

Der ewig lebt, der hat alles miteinander geschaffen. Wer kann seine großen Taten erforschen? Selbst wenn ein Mensch dabei sein Bestes getan hat, so ist's noch kaum angefangen; und wenn er aufhört, merkt er erst, wieviel noch fehlt. Darum hat Gott Geduld mit den Menschen und schüttet seine Barmherzigkeit über sie aus.

(Sirach 18)

## 1 Einleitung und Zielsetzung

### 1.1 Die proteolytischen Enzyme

Für lebende Systeme gelten dieselben chemischen Gesetze wie für die unbelebte Welt. Dieses Erkenntnis setzte sich vor etwa einem Jahrhundert allgemein durch und hat unsere Betrachtungsweise biologischer Systeme revolutioniert. Diese wurden nämlich dadurch der naturwissenschaftlichen Beobachtung und Analyse zugänglich. Fast alle chemischen Reaktionen in biologischen Systemen werden durch Makromoleküle katalysiert, die man Enzyme nennt. Ihr katalytisches Potential ist enorm. Sie können die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor  $10^6$  -  $10^{20}$  im Vergleich zur nichtkatalysierten Reaktion beschleunigen; ohne sie laufen chemische Umsetzungen *in vivo* nur selten in nennenswertem Umfang ab. Die katalytische Aktivität vieler Enzyme ist regulierbar. Sie sind in der Regel hochspezifisch, sowohl was die katalysierte Reaktion als auch was die Wahl der Reaktionsteilnehmer (Substrate) betrifft. Mehrere tausend Enzyme sind bisher charakterisiert worden. Das Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) hat sie klassifiziert und mit einer E.C.-Nummer (Enzyme Commission) versehen (Nomenclature Committee 1992). Dabei wurden die Enzyme nach der Art der katalysierten Reaktion in sechs Hauptklassen eingeteilt: Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen. Innerhalb der Hauptklassen wird nach den chemischen Bindungen, die gelöst oder geknüpft werden, weiter aufgeteilt. Eine wichtige Untergruppe der Hydrolasen bilden die proteolytischen Enzyme (E.C. 3.4.), deren Aufgabe es ist, Peptidbindungen zu hydrolysieren. Schätzungsweise 2 % aller Gen-Produkte sind proteolytische Enzyme (Übersichten bei Nomenclature Committee 1992, Barrett 1994, Barrett et al. 1998, Karlson et al. 1994, Löffler et al. 1997, Schweizer Institut für Bioinformatik: <http://www.expasy.org>).

Nach dem Angriffsort am Substrat unterscheidet man *Exopeptidasen* und *Endopeptidasen*. Exopeptidasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine Peptidkette nur vom Ende her spalten, also nur endständige Aminosäuren, Di- und Tripeptide von einer Peptidkette ablösen können. Endopeptidasen dagegen spalten an bestimmten Stellen innerhalb einer Peptidkette. Nach dem Ende der Peptidkette, an dem die Abtrennung von Aminosäuren bzw. Peptiden erfolgt, lassen sich die Exopeptidasen in *Carboxypeptidasen* und *Amino-peptidasen* einteilen.

Nach den reaktiven Gruppen des aktiven Zentrums unterscheidet man *Serinpeptidasen* (z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Dipeptidylpeptidase IV), *Cysteinpeptidasen* (z.B. Papain), *Aspartatpeptidasen* (z.B. Pepsin, Renin, HIV-I Protease), *Metallopeptidasen* (z.B. Matrix-Metallopeptidasen, MMP) und *Threoninpeptidasen* (z.B. Proteasom-Untereinheit alpha Typ 6).

Nach der Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz, insbesondere im aktiven Zentrum, teilen Barrett und Rawlings die Peptidasen in *Familien* ein (Barrett et al. 1998, <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/merops/pnfam.htm#S01>). Trypsin wird beispielsweise der Familie S1 zugeordnet, der u.a. auch Chymotrypsin, die Leukozyten-Elastase und die Pankreatische Elastase angehören. Barrett und Rawlings gehen davon aus, dass die Mitglieder einer Familie evolutionär miteinander verwandt sind.

Ein *Clan* ist nach Barrett und Rawlings (Barrett et al. 1995, Barrett et al. 1998) eine Gruppe von Peptidase-Familien, bei denen man aufgrund von ähnlicher Tertiärstruktur oder ähnlicher Anordnung der Aminosäuren im katalytischen Zentrum eine gemeinsame Herkunft annimmt. Die Familie S1 bildet beispielsweise mit den Familien S2, S3, S6, S7, S29, S30, S31 und S32 den Clan SA, bei dem die Aminosäuren in der Reihenfolge Histidin, Asparaginsäure, Serin im katalytischen Zentrum auftreten. Bei Serinpeptidasen anderer Clans findet sich eine entsprechend andere Anordnung.

Je nach Größe des gespaltenen Substrats kann man von *Proteasen* (Substrat > 10 kD) oder *Peptidasen* (Substrat < 10 kD) sprechen. Das NC-IUBMB (Enzyme Nomenclature 1992) empfiehlt jedoch, alle proteolytischen Enzyme als Peptidasen zu bezeichnen.

Die *Spezifität der Spaltstelle* gibt die Aminosäure an, hinter welcher (bzw. seltener, vor welcher) vom N-Terminus aus gesehen gespalten wird. Beispielsweise spaltet die Enteropeptidase ausschließlich zwischen Lysin und Isoleucin, während Pepsin bevorzugt Bindungen mit aromatischen oder sauren Aminosäuren angreift (Barrett et al. 1998). Manche

bakterielle Peptidasen vermögen beliebige Peptidbindungen zu spalten. Nach Schechter und Berger (1967) werden die Reste des Substrats auf der Amino-Seite einer Spaltstelle mit P1, P2, P3 etc. und auf der Carboxy-Seite mit P1', P2', P3' etc. bezeichnet, wobei die Zählung jeweils an der Spaltstelle beginnt.

