv.
- Popkin, B. M., L. S. Adair and S. W. Ng (2012). "Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries." Nutr Rev **70**(1): 3-21.
- Pozsgay, M., C. Michaud, M. Liebman and M. Orłowski (1986). "Substrate and inhibitor studies of thermolysin-like neutral metalloendopeptidase from kidney membrane fractions. Comparison with bacterial thermolysin." Biochemistry **25**(6): 1292-9.
- Prentice, A. M. and S. A. Jebb (1995). "Obesity in Britain: gluttony or sloth?" BMJ **311**(7002): 437-9.
- Rains, T. M., S. Agarwal and K. C. Maki (2011). "Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review." J Nutr Biochem **22**(1): 1-7.
- Rawlings, N. D., A. J. Barrett and A. Bateman (2012). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D343-50.
- Relton, J. M., N. S. Gee, R. Matsas, A. J. Turner and A. J. Kenny (1983). "Purification of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase') from pig brain by immunoadsorbent chromatography." Biochem J **215**(3): 519-23.
- Richards, A. M., I. G. Crozier, T. Kosoglou, M. Rallings, E. A. Espiner, M. G. Nicholls, T. G. Yandle, H. Ikram and C. Frampton (1993). "Endopeptidase 24.11 inhibition by SCH 42495 in essential hypertension." Hypertension **22**(1): 119-26.

- Rojas, J. M., R. L. Printz and K. D. Niswende (2011). "Insulin detemir attenuates food intake, body weight gain and fat mass gain in diet-induced obese Sprague–Dawley rats." Nutrition and Diabetes **1**: e10.
- Rokholm, B., J. L. Baker and T. I. Sorensen (2010). "The levelling off of the obesity epidemic since the year 1999--a review of evidence and perspectives." Obes Rev **11**(12): 835-46.
- Roques, B. P., M. C. Fournie-Zaluski, E. Soroca, J. M. Lecomte, B. Malfroy, C. Llorens and J. C. Schwartz (1980). "The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice." Nature **288**(5788): 286-8.
- Roques, B. P., M. C. Fournie-Zaluski and M. Wurm (2012). "Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain." Nat Rev Drug Discov **11**(4): 292-310.
- Rose, J. B., L. Crews, E. Rockenstein, A. Adame, M. Mante, L. B. Hersh, F. H. Gage, B. Spencer, R. Potkar, R. A. Marr and E. Masliah (2009). "Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease." J Neurosci **29**(4): 1115-25.
- Rossi, M., M. S. Kim, D. G. Morgan, C. J. Small, C. M. Edwards, D. Sunter, S. Abusnana, A. P. Goldstone, S. H. Russell, S. A. Stanley, D. M. Smith, K. Yagaloff, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (1998). "A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo." Endocrinology **139**(10): 4428-31.
- Sahli, S., B. Stump, T. Welti, W. B. Schweizer, F. Diederich, D. Blum-Kaelin, J. D. Aebi and H.-J. Böhm (2005). "A New Class of Inhibitors for the Metalloprotease Neprilysin Based on a Central Imidazole Scaffold." Helvetica Chimica Acta **88**(4): 707-730.
- Samarasinghe, A. E., S. A. Hoselton and J. M. Schuh (2010). "Spatio-temporal localization of vasoactive intestinal peptide and neutral endopeptidase in allergic murine lungs." Regul Pept **164**(2-3): 151-7.
- Sarwer, D. B., A. von Sydow Green, M. L. Vetter and T. A. Wadden (2009). "Behavior therapy for obesity: where are we now?" Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **16**(5): 347-52.
- Schill, W. B. and W. Miska (1992). "Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions." Andrologia **24**(2): 69-75.
- Schlaeger, T. M., S. Bartunkova, J. A. Lawitts, G. Teichmann, W. Risau, U. Deutsch and T. N. Sato (1997). "Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3058-63.
- Scholzen, T. E., S. König, M. Fastrich, M. Böhm and T. A. Luger (2007). "Terminating the stress: peripheral peptidolysis of proopiomelanocortin-derived regulatory hormones by the dermal microvascular endothelial cell extracellular peptidases neprilysin and angiotensin-converting enzyme." Endocrinology **148**(6): 2793-805.
- Seidell, J. C. and C. Bouchard (1997). "Visceral fat in relation to health: is it a major culprit or simply an innocent bystander?" Int J Obes Relat Metab Disord **21**(8): 626-31.

