

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Spaltung von denaturiertem Kollagen durch DPP IV als Beweis der Endopeptidase-Aktivität

In der vorliegenden Arbeit wurde die gelatinolytische Aktivität der DPP IV nachgewiesen und charakterisiert. Mit ihrem Nachweis ist zugleich gezeigt, dass die DPP IV neben ihrer bekannten Exopeptidase-Aktivität auch eine Endopeptidase-Aktivität besitzt. Denn der beobachtete Abbau von Gelatin lässt sich nicht damit erklären, dass die DPP IV die Alpha-Ketten durch wiederholte Abspaltung von Dipeptiden schrittweise vom N-Terminus her zerlegen würde. Schon nach Abtrennung eines oder weniger Dipeptide stünde nämlich am N-Terminus der Alpha-Kette eine Aminosäuresequenz, welche die DPP IV nicht anzugreifen vermag.

Bei der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität besteht eine Spaltstellenspezifität für Prolin, Hydroxyprolin und Alanin in der Position P1. Prolin und Hydroxyprolin werden in der Position P1' nicht akzeptiert (Kenny et al. 1976, Yoshimoto et al. 1977, Kato et al. 1978, Demuth et al. 1995, Mentlein 1999, Augustyns et al. 1999). Bei Growth hormone-releasing hormone-Analoga wurde darüber hinaus eine Spaltung hinter Serin, Glycin, Threonin, Leucin und Valin beobachtet (Bongers et al. 1992, Kubiak et al. 1993, Martin et al. 1993) sowie bei GLP-1-Analoga hinter Serin und Glycin (Siegel et al. 1999). Angenommen, auch bei Kollagen-Alpha-Ketten vermochte die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität hinter diesen Aminosäuren zu hydrolysieren, so käme es dennoch nach Abtrennung eines oder weniger Dipeptide zum Abbruch der Spaltung. Wie Abb. 26 zeigt, wäre bei N-terminalem Angriff an der helikalen Sequenz der Alpha 1 (I)-Kette bereits nach Abspaltung eines Dipeptids Prolin in Position P1' anzutreffen, was einen Abbruch der Spaltung zur Folge hätte. Geht man die Sequenz der Alpha 1(I)-Kette in Dipeptid-Schritten durch, so lassen sich zahlreiche Abbruchsequenzen

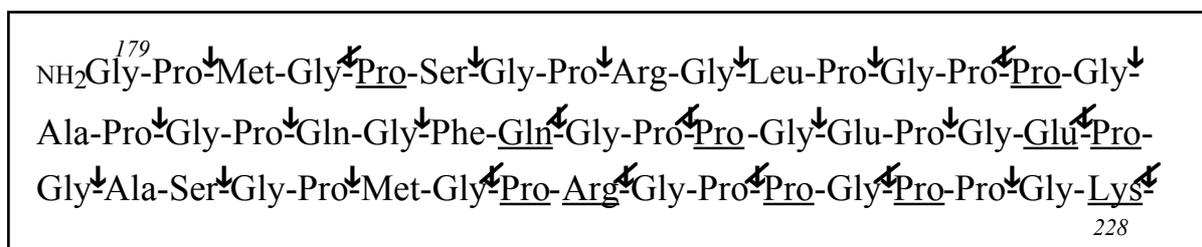


Abb. 26: N-Terminus der tripelhelikalen Region der Alpha 1-Kette des Typ I-Kollagen. Die Pfeile zeigen potentielle Spaltstellen einer vom N-Terminus her schrittweise die Tripelhelix abbauenden Dipeptidase-Aktivität an. Durchgestrichene Pfeile markieren Spaltstellen, an denen die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität nicht anzugreifen vermochte. Unterstrichen ist dabei jeweils derjenige Rest, welcher zum Abbruch der Spaltung führen würde.

ausmachen, selbst wenn man unterstellt, die DPP IV könnte auch nach Serin, Glycin, Threonin, Leucin und Valin angreifen. Da die DPP IV nicht in der Lage ist, am N-Terminus einzelne Aminosäuren oder Tripeptide abzutrennen (Demuth et al. 1995), muss der Abbau der Kollagen-Alpha-Ketten auf eine DPP IV-Endopeptidase-Aktivität zurückgeführt werden.

### 4.2 Ausschluss einer Kontamination

Für die Schlussfolgerungen der vorliegenden Arbeit ist es von entscheidender Bedeutung, dass die beobachtete gelatinolytische Aktivität nicht durch eine Kontamination mit einer kopurifizierten Endopeptidase verursacht ist. Wie aus den Gelatin-Zymogrammen hervorging, enthielt die für die Spaltungsassays eingesetzte DPP IV-Präparation offenbar zwei gelatinolytisch aktive Peptidasen, deren elektrophoretisches Molekulargewicht unterhalb von  $160 \times 10^3$  (aktive DPP IV) bzw. oberhalb von  $200 \times 10^3$  liegt. Im Silbergel der entsprechenden Präparation waren sie nicht sichtbar, so dass es sich offenbar um Spuren hochaktiver Peptidasen handelt. Da sie durch EDTA vollständig inhibierbar waren, handelt es sich vermutlich um Metallopeptidasen. Bei der kleineren der beiden kontaminierenden Peptidasen könnte es sich um MMP-9 (Gelatinase B) und/oder MMP-2 (Gelatinase A) handeln, welche in Bindegewebszellen und Leukozyten vorkommen und bereits in extrem kleinen Konzentrationen durch die Gelatin-Zymographie erfasst werden (Bailey 2000). Sie stellen mit kalkulierten Molekulargewichten von  $86 \times 10^3$  bzw.  $66 \times 10^3$  die größten MMPs dar (Mauch et al. 1994, Reynolds et al. 1997). Welche Peptidase im Zymogramm die schwache Bande oberhalb von 200 kD erzeugt hat, bleibt unklar.

Nach Zugabe von EDTA zeigte das Zymogramm gelatinolytische Aktivität nur noch im Molekulargewichts-Bereich von  $160 \times 10^3$ . Die helle Zone des Zymogramms entspricht der Bande, welche die aktive Form der DPP IV auch in Silberfärbung, Immunblot und Aktivitätsblot erzeugte, und kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine bisher nicht beschriebene DPP IV-Gelatinase-Aktivität zurückgeführt werden. Das Zymogramm legt außerdem mit hoher Wahrscheinlichkeit nahe, dass nach Zugabe von EDTA in der benutzten DPP IV-Fraktion keine Kontamination mehr gelatinolytisch aktiv war.

Eine Kontamination könnte nur dann vorliegen, wenn die 160 kD-Bande im Zymogramm nicht durch die DPP IV, sondern durch eine kontaminierende Peptidase oder durch beide zusammen erzeugt worden wäre. Da die proteolytische Zone im Zymogramm nach Zugabe von DFP

verschwand, müsste es sich bei der Kontamination um eine Serinpeptidase handeln.<sup>1</sup> Die Mehrzahl der Serinpeptidasen kommt bereits aufgrund ihres Molekulargewichts nicht als potentielle Kontamination in Frage. So ist z.B. nicht zu erwarten, dass Trypsin (kalkuliertes Molekulargewicht von 26,6 k), Chymotrypsin (27,8 k), Leukozyten-Elastase (28,5 k), Pankreatische Elastase I (29,0 k) und II (28,9 k), Cathepsin G (28,8 k), Myeloblastin (27,8 k) oder die Granzyme (27-29 k) die isolierte 160 kD-Bande im Zymogramm erzeugt haben.