Die *Spezifität des Substrats* gibt das Substrat bzw. die Substrate an, die ausschließlich gespalten werden. Viele Peptidasen weisen keine Substratspezifität, sondern nur Spaltstellenspezifität auf. Sie sind nicht spezifisch auf bestimmte Substrate, sondern auf bestimmte Strukturmerkmale von Peptidketten eingestellt. So vermag etwa Trypsin alle Proteine anzugreifen, die Lysyl- und Arginyl-Bindungen enthalten. Andere Peptidasen dagegen besitzen neben einer Spaltstellen- auch eine hohe Substratspezifität. Dazu zählen die Peptidasen des Blutgerinnungssystems und des Komplementsystems.

Nach dem Ausmaß der Spaltung unterscheidet man *nicht-limitierte* und *limitierte* Proteolyse. Nicht-limitierte Proteolyse dient dem Abbau von Proteinen. Sie erfolgt z.B. bei der Verdauung von Nahrungseiweißen im Gastro-Intestinaltrakt und von körpereigenen Proteinen in Lysosomen. Limitierte Proteolyse dient oft der Aktivierung von Proteinen. Viele Proteine werden als inaktive Vorstufen (sog. Proproteine) synthetisiert und erst unter geeigneten Bedingungen aktiviert, indem bestimmte Peptide (sog. Propeptide) gezielt abgespalten werden. So ist die Aktivität dieser Wirkstoffe kontrollierbar. Limitierte Proteolyse erfolgt z.B. zur Aktivierung von Trypsin, Pepsin, Insulin, Albumin, Immunglobulinen, Gerinnungsfaktoren und Komplementfaktoren. Sie findet sich auch bei der Synthese von Kollagen. Nach Sekretion von Prokollagen in den Extrazellularraum werden durch eine spezifische Prokollagenpeptidase von Prokollagen Registerpeptide abgespalten, so dass Tropokollagen entsteht (Ayad et al. 1994).

Peptidasen können durch spezifische Moleküle gehemmt werden (*Inhibitoren*). Die Hemmung einer Peptidase kann reversibel oder irreversibel sein. Ein irreversibler Inhibitor dissoziiert nicht von der betroffenen Peptidase, ein reversibler rasch. Diisopropylfluorophosphat (DFP) ist ein Beispiel für einen irreversiblen Inhibitor. Es reagiert mit dem Serinrest im aktiven Zentrum einer Serinpeptidase, so dass inaktive Diisopropylphosphoryl-Peptidasen entstehen. Zu den reversiblen Inhibitoren wird u.a. Aprotinin gerechnet, ein Polypeptid, das mit den Substraten bestimmter Serinpeptidasen (Kallikrein, Chymotrypsin, Trypsin und Plasmin) um die Bindung an das aktive Zentrum konkurriert. Durch Einsatz verschiedener Inhibitoren können Peptidasen charakterisiert werden.

### 1.2 Aufbau, Vorkommen und Funktion der DPP IV

#### 1.2.1 Die Struktur der DPP IV

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) wurde von Hopsu-Havu und Glenner in Ratten-Leber-Homogenaten und kommerziellen Enzympräparationen entdeckt und erstmals 1966 als "Glycyl-prolyl-naphthylamidase" beschrieben (Hopsu-Havu et al. 1966). Ein Jahr später erfolgte die partielle Reinigung aus der Mikrosomenfraktion der Rattenleber (Hopsu-Havu et al. 1967). Die Primärstruktur der Ratten-DPP IV wurde von Hong und Doyle (1987) erstmals publiziert und später mit geringen Abweichungen bestätigt (Ogata et al. 1989, Xu 1992). Ebenfalls entschlüsselt sind die Sequenzen der cDNA der humanen DPP IV (Darmoul et al. 1990, Misumi et al. 1992) und der murinen DPP IV (Marguet et al. 1992). Zwischen humaner und Ratten-DPP IV besteht eine Ähnlichkeit von 84,5 % (Misumi et al. 1992). Die cDNA der Ratten-DPP IV kodiert eine Sequenz von 767 Aminosäuren, aus der sich eine Einteilung der DPP IV in fünf strukturelle Domänen ableiten lässt (Reutter et al. 1995). Diese wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt, welche drei distinkte und voneinander relativ unabhängige extrazelluläre Domänen zeigte (Lambeir et al. 1997). Die sechs N-terminalen Aminosäuren bilden das zytoplasmatische Ende des integralen Membranglykoproteins (Hong et al. 1990). Auf die N-terminale intrazelluläre Domäne, welche die DPP IV als Typ II-Membranprotein kennzeichnet, folgen 22 hydrophobe Aminosäuren, welche die Transmembrandomäne bilden. An das transmembrane Segment schließen sich 296 Aminosäuren an, die reich an Kohlenhydratseitenketten in N-glykosidischer Bindung sind. Fünf von insgesamt acht Glykosylierungsstellen der DPP IV finden sich in dieser Domäne (Hong et al. 1987). Der Grad der Glykosylierung variiert zwischen den Species und Geweben (Hartel et al. 1988b). Untersuchungen an mutierten DPP IV-Molekülen legen nahe, dass die Glykosylierungsstellen möglicherweise für subzelluläres Protein-Trafficking und korrekte Proteinfaltung eine Rolle spielen (Fan et al. 1997). O-Glykosylierung ist für die DPP IV nicht nachgewiesen. Die vierte Domäne (228 Aminosäuren) enthält zehn der insgesamt zwölf Cysteinreste der DPP IV. Die cysteinreiche Domäne ist für die Bindung an die Adenosindesaminase (ADA) verantwortlich (Morimoto et al. 1998). Titrationsexperimente wiesen sechs freie Cysteine und drei Disulfid-Brücken in nativer Ratten-DPP IV nach. Welche Cysteine an den Disulfid-Brücken beteiligt sind, ist noch unbekannt. Cystein-Punktmutationen von Ratten-DPP IV ergaben, dass die Cysteinreste 326, 337, 445, 448, 455, 473 und 552 für die korrekte Faltung und das intrazelluläre Trafficking essentiell sind (Dobers et al. 2000). Die C-terminale Domäne, die aus 214 Aminosäuren besteht, enthält das aktive Zentrum der Serinpeptidase mit der katalytischen

Triade, die in der Ratten-DPP IV durch Serin 631, Aspartat 709 und Histidin 741 gebildet wird (Ogata et al. 1992, Marguet et al. 1992, David et al. 1993).