- Shimotoyodome, A., S. Haramizu, M. Inaba, T. Murase and I. Tokimitsu (2005). "Exercise and green tea extract stimulate fat oxidation and prevent obesity in mice." Med Sci Sports Exerc **37**(11): 1884-92.
- Shipp, M. A., N. E. Richardson, P. H. Sayre, N. R. Brown, E. L. Masteller, L. K. Clayton, J. Ritz and E. L. Reinherz (1988). "Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) identifies a type II integral membrane protein." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4819-23.
- Siems, W., B. Maul, W. Krause, C. Gerard, K. F. Hauser, L. B. Hersh, H. S. Fischer, G. Zernig and A. Saria (2000). "Neutral endopeptidase and alcohol consumption, experiments in neutral endopeptidase-deficient mice." Eur J Pharmacol **397**(2-3): 327-34.
- Sjostrom, L., A. K. Lindroos, M. Peltonen, J. Torgerson, C. Bouchard, B. Carlsson, S. Dahlgren, B. Larsson, K. Narbro, C. D. Sjostrom, M. Sullivan, H. Wedel and G. Swedish Obese Subjects Study Scientific (2004). "Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery." N Engl J Med **351**(26): 2683-93.
- Skidgel, R. A., S. Engelbrecht, A. R. Johnson and E. G. Erdos (1984). "Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase." Peptides **5**(4): 769-76.
- Skidgel, R. A. and E. G. Erdos (2004). "Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies." Peptides **25**(3): 521-5.
- Song, J., G. Aumuller, F. Xiao, B. Wilhelm and M. Albrecht (2004). "Cell specific expression of CD10/neutral endopeptidase 24.11 gene in human prostatic tissue and cells." Prostate **58**(4): 394-405.
- Speliotes, E. K., C. J. Willer, S. I. Berndt, K. L. Monda, G. Thorleifsson, A. U. Jackson, H. L. Allen, C. M. Lindgren, J. Luan, R. Magi, J. C. Randall, S. Vedantam, T. W. Winkler, L. Qi, T. Workalemahu, I. M. Heid, V. Steinthorsdottir, H. M. Stringham, M. N. Weedon, E. Wheeler, A. R. Wood, T. Ferreira, R. J. Weyant, A. V. Segre, K. Estrada, L. Liang, J. Nemesh, J. H. Park, S. Gustafsson, T. O. Kilpelainen, J. Yang, N. Bouatia-Naji, T. Esko, M. F. Feitosa, Z. Kutalik, M. Mangino, S. Raychaudhuri, A. Scherag, A. V. Smith, R. Welch, J. H. Zhao, K. K. Aben, D. M. Absher, N. Amin, A. L. Dixon, E. Fisher, N. L. Glazer, M. E. Goddard, N. L. Heard-Costa, V. Hoesel, J. J. Hottenga, A. Johansson, T. Johnson, S. Ketkar, C. Lamina, S. Li, M. F. Moffatt, R. H. Myers, N. Narisu, J. R. Perry, M. J. Peters, M. Preuss, S. Ripatti, F. Rivadeneira, C. Sandholt, L. J. Scott, N. J. Timpson, J. P. Tyrer, S. van Wingerden, R. M. Watanabe, C. C. White, F. Wiklund, C. Barlassina, D. I. Chasman, M. N. Cooper, J. O. Jansson, R. W. Lawrence, N. Pellikka, I. Prokopenko, J. Shi, E. Thiering, H. Alavere, M. T. Alibrandi, P. Almgren, A. M. Arnold, T. Aspelund, L. D. Atwood, B. Balkau, A. J. Balmforth, A. J. Bennett, Y. Ben-Shlomo, R. N. Bergman, S. Bergmann, H. Biebermann, A. I. Blakemore, T. Boes, L. L. Bonnycastle, S. R. Bornstein, M. J. Brown, T. A. Buchanan, F. Busonero, H. Campbell, F. P. Cappuccio, C. Cavalcanti-Proenca, Y. D. Chen, C. M. Chen, P. S. Chines, R. Clarke, L. Coin, J. Connell, I. N. Day, M. den Heijer, J. Duan, S. Ebrahim, P. Elliott, R. Elosua, G. Eiriksdottir, M. R. Erdos, J. G. Eriksson, M. F. Facheris, S. B. Felix, P. Fischer-Posovszky, A. R. Folsom, N.

