

Aus dem  
Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin  
Direktor: Prof. Dr. Werner Reutter  
Universitätsklinikum Benjamin Franklin

**Nachweis und Charakterisierung der  
Endopeptidase-Aktivität der  
Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV)**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Felix Bempohl**  
aus München

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Reutter**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Körber**

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität**

**Promoviert am 13. September 2002**

## **Zusammenfassung**

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV, CD 26) ist ein dimeres Typ II-Membranprotein, das in zahlreichen Geweben und Zellen von Säugetieren vorkommt. Innerhalb des Clans SC der nicht-klassischen Serinpeptidasen wird die DPP IV der Prolyl-Oligopeptidase-Familie (S9) zugerechnet. Sie weist eine gut charakterisierte Exopeptidase-Aktivität mit bevorzugter Spaltung hinter Prolin und Alanin auf. Ob die DPP IV darüber hinaus auch eine Endopeptidase-Aktivität besitzt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Zunächst wurde aktive DPP IV in einem dreistufigen Reinigungsverfahren, das als letzten Schritt eine Immunaffinitätschromatographie enthielt, isoliert. Das gereinigte Enzym wurde sowohl in einem Zymographie-Assay als auch in einem löslichen proteolytischen Assay zum Nachweis der spezifischen Endopeptidase-Aktivität der DPP IV eingesetzt. Dabei konnten die denaturierten fibrillären Kollagene der Typen I, II, III und V als Substrate der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität identifiziert werden. Pro min wurden durch 1 mg der eingesetzten DPP IV-Präparation ungefähr  $7,0 \times 10^{-6}$   $\mu\text{mol}$  der Typ I-Kollagen-Alpha-Ketten abgebaut, womit die Spaltungsrate als relativ niedrig zu bewerten ist. Denaturiertes Basalmembran-Kollagen (Typ IV) wurde deutlich langsamer hydrolysiert, während natives Kollagen, Albumin, Fibronectin und DPP IV selbst nicht verdaut wurden. Die höchste DPP IV-Endopeptidase-Aktivität wurde im physiologischen pH-Bereich bei 37°C beobachtet. Spaltprodukte wurden im Immunblot als relativ zahlreiche und diffuse Zwischenbanden sichtbar, so dass die DPP IV offenbar die Ketten des denaturierten Kollagens an zahlreichen Stellen spaltet. Bei Einsatz verschiedener Peptidase-Inhibitoren im löslichen proteolytischen Assay ergab sich für die Exo- und die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV ein weitgehend übereinstimmendes Inhibitionsprofil, was auf ein gemeinsames katalytisches Zentrum schließen lässt. In immunhistochemischen Untersuchungen mit Anti-Kollagen I-Antikörpern wurden bei DPP IV-negativen Fischer 344-Ratten im Disse'schen Raum der Leber vermehrt faserartige Strukturen nachgewiesen, bei denen es sich wahrscheinlich um retikuläre Fasern handelt, deren Abbau offenbar infolge der fehlenden DPP IV-Expression gestört ist. Als mögliche biologische Funktionen der hier erstmals gezeigten DPP IV-Endopeptidase-Aktivität kommen eine Beteiligung am Kollagenkatabolismus, an Zelladhäsionsprozessen, an der Translokation von Zellen sowie an der Resorption von prolinhaltigen Peptiden in Frage.