Es ist jedoch zu bedenken, dass auch für die aktive Form der DPP IV, die in der SDS-PAGE als 160 kD-Bande erscheint, nur ein Molekulargewicht von  $88,3 \times 10^{-3}$  errechnet wird, da die Kalkulation auf der Basis der Aminosäuresequenz unter Vernachlässigung der Glykosylierungen erfolgt. Als potentielle Kontamination sind also Serinpeptidasen mit kalkulierten Molekulargewichten von  $90 \times 10^{-3}$  oder weniger durchaus zu erwägen. Von den Serinpeptidasen, für die ein Molekulargewicht über  $70 \times 10^{-3}$  angegeben wird, verfügen die meisten über eine hohe Substrat- bzw. Spaltstellenspezifität, z.B. Acylaminoacyl-Peptidase, Enteropeptidase, Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Aktivator, Plasmakallikrein, Protein C, Gewebe-Plasminogen-Aktivator, Gamma-Glutamyltransferase, Furin, die Komponenten des Komplementsystems, die Gerinnungsfaktoren oder die Proprotein-Konvertasen. Diese Peptidasen wären ebensowenig in der Lage, die Kollagen-Alpha-Ketten zu spalten, wie die Prolyl-Oligopeptidase (POP), die nur Peptide bis zu einer Größe von etwa 30 Aminosäuren angreift, in der SDS-PAGE als 75 kD-Bande erscheint und im Gegensatz zur beobachteten Gelatinase-Aktivität durch NEM und TPCK inhibierbar ist, während die DPP IV-spezifischen Inhibitoren Diprotin A und B keinen Einfluss auf ihre Aktivität haben (Palmieri et al. 1989, Rennex et al. 1991). Apolipoprotein besitzt ein kalkuliertes Molekulargewicht von  $501,3 \times 10^{-3}$  und vermag Fibronectin zu spalten. Fibroblast-Activation-Protein alpha (FAP) erzeugt durch seine dimere Form im Gelatin-Zymogramm eine 180-190 kD-Bande (Levy et al. 1999) und kommt daher grundsätzlich als kontaminierende Peptidase in Frage. Jedoch findet sich FAP nicht im normalen adulten Nierengewebe (Garin-Chesa et al. 1990, Scanlan et al. 1994), woraus die für die Zymographie eingesetzte DPP IV-Präparation gewonnen wurde. FAP wird zudem durch NEM inhibiert, während DTT und EDTA die Aktivität erhöhen (Aoyama et al. 1990). Auch die Tripeptidylpeptidase II, die neben der Tri- eine Endopeptidase-Aktivität besitzt,

---

<sup>1</sup> Eine Übersicht über die Serinpeptidasen bietet das „Handbook of Proteolytic Enzymes“ (Barrett et al. 1998). Noch aktuellere Daten lassen sich über die Website des Babraham Institut (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/merops/pnfam.htm>) beziehen, die von denselben Autoren unterhalten wird. Wesentliche Eigenschaften der einzelnen Enzyme können auch vom Schweizer Institut für Bioinformatik über <http://www.expasy.org> abgerufen werden.

kann wegen ihres Inhibitionsprofils als potentielle Kontamination ausgeschlossen werden: Balow et al. (1986) erzielten durch Einsatz von 0,2 mM PMSF und 1 mM NEM eine Hemmung von über 90 % (zur Inhibition durch PMSF siehe auch Geier et al. 1999) und beobachteten, dass DTT den Enzym-Präparaten zugesetzt werden musste, um die proteolytische Aktivität zu erhalten. Mantle (1990) beobachtete eine 50%ige Hemmung bei Zugabe von NEM (0,1 mM) und Phenanthrolin (0,05 mM). Plasmin, das ein kalkuliertes Molekulargewicht von  $90,5 \times 10^3$  besitzt, kommt als Kontamination ebenfalls nicht in Frage, da es durch TPCK und Leupeptin inhibiert wird und Fibronectin zu spalten vermag (Barrett et al. 1998). Die Lysosomale Carboxypeptidase A und die Lysosomale Pro-X-Carboxypeptidase besitzen pH-Optima im sauren Bereich und erscheinen auch aufgrund ihres Molekulargewichts von etwa  $55 \times 10^3$  als Verursacher der 160 kD-Bande im Zymogramm unwahrscheinlich. Die Lysosomale Carboxypeptidase A wird zudem durch Iodacetamid gehemmt (Barrett et al. 1998). Die Dipeptidylpeptidase II (DPP II) bildet in der SDS-PAGE eine 65 kD-Bande (Demuth et al. 1995), die Dipeptidylpeptidase 8 (DPP8) eine 100 kD-Bande. DPP8 wird zudem durch Aprotinin (4 mg/l) zu etwa 50 % inhibiert (Abbott et al. 2000). Die Dipeptidylpeptidase X (DPP X) ist nicht proteolytisch aktiv (Kin et al. 2001). Die Dipeptidylpeptidase IV-beta (DPP IV-beta) erscheint in der SDS-PAGE als 75-80 kD-Bande und ist bislang nur in Lymphozyten nachgewiesen worden (Blanco et al. 1998). Eine Endopeptidase-Aktivität ist für sie ebensowenig beschrieben wie für die anderen Dipeptidylpeptidasen und die Quiescent-Cell-Proline-Dipeptidase (QPP), die in der SDS-PAGE eine 58 kD-Bande aufweist und in einem ungewöhnlich breiten pH-Spektrum arbeitet (Underwood et al. 1999). Neben den genannten Säugetier-Serinpeptidasen können als potentielle Kontamination auch bakterielle Enzyme ausgeschlossen werden, da die DPP IV-Präparation vom ersten Reinigungsschritt an mit  $\text{NaN}_3$  (mindestens 0,2 g/l) vor bakteriellem Befall geschützt wurde.

### **4.3 Die Spaltungsrate der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität**

Die spezifische DPP IV-Exopeptidase-Aktivität wurde mit Hilfe des synthetischen Substrats Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-tosylat bestimmt und betrug 45,4 U/mg. Das bedeutet, dass 1 mg der eingesetzten DPP IV-Präparation 45,4  $\mu\text{mol}$  des Substrats pro min umgesetzt hat. Die Spaltungsrate der Endopeptidase-Aktivität wurde näherungsweise im löslichen proteolytischen Assay ermittelt. 2,5  $\mu\text{g}$  der DPP IV-Präparation benötigten rund 80 h, um 8,0  $\mu\text{g}$  denaturiertes Kollagen der Typen I, II, III und V zu spalten. Ausgehend vom

Molekulargewicht einer Alpha 1(I) Kette von  $94738 \times 10^{-3}$  ergibt sich, dass 1 mg der eingesetzten DPP IV-Präparation ungefähr  $7,0 \times 10^{-6}$   $\mu\text{mol}$  der Kollagen-Alpha-Ketten pro min abgebaut hat. Im Vergleich dazu verdauten  $0,5 \mu\text{g}$  *Clostridium histolyticum*-Kollagenase  $4,0 \mu\text{g}$  Kollagen in etwa 10 s, d.h. 1 mg Kollagenase zerlegte ungefähr  $0,5 \mu\text{mol}$  Kollagen pro min.