Friedrich, N. B. Freimer, M. Fu, S. Gaget, P. V. Gejman, E. J. Geus, C. Gieger, A. P. Gjesing, A. Goel, P. Goyette, H. Grallert, J. Grassler, D. M. Greenawalt, C. J. Groves, V. Gudnason, C. Guiducci, A. L. Hartikainen, N. Hassanali, A. S. Hall, A. S. Havulinna, C. Hayward, A. C. Heath, C. Hengstenberg, A. A. Hicks, A. Hinney, A. Hofman, G. Homuth, J. Hui, W. Igl, C. Iribarren, B. Isomaa, K. B. Jacobs, I. Jarick, E. Jewell, U. John, T. Jorgensen, P. Jousilahti, A. Jula, M. Kaakinen, E. Kajantie, L. M. Kaplan, S. Kathiresan, J. Kettunen, L. Kinnunen, J. W. Knowles, I. Kolcic, I. R. Konig, S. Koskinen, P. Kovacs, J. Kuusisto, P. Kraft, K. Kvaloy, J. Laitinen, O. Lantieri, C. Lanzani, L. J. Launer, C. Lecoeur, T. Lehtimaki, G. Lettre, J. Liu, M. L. Lokki, M. Lorentzon, R. N. Luben, B. Ludwig, Magic, P. Manunta, D. Marek, M. Marre, N. G. Martin, W. L. McArdle, A. McCarthy, B. McKnight, T. Meitinger, O. Melander, D. Meyre, K. Midthjell, G. W. Montgomery, M. A. Morken, A. P. Morris, R. Mulic, J. S. Ngwa, M. Nelis, M. J. Neville, D. R. Nyholt, C. J. O'Donnell, S. O'Rahilly, K. K. Ong, B. Oostra, G. Pare, A. N. Parker, M. Perola, I. Pichler, K. H. Pietilainen, C. G. Platou, O. Polasek, A. Pouta, S. Rafelt, O. Raitakari, N. W. Rayner, M. Ridderstrale, W. Rief, A. Ruokonen, N. R. Robertson, P. Rzehak, V. Salomaa, A. R. Sanders, M. S. Sandhu, S. Sanna, J. Saramies, M. J. Savolainen, S. Scherag, S. Schipf, S. Schreiber, H. Schunkert, K. Silander, J. Sinisalo, D. S. Siscovick, J. H. Smit, N. Soranzo, U. Sovio, J. Stephens, I. Surakka, A. J. Swift, M. L. Tammesoo, J. C. Tardif, M. Teder-Laving, T. M. Teslovich, J. R. Thompson, B. Thomson, A. Tonjes, T. Tuomi, J. B. van Meurs, G. J. van Ommen, V. Vatin, J. Viikari, S. Visvikis-Siest, V. Vitart, C. I. Vogel, B. F. Voight, L. L. Waite, H. Wallaschofski, G. B. Walters, E. Widen, S. Wiegand, S. H. Wild, G. Willemsen, D. R. Witte, J. C. Witterman, J. Xu, Q. Zhang, L. Zgaga, A. Ziegler, P. Zitting, J. P. Beilby, I. S. Farooqi, J. Hebebrand, H. V. Huikuri, A. L. James, M. Kahonen, D. F. Levinson, F. Macciardi, M. S. Nieminen, C. Ohlsson, L. J. Palmer, P. M. Ridker, M. Stumvoll, J. S. Beckmann, H. Boeing, E. Boerwinkle, D. I. Boomsma, M. J. Caulfield, S. J. Chanock, F. S. Collins, L. A. Cupples, G. D. Smith, J. Erdmann, P. Froguel, H. Gronberg, U. Gyllensten, P. Hall, T. Hansen, T. B. Harris, A. T. Hattersley, R. B. Hayes, J. Heinrich, F. B. Hu, K. Hveem, T. Illig, M. R. Jarvelin, J. Kaprio, F. Karpe, K. T. Khaw, L. A. Kiemeny, H. Krude, M. Laakso, D. A. Lawlor, A. Metspalu, P. B. Munroe, W. H. Ouwehand, O. Pedersen, B. W. Penninx, A. Peters, P. P. Pramstaller, T. Quertermous, T. Reinehr, A. Rissanen, I. Rudan, N. J. Samani, P. E. Schwarz, A. R. Shuldiner, T. D. Spector, J. Tuomilehto, M. Uda, A. Uitterlinden, T. T. Valle, M. Wabitsch, G. Waeber, N. J. Wareham, H. Watkins, C. Procardis, J. F. Wilson, A. F. Wright, M. C. Zillikens, N. Chatterjee, S. A. McCarroll, S. Purcell, E. E. Schadt, P. M. Visscher, T. L. Assimes, I. B. Borecki, P. Deloukas, C. S. Fox, L. C. Groop, T. Haritunians, D. J. Hunter, R. C. Kaplan, K. L. Mohlke, J. R. O'Connell, L. Peltonen, D. Schlessinger, D. P. Strachan, C. M. van Duijn, H. E. Wichmann, T. M. Frayling, U. Thorsteinsdottir, G. R. Abecasis, I. Barroso, M. Boehnke, K. Stefansson, K. E. North, M. I. McCarthy, J. N. Hirschhorn, E. Ingelsson and R. J. Loos (2010). "Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index." *Nat Genet* **42**(11): 937-48.