Die DPP IV bildet unter physiologischen Bedingungen auf Zelloberflächen ein Dimer zweier identischer Protein-Ketten, die beide enzymatisch aktiv sind (Kenny et al. 1976, Kreisel et al. 1982). Die Monomere sind nicht-kovalent miteinander verbunden. Ob die Dimerisierung vor dem Transport in den Golgi-Apparat (Danielsen 1994) oder nach komplexer Glykosylierung in einem späten Golgi-Kompartiment (Jascur et al. 1991) stattfindet, ist noch nicht geklärt.

### 1.2.2 Die Gewebeverteilung der DPP IV

Die DPP IV kommt in vielen Geweben und Zellen von Säugetieren vor, wobei die jeweilige Konzentration stark variiert. Durch Immunhistochemie und Aktivitätshistochemie ließ sich folgende physiologische Gewebeverteilung der DPP IV ermitteln (Hopsu-Havu et al. 1969, McDonald et al. 1986, Hartel et al. 1988, Reutter et al. 1989): In der Niere, wo die DPP IV in besonders hoher Konzentration vorliegt, findet sie sich vor allem in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus, aber auch apikal in der absteigenden Henle-Schleife und auf Podozyten in der Region der glomerulären Basalmembran. Auch die Bürstensaummembranen von Enterozyten im Dünndarm enthalten viel DPP IV. In der Leber ist die DPP IV vor allem am Gallepol der Hepatozyten und in der luminalen Membran von Gallengangsepithel lokalisiert. Jedoch ist sie auch in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten und auf Sinusoidendothel nachgewiesen worden (Hartel et al. 1988, Piazza et al. 1989, Thompson et al. 1991, Loch 1992). Unter den Zellen des Immunsystems findet sich DPP IV insbesondere als CD26 auf T-Lymphozyten, aber auch auf Gewebemakrophagen, natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten (Augustyns et al. 1999). Auch ist die DPP IV auf Fibroblasten nachgewiesen worden (Hartel et al. 1988, Bauvois 1988, Atherton et al. 1992). Besonders hohe Konzentrationen lagen im subepithelialen Bindegewebe von Haut, Ösophagus, Ureter und Penis vor. DPP IV ist aber auch im Bindegewebe von Brustdrüse, Plazenta, Lunge und Synovia vorhanden. Nur geringe DPP IV-Expression zeigte die Lamina propria von Dünndarm und Endometrium. In der Haut wird DPP IV auch auf Keratinozyten und Melanozyten exprimiert. Weiterhin konnte DPP IV auf Epithelzellen des Pankreasganges und der Prostata sowie im Streifenstück der Glandulae parotidea und submaxillaris dargestellt werden. Die DPP IV kommt auf den luminalen Membranen der Endothelzellen von Sinus, Kapillaren, Venolen und Arteriolen vieler Gewebe vor, u.a. in Myokard, quergestreifter Muskulatur, Lunge, Aorta,

endokrinen Organen und Gehirn. Im adulten Gehirn ist DPP IV zudem auf leptomeningealen Zellen, auf Ependymzellen des Plexus chorioideus und auf vereinzelt Pyramidenzellen des Neocortex lokalisiert (Gossrau 1979, Bernstein et al. 1987). Bernstein et al. (1987) zeigten in immunhistochemischen Untersuchungen von spontan abgegangenen Feten (Gestationswochen 16, 20 und 22), dass DPP IV auf fetalen Neuroblasten in Neocortex, Cerebellum, Hypothalamus und Hippocampus in hohen Konzentrationen exprimiert wird. Gliazellen enthalten keine DPP IV. Im peripheren Nervensystem findet sich DPP IV im Perineurium und in den Schwann-Zellen. In der Endometriumschleimhaut kommen in der Sekretionsphase erhöhte DPP IV-Konzentrationen vor (Imai et al. 1992). Nach der Ovulation wird DPP IV in Granulosaluteinzellen und Theka-interna-Zellen exprimiert (Fujiwara H et al. 1992). In der Plazenta wird DPP IV auf Trophoblastzellen und Amnionepithelzellen nachgewiesen. Alveolarzellen der Lunge und Schilddrüsengewebe enthalten keine DPP IV.

Neben der membrangebundenen wurde auch eine lösliche Form der DPP IV beobachtet, die u.a. im Serum, in Lysosomen der Leber und in sekretorischen Granula des Pankreas gefunden wurde. Der löslichen Form fehlt das zytosolische und das transmembrane Segment (Hartel et al. 1988a, Poulsen et al. 1993, Iwaki-Egewara et al. 1998).

Verminderte DPP IV-Expression wurde u.a. beobachtet beim Morris-Hepatom 7777 der Ratte (Reutter et al. 1989, Loch et al. 1992) und bei Metastasen des Prostata-Karzinoms (Bogenrieder et al. 1997). Gesteigerte Expression ist u.a. beschrieben bei T-Lymphozyten-Aktivierung, Muskeldystrophie und denervierenden Erkrankungen (Walter et al. 1980), einem aggressiven hepatosplenischen T-Zell-Lymphom (Ruiz et al. 1998), beim Prostata-Karzinom im Karzinom-Gewebe und in angrenzenden benignen hyperplastischen Drüsen (Wilson et al. 2000), beim Adenokarzinom der Lunge (Asada et al. 1993), beim Basaliom und umgebenden Gewebe (Schlagenhauff et al. 1992) sowie bei papillären und follikulären Karzinomen der Schilddrüse (Kotani et al. 1991). Beim hepatozellulären Karzinom des Menschen (Stecca et al. 1997) und beim malignen Melanom des Menschen (Van den Oord 1998) wurde in manchen Präparaten eine gesteigerte, in anderen eine reduzierte DPP IV-Aktivität beobachtet. Für die malignen Melanome wird daher eine Stadienabhängigkeit der DPP IV-Expression diskutiert.

