

3 Zusammenfassung und Diskussion

3.1 Eigenschaften der Primärstruktur und des katalytischen Zentrums von DPPIV/CD26

Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der Struktur und Funktionen von DPPIV/CD26 wurde zu Beginn dieser Arbeit die bisher noch nicht ganz geklärte Primärstruktur der DPPIV/CD26 durch cDNA-Klonierung und Sequenzierung ermittelt. Mit der dabei gewonnenen cDNA eröffnet sich die Möglichkeit, durch gezielte Mutagenese die funktionellen Domänen und biochemischen Eigenschaften des Proteins *in vitro* zu untersuchen. Schließlich wird die Expression großer Mengen des Proteins die Aufklärung der 3D- bzw. Kristallstruktur erlauben.

Zuerst wurde die cDNA der DPPIV/CD26 aus der Ratten-Leber-cDNA-Bank isoliert und sequenziert (Xu, 1992; Fan et al., 1993). Unsere Sequenz aus Ratten ist bis auf 2 Nukleotide identisch mit der Sequenz von Ogata (Ogata et al., 1989). Die Unterschiede sind an den Positionen 321 und 747 zu finden. Statt C und C in der Ogata-Sequenz befinden sich an beiden Stellen G und G in unserer Sequenz. Diese Nukleotide liegen an der dritten Position der Codons, dadurch ändert sich keine codierte Aminosäure. Die cDNA der DPPIV/CD26 wurde später auch aus der menschlichen Nieren-cDNA-Bank isoliert und sequenziert. Diese ist identisch mit der Sequenz von Misumi (Misumi et al., 1992). Die Ratten-cDNA der DPPIV/CD26 kodiert für ein Protein von 767 Aminosäuren Länge mit einer Übereinstimmung von 84,9 % zur menschlichen cDNA (766 Aminosäuren). Auf der cytosolischen Seite der Membran befinden sich nur sechs Aminosäuren. Daran schließt sich eine 22 Aminosäuren lange Transmembranregion an. Der 739 Aminosäuren umfassende extrazelluläre Teil des Enzyms lässt sich in drei etwa gleich große Regionen unterteilen. Auf den Membrananker folgt die glykanreiche Region, die fünf der insgesamt acht *N*-Glykosylierungsstellen trägt. Danach schließt sich die cysteinreiche Sequenz an, und an diese die C-terminale Domäne mit dem aktiven Zentrum (Abb. 1) (Reutter et al., 1995). Diese Orientierung mit einem in den Intrazellulärraum gerichteten Aminoterminus, der als Membrananker dient und nach der Translokation im ER nicht abgespalten wird, bestimmt die Zugehörigkeit der DPPIV/CD26 zu der Gruppe der Typ II-Membranproteine (Wickner & Lodish, 1985; Hong & Doyle, 1990). Ratten- und humane DPPIV/CD26 wurden beide erfolgreich in verschiedenen tierischen Zelllinien, wie CHO-, BHK-, und Jurkat-Zellen, die alle keine endogene DPPIV/CD26 exprimieren, sowie in den Insekten-Sf9- und High-Five-Zellen nach der Transfektion enzymatisch aktiv exprimiert.

Zunächst ist das katalytische Zentrum der DPPIV/CD26 zu charakterisieren. Verschiedene DPPIV/CD26-Mutanten wurden konstruiert und in CHO-Zellen transfiziert. Eine Deletionsmutante, deren C-Terminus um 50 Aminosäuren verkürzt wurde (DPPIV/CD26 Δ 718-776), führte zu einem vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität der DPPIV/CD26. Das deletierte Fragment enthält offenbar das aktive Zentrum, inklusive His741. Das bedeutet, dass der gesamte Bereich des C-Terminus (718-776) oder zumindest His741 als Bestandteil der katalytischen Triade für die Enzymaktivität notwendig ist. Weiterhin wurden zwei DPPIV/CD26-Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese konstruiert, in denen Serin631 bzw. Asp709 durch Ala bzw. Asn (DPPIV/CD26-S631A und DPPIV/CD26-D709N) ersetzt wurden (Bork, 1996). Die Untersuchung dieser Transfektanten zeigte, dass auch diese beiden DPPIV/CD26-Mutanten keine Enzymaktivität mehr besitzen (Bernt et al., 1994). Darum können wir schlussfolgern, dass das katalytische Zentrum der DPPIV/CD26 im C-Terminus der extrazellulären Domäne lokalisiert ist und die Aminosäurereste Ser631, Asp709 und His741 durch Ausbildung einer katalytischen Triade für die enzymatische Aktivität der Ratten-Dipeptidylpeptidase IV benötigt werden (Abb. 1) (Reutter et al., 1995; Bernt, 2000).