Stephenson, S. L. and A. J. Kenny (1987a). "The hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11." *Biochem J* **243**(1): 183-7.

- Stephenson, S. L. and A. J. Kenny (1987b). "Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of the angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes." Biochem J **241**(1): 237-47.
- Sun, Y., S. Ahmed and R. G. Smith (2003). "Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite." Mol Cell Biol **23**(22): 7973-81.
- Suzuki, Y., N. Miyoshi and M. Isemura (2012). "Health-promoting effects of green tea." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **88**(3): 88-101.
- Swinburn, B. A., G. Sacks, K. D. Hall, K. McPherson, D. T. Finegood, M. L. Moodie and S. L. Gortmaker (2011). "The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments." Lancet **378**(9793): 804-14.
- Tam, L. T., S. Engelbrecht, J. M. Talent, R. W. Gracy and E. G. Erdos (1985). "The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage." Biochem Biophys Res Commun **133**(3): 1187-92.
- Tao, Y. X. (2010). "The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology." Endocr Rev **31**(4): 506-43.
- Tatham, M. H. and R. T. Hay (2009). "FRET-based in vitro assays for the analysis of SUMO protease activities." Methods Mol Biol **497**: 253-68.
- Thompson, J. S. and A. H. Morice (1996). "Neutral endopeptidase inhibitors and the pulmonary circulation." Gen Pharmacol **27**(4): 581-5.
- Tschöp, M., D. L. Smiley and M. L. Heiman (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." Nature **407**(6806): 908-13.
- Tschöp, M., C. Weyer, P. A. Tataranni, V. Devanarayan, E. Ravussin and M. L. Heiman (2001). "Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity." Diabetes **50**(4): 707-9.
- Tsigos, C., V. Hainer, A. Basdevant, N. Finer, M. Fried, E. Mathus-Vliegen, D. Micic, M. Maislos, G. Roman, Y. Schutz, H. Toplak and B. Zahorska-Markiewicz (2008). "Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines." Obes Facts **1**(2): 106-16.
- Tung, Y. C. and G. S. Yeo (2011). "From GWAS to biology: lessons from FTO." Ann N Y Acad Sci **1220**: 162-71.
- Turner, A. J. (2003). "Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries." Biochem Soc Trans **31**(Pt 3): 723-7.
- Vane, J. R. and R. M. Botting (2003). "The mechanism of action of aspirin." Thromb Res **110**(5-6): 255-8.
- Velazquez, E. F., M. Yancovitz, A. Pavlick, R. Berman, R. Shapiro, D. Bogunovic, D. O'Neill, Y. L. Yu, J. Spira, P. J. Christos, X. K. Zhou, M. Mazumdar, D. M. Nanus, L. Liebes, N. Bhardwaj, D. Polsky and I. Osman (2007). "Clinical relevance of neutral endopeptidase (NEP/CD10) in melanoma." J Transl Med **5**: 2.
- von Ruesten, A., A. Steffen, A. Floegel, A. D. van der, G. Masala, A. Tjønneland, J. Halkjaer, D. Palli, N. J. Wareham, R. J. Loos, T. I. Sorensen and H. Boeing (2011). "Trend in