Watanabe et al. (1987) beobachteten, dass Fischer-344-Ratten, die sie von Charles River Japan erworben hatten, in allen Geweben nur eine minimale DPP IV-Aktivität besaßen. Immundiffusion nach Ouchterlony zeigte keine Reaktion zwischen einem DPP IV-Antiserum und Nierenmembranen der Ratte, so dass die fehlende Aktivität auf mangelndes DPP IV-

Protein in der Membranfraktion zurückgeführt wurde, was andere Arbeitsgruppen bestätigten (Gossrau et al. 1990, Erickson et al. 1992). Northern-Blot-Analyse ergab keinen Unterschied in Größe und Menge von DPP IV-mRNA zwischen den defizienten und normalen Ratten (Thompson et al. 1991, Erickson et al. 1992, Tsuji et al. 1992). Durch Klonierung und Sequenzierung von DPP IV-cDNA ließ sich eine Transition von G nach A im Nukleotid 1897 der defizienten Ratte nachweisen, die zu einem Ersatz von Glycin 633 durch Arginin in unmittelbarer Nachbarschaft des reaktiven Serin 631 im aktiven Zentrum des Enzyms führt (Tsuji et al. 1992). Pulse-chase-Experimente zeigten, dass die mutierte DPP IV zunächst zwar synthetisiert, dann aber nicht prozessiert, sondern rasch degradiert wird (Erickson et al. 1992, Tsuji et al. 1992). Immunelektronenmikroskopisch ließ sich die mutierte DPP IV nur im endoplasmatischen Retikulum nachweisen, jedoch nicht im Golgi-Apparat und auf der Zelloberfläche (Tsuji et al. 1992). Wie sich herausstellte, besteht das DPP IV-Defizit nur bei bestimmten Stämmen der Fischer-344-Ratten. Ein DPP IV-Defizit ist u.a. für deutsche und japanische Stämme beschrieben, während amerikanische Stämme intakte DPP IV exprimieren (Gossrau et al. 1990, Thompson et al. 1991).

### 1.2.3 Die Exopeptidase-Aktivität der DPP IV

Da die DPP IV Dipeptide am N-Terminus von Peptiden abtrennt, wählte die Commission on Biochemical Nomenclature 1973 für die von Hopsu-Havu et al. (1966) so bezeichnete Glycyl-prolyl-naphthylamidase den Namen Dipeptidylaminopeptidase IV. Bevorzugt spaltet die DPP IV, wenn Prolin an vorletzter Stelle steht, d.h. in der P1-Position nach Schechter und Berger (1967; Übersicht über die Substrat-Spezifität der DPP IV bei Demuth et al. 1995). Mit geringerer Aktivität spaltet die DPP IV außerdem hinter Alanin und Hydroxyprolin. Darüber hinaus ist beschrieben, dass die DPP IV in Analoga von Somatoliberin (Growth hormone-releasing hormone, GRH) mit minimaler Aktivität hinter Serin, Glycin, Threonin, Leucin und Valin zu spalten vermag (Bongers et al. 1992, Kubiak et al. 1993, Martin et al. 1993). Bei Derivaten von Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) vermag die DPP IV hinter Serin und Glycin zu spalten (Siegel et al. 1999). Bei anderen Substraten als den genannten Hormonen der GRH-Glucagon-Familie konnte dieses Spaltverhalten nicht beobachtet werden (Kenny et al. 1976, Yoshimoto et al. 1977, Walter et al. 1980, Heins et al. 1984, Heins et al. 1988, Bongers et al. 1992, Rahfeld et al. 1991, Demuth et al. 1995). Während in Position P2 alle 20 Aminosäuren lokalisiert sein dürfen, werden in Position P1' N-methylierte Verbindungen, Prolin und Hydroxyprolin nicht akzeptiert, wie z.B. bei Bradykinin (Kenny et al. 1976, Yoshimoto et al.

1977, Kato et al. 1978, Demuth et al. 1995, Mentlein 1999, Augustyns et al. 1999). Am N-Terminus muss die Amino-Gruppe protoniert sein, was sich auf die pH-Abhängigkeit der Exopeptidase-Aktivität auswirkt. Die Peptidbindung zwischen P1 und P2 muss die *trans*-Form aufweisen. Die Aminosäuren in den Positionen P1 und P2 müssen in der L-Konfiguration vorliegen (Demuth et al. 1995).

Seit Entdeckung der DPP IV wird über ihre biologische Funktion spekuliert. Etliche (potentielle) physiologische Substrate sind untersucht worden, aber auch eine Beteiligung an zellulären Vorgängen, die von der proteolytischen Aktivität unabhängig sind, konnte beobachtet werden.