## **Abstract**

Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV, CD26) is a homodimeric type II membrane protein that is found on the cell surface of many solid tissues and different subtypes of lymphocytes in mammals. DPP IV is a member of the prolyl oligopeptidase family (S9) within the clan SC of non-classical serine peptidases. DPP IV is known to exhibit a well characterized exopeptidase activity specific for proline residues. This doctoral thesis describes a novel, specific endopeptidase activity of DPP IV. The enzyme was isolated in a three step purification procedure that included concanavalin A chromatography and immunoaffinity chromatography. The purified DPP IV was submitted to both a gelatin zymography assay and a soluble proteolytic assay in order to demonstrate and investigate its endopeptidase activity. Substrate specificity was detected for denatured fibrillar collagens (types I, II, III and V). Denatured basement membrane collagen type IV was also cleaved, but at a lower rate, whereas native collagens, albumin, fibronectin and the enzyme itself were not digested by DPP IV at all. 1 mg DPP IV was found to degrade  $7 \times 10^{-6}$   $\mu\text{mol}$  of denatured type I collagen per min under optimal conditions of 37°C at pH 7.4. Cleavage products were detected on immunoblots as multiple peptide bands in a stepladder pattern, suggesting that DPP IV recognises multiple cleavage sites within the collagen chains. Endo- and exopeptidase activities of DPP IV showed the same peptidase inhibitor profile, including similar inhibition by DFP, PMSF and diprotin A and B, which suggests that both activities of DPP IV reside in a single active site. Immunohistochemical studies using anti-collagen-pAb revealed an accumulation of fibrillar collagen structures in the space of Disse of DPP IV-deficient Fischer-344-rats, indicating a disturbed collagen metabolism in these animals. The biological relevance of DPP IV endopeptidase activity should be seen in context with other collagenases and gelatinases, as well as with DPP IV exopeptidase activity. Therefore, DPP IV might participate in processes such as final collagen degradation, cellular adhesion to collagens, cellular translocation through the ECM and resorption of proline containing peptides.

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADA	Adenosindesaminase
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. Bidest.	Bidestilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin)
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Con A	Concanavalin A
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
E.C.	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FAP	Fibroblast-Activation-Protein alpha
GIP	Glucose-abhängiges insulinotropes Polypeptid bzw. Gastrisches inhibitorisches Polypeptid
GLP	Glucagon-like-peptide
GRH	Growth hormone-releasing hormone (= Somatoliberin)
HPLC	High performance liquid chromatography
IP	Interferon-gamma-inducible protein
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MCP	Monocyte chemotactic protein
MDC	Macrophage-derived chemokine
MMP	Matrix-Metallopeptidasen
MNA	4-Methoxy-2-Naphthylamid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
NEM	N-Ethylmaleimid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POP	Prolyl-Oligopeptidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDF	Stromal cell-derived factor
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TPCK	Tosyl-L-phenylalanin-chlormethylketon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Reutter, der mich als Chef wissenschaftlich und menschlich beeindruckt hat. Mit der Themenstellung hat er einen guten Forscherinstinkt bewiesen. Für die Bereitstellung optimaler Rahmenbedingungen, die anregenden Diskussionen und die vielfältige anderweitige Förderung bin ich ihm dankbar.

Besonderen Dank schulde ich meinem Betreuer Herrn Dr. Oliver Baum. Er lehrte mich wissenschaftliches Denken und Arbeiten, lenkte meinen Blick immer wieder auf das Wesentliche und steuerte wertvolle Ideen bei. Selbst nachts um zwei Uhr war er bereit und in der Lage, Schlüsselfragen der Arbeit zu beantworten.

Herrn Dr. Klemens Löster danke ich für die Co-Betreuung zu Beginn der Experimente. Von ihm lernte ich Sorgfalt und Beharrlichkeit bei der Laborarbeit.

Herr Werner Hofmann hat mir zahlreiche proteinbiochemische Arbeitstechniken beigebracht. Ich danke ihm, dass er all die Tricks und Kniffe, die er sich im Laufe der Jahre angeeignet hat, bereitwillig an uns Junge weitergegeben hat.

Herrn Prof. Dr. Reinhart Gossrau danke ich für fruchtbare Diskussionen sowie die Unterstützung bei der Durchführung der histochemischen Experimente im Institut für Anatomie.

Ich möchte mich namentlich noch bei Herrn Prof. Dr. D. Schuppan für das Anti-Prokollagen III-Kaninchenserum, Herrn Prof. Dr. H. J. Merker für das Anti-Kollagen I-Kaninchenserum, Herrn Dr. C. Weise für die N-terminale Sequenzierung des 60 kD-Fragments, Frau H. Richter für die Unterstützung bei den histochemischen Experimenten und Herrn T. Junek sowie Herrn P. de Souza für phototechnische Hilfen bedanken. Frau G. und Herrn U. Stenneke danke ich für das gründliche Korrekturlesen, Herrn K. Ostermann für seine kompetente Hilfe im EDV-Bereich.