Da das aktive Zentrum der DPPIV/CD26 im C-terminalen Fünftel des Proteins lokalisiert ist, stellt sich die Frage, inwiefern die weiter N-terminal gelegenen Domänen für die Enzymaktivität eine Bedeutung haben, oder ob der Bereich des katalytischen Zentrums als selbständige Domäne aufzufassen ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden vier weitere DPPIV/CD26-Mutanten konstruiert und in CHO-Zellen exprimiert: DPPIV/CD26 Δ 139-470 enthält eine Deletion (333 Aminosäuren), die N-terminal zum Reaktionszentrum gelegen ist und Teile der *N*-glykanreichen und cysteinreichen Domäne umfasst; bei DPPIV/CD26 Δ 36-258 wurde die *N*-glykanreiche Domäne (334 Aminosäuren) deletiert; DPPIV/CD26 Δ 35-78 enthält eine Deletion (45 Aminosäuren), die sich zwischen der Transmembrandomäne und der ersten *N*-Glykosylierungsstelle befindet. Außerdem wurde ein chimäres Protein konstruiert, das aus der cytosolischen und transmembranären Domäne des Transferrin-Rezeptors und dem extrazellulären Teil der DPPIV/CD26 besteht (TfR/DPPIV). Die Messung der jeweiligen enzymatischen Aktivität zeigte, dass alle Deletionen im extrazellulären Teil der DPPIV/CD26 zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität führten, während die TfR/DPPIV-Chimäre weiterhin Enzymaktivität besitzt (Kiesewalter et al., 1994; Dobers et al., 1996). Das bedeutet, dass der Abschnitt mit dem katalytischen Zentrum nicht als selbständige Domäne aufzufassen ist, sondern wahrscheinlich von der korrekten Expression der Domänen in der Nachbarschaft des Reaktionszentrums für die Enzymaktivität der DPPIV/CD26 abhängt, während weder die

cytosolische noch die transmembranäre Domäne die Enzymaktivität beeinflussen. Deshalb konnten wir auf cDNA-Ebene die von Lambeir et al. vorausgesagten drei unabhängigen funktionellen Domänen im extrazellulären Teil der DPPIV/CD26 nicht bestätigen (Lambeir et al., 1997). Die Stabilität aller Deletionsmutanten war stark beeinträchtigt, selbst bei der kurzen Deletion von nur 45 AS. Keines der mutierten DPPIV/CD26-Moleküle konnte an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Sie blieben nach ihrer Biosynthese im Zellinneren, waren enzymatisch inaktiv und wurden rasch abgebaut. Diese biologischen Veränderungen sind wahrscheinlich durch Störungen der Proteinfaltung bedingt.

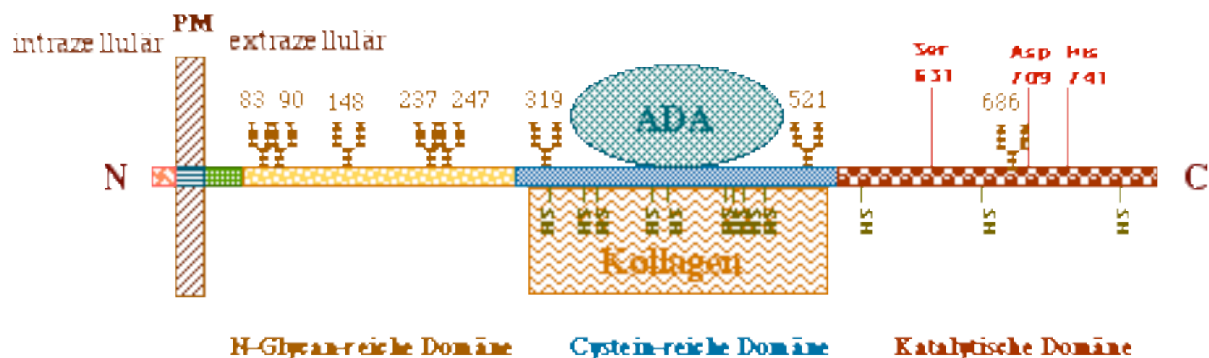


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primärstruktur der Ratten-DPPIV/CD26

3.2 Biologische Bedeutung der *N*-Glykosylierung und der Cysteine für biochemische Eigenschaften und Funktionen von DPPIV/CD26