Zahlreiche bioaktive Peptide (Übersicht bei Mentlein 1999) besitzen Prolin am N-Terminus in vorletzter Position. Aufgrund der einzigartigen Struktur von Prolin sind Peptidbindungen mit Prolinresten weitgehend resistent gegenüber Proteolyse (Vanhoof et al. 1995). Peptide mit Prolinresten an vorletzter Stelle werden oft nur von spezialisierten Exopeptidasen angegriffen. Die Prolin-Spezifität der DPP IV und ihre Lokalisation als Ektoenzym in der Plasmamembran führten zu der Annahme, dass sie eine regulatorische Funktion in der Aktivierung oder Inaktivierung von bioaktiven Peptiden besitze. Während frühe Studien sich vor allem der Frage widmeten, ob verschiedene Neuropeptide, Peptidhormone und Chemokine durch DPP IV gespalten werden, zielten spätere Experimente darauf ab, die biologische Funktion der DPP IV in Zellsystemen und *in vivo* aufzuklären. Als nützlich erwiesen sich dabei oft die Anwendung von DPP IV-spezifischen Inhibitoren und die Untersuchung von DPP IV-negativen Fischer-344-Ratten. Unter den *Neuropeptiden* kommen insbesondere Substanz P (Kato et al. 1978, Heymann et al. 1978), Endomorphin 2 (Shane et al. 1999), Beta-Casomorphin (Nausch et al. 1990) sowie Neuropeptid Y (Mentlein et al. 1993a) als biologische Substrate der DPP IV in Frage. Bradykinin kann durch DPP IV nur gespalten werden, wenn eine andere Exopeptidase zuvor den Arginyl-Rest am N-Terminus entfernt (Kato et al. 1978). Unter den *Peptidhormonen* spielen neben Peptid YY (Mentlein et al. 1993a) insbesondere die Mitglieder der Somatoliberin-Glucagon-Familie eine Rolle als physiologische Substrate der DPP IV. Zur Somatoliberin-Glucagon-Familie gehören u.a. GRH (Bongers et al. 1992, Mentlein et al. 1993b), GLP-1 (Mentlein et al. 1993b), GLP-2 (Brubaker et al. 1997) und das Glucose-abhängige insulinotrope Polypeptid (Gastrisches inhibitorisches Polypeptid, GIP) (Mentlein et al. 1993b). GLP-1 wird postprandial von Enteroglucagon-Zellen im Dünn- und Dickdarm freigesetzt und stimuliert die Insulin-Sekretion, während es die Glucagon-Sekretion hemmt.

Zur Zeit werden DPP IV-Inhibitoren und DPP IV-resistente GLP-1-Derivate darauf untersucht, ob sie zur Therapie des Diabetes mellitus vom Typ II eingesetzt werden können (Holst et al. 1998a, Holst et al. 1998b, Mentlein 1999). Außerdem wurden in den letzten Jahren vermehrt *Chemokine* zum Gegenstand der DPP IV-Forschung, insbesondere das RANTES-Protein (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), Eotaxin, das Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10), das Monocyte chemotactic protein 2 (MCP-2), das Makrophage-derived chemokine (MDC) und der Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) (Oravecz et al. 1997, Shioda et al. 1998, Proost et al. 1999). Bei den Chemokinen wurde teilweise beobachtet, dass die Abspaltung des N-terminalen Dipeptids sie für einige Rezeptor-Subtypen inaktivierte, für andere dagegen aktivierte. So ist denkbar, dass die DPP IV durch Prozessierung von Chemokinen die Zielzell-Spezifität von Chemokinen reguliert (Mentlein 1999). Neben bioaktiven Peptiden vermag die DPP IV auch Fibrin-Alpha-Ketten zu spalten (Mentlein et al. 1982). Die DPP IV könnte also einen antikoagulatorischen Effekt besitzen.

Die bislang genannten potentiellen Substrate erklären nicht die hohe Expression von DPP IV in der apikalen Plasmamembran der proximalen Tubuluszellen in der Niere und der Enterozyten. Dort trägt die DPP IV durch ihre Exopeptidase-Aktivität zur Spaltung von filtrierten bzw. mit der Nahrung aufgenommenen Peptiden bei, die nach ihrer Verdauung zu Aminosäuren, Di- oder Tripeptiden (re)absorbiert werden können (Tiruppathi et al. 1990a, Tiruppathi et al. 1990b, Tiruppathi et al. 1993, Watanabe et al. 1993). Dazu passt der Befund, dass nach fünftägigem Fasten die DPP IV-Aktivität in der Bürstensaummembran von Darm und Niere der Ratte deutlich anstieg (Ihara et al. 2000). Die physiologische Funktion der DPP IV am Gallepol der Hepatozyten ist noch unklar.

Wesentliche biologische Funktionen, die der DPP IV zugeschrieben werden, stehen möglicherweise nicht im Zusammenhang mit ihrer proteolytischen Aktivität. Die DPP IV findet sich als CD26 auf der Oberfläche von T-Lymphozyten (Ulmer et al. 1990, Morimoto et al. 1998, De Meester et al. 1999). Im Verlauf der Aktivierung von T-Lymphozyten wird DPP IV vermehrt exprimiert. Sie trägt aber auch selbst zur Aktivierung der T-Lymphozyten bei. Trotz ihres nur sechs Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Endes übt sie offenbar eine kostimulatorische Funktion im T-Zell-Rezeptor-vermittelten Aktivierungsweg aus. Die Signalübertragung erfolgt vermutlich durch Interaktion mit den Membranproteinen CD45 und Adenosindesaminase (ADA). Darüber hinaus wird der DPP IV eine Rolle bei der Pathogenese von AIDS zugeschrieben (Ohtsuki et al. 2000). Welche Funktion die DPP IV-Exopeptidase-

Aktivität bei der T-Zell-Aktivierung und bei der Pathogenese von AIDS besitzt, ist allerdings noch unklar.

### 1.2.4 Die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV

Neben der Exopeptidase-Aktivität wurde auch eine Endopeptidase-Aktivität der DPP IV beschrieben. Kenny et al. (1976) beobachteten die Spaltung der N-terminal blockierten Peptide Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro und Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala durch DPP IV. Die Hydrolyse erfolgte jeweils auf der Carboxyl-Seite des Prolin-Rests und erforderte längere Inkubationszeiten sowie höhere Enzym-Konzentrationen als der Umsatz von Substraten der Exopeptidase-Aktivität. Yoshimoto et al. (1977) vermuteten, dass die beobachtete Endopeptidase-Aktivität auf eine kopurifizierte Prolyl-Oligopeptidase zurückzuführen sei. Bei einer Überprüfung der benutzten DPP IV-Präparation fanden Kenny et al. Spuren von Prolyl-Oligopeptidase und widerriefen ihr Postulat einer DPP IV-Endopeptidase-Aktivität (David et al. 1979). Lojda et al. (1988) beschrieben erneut eine DPP IV-Endopeptidase-Aktivität. Sie berichteten, dass aus der Schweineniere isolierte DPP IV das N-terminal blockierte Peptid Z-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-4-Methoxy-2-Naphthylamid (Z-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-MNA) mit geringer Spaltungsrate umsetzte. Die beobachtete Aktivität war durch DFP inhibierbar. Vermutlich wegen Kontaminationsverdachts haben die Ergebnisse von Lojda et al. (1988) wenig Beachtung gefunden. Weitere Berichte über eine DPP IV-Endopeptidase-Aktivität gegenüber synthetischen Peptiden liegen nicht vor.