- obesity prevalence in European adult cohort populations during follow-up since 1996 and their predictions to 2015." PLoS One **6**(11): e27455.
- Wadden, T. A., M. L. Butryn and C. Wilson (2007). "Lifestyle modification for the management of obesity." Gastroenterology **132**(6): 2226-38.
- Wadden, T. A., V. L. Webb, C. H. Moran and B. A. Bailer (2012). "Lifestyle modification for obesity: new developments in diet, physical activity, and behavior therapy." Circulation **125**(9): 1157-70.
- Wagener, A., A. O. Schmitt, S. Aksu, W. Schlote, C. Neuschl and G. A. Brockmann (2006). "Genetic, sex, and diet effects on body weight and obesity in the Berlin Fat Mouse Inbred lines." Physiol Genomics **27**(3): 264-70.
- Waksman, G., R. Bouboutou, J. Devin, R. Besselievre, M. C. Fournie-Zaluski and B. P. Roques (1985). "Binding of the bidentate inhibitor [3H]HACBO-Gly to the rat brain neutral endopeptidase "enkephalinase"." Biochem Biophys Res Commun **131**(1): 262-8.
- Waksman, G., E. Hamel, M. C. Fournie-Zaluski and B. P. Roques (1986). "Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of mu and delta opioid receptors in rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(5): 1523-7.
- Walther, T., D. Albrecht, M. Becker, M. Schubert, E. Kouznetsova, B. Wiesner, B. Maul, R. Schliebs, G. Grecksch, J. Furkert, A. Sterner-Kock, H. P. Schultheiss, A. Becker and W. E. Siems (2009). "Improved learning and memory in aged mice deficient in amyloid beta-degrading neutral endopeptidase." PLoS One **4**(2): e4590.
- Walther, T., H. Stepan, K. Pankow, M. Becker, H. P. Schultheiss and W. E. Siems (2004). "Biochemical analysis of neutral endopeptidase activity reveals independent catabolism of atrial and brain natriuretic peptide." Biol Chem **385**(2): 179-84.
- Wardlaw, S. L. (2011). "Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance." Eur J Pharmacol **660**(1): 213-9.
- Webb, R. L., G. D. Yasay, Jr., C. McMartin, R. B. McNeal, Jr. and M. B. Zimmerman (1989). "Degradation of atrial natriuretic peptide: pharmacologic effects of protease EC 24.11 inhibition." J Cardiovasc Pharmacol **14**(2): 285-93.
- Weber, M. A. (2001). "Vasopeptidase inhibitors." Lancet **358**(9292): 1525-32.
- Winkler, A., M. Rottmann, G. Heder, P. Hyytia, W. E. Siems and M. F. Melzig (1998). "Gene expression and activity of specific opioid-degrading enzymes in different brain regions of the AA and ANA lines of rats." Biochim Biophys Acta **1406**(3): 219-27.
- Wolfram, S., Y. Wang and F. Thielecke (2006). "Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench." Mol Nutr Food Res **50**(2): 176-87.
- Wong-Leung, Y. L. and A. J. Kenny (1968). "Some properties of a microsomal peptidase in rat kidney." Biochem J **110**(2): 5P.
- Wren, A. M., L. J. Seal, M. A. Cohen, A. E. Brynes, G. S. Frost, K. G. Murphy, W. S. Dhillo, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (2001). "Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans." J Clin Endocrinol Metab **86**(12): 5992.

- Wynne, K., A. J. Park, C. J. Small, K. Meeran, M. A. Ghatei, G. S. Frost and S. R. Bloom (2006). "Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: a randomised controlled trial." Int J Obes (Lond) **30**(12): 1729-36.
- Yang, L., J. Hao, J. Zhang, W. Xia, X. Dong, X. Hu, F. Kong and X. Cui (2009). "Ginsenoside Rg3 promotes beta-amyloid peptide degradation by enhancing gene expression of neprilysin." J Pharm Pharmacol **61**(3): 375-80.
- Yang, L. L., S. Duan, J. R. Hao, X. Y. Hu, F. Kong, L. N. Wang and X. Cui (2008). "Enhancement of neutral endopeptidase activity in SK-N-SH cells by ginsenoside Rb1." Neuro Endocrinol Lett **29**(6): 924-8.
- Yaswen, L., N. Diehl, M. B. Brennan and U. Hochgeschwender (1999). "Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin." Nat Med **5**(9): 1066-70.
- Zhang, J. H., T. D. Chung and K. R. Oldenburg (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." J Biomol Screen **4**(2): 67-73.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-32.

## 9. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Walther für die Bereitstellung des interessanten Arbeitsthemas und die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation, für die vielen Diskussionen und die exzellenten wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Ich bedanke mich vielmals bei Herrn Prof. Dr. Matthias Melzig für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Dr. Wolf Siems möchte ich mich bedanken, für die großartige Unterstützung - bei den Experimenten die am FMP durchgeführt worden, und darüber hinaus. Sein weitreichendes Wissen war für alle Bereiche meiner Arbeit eine wertvolle Bereicherung. Ebenfalls danke ich Matthias Münzner für die sehr gute Zusammenarbeit und die sehr große Hilfe bei den Arbeiten am FMP.

Dr. Fraser Courts danke ich für die chromatographische Auftrennung des Grünen Tee-Extrakts in die unterschiedlichen Fraktionen.

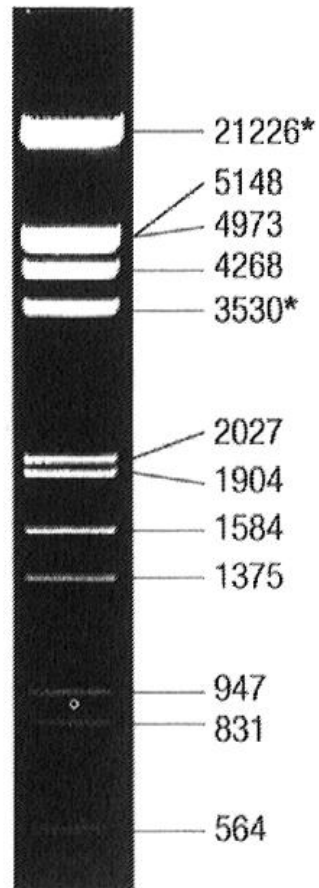
Mein herzlicher Dank gilt allen (ehemaligen) Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre und die Zusammenarbeit, insbesondere Anja, Christian, Florian, Pia, Pooja, Wang Yong und Xudong

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Promotion begleitet haben, für die Unterstützung und ihr Dasein. Ganz besonders danke ich Karina für die wunderbare Zeit und die Motivation in allen Lebenslagen.

## 10. Anhang

### Anhang 1: DNA-Marker

$\lambda$  EcoRI/ HindIII (Fragmente in bp)



1.0% agarose

## Anhang 2: Karten aller genutzter und erstellter Plasmide