Vergleicht man die ermittelten Aktivitäten von DPP IV-Endopeptidase und *Clostridium histolyticum*-Kollagenase, so ist zu berücksichtigen, dass die DPP IV-Präparation zu einem beträchtlichen Anteil im Rahmen des Reinigungsprozesses inaktivierte DPP IV enthielt, wie die Analyse durch SDS-PAGE ergab. Stellt man die Werte von Exo- und Endopeptidase-Aktivität der DPP IV einander gegenüber, so ist zu bedenken, dass das Molekül Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-tosylat nur eine Spaltstelle bietet, während z.B. eine Alpha 1(I)-Kette mit 240 Prolinresten in einer Sequenz von 1057 Aminosäuren zahlreiche potentielle Spaltstellen enthält und offenbar auch vielfach gespalten wurde. Der Abbau von 1 mol Alpha-Ketten geht also mit ungleich mehr Spaltvorgängen einher als der Umsatz von 1 mol Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-tosylat. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität möglicherweise Oligopeptide schneller spaltet als die mehr als 1000 Aminosäuren umfassenden Kollagen-Alpha-Ketten, deren Abbau hier gemessen wurde. Trotzdem machen die genannten Werte deutlich, dass die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV im Vergleich zu ihrer Exopeptidase-Aktivität und zur *Clostridium histolyticum*-Kollagenase-Aktivität sehr schwach ist.

#### 4.4 Die Spaltprodukte der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität

Die DPP IV vermochte im Gelatin-Zymogramm eine proteolytische Zone zu erzeugen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Alpha-Ketten durch die DPP IV in relativ kleine Fragmente zerlegt werden. Aus Zymographien mit anderen Peptidasen ist nämlich bekannt, dass ein Substrat nur dann aus dem Zymographiegel diffundieren kann, wenn es zu verhältnismäßig kleinen Bruchstücken verdaut wurde. So wird z.B. interstitielle Kollagenase (MMP-1) im Gelatingel nicht sichtbar, obwohl sie die Alpha-Ketten in 3/4 und 1/4 Fragmente spaltet (Birkedal-Hansen 1987). Ähnlich verhält es sich in Fibronectin-Zymogrammen mit dem Plasminogen-Aktivator, der Fibronectin an einigen selektiven Stellen spaltet (Chen et al. 1987).

Beim Abbau von denaturiertem Kollagen ist neben der Endo- wahrscheinlich auch die Exopeptidase-Aktivität der DPP IV wirksam. Vermutlich werden die durch DPP IV-Endopeptidase-Aktivität erzeugten Fragmente rasch durch die Exopeptidase-Aktivität vom N-

Terminus her weiter gespalten, solange für die DPP IV angreifbare Aminosäuren an vorletzter Stelle stehen. Es ist also zu erwarten, dass sich unter den Spaltprodukten zahlreiche Dipeptide befinden und die übrigen Fragmente am N-Terminus "Abbruchsequenzen" aufweisen, d.h. Konstellationen, welche die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität nicht angreifen kann.

Um solche Zwischenprodukte der Spaltung zu visualisieren, wurde denaturiertes Kollagen im löslichen proteolytischen Assay verschieden lang mit DPP IV inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. In der Coomassie-Färbung waren Spaltprodukte allenfalls in der Lauffront des Gels sichtbar, der Immunblot mit Anti-Kollagen-Antikörpern zeigte dagegen relativ viele diffuse Zwischenbanden. Offenbar variieren die Spaltprodukte stark in ihrer Größe, so dass sie sich bei Auftrennung durch SDS-PAGE im Gel verteilen und anschließend kaum sichtbar machen lassen. Hinzu kommt möglicherweise, dass die anfallenden Zwischenprodukte verhältnismäßig rasch weiter verdaut werden.

Im Gegensatz zu Assays mit DPP IV ließen sich bei Spaltansätzen mit *Clostridium histolyticum*-Kollagenase nach Auftrennung durch SDS-PAGE distinkte Zwischenbanden beobachten, wenn die Inkubation bei 16 °C mit nativem Kollagen erfolgte. Wurde hingegen bei 37 °C inkubiert, so tauchten die distinkten Zwischenbanden nicht auf. Dies ist dadurch erklärbar, dass nach Spaltung eines Kollagenmoleküls die Fragmente bei 37 °C sogleich denaturieren, bei 16 °C jedoch nicht (Birkedal-Hansen 1987). Die *Clostridium histolyticum*-Kollagenase besitzt für natives Kollagen bevorzugte Spaltstellen, während sie denaturiertes Kollagen an zahlreichen Stellen angreift und daher auch viel rascher abbaut (French et al. 1987). Während bei 37 °C also die Spaltung des intakten Kollagenmoleküls der limitierende Faktor für die Verdauung ist und die entstehenden Fragmente rasch weiter abgebaut werden, können bei 16 °C nach Hydrolyse der bevorzugten Spaltstellen die Fragmente nur langsam abgebaut werden, da sie nicht denaturieren.

### **4.5 Die Spaltstellenspezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität**

Wie im vorangehenden Kapitel erläutert, entstehen beim Abbau von denaturierten Kollagenen durch DPP IV wahrscheinlich relativ kleine Spaltprodukte. Die Zwischenprodukte der Verdauung variieren offenbar stark in ihrer Größe. Daraus lässt sich folgern, dass es wohl nicht eine oder wenige bevorzugte Spaltstellen der DPP IV in den Alpha-Ketten des Kollagens gibt, sondern die DPP IV an zahlreichen Spaltstellen angreifen kann. Da die prolinhaltigen Tripeptide Diprotin A (H-Ile-Pro-Ile-OH) und B (H-Val-Pro-Leu-OH) den Gelatinabbau

inhibierten, spaltet die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV möglicherweise wie ihre Exopeptidase-Aktivität (Demuth et al. 1995) bevorzugt hinter Prolin. Es ist denkbar, dass die DPP IV an zahlreichen Prolinresten innerhalb der Alpha-Kette gleichermaßen anzugreifen vermag. Für eine bevorzugte Spaltung hinter Prolin sprechen auch die Beobachtungen, die Kenny et al. (1976) und Lojda et al. (1988) mit N-terminal geblockten synthetischen Peptiden gemacht haben. Kenny et al. (1976) beschrieben eine Spaltung der Peptide Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro und Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala durch isolierte DPP IV. Lojda et al. (1988) erzielten ähnliche Ergebnisse für Z-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-4-Methoxy-2-Naphthylamid (MNA), während Z-Arg-Gly-Phe-Phe-Leu-MNA nicht umgesetzt wurde.

Mit den vorliegenden Daten lässt sich noch keine sichere Aussage bezüglich einer Prolin-Spezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität treffen. Offen bleiben u.a. die Fragen, ob die DPP IV als Endopeptidase auch hinter Alanin oder Hydroxyprolin zu spalten vermag und welche Rolle die Aminosäuren in den Positionen P2 und P1' (nach Schlechter und Berger, 1967) spielen. Klarheit darüber könnten Untersuchungen mit synthetischen Analoga von Fragmenten der Kollagen-Alpha-Ketten liefern.

#### 4.6 Die Substratspezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität

Die DPP IV spaltete als Endopeptidase die denaturierten fibrillären Kollagene (Typen I, II, III und V). Typ IV wurde deutlich langsamer abgebaut. Natives Kollagen (Typ I), Albumin und Fibronectin wurden nicht angegriffen. Auch verdaute die DPP IV sich nicht selbst. Geht man von einer bevorzugten Spaltung der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität hinter Prolin und eventuell auch Alanin aus, so stellt sich die Frage, ob die beobachtete Substratspezifität auf den Prolin- und Alanin-Gehalt der untersuchten Proteine zurückzuführen ist. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, ist der Prolin-Anteil der Alpha-Ketten I, II, III und V ungefähr viermal so groß wie der von Albumin, Fibronectin und DPP IV. Auch übersteigt er geringfügig den Prolin-Anteil

Tab. 3: Prolin- und Alanin-Gehalt der Proteine, die durch die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität relativ rasch (+), nur langsam ([+]) oder gar nicht (-) abgebaut wurden. Die Daten wurden bezogen vom Schweizer Institut für Bioinformatik (<http://www.expasy.org>).