Als Substrat einer möglichen DPP IV-Endopeptidase-Aktivität wurde schon 1969 von Hopsu-Havu et al. Kollagen in Erwägung gezogen, da es wie die DPP IV im Körper weit verbreitet ist und zudem zahlreiche Prolinreste besitzt, die potentielle Spaltstellen für die Prolin-spezifische DPP IV darstellen. Diese Hypothese wurde später durch experimentelle Befunde unterstützt. So zeigte sich in Bindungsassays und bei Affinitätschromatographie über Kollagen-Sepharose, dass die DPP IV an natives und denaturiertes Kollagen zu binden vermag (Hanski 1987, Hanski et al. 1988, Löster 1994, Löster et al. 1995). Adhäsionsassays zeigten eine Beteiligung der DPP IV an der Zell-Matrix-Interaktion. Man beobachtete, dass die Abflachung von Zellen auf einer Kollagenmatrix gehemmt wurde, wenn man bestimmte DPP IV-Antikörper oder auch die DPP IV kompetitiv inhibierende Tripeptide, wie z.B. Gly-Pro-Ala oder Val-Pro-Leu, zugab (Hanski et al. 1985, 1988, Hanski 1987, Bauvois 1988).

Erste Versuche zur Kollagenspaltung durch DPP IV wurden von Hanski (1987) durchgeführt.

Er inkubierte 100 mU DPP IV mit <sup>3</sup>H-markiertem Kollagen für 48 h und konnte nach anschließender SDS-PAGE und Fluorographie Proteinfragmente mit einem Molekulargewicht unter 2 kD nachweisen. Außerdem beobachtete er, dass DPP IV-haltige Liposomen aus mit <sup>3</sup>H-markiertem Kollagen kovalent modifizierten Deckgläsern Radioaktivität freizusetzen vermochten. Da der Nachweis der Kollagenspaltung durch DPP IV nur indirekt erfolgte, konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, dass eine kontaminierende Peptidase den geringfügigen Abbau von Kollagen bewirkt hatte.

### 1.3 Die Großfamilie der Kollagene

Kollagene bilden mit ca. 25-30 % des Gesamtproteins die quantitativ bedeutendste Proteinklasse bei Säugetieren. Sie sind nahezu überall im Körper vorhanden. Mit Elastin, Proteoglykanen und adhäsiven Glykoproteinen stellen sie die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix dar. Die wesentliche Funktion der Kollagene liegt darin, Geweben und Organen mechanische Stabilität zu verleihen und ihre strukturelle Integrität aufrechtzuerhalten. Kollagenfasern besitzen aufgrund ihrer Molekularstruktur eine höhere Zugfestigkeit als Stahl. Sie beträgt bei Kollagenfasern bis zu 6 kg/mm<sup>2</sup>. Der Name "Kollagen" geht auf die Beobachtung zurück, dass beim Kochen von kollagenem Bindegewebe Leim (griechisch: κολλα) entsteht (Übersicht über die Kollagene bei Junqueira et al. 1991, Löffler et al. 1997, Ayad et al. 1994, Van der Rest et al. 1991).

#### 1.3.1 Das Bauprinzip der Kollagene

Die Großfamilie der Kollagene wird in fibrilläre und nicht-fibrilläre Kollagene eingeteilt. Charakteristisches Merkmal aller Kollagentypen ist, dass sie Bestandteil der extrazellulären Matrix sind und zumindest eine tripelhelikale Domäne besitzen.

*Fibrilläre Kollagene* weisen durchgehend Tripelhelixstruktur auf. Die bereits mit bloßem Auge erkennbare Struktur des fibrillären Kollagens ist die Kollagenfaser. Sie besteht aus mehreren Kollagenfibrillen, die im Lichtmikroskop erkennbar sind. Kollagenfibrillen setzen sich aus mehreren Mikrofibrillen zusammen, die elektronenmikroskopisch darstellbar sind. Die Bausteine der Mikrofibrillen sind Tropokollagen-Moleküle, die aus drei Polypeptidketten (Alpha-Ketten) bestehen, welche in Form einer rechtsgedrehten Tripelhelix umeinander gewunden sind. Eine komplette Windungstour beträgt 0,87 nm. Die Alpha-Ketten des fibrillären Kollagens bestehen über eine Strecke von mehr als 1000 Aminosäuren aus der

repetitiven Sequenz Gly-X-Y. An der Position X findet sich meist Prolin, an Position Y oft Hydroxyprolin. Beispielsweise enthält die aus 1464 Resten bestehende Alpha1-Kette von Typ I-Kollagen des Menschen 391mal die Aminosäure Glycin und 278mal die Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin (Ayad et al. 1994). Das regelmäßige Auftreten von Glycin im Bereich der helikalen Strukturen ist dadurch bedingt, dass in das enge Innere der Tripelhelix keine andere Aminosäure als Glycin passt, dessen "Seitenkette" nur aus einem Wasserstoff besteht. Die Prolin- und Hydroxyprolinreste stabilisieren die Tripelhelix dadurch, dass sich ihre Pyrrolidinringe gegenseitig ausweichen, so dass der Peptidkette nur eine geringe Drehung in sich möglich ist. Außerdem ist der Sauerstoff des Prolin besonders elektronegativer und bietet sich deshalb für feste Wasserstoffbrückenbindungen an. Auch die Hydroxyl-Gruppe von Hydroxyprolin ist an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Die Wasserstoffbrückenbindungen verknüpfen die drei Alpha-Ketten miteinander, treten jedoch nicht innerhalb einer Kette auf. Lysin- und Hydroxylysinreste haben eine große Bedeutung bei der Bildung von kovalenten Bindungen innerhalb und zwischen den Tropokollagen-Molekülen, die für die Zugfestigkeit des Kollagens entscheidend sind. Hydroxylysinreste sind ferner potentielle Glykosylierungsstellen für Galaktose und Glykosylgalaktose. Neben helikalen Domänen weisen Tropokollagenmoleküle auch nicht-helikale Abschnitte auf. Diese befinden sich sowohl am Amino- als auch am Carboxyl-Ende der Peptidketten und werden als Telopeptide (16-25 Aminosäuren) bezeichnet.