Die DPPIV/CD26 ist ein stark glykosyliertes Protein. Der Einfluss der zahlreichen *N*-Glykane auf die biochemischen und funktionellen Eigenschaften des Proteins ist bislang nicht bekannt. Zur Ermittlung der biologischen Bedeutung der *N*-Glykosylierung der DPPIV/CD26 wurden Experimente (a) mit *N*-Glykosylierungsinhibitoren und (b) mit *N*-Glykosylierungsmutanten der Ratten DPPIV/CD26 durchgeführt. Die Experimente mit *N*-Glykosylierungsinhibitoren in DPPIV/CD26⁺-CHO-Zellen zeigten, dass die Expression der DPPIV/CD26 auf der Zelloberfläche nach Verhinderung der *N*-Glykosylierung durch Tunicamycin unterbleibt und mit dem Verlust der Enzymaktivität der DPPIV verbunden ist. Demgegenüber scheint das Processing der *N*-Glykane keinen entscheidenden Einfluss auf die Biosynthese der DPPIV/CD26 zu haben, wie die Versuche mit 1-Desoxymannojirimycin zeigten. Weder die Enzymaktivität noch die Zelloberflächenexpression der DPPIV/CD26 wurden beeinträchtigt, wenn das Processing der mannosereichen Strukturen durch 1-Desoxymannojirimycin gehemmt wurde (Loch et al., 1992). Das bedeutet, dass die *N*-Glykane nicht vom komplexen

Typ sein müssen, denn die mannosereichen Strukturen sind für die Expression an die Zelloberfläche und die biologische Stabilität ausreichend.

Alle acht *N*-Glykosylierungsstellen in der DPPIV/CD26 wurden jede für sich durch ortsspezifische Mutagenese ausgeschaltet, indem Asn durch Gln ersetzt wurde. Die so mutierten DPPIV/CD26-Moleküle wurden in CHO-Zellen exprimiert. Untersuchungen der *N*-Glykosylierungsmutanten der DPPIV/CD26 zeigten eine ortsspezifische Wirkung der *N*-Glykane auf die Kollagen I-Adhäsion, die enzymatische Aktivität, die intrazelluläre Translokation, die Dimerisierung und Proteinstabilität. Die Defekte einzelner *N*-Glykosylierungen in Position Asn83 und Asn90, Asn148, Asn237, Asn247, Asn521 und Asn686 zeigten nur einen geringen Einfluss auf die Enzymaktivität und Zelloberflächenexpression der DPPIV/CD26. Die Halbwertszeit dieser Mutanten ist im Vergleich zu Wildtyp-DPPIV/CD26 um 30 – 50 % reduziert. Im Unterschied dazu bewirkte die defekte *N*-Glykosylierung in Position 319 in der cysteinreichen Domäne eine dramatische Veränderung der biochemischen Eigenschaften der DPPIV/CD26. Diese Mutante besaß kaum Enzymaktivität und wurde nur in sehr geringer Menge an die Zelloberfläche transportiert. Das meiste Protein der Mutante Asn319 verblieb im endoplasmatischen Retikulum, wo sie rasch abgebaut wurde. Die Analyse der *N*-Glykane mit Endoglykosidase H zeigte, dass diese Mutante nur mannosereiche Oligosaccharidstrukturen besaß, d.h. dass das Processing der *N*-Glykane nicht stattgefunden hat (Fan et al., 1997; Fan et al., 2001). Weiterhin wurden doppelt-, dreifach- und vierfach-*N*-Glykosylierungsdefekte der DPPIV/CD26 konstruiert. Die Mutanten N148/686Q, N148/247/686Q und N90/148/247/686Q sind enzymatisch aktiv und werden auf der Zelloberfläche exprimiert. Sie zeigten jedoch reduzierte biologische Stabilitäten in unterschiedlichem Ausmaß im Vergleich mit Wildtyp-DPPIV/CD26. Im Gegensatz zu ihnen konnten bei den Mutanten N148/237/247/686Q, N148/247/521/686Q und N83/148/247/686Q mit einem gegenüber dem Wildtyp um 50 % verringerten Kohlenhydratanteil keine Enzymaktivität und Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Sie wurden nach der Synthese rasch abgebaut (Ergebnisse noch nicht publiziert). Trombetta und Helenius vertreten die Ansicht, dass eine Oligosaccharid-vermittelte Bindung des neusynthetisierten Glykoproteins an die Chaperone, Calnexin und Calretikulin, für die korrekte Faltung und Oligomerisierung des Proteins notwendig ist (Hammond et al., 1994; Helenius, 1994; Michalak et al., 1998; Trombetta & Helenius, 1998). Dies ist vermutlich ein Mechanismus zur qualitativen Kontrolle von glykosylierten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER) während der Biosynthese. Da die reduzierte enzymatische Aktivität der DPPIV/CD26-*N*-Glykosylierungs-