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V	DPP IV	Album	Fibronekt
Prolin-Geh.	22,7 %	21,5 %	22,7 %	19,6 %	20,0 %	3,9 %	5,1 %	7,8 %
Alanin-Geh.	11,5 %	10,0 %	8,9 %	3,3 %	4,6 %	6,1 %	10,4 %	4,4 %
Spaltbarkeit	+	+	+	[+]	+	-	-	-

der Alpha-Kette IV. Dennoch enthalten die nicht oder nur langsam gespaltenen Proteine so viele Prolinreste, dass die Differenzen im Prolin-Gehalt der Proteine ihre unterschiedliche Spaltbarkeit nicht ausreichend erklären können. Der Alanin-Gehalt korreliert so gut wie gar nicht mit der Spaltbarkeit der Proteine.

Es ist vorstellbar, dass die an die jeweiligen Prolin- und Alaninreste angrenzenden Aminosäuren für die unterschiedliche Spaltbarkeit der Proteine verantwortlich sind. Möglicherweise gibt aber auch die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine den Ausschlag. Dies wird insbesondere durch die Beobachtung nahegelegt, dass natives Kollagen (Typ I) von der DPP IV nicht verdaut wurde, während denaturiertes Kollagen gut gespalten wurde. Offenbar vermag die DPP IV tripelhelikale Strukturen nicht anzugreifen. Diese haben sich auch bei Untersuchungen mit anderen Peptidasen als außerordentlich resistent gegen Proteolyse erwiesen. Selbst Peptidasen mit breiter Spezifität wie Pepsin und Trypsin können die Tripelhelix des Kollagens nicht spalten. So konnte eine kollagenolytische Aktivität bei Säugetieren bislang nur für Cathepsin K, die Leukozyten-Elastase und drei Kollagenasen nachgewiesen werden (Garnero et al. 1998). Ähnlich wie bei nativem Kollagen könnten auch bei nativem Albumin, Fibronectin und DPP IV die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine bewirken, dass die DPP IV nicht an den Prolinresten oder anderen Spaltstellen angreifen kann.

Auch beim denaturierten Typ IV-Kollagen ist möglicherweise die räumliche Struktur dafür verantwortlich, dass es langsamer als die Kollagentypen I, II, III und V abgebaut wird. Denn nach Denaturierung liegen die Alpha-Ketten der Kollagene nur vorübergehend als "random coils" vor, bevor sie sich wieder zu stabilen Formen organisieren (Beier et al. 1966, Igarashi et al. 1970, Harrington et al. 1970). Bei bestimmten Kollagen-Konzentrationen, Inkubationstemperaturen und pH-Bedingungen können sogar wieder tripelhelikale Strukturen entstehen, so dass von einer "Renaturierung" der Kollagene gesprochen wird. Offenbar bilden also Kollagene nach Denaturierung wieder eine Tertiär-Struktur aus, die ihrer nativen Tertiär-Struktur mehr oder weniger ähneln kann. Da sich Typ IV-Kollagen in seiner nativen Tertiärstruktur durch seine zahlreichen globulären Domänen wesentlich von den fibrillären Kollagenen unterscheidet, sind auch deutliche Unterschiede der Tertiär-Strukturen im denaturierten Zustand zu erwarten, welche erklären könnten, warum denaturiertes Typ IV-Kollagen langsamer gespalten wurde. Dabei könnten Unterschiede in der Bindung der DPP IV an die verschiedenen Kollagen-Typen eine Rolle spielen. In Bindungsassays wurde beobachtet, dass DPP IV natives Typ IV-Kollagen schlechter bindet als die Typen I und III (Löster 1994,

Löster et al. 1995). Bei denaturiertem Kollagen könnte es sich eventuell ähnlich verhalten.

Während in den hier durchgeführten Untersuchungen DPP IV natives Kollagen nicht zu spalten vermochte, beobachtete Hanski (1987) die Bildung von Proteinfragmenten nach Inkubation mit nativem Kollagen. Möglicherweise enthielt seine Kollagen-Präparation Anteile denaturierten Kollagens, die fragmentiert wurden.

Die vorliegenden Experimente zur Substratspezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität beschränkten sich auf wenige Proteine. Nicht getestet wurden z.B. denaturiertes Albumin und Fibronectin sowie die Kollagen-Typen VI-XX. Als potentielle Substrate kommen neben Kollagenen auch die C1q-Komponente des Komplementsystems und die Acetylcholinesterase in Frage, da sie auch tripelhelikale Strukturen besitzen.

### **4.7 Das katalytische Zentrum der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität**

Die DPP IV ist als Exopeptidase eine Serinpeptidase, deren Aktivität auf dem Zusammenspiel einer katalytischen Triade beruht, die bei der Ratte von den Resten Serin 631, Aspartat 709 und Histidin 741 gebildet wird. Dies ergibt sich aus einem Aminosäuresequenz-Vergleich der DPP IV mit anderen nicht-klassischen Serinpeptidasen (Marguet et al. 1992, David et al. 1993), aus einer Markierung von Serin 631 mit radioaktivem DFP (Ogata et al. 1992) sowie aus ortsspezifischer Mutagenese (Ogata et al. 1992, David et al. 1993).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Peptidase-Inhibitoren auf die Exo- und die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV legen nahe, dass die beiden Aktivitäten wahrscheinlich auf das gleiche katalytische Zentrum zurückgehen. Abgesehen von einer Hemmung der Endopeptidase-Aktivität durch DTT, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird, wiesen die Exo- und Endopeptidase-Aktivität der DPP IV ein identisches Inhibitionsprofil auf. Während die Aspartat-, Cystein- und Metallopeptidase-Inhibitoren keinen Einfluss auf Exo- oder Endopeptidase-Aktivität hatten, wurden beide Aktivitäten gleichermaßen durch die Serinpeptidase-Inhibitoren DFP und PMSF sowie durch die für die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität spezifischen Inhibitoren Diprotin A und B inhibiert. Dass PMSF nur einen schwachen inhibitorischen Effekt ausübt bzw. erst in hohen Konzentrationen wirksam ist, wurde bereits von Kenny et al. (1976) und Shibuya-Saruta et al. (1996) beschrieben.

Das Inhibitionsprofil zeigte, dass die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV von einem

reaktiven Serin im aktiven Zentrum abhängt. Da bei der kovalenten Modifizierung von DPP IV mit radioaktivem DFP nur Serin 631 markiert (Ogata et al. 1992) und nach Austausch des Serin 631 durch Alanin radioaktives DFP nicht mehr gebunden wird (Fujiwara T et al. 1992), kommt keiner der 65 anderen Serinreste der DPP IV als Bestandteil des aktiven Zentrums der Endopeptidase-Aktivität in Frage.

### **4.8 Die Kollagenbindungsdomäne der DPP IV**

In Bindungsassays und bei Affinitätschromatographie über Kollagen-Sepharose wurde mehrfach gezeigt, dass die DPP IV an natives und denaturiertes Kollagen zu binden vermag (Hanski 1987, Hanski et al. 1988, Löster 1994, Löster et al. 1995). Kollagen-bindende Eigenschaften der DPP IV könnten auch in Adhäsionsassays eine Rolle spielen, in denen DPP IV an der Abflachung von Zellen auf einer Kollagenmatrix beteiligt ist (Hanski et al. 1985, 1988, Hanski 1987, Bauvois et al., 1988 Löster 1994). Es wird vermutet, dass die Kollagenbindung in der cysteinreichen Region der DPP IV stattfindet, in der auch die Bindung an die Adenosindesaminase erfolgt (Löster 1994, Löster et al. 1995). Denn der monoklonale Antikörper 13.4, der ein Epitop in der cysteinreichen Domäne der DPP IV erkennt, hemmt die Bindung von DPP IV an Kollagen, während bei Einsatz des monoklonalen Antikörpers 25.8, der eine komplexe Kohlenhydratstruktur im Epitop Tyr236-Glu491 erkennt, kein Effekt beobachtet wird.

Eine Kollagenbindungsdomäne in der cysteinreichen Region der DPP IV könnte erklären, warum die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV durch 3 M DTT inhibiert wurde, während die Exopeptidase-Aktivität nicht gehemmt wurde. Die Wirkung von DTT beruht nämlich auf der Reduktion von Disulfidbrücken, die möglicherweise dann zu einer Konformationsänderung in der Cystein-reichen Region der DPP IV führt. So könnte die Kollagenbindung und damit eventuell auch die Kollagenspaltung der DPP IV beeinträchtigt werden, während das katalytische Zentrum in der C-terminalen Domäne und die davon ausgehende Exopeptidase-Aktivität unbeeinflusst blieben.

### 4.9 Mögliche biologische Funktionen der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität

#### 4.9.1 Beteiligung am Kollagenkatabolismus

Aufgrund der Substratspezifität für denaturierte Kollagene der Typen I, II, III und V liegt es nahe, dass die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität eine Rolle beim Kollagenkatabolismus und beim damit verbundenen Remodelling von Bindegewebe spielt. Hierfür spricht auch die Lokalisation der DPP IV in der Plasmamembran von Fibroblasten, insbesondere im subepithelialen Bindegewebe von Haut, Ösophagus, Ureter und Penis, aber auch im Bindegewebe von Brustdrüse, Plazenta, Lunge und Synovia (Hartel et al. 1988, Bauvois 1988, Atherton et al. 1992). Zudem findet sich DPP IV auf Gewebemakrophagen, die ebenfalls am Gewebeabbau teilnehmen. Da die Endopeptidase-Aktivität relativ schwach ist und natives Kollagen nicht anzugreifen vermag, ist wohl davon auszugehen, dass die DPP IV nicht selbständig Kollagen abbaut, sondern Bestandteil der komplexen Enzymkaskade ist, die beim Kollagenabbau gewöhnlich abläuft. Dabei werden native Kollagenfasern initial durch Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13) in große Fragmente gespalten, die bei Körpertemperatur rasch denaturieren und damit dem weiteren Abbau durch akzessorische intra- und extrazelluläre Peptidasen (u.a. MMP-2, MMP-9, Cathepsine und Leukozyten-Elastase) zugänglich werden, die selbst keine kollagenolytische Aktivität besitzen (Kafienah et al. 1998, Creemers et al. 1998). Da die meisten proteolytischen Enzyme nicht in der Lage sind, Prolyl-X-Bindungen anzugreifen (Walter et al. 1980), könnte die Funktion der DPP IV im Konzert der akzessorischen gelatinolytischen Peptidasen darin bestehen, Prolyl-X-Bindungen in den anfallenden Kollagenfragmenten zu lösen. Daran könnten sowohl die Endo- als auch die Exopeptidase-Aktivität der DPP IV beteiligt sein.

Um zu überprüfen, ob die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität *in vivo* eine Relevanz für den Abbau von Kollagen hat, wurden in immunhistochemischen Untersuchungen mit Anti-Kollagen I-Antikörpern verschiedene Gewebe von DPP IV-negativen Fischer-344-Ratten mit Geweben von DPP IV-positiven Wistar-Ratten verglichen. Dabei zeigten die Fischer-Ratten im Disse'schen Raum der Leber vermehrt faserartige Strukturen, bei denen es sich wahrscheinlich um retikuläre Fasern handelt. Diese Fasern stehen bei DPP IV-positiven Ratten im Kontakt mit der DPP IV der sinusoidalen Membran von Hepatozyten und der Sinusoidendothelzellen (Hartel et al. 1988, Piazza et al. 1989, Thompson et al. 1991, Loch 1992). Möglicherweise ist bei den Fischer-Ratten infolge des DPP IV-Defizits der Abbau des retikulären Bindegewebes gestört, so dass es sich im Disse'schen Raum anhäuft.

Im Gegensatz zur Leber waren bei den immunhistochemischen Untersuchungen von Haut, Sehne und Niere keine wesentlichen Unterschiede zwischen Fischer- und Wistar-Ratten zu beobachten. Möglicherweise ist das Remodelling von Bindegewebe in Haut, Sehne und Niere weniger gestört als in der Leber. Dies wäre damit zu erklären, dass in diesen Geweben andere Peptidasen die Funktion der DPP IV übernehmen und das Defizit ausgleichen. Diese Kompensationsmechanismen könnten in Perioden vermehrten Kollagenabbaus nicht mehr ausreichen, so dass dann auch in diesen Geweben Unterschiede zwischen DPP IV-positiven und DPP IV-negativen Ratten strukturell auffällig würden. Künftige Untersuchungen könnten also zum Ziel haben, das Bindegewebe in Haut, Sehne und Niere von DPP IV-negativen Ratten in Situationen erhöhten Kollagenabbaus zu untersuchen, wie z.B. bei Entzündung, Morphogenese und Metastasierung (Kafienah et al. 1998).

### 4.9.2 Beteiligung an Zelladhäsionsprozessen

In Adhäsionsassays wurde mehrfach gezeigt, dass die DPP IV an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist. So beobachtete man, dass die Abflachung von Zellen auf einer Kollagenmatrix gehemmt wird, wenn man bestimmte DPP IV-Antikörper zugibt (Hanski et al. 1985, Hanski et al. 1988). Da die DPP IV Kollagen zu binden vermag (Hanski 1987, Hanski et al. 1988, Löster 1994, Löster et al. 1995), schreibt man ihr die Funktion eines Zelladhäsionsmoleküls zu. Neben der Fähigkeit zur Kollagenbindung könnte aber auch die gelatinolytische Aktivität der DPP IV an den beobachteten DPP IV-vermittelten Zelladhäsionsprozessen beteiligt sein. Für diese Hypothese spricht, dass Tripeptide wie Val-Pro-Leu, welche die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV kompetitiv inhibieren, auch die Zelladhäsion hemmen (Hanski et al. 1985, Hanski 1987, Hanski et al. 1988, Bauvois 1988), während die Bindung von gereinigter DPP IV an Kollagen durch diese Tripeptide nicht gehemmt wird (Bindungsassays bei Hanski 1987 und Löster 1995).

An der Entstehung von Zell-Matrix-Kontakten sind membranständige Zelladhäsionsmoleküle (CAM) beteiligt, zu denen u. a. die Familie der Integrine gezählt wird. Zur Zeit sind acht Kollagen-bindende Integrine bekannt, zu denen Integrin  $\alpha_1\beta_1$  und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  gehören (Ivaska et al. 2000). Diese vermögen tripelhelikale Strukturen an verschiedenen Stellen zu erkennen (Xu et al. 2000), während andere Integrine nur denaturiertes Kollagen binden können. Beispielsweise erkennt Integrin  $\alpha_v\beta_3$  seine Bindungsstelle, eine Arg-Gly-Asp-Sequenz (RGD-Sequenz), nur in denaturiertem Kollagen (Davis 1992, Pfaff et al. 1993). Diese

Bindungssequenz ist im nativen Zustand des Kollagens maskiert und wird für Integrin  $\alpha_v\beta_3$  erst nach Denaturierung und möglicherweise Fragmentierung der Tripelhelix zugänglich (Davis 1992). Dadurch, dass die Zelle für natives und denaturiertes Kollagen unterschiedliche Rezeptoren besitzt, erhält sie abhängig vom Zustand der umgebenden extrazellulären Matrix unterschiedliche adhäsive Signale, die wiederum unterschiedliche zelluläre Vorgänge hervorrufen. Die Bindung von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  an denaturiertes Kollagen hat z.B. eine Hochregulation der Expression von Gelatinase-A (MMP-2) zur Folge (Ivaska et al. 2000). Die Rolle der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität bei Zelladhäsionsprozessen könnte darin bestehen, an der Demaskierung von kryptischen Bindungsstellen durch Fragmentierung denaturierten Kollagens mitzuwirken.