Die *nicht-fibrillären Kollagene* weisen die Tripelhelixstruktur nur in bestimmten Molekülanteilen auf. Sie besitzen auch größere globuläre Domänen, wodurch sich ihre Quartärstruktur erheblich von der der fibrillären Kollagene unterscheidet.

Die für Kollagene charakteristische tripelhelikale Struktur findet sich auch in anderen Proteinen, wie z.B. in dem Enzym Azetylcholinesterase und der C1q-Komponente des Komplementsystems. Diese werden aber nicht zu den Kollagenen gerechnet, da sie nicht Bestandteile der extrazellulären Matrix sind (Van der Rest et al. 1991, Ayad et al. 1994).

### 1.3.2 Die Kollagentypen

Zur Zeit sind 20 verschiedene Kollagentypen bekannt (Koch et al. 2001). Die Kollagentypen I, II und III stellen die "klassischen" fibrillären Kollagene dar und machen etwa 90 % aller Kollagene im Körper aus. Zu den fibrillären Kollagenen werden außerdem die Typen V und XI gerechnet. Die nicht-fibrillären Kollagene weisen eine Vielfalt von supramolekularen Strukturen

auf. Die Typ IV-Kollagenmoleküle sind etwa 90 nm länger als die fibrillären Kollagene. Ihre Tripelhelix ist durch etwa 20 nicht-helikale Abschnitte unterbrochen, in denen die Kette eine erhöhte Flexibilität aufweist. In der N-terminalen Region befindet sich eine zusätzliche Tripelhelix, die von der Haupthelix abgeknickt ist; die C-terminale Region weist eine globuläre Domäne auf. Aus diesem Grunde können sich die Fibrillen nicht zusammenlagern. Stattdessen bildet Typ IV-Kollagen ein dreidimensionales Netzwerk. Dieses unterscheidet sich von den fibrillären Kollagenen durch N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharidketten und einen wesentlich höheren Gehalt an hydroxylierten Lysyl- und glykosylierten Hydroxylysylresten (Löffler et al. 1997). Typ VI-Kollagen ist gekennzeichnet durch perlschnurartige Filamente, Typ VII-Kollagen durch Ankerfibrillen zwischen Basalmembran und Gewebestroma. Die Kollagentypen VIII und X formen ein hexagonales Netzwerk.

Je nach Kollagentyp setzt sich die Tripelhelix aus drei identischen Alpha-Ketten (Homotrimer) oder aus zwei bzw. drei verschiedenen Alpha-Ketten (Heterotrimer) zusammen. Bei den Kollagentypen II und III handelt es sich um Homotrimere, bei den Kollagentypen I, IV und V um Heterotrimere. Bei Auftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese werden entsprechend der Molekül-Zusammensetzung eine, zwei oder drei Alpha-Ketten sichtbar. Außerdem stellen sich Beta- und Gamma-Komponenten dar, bei denen es sich um zwei bzw. drei durch Quervernetzungen zusammenhängende Alpha-Ketten handelt. Bei den Beta-Komponenten von Heterotrimern kann man eine Beta12-Komponente (aus Alpha1- und Alpha2-Kette) von einer Beta11-Komponente (aus zwei Alpha1-Ketten) unterscheiden (Beier et al. 1966).

Typ I-Kollagen zeichnet sich durch hohe Zugfestigkeit aus und findet sich u.a. in Dermis, Faszien, Knochen, Sehnen und Organkapseln. Typ II-Kollagen besitzt eine besondere Widerstandsfähigkeit gegen intermittierende Druckbelastung und ist in Knorpelgewebe, Glaskörper und Nucleus pulposus vorhanden. Typ III-Kollagen (retikuläre Fasern) dient der Strukturhaltung in Organen und kommt vor allem im retikulären Bindegewebe von Milz, Lymphknoten und Knochenmark vor. Retikuläre Fasern treten aber auch unabhängig von retikulären Zellen auf und bilden in manchen Organen (z.B. Leber, Niere, Herz, Lunge, endokrine Drüsen) Netze um die zugehörigen Parenchymzellen, oder sie fügen sich an Grenzflächen zwischen Epithel und Muskulatur (z.B. in Arterien, Uterus, Darmwand) zu feinen Gittern zusammen, die flexibel sind und sich Form- oder Volumenänderungen anpassen können. Auch sind retikuläre Fasern in Corium, Endomysium und Endoneurium zu finden.

Typisch sind sie ferner für fetales Bindegewebe, wo es mit fortschreitender Entwicklung durch Typ I-Kollagen ersetzt wird. Typ IV-Kollagen, das in endothelialen und epithelialen Basallaminae und Basalmembranen vorkommt, trägt zur Erhaltung der Architektur der Zellschichten bei. Die Funktion der Kollagentypen V und XI liegt möglicherweise in der Regulation des Durchmessers der aus den Kollagentypen I und II gebildeten Fibrillen. Die Kollagentypen IX, XII, XIV, XIX und XX verbinden vermutlich die Fibrillen der Kollagentypen I und II untereinander und mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Sie werden "fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Helices" genannt (Ayad et al. 1994, Löffler et al. 1997).

Die fibrillären Kollagene können "molekulare Legierungen" bilden, d.h. Fibrillen formen, in denen Kollagenmoleküle verschiedener Typen kopolymerisieren (Ayad et al. 1994, Van der Rest et al. 1991).