Viele Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Molekularbiologie und Biochemie haben durch Diskussionen, Anregungen, Hilfestellungen und eine gute Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herzlich danken möchte ich meiner Frau, die mir in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit liebevoll zur Seite stand.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern, welche die Entstehung dieser Arbeit mit großem Interesse und Zuspruch verfolgt haben. Ihnen widme ich diese Arbeit.

# INHALT

<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Die proteolytischen Enzyme</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Aufbau, Vorkommen und Funktion der DPP IV</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Die Struktur der DPP IV.....	9
1.2.2 Die Gewebeverteilung der DPP IV.....	10
1.2.3 Die Exopeptidase-Aktivität der DPP IV.....	12
1.2.4 Die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV.....	15
<b>1.3 Die Großfamilie der Kollagene</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Das Bauprinzip der Kollagene.....	16
1.3.2 Die Kollagentypen.....	17
1.3.3 Der Kollagenkatabolismus.....	19
<b>1.4 Zielsetzung</b> .....	<b>21</b>
<b>2 VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Versuchstiere</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2 Material</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 Geräte.....	22
2.2.2 Chemikalien und Verbrauchswaren.....	23
2.2.3 Antikörper.....	23
2.2.4 Puffer.....	23
<b>2.3 Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.3.1 Proteinchemische Methoden.....	23
2.3.1.1 Allgemeine proteinbiochemische Verfahren.....	23
2.3.1.1.1 Proteinbestimmung.....	23
2.3.1.1.2 Bestimmung der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität.....	24
2.3.1.2 Verfahren zur Isolierung von Membranfraktionen.....	24
2.3.1.2.1 Gewinnung von Rohmembranen aus Nierenrinden.....	24
2.3.1.2.2 Solubilisierung von Membranproteinen.....	24
2.3.1.3 Chromatographische Verfahren.....	25
2.3.1.3.1 Dünnschichtchromatographie.....	25
2.3.1.3.2 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose.....	25
2.3.1.3.3 Immunaффinitätschromatographie an mAk 13.4-Sepharose.....	26
2.3.1.3.3.1 Kopplung des mAk 13.4 an Protein G-Sepharose.....	26
2.3.1.3.3.2 Immunaффinitätschromatographie an mAk 13.4-Sepharose.....	27
2.3.1.4 Elektrophoretische Verfahren.....	28
2.3.1.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.3.1.4.2 Western-Blotting.....	29
2.3.1.5 Färbungen von PAGE-Gelen.....	30
2.3.1.5.1 Coomassie-Blue G-250.....	30
2.3.1.5.2 Silberfärbung.....	30