### 4.9.3 Beteiligung an der Translokation von Zellen

Die Translokation von Zellen spielt eine wesentliche Rolle bei Wundheilung, Entzündungsprozessen, interstitieller Implantation, Embryogenese und Tumorausbreitung (Chen et al. 1987). Kollagenolytischen und gelatinolytischen Peptidasen kommt dabei im Zusammenspiel die Aufgabe zu, physiologische Barrieren in Form von kollagenen Fasern abzubauen und dadurch den einwandernden Zellen den Durchtritt durch das Bindegewebe zu ermöglichen. Eine derartige Funktion wird u.a. verschiedenen Matrix-Metallopeptidasen (z.B. MMP-1, MMP-2, MMP-9) und der membranständigen Serinpeptidase Fibroblast-Activation-Protein alpha (FAP) zugeschrieben (Chen et al. 1987, Aoyama et al. 1990, Chen 1996, Ohtani 1998, Pilcher et al. 1998, 1999). In ähnlicher Weise könnte auch die DPP IV mit ihrer Endopeptidase-Aktivität an der Translokation von Zellen beteiligt sein. Auf einige Zellen, die dafür in Frage kommen, wird im folgenden kurz eingegangen.

Bei der sekundären Wundheilung bewirkt epidermale Migration, dass die freigelegte Oberfläche bedeckt wird (Pilcher et al. 1999). Innerhalb von 3-6 h nach einer Verletzung lösen sich basale *Keratinocyten* von der angrenzenden Basallamina und wandern durch das dermale Bindegewebe, das reich an Typ I-Kollagen ist, in die lädierte Region ein. Durch die Bindung von Kollagen an Integrin  $\alpha_2\beta_1$  kommt es zur Expression von Kollagenase-1 (MMP-1) und anderen Matrix-Metallopeptidasen, welche die Migration erst möglich machen (Pilcher et al. 1998, 1999). Da DPP IV auf der Oberfläche von Keratinocyten exprimiert wird, könnte ihr eine gelatinolytische Hilfsfunktion bei diesen Vorgängen zukommen. Ähnliche Prozesse wie bei der Migration von Keratinocyten finden statt, wenn *Fibroblasten* und *Endothelzellen* in

lädiertes Gewebe einwandern (Chen et al. 1987, Pilcher et al. 1999). Auch diese Zellen exprimieren DPP IV, so dass auch hier eine Hilfsfunktion ihrer Endopeptidase-Aktivität bei der Migration denkbar ist. Für eine biologische Bedeutung der DPP IV bei der Wundheilung sprechen die Befunde, dass DPP IV im Exsudat von Brandwunden nachgewiesen wurde (Prager et al. 1994) und besonders hohe DPP IV-Konzentrationen auf reaktiven Fibroblasten von dermale Narbengewebe auftreten (Scanlan et al. 1994). Neben einer Mitwirkung bei der Zellmigration könnte die DPP IV bei der Wundheilung die Funktion haben, am Abbau geschädigten Kollagens teilzunehmen und Zelladhäsionsprozesse einwandernder Zellen zu vermitteln.

Da die DPP IV auf *T-Helfer-Zellen*, *Gewebemakrophagen*, *natürlichen Killerzellen* und *B-Lymphozyten* vorkommt, ist eine Rolle der DPP IV bei der Leukozytendiapedese vorstellbar. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass Kollagen eine T-Helfer-Zell-Aktivierung induziert, die durch anti-DPP IV-Antikörper und Gly-Pro-X-Peptide gehemmt wird (Dang et al. 1990). Über die von *Trophoblastzellen* exprimierte DPP IV lässt sich spekulieren, dass sie an der interstitiellen Implantation der Blastozyste mitwirken könnte. Denn das Eindringen der Blastozyste in das Endometrium wird der Wirkung proteolytischer Enzyme aus dem Trophoblast zugeschrieben (Langmann 1989). Auch eine Funktion der DPP IV bei der Zelltranslokation im Rahmen der *Embryogenese* könnte erwogen werden, da die DPP IV in verschiedenen Organen bereits früh in der Entwicklung exprimiert wird (Hildebrandt et al. 1991).

Kollagenolytische und gelatinolytische Peptidasen sind darüber hinaus an *Tumorinvasion* und *Metastasierung* beteiligt. Sie tragen dazu bei, dass sich die entarteten Zellen aus ihrem Zellverband lösen und physiologische Barrieren wie Basalmembranen, Organkapseln oder Gefäßwände zerstören und durchwandern können. Es wurde gezeigt, dass die Invasivität von Tumorzellen mit einer vermehrten Produktion bestimmter Peptidasen einhergeht. Dazu zählen der Plasminogen Aktivator, lysosomale Cystein-Peptidasen, Kollagenasen, Gelatinasen, Glykosidasen, FAP und membrangebundene Peptidasen (Aoyama et al. 1990, Chen 1996, Ohtani 1998). Da auch die DPP IV in bestimmten Malignomen in erhöhter Konzentration auftritt, ist denkbar, dass sie durch ihre gelatinolytische Aktivität bei der Invasion entarteter Zellen mitwirkt. Gesteigerte DPP IV-Expression ist u.a. beschrieben beim Prostata-Karzinom (Wilson et al. 2000), beim Adenokarzinom der Lunge (Asada et al. 1993), beim Basaliom (Schlagenhauff et al. 1992) sowie bei papillären und follikulären Karzinomen der Schilddrüse

(Kotani et al. 1991). Jedoch ist bei anderen invasiv wachsenden Zellen DPP IV vermindert exprimiert, wie z.B. im Hepatom (Reutter et al. 1989, Loch et al. 1992) und in Metastasen des Prostata-Karzinoms (Bogenrieder et al. 1997).

### 4.9.4 Beteiligung an der Resorption von prolinhaltigen Peptiden

In Darm und Niere wird die DPP IV vor allem in der Bürstensaummembran von Enterozyten und proximalen Tubuluszellen exprimiert. Wegen ihrer luminalen Lokalisation besteht in diesen Organen kein Kontakt zwischen DPP IV und nativem Bindegewebe, wo die DPP IV an Kollagenkatabolismus, Zelladhäsionsprozessen oder Zelltranslokationsvorgängen beteiligt sein könnte. Jedoch besteht Kontakt zu prolinhaltigen Peptiden in Darminhalt und Glomerulumfiltrat, die Substrate der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität darstellen könnten.