### 1.3.3 Der Kollagenkatabolismus

Kollagenes Bindegewebe ist keineswegs inert, sondern unterliegt einem kontinuierlichen Umsatz. Die Kollagenfibrillen besitzen eine von Bindegewebe zu Bindegewebe unterschiedlich lange Halbwertszeit, die z.B. in der Haut 200 Tage, im Muskel 60 Tage und in der Leber 30 Tage beträgt. Synthese und Degradation befinden sich normalerweise in einem dynamischen Gleichgewicht. Die *Degradation von Kollagenen* erfolgt durch ein Zusammenspiel einer Vielzahl von Enzymen, deren Aktivität durch Zytokine reguliert wird. Eingeleitet wird der Kollagen-Abbau durch Substrat-spezifische Kollagenasen aus der Familie der Matrix-Metallopeptidasen (MMP). Die Spaltung erfolgt an spezifischen Punkten. So wird z.B. Typ I-Kollagen durch MMP-1 zwischen den Resten Glycin 775 und Isoleucin 776 in den Alpha 1-Ketten sowie korrespondierend zwischen Glycin und Leucin in der Alpha 2-Kette gespalten, was in 3/4 und 1/4 Fragmenten resultiert (Lauer-Fields et al. 2000). Da die Schmelztemperatur von Tripelhelixfragmenten bei 29-32 °C liegt, denaturieren sie und entfalten sich spontan an den Enden, so dass sie dem weiteren Abbau durch andere intra- und extrazelluläre Peptidasen (u.a. MMP-2, MMP- 9, Cathepsine und Leukozyten-Elastase) zugänglich werden (Kafienah et al. 1998, Creemers et al. 1998). Die dabei entstehenden Aminosäuren werden für die Synthese von neuen Proteinen reutilisiert. Hydroxyprolin, Hydroxylysin und die quervernetzten Aminosäuren (z.B. Hydroxylysyl-Pyridinolin) können nicht reutilisiert werden und werden in der Leber abgebaut oder erscheinen im Urin (Bailey 2000).

Bei den *Matrix-Metallopeptidasen* handelt es sich um eine Großfamilie von mindestens 20 Enzymen (Seiki 1999), die in Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen, Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten, Keratinozyten und anderen Zellen gebildet werden. Sie benötigen Zink für ihre katalytische Funktion und Kalzium für ihre strukturelle Stabilität. Daher sind sie *in vitro* durch Kationen-Chelatoren wie EDTA inhibierbar. *In vivo* werden sie mittels Komplexbildung durch sogenannte TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) reguliert. Zusammen genommen sind die einzelnen Vertreter der MMP-Familie in der Lage, die gesamten Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagene, Gelatine, Nektine, Laminine, Elastin, Core-Proteine der Proteoglykane u.a.) zu hydrolysieren. Sie werden als inaktive Pro-Enzyme synthetisiert, die durch limitierte Proteolyse aktiviert werden. Man unterscheidet Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10), Matrilysin (MMP-7), die Makrophagen-Metalloelastase (MMP-12) und neuerdings membrangebundene MMPs (MMP-14, MMP-15) (Werb 1997). Die fibrillären Kollagentypen I, II und III werden lediglich durch die Kollagenasen gespalten, Typ IV-Kollagen durch die Gelatinasen. Gelatin wird durch fast alle Matrix-Metallopeptidasen hydrolysiert (Reynolds et al. 1997, Werb 1997).

Neben den genannten Matrix-Metallopeptidasen sind bei Säugetieren bislang nur zwei weitere Peptidasen bekannt, die tripelhelikale Strukturen spalten können. Die *Leukozyten-Elastase*, eine in Granulozyten vorkommende Serinpeptidase mit einem Molekulargewicht von 28,5 kD, vermag natives Typ I-Kollagen zu hydrolysieren (Kafienah et al. 1998b). Die Cysteinpeptidase *Cathepsin K*, die ein Molekulargewicht von 37 kD besitzt, in Lysosomen vorkommt und beim Abbau von Kollagen im Knochen eine Rolle spielt, spaltet die Tripelhelix an verschiedenen Punkten entlang der Kette (Garnero et al. 1998, Kafienah et al. 1998a), wie man es auch von zahlreichen *bakteriellen Kollagenasen* kennt, z.B. der *Clostridium histolyticum*-Kollagenase (Harrington 1996).

Zu den kollagenolytischen Enzymen werden im weiteren Sinne auch die lysosomalen *Cathepsine B, C, D, G, H, K, L, N und S* gerechnet (Bailey 2000), die nicht in der Lage sind, tripelhelikale Strukturen anzugreifen. Diese Peptidasen spalten die nicht-helikalen terminalen Regionen (Telo peptide) von fibrillärem Kollagen, wo sich Quervernetzungen der Kollagenmoleküle befinden. In der Folge denaturiert die Tripelhelix, die sodann durch andere Peptidasen weiter abgebaut werden kann.

### 1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Endopeptidase-Aktivität der DPP IV zu suchen.

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob die DPP IV tatsächlich eine Endopeptidase-Aktivität besitzt. Hierzu sollte die DPP IV mittels Immunaffinitätschromatographie gereinigt werden. Der Nachweis der Endopeptidase-Aktivität musste die Möglichkeit der Verunreinigung durch eine kopurifizierte Endopeptidase ausschließen.

In einem zweiten Schritt sollte eine gegebenenfalls nachgewiesene Endopeptidase-Aktivität näher charakterisiert werden. Dabei sollte aufgedeckt werden, mit welcher Spaltungsrate die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität verschiedene Substrate umzusetzen vermag und welchen Einfluss verschiedene experimentelle Bedingungen auf die Endopeptidase-Aktivität haben. Die Spaltprodukte der beobachteten Proteolyse sollten ebenfalls nachgewiesen werden.

Da fibrilläres Kollagen als Substrat einer DPP IV-Endopeptidase-Aktivität in Frage kommt, sollte in einem dritten Schritt untersucht werden, ob sich kollagenes Bindegewebe DPP IV-defizienter Fischer 344-Ratten strukturell vom Gewebe gewöhnlicher Wistar-Ratten unterscheidet.