mutanten immer im Zusammenhang mit der Veränderung der biochemischen Eigenschaften des Proteins, wie z. B. der Stabilität, intrazellulären Translokation und Dimerisierung steht, könnten die Fehler der Faltung, die durch die defekten *N*-Glykosylierungen entstanden sind, als Ursache für solche reduzierten Aktivitäten betrachtet werden. Die Stärke der falschen Faltung hängt von der Position bestimmter *N*-Glykane innerhalb der Primärstruktur ab. Am Beispiel des GABA-Transporters Typ 1, der ebenso ein Glykoprotein ist, wurde herausgefunden, dass sowohl die Aktivität der GABA-Aufnahme als auch die Stabilität und intrazelluläre Translokation aller *N*-Glykosylierungsmutanten stark reduziert wurden (Cai et al., 2004). Zusammenfassend kann man schließen, dass die *N*-Glykosylierung eine wichtige Rolle für die richtige Faltung des Glykoproteins mit der Ausbildung einer funktionellen Einheit spielt. Fehler der Faltung, die durch Defekte der *N*-Glykosylierung entstanden sind, können zu einem Festhalten des neu synthetisierten Moleküls im ER und anschließend zum Abbau führen (Abb. 2).

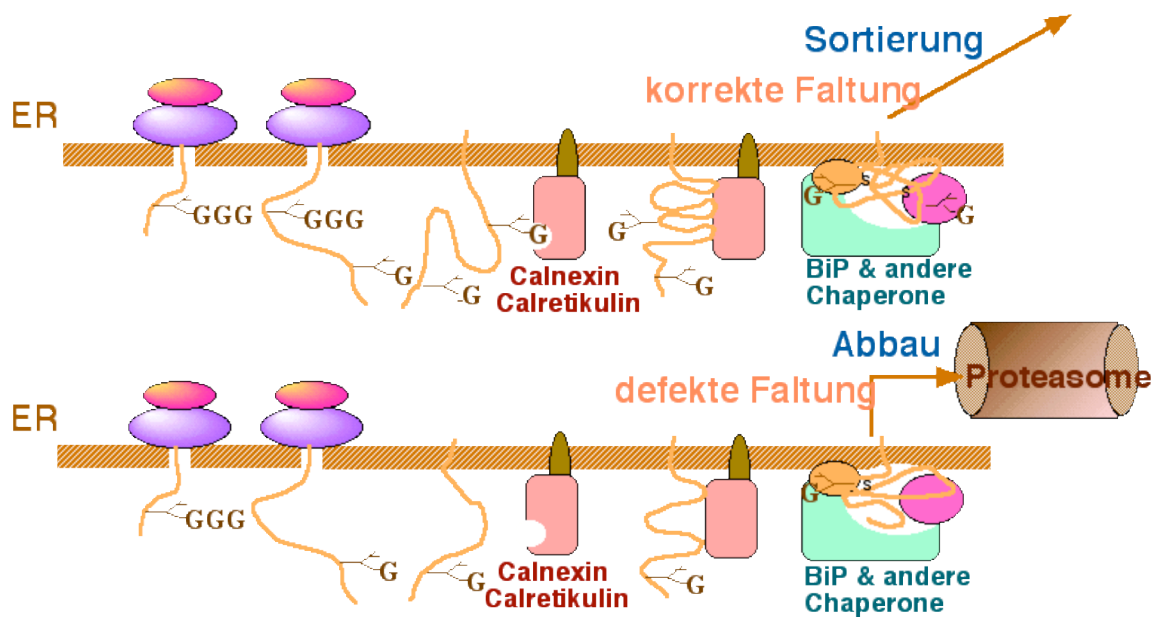


Abbildung 3: Rolle der *N*-Glykosylierung für Glykoprotein-Faltung
 G: Glucose

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit herausgefunden, dass die *N*-Glykane an der Adhäsion der DPPIV/CD26 auf Kollagen I und an der GABA-Aufnahme von GAT 1 beteiligt sind (Fan et al., 2001; Cai et al., 2004)) Die *N*-Glykane des GAT1, insbesondere seine terminalen Saccharide, sind an der GABA-Aufnahme beteiligt, da durch die Blockierung des