An der Assimilation von Nahrungsproteinen im *Darm* sind eine Vielzahl von Enzymen beteiligt. Durch gastrische und pankreatische proteolytische Enzyme werden die Nahrungsproteine in größere Fragmente zerlegt, die anschließend von büstensaum-assoziierten Peptidasen weiter gespalten werden. Die Resorption von Aminosäuren, Di- und Tripeptiden erfolgt schließlich durch spezifische aktive Transportsysteme. Wie Erickson et al. (1992) und Tirupathi et al. (1993) zeigten, ist die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität über eine Spaltung von prolinhaltigen Peptiden an deren Resorption im Dünndarm beteiligt. So verfügen DPP IV-negative Fischer-Ratten über eine deutlich reduzierte Fähigkeit, die Tetrapeptide Leu-Pro-Gly-Gly und Gly-Pro-Gly-Gly zu hydrolysieren und zu absorbieren (Erickson et al. 1992). Wenn diese Ratten ihren Proteinbedarf ausschließlich über das prolinreiche Gliadin zu decken hatten, verloren sie innerhalb von vier Wochen deutlich an Gewicht, während DPP IV-positive Ratten ihr Gewicht konstant halten konnten. Unter üblicher Kost entwickelten sich die DPP IV-defizienten Ratten genauso gut wie die DPP IV-positiven Ratten (Tirupathi et al. 1993). Möglicherweise ist nicht nur die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität, sondern auch ihre Endopeptidase-Aktivität an der Spaltung von vorverdauten Peptiden beteiligt. Neben Kollagen-Fragmenten kommen dabei auch andere prolinreiche Proteine aus der Nahrung als potentielle Substrate in Frage, wie z.B. Gliadin, was im Zymographie-Assay oder im löslichen proteolytischen Assay zu überprüfen wäre.

Im Glomerulum der gesunden *Niere* werden Peptide und kleine Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 6-15 kD weitgehend frei filtriert, während Proteine von 15-80 kD nur partiell und Proteine von mehr als 80 kD gar nicht filtriert werden. Bei einer glomerulären

Filtrationsrate von etwa 180 l/d ergibt sich eine erhebliche Menge von filtrierten Peptiden und niedermolekularen Proteinen. Beispielsweise lässt sich für Albumin, das im Filtrat eine Konzentration von 0,01-0,05 % der Plasmakonzentration aufweist, eine filtrierte Menge von 0,75-4 g/d errechnen. Ein Verlust der filtrierten Peptide und Proteine wird durch zwei verschiedene Resorptionsmechanismen verhindert: Disulfidhaltige Peptide (z.B.  $\beta_2$ -Mikroglobulin) und Proteine (z.B. Albumin) werden im proximalen Tubulus durch rezeptorvermittelte Endozytose resorbiert. Lineare Peptide werden durch verschiedene Peptidasen, die in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus lokalisiert sind, intraluminal zu Aminosäuren, Di- und Tripeptiden verdaut, die anschließend durch spezifische Transportsysteme resorbiert werden können (Silbernagl 1994). Wie Tiruppathi et al. (1990a, 1990b) und Watanabe et al. (1993) zeigten, ist die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität über eine Spaltung von prolinhaltigen Peptiden an deren Rückresorption im proximalen Tubulus beteiligt. So waren renale Bürstensaum-Vesikel von DPP IV-negativen Fischer-Ratten nicht in der Lage, das Pentapeptid Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly zu hydrolysieren und zu absorbieren (Tiruppathi et al. 1990b). Im Urin der defizienten Ratten wurden vermehrt prolinhaltige Peptide gefunden (Tiruppathi et al. 1990b, Watanabe et al. 1993). Da die Fischer-Ratten auch vermehrt hydroxyprolin- und glycinhaltige Peptide im Urin aufwiesen, wurde vermutet, dass es sich bei den Peptiden u.a. um filtrierte, nicht rückresorbierte Kollagenfragmente handelt (Watanabe et al. 1993). An der Spaltung dieser prolinhaltigen Peptide ist die DPP IV möglicherweise nicht nur mit ihrer Exo-, sondern auch mit ihrer Endopeptidase-Aktivität beteiligt.

In *Endothelzellen* von Sinus, Kapillaren, Venolen und Arteriolen zahlreicher Gewebe findet sich DPP IV in den luminalen Membranen. Hier könnte die DPP IV an einer Spaltung und Resorption der gleichen prolinhaltigen Peptide mitwirken, die nach glomerulärer Filtration Substrat der renalen DPP IV sind.

### **4.9.5 Funktion in Leber, Speicheldrüsen, Pankreasgang und Prostata**

Neben Darm, Niere und Blutgefäßen gibt es noch andere Gewebe, in denen die DPP IV nicht in Kontakt mit nativem Bindegewebe tritt, z.B. ist die DPP IV auf *Epithelzellen des Pankreasganges und der Prostata* sowie im *Streifenstück der Glandulae parotidea und submaxillaris* apikal lokalisiert. Auch in der Leber kommt die DPP IV in hohen Konzentrationen am *Gallepol* von *Hepatozyten* und in *Gallengangsepithelzellen* vor

(Thompson et al. 1991), wo sich im Gegensatz zum sinusoidalen Pol kein Bindegewebe findet. Zwar wird neu synthetisierte DPP IV in Hepatozyten zunächst in die basolaterale Membran eingefügt, der Großteil der Hepatozyten-DPP IV wird aber daraufhin zum apikalen Pol sortiert (Bartles et al. 1987). Da in Pankreassekret, Prostatasekret, Speichel und Galle keine Fragmente von Kollagenen zu erwarten sind, bleibt unklar, welche Rolle die gelatinolytische Aktivität der DPP IV hier spielen könnte. Möglicherweise muss hier nach anderen Substraten der Exo- und Endopeptidase-Aktivität der DPP IV gesucht werden. Weiterführen könnten dabei Experimente an DPP IV-negativen Fischer-Ratten, die sich an die Urin-Untersuchungen von Tiruppathi et al. (1990b) und Watanabe et al. (1993) anlehnten. Man könnte Pankreassekret, Prostatasekret, Speichel und Galle von DPP IV-negativen und -positiven Ratten in bezug auf ihren Gehalt an prolin-, hydroxyprolin- und glycinhaltigen Peptiden vergleichen. Fände man bei DPP IV-negativen Tieren erhöhte Konzentrationen bestimmter Peptide, so wären ihre Herkunft und Identität zu klären, was auch für die von Tiruppathi et al. (1990b) und Watanabe et al. (1993) im Urin nachgewiesenen Peptide noch aussteht.

### **4.10 Die DPP IV im Kontext anderer proteolytischer Enzyme**

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die DPP IV zusätzlich zu ihrer Exo- eine Endopeptidase-Aktivität besitzt. Eine derartige Kombination von Exo- und Endopeptidase-Aktivität ist bereits für einige andere Peptidasen beschrieben: Cathepsin H löst N-terminal beinahe alle Aminosäuren von Peptiden und Proteinen ab und vermag zudem als Endopeptidase die Proteine Hämoglobin, Casein, Glucagon und Insulin sowie N-terminal blockierte Peptide zu spalten (Kirschke et al. 1976). Die Hydrolase H besitzt als Exopeptidase eine breite Spezifität, während eine Endopeptidase-Aktivität nur gegenüber Protamin beobachtet wurde (Nishimura et al. 1983). Die Tripeptidylpeptidase II trennt als Exopeptidase N-terminal Tripeptide ab und weist zugleich eine Endopeptidase-Aktivität mit bevorzugter Spaltung hinter Lysin und Arginin auf (Geier et al. 1999). Das Fibroblast-Activation-Protein alpha (FAP) besitzt sowohl Dipeptidase- als auch Gelatinase-Aktivität (Levy et al. 1999). Da die Enzym-Nomenklatur des Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) auf einer Einteilung der Peptidasen in Exo- und Endopeptidasen basiert (Nomenclature Committee 1992), sind die kombinierten Exo- und Endopeptidasen nach dieser Nomenklatur zur Zeit nicht korrekt klassifizierbar. Die Nomenklatur wäre um eine dritte Klasse von Peptidasen zu erweitern, für welche bereits die Bezeichnungen "Exoendopeptidasen" (Kirschke et al. 1976),

"Endoaminopeptidasen" (Kirschke et al. 1976) und "Aminoendopeptidasen" (Nishimura et al. 1983) vorgeschlagen wurden.

Während die Enzym-Nomenklatur des NC-IUBMB die Enzyme nach funktionellen Kriterien klassifiziert, basiert die Einteilung der Peptidasen von Rawlings und Barrett auf Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz (Rawlings et al. 1994). Wie Barrett (1994) jedoch betont, gehen strukturelle Ähnlichkeiten von Peptidasen häufig mit funktionellen Ähnlichkeiten einher. Bisher sind über 30 Familien von Serinpeptidasen beschrieben (Barrett et al. 1998)<sup>2</sup>. Die DPP IV wird der Familie S9 zugeordnet, die mit den Familien S10, S15, S28, S33 und S37 den Clan SC bildet.<sup>3</sup> Die Mitglieder dieses Clans werden nicht-klassische Serinpeptidasen genannt, da bei ihnen die katalytischen Reste in der Reihenfolge Ser-Asp-His auftreten, während in der Chymotrypsin-Familie die Folge His-Asp-Ser und in der Subtilisin-Familie (S8) die Folge Asp-His-Ser zu finden ist. Die Mitglieder der Familie S9, die auch Prolyl-Oligopeptidase-Familie genannt wird, zeigen Ähnlichkeiten besonders in der C-terminalen Region, wo das aktive Zentrum gelegen ist (Rawlings et al. 1991, Barrett et al. 1992). Eine Endopeptidase-Aktivität wird innerhalb der Familie S9 zur Zeit nur der Prolyl-Oligopeptidase (POP) und dem Fibroblast-Activation-Protein alpha (FAP) zugeschrieben.

Die POP liegt im Zytosol in monomerer Form vor und besitzt ein Molekulargewicht von  $75 \times 10^{-3}$ . Sie wird u.a. in Niere, Gehirn, Plazenta und verschiedenen Bakterien exprimiert und vermag nur Peptide bis zu einer Größe von etwa 30 Aminosäuren anzugreifen, wodurch sich die Bezeichnung Oligopeptidase erklärt (Demuth et al. 1995). Die POP ist bislang die einzige Endopeptidase, für die eine Prolin-Spezifität nachgewiesen wurde (Augustyns et al. 1999). Wie die DPP IV akzeptiert die POP auch Alanin und Hydroxyprolin in der Position P1 nach Schechter und Berger (1967), während in Position P2 jede beliebige Aminosäure stehen kann und in Position P1' Prolin und Hydroxyprolin die Spaltung verhindern. Wie bei der DPP IV muss die Peptidbindung zwischen P1 und P2 die *trans*-Form aufweisen, und müssen die Aminosäuren in den Positionen P1 und P2 in der L-Konfiguration vorliegen (Demuth et al. 1995). Der Ähnlichkeit der Spaltstellenspezifität zwischen DPP IV und POP entspricht eine Sequenzähnlichkeit, die von Polgár et al. (1992) eingehend untersucht wurde. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen beträgt für das Gesamtmolekül 16,5 %, in den 180 C-terminalen Resten 21,7 %, in den 44 Resten um das katalytische Serin 31,8 %, in den 11

---

<sup>2</sup> <http://meropslinks.iapc.bbsrc.ac.uk/meropslinks/famcards/SS9.htm>

<sup>3</sup> <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/merops/clans.htm>

Resten um das katalytische Aspartat 45,5 % und in den 12 Resten um das katalytische Histidin 41,7 %.

Das *FAP*, das mit der Peptidase Seprase identisch ist (Goldstein et al. 1997), wird nur in sehr wenigen normalen adulten Geweben exprimiert, z.B. den A-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas. Es ist vor allem in Geweben lokalisiert, in denen ein Remodelling der extrazellulären Matrix stattfindet. So findet es sich auf reaktiven Stroma-Fibroblasten von Tumoren im Bereich von neu gebildeten Gefäßen, auf Fibroblasten des Granulationsgewebes von heilenden Wunden, in bestimmten fetalen mesenchymalen Geweben sowie auf aktivierten Kupffer-Sternzellen bei Leberzirrhose. In benignen epithelialen Tumoren kommt es nur selten vor (Garin-Chesa et al. 1990, Scanlan et al. 1994, Niedermeyer et al. 1998, Levy et al. 1999).

Wie bei der DPP IV handelt es sich beim FAP um ein integrales Membranprotein, das N-glykosyliert ist und eine große C-terminale extrazelluläre Domäne, ein hydrophobes transmembranes Segment sowie ein kurzes zytoplasmatisches Ende besitzt. Das Molekulargewicht des FAP beträgt ungefähr  $95 \times 10^3$ . Es kann als Dimer auftreten (Levy et al. 1999). Zwischen FAP und DPP IV besteht beim Menschen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 52 % im gesamten Molekül und von 68 % in den 200 C-terminalen Aminosäuren, die das katalytische Zentrum enthalten (Goldstein et al. 1997). Das humane FAP-Gen umfasst ungefähr 70 kb und setzt sich aus 26 Exons zusammen. Anzahl und Größe von Exons und Introns sind bei FAP und DPP IV bemerkenswert ähnlich (Niedermeyer et al. 1998). Wie bei der DPP IV ist das Serinpeptidase-Consensus-Motiv um das reaktive Serin (Trp-Gly-Trp-Ser-Tyr-Gly-Gly) auf zwei Exons aufgeteilt, während es bei den klassischen Serinpeptidasen auf *einem* Exon lokalisiert ist (Niedermeyer et al. 1998). Die Gene von DPP IV und FAP sind in derselben Region des Chromosoms 2 gelegen. Bei der Maus sind sie in der mittleren Portion des Chromosoms 2 lokalisiert (Niedermeyer et al. 1998), beim Menschen wurde für DPP IV und FAP der Gen-Locus 2q23 ermittelt (Mathew et al. 1994, 1995). Dagegen findet sich das Gen der Dipeptidylpeptidase X (DPP X), die von Rawlings und Barrett auch der Familie S9B zugeordnet wird, auf Chromosom 7 (Niedermeyer et al. 1998).

Die weitreichenden Übereinstimmungen in struktureller Organisation, Sequenz, Gen-Architektur und Gen-Lokalisation legen nahe, dass DPP IV und FAP in der Evolution durch Duplikation eines gemeinsamen Vorläufer-Gens entstanden sind und also als homolog betrachtet werden können (Reeck et al. 1987, Niedermeyer et al. 1998). Sie legen auch nahe, dass DPP IV und FAP Ähnlichkeiten auf funktioneller Ebene besitzen. Für beide ist eine

Dipeptidylpeptidase-Aktivität mit Prolin-Spezifität bekannt (Demuth et al. 1995, Niedermeyer et al. 1998, Levy et al. 1999). Durch Gelatin-Zymographie wurde von Levy et al. (1999) außerdem eine Gelatinase-Aktivität des FAP nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch die DPP IV eine Gelatinase-Aktivität besitzt. Ich schlage daher vor, dass DPP IV und FAP eine neue Subfamilie integraler Membran-Serinpeptidasen mit gleichzeitiger Gelatinase- und prolinspezifischer Dipeptidylpeptidase-Aktivität repräsentieren.