2.3.1.6 Nachweisverfahren auf Blot-Matrices .....	31
2.3.1.6.1 Ponceau-Rot .....	31
2.3.1.6.2 Substratfärbung zum Nachweis aktiver DPP IV .....	31
2.3.1.6.3 Immunblot .....	32
2.3.1.7 Enzymatische Verdauungen .....	33
2.3.1.7.1 Gelatin-Zymographie .....	33
2.3.1.7.2 Löslicher proteolytischer Assay .....	34
2.3.2 Histochemische Methoden .....	35
2.3.2.1 Kryostatschnittherstellung .....	35
2.3.2.2 DPP IV-Aktivitätshistochemie .....	36
2.3.2.3 Kollagen-Immunhistochemie mit polyklonalen Primärantikörpern .....	36
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Reinigung und Charakterisierung von DPP IV aus der Nierenrinde .....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Reinigung von aktiver DPP IV .....	37
3.1.2 Darstellung von DPP IV-Formen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	39
3.1.3 N-terminale Sequenzierung des 60 kD-Proteins .....	41
<b>3.2 Etablierung zweier Assays zur Untersuchung gelatinolytisch aktiver Peptidasen .....</b>	<b>42</b>
3.2.1 Gelatin-Zymographie .....	42
3.2.1.1 Herstellung von Gelatingelen .....	42
3.2.1.2 Gelatin-Zymographie mit <i>Clostridium histolyticum</i> -Kollagenase .....	43
3.2.2 Löslicher proteolytischer Assay mit <i>Clostridium histolyticum</i> -Kollagenase .....	44
3.2.2.1 Einfluss der Kollagenasemenge auf die Kollagenspaltung .....	45
3.2.2.2 Nachweis von niedermolekularen Spaltprodukten durch Dünnschichtchromatographie .....	45
3.2.2.3 Nachweis von höhermolekularen Spaltprodukten bei niedrigeren Inkubationstemperaturen .....	47
3.2.2.4 Zeitabhängigkeit der Kollagenspaltung .....	48
3.2.2.5 Verschiedene Substrate im löslichen proteolytischen Assay .....	49
3.2.2.6 Einsatz von Inhibitoren im löslichen proteolytischen Assay .....	49
3.2.2.7 Densitometrische Quantifizierung von Kollagenbanden .....	50
<b>3.3 Nachweis der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität durch Gelatin-Zymographie .....</b>	<b>51</b>
3.3.1 Einsatz der DPP IV-Präparation in den Zymographie-Assay .....	51
3.3.2 Einfluss von Elektrophoresebedingungen und Waschvorgang auf die Gelatinzymographie mit DPP IV .....	53
3.3.3 Einfluss von DPP IV-Menge und Inkubationsdauer auf die Gelatinolyse .....	54
<b>3.4 Charakterisierung der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität mit Hilfe des löslichen     proteolytischen Assays .....</b>	<b>55</b>
3.4.1 Einfluss der EDTA-Konzentration auf den löslichen proteolytischen Assay .....	55
3.4.2 Einfluss des pH auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität .....	56
3.4.3 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität .....	57
3.4.4 Nachweis von Spaltprodukten durch Immunblotting .....	58
3.4.5 Untersuchungen zur Substrat-Spezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität .....	59
3.4.5.1 Natives Albumin, Fibronectin und Kollagen im löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV .....	59

3.4.5.2 Die Spaltung denaturierten Kollagens der Typen I-V im Vergleich .....	59
3.4.6 Einfluss von Inhibitoren auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität .....	61
3.4.6.1 Diprotin A und B .....	61
3.4.6.2 Aspartat-, Cystein-, Metallo- und Serinpeptidase-Inhibitoren .....	62
<b>3.5 Untersuchungen zum DPP IV-Defizit deutscher Fischer-344-Ratten .....</b>	<b>64</b>
3.5.1 Die DPP IV-Expression in Wistar- und Fischer-Ratten .....	64
3.5.1.1 Analyse der Con A-Eluate des Nierenrinden-Rohmembran-Solubilisats .....	64
3.5.1.2 Enzymhistochemie .....	65
3.5.2 Immunhistochemie .....	65
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 Die Spaltung von denaturiertem Kollagen durch DPP IV als Beweis der     Endopeptidase-Aktivität.....</b>	<b>68</b>
<b>4.2 Ausschluss einer Kontamination .....</b>	<b>69</b>
<b>4.3 Die Spaltungsrate der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität .....</b>	<b>71</b>
<b>4.4 Die Spaltprodukte der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität.....</b>	<b>72</b>
<b>4.5 Die Spaltstellenspezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität.....</b>	<b>73</b>
<b>4.6 Die Substratspezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität .....</b>	<b>74</b>
<b>4.7 Das katalytische Zentrum der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität.....</b>	<b>76</b>
<b>4.8 Die Kollagenbindungsdomäne der DPP IV .....</b>	<b>77</b>
<b>4.9 Mögliche biologische Funktionen der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität .....</b>	<b>78</b>
4.9.1 Beteiligung am Kollagenkatabolismus .....	78
4.9.2 Beteiligung an Zelladhäsionsprozessen.....	79
4.9.3 Beteiligung an der Translokation von Zellen.....	80
4.9.4 Beteiligung an der Resorption von prolinhaltigen Peptiden.....	82
4.9.5 Funktion in Leber, Speicheldrüsen, Pankreasgang und Prostata .....	83
<b>4.10 Die DPP IV im Kontext anderer proteolytischer Enzyme.....</b>	<b>84</b>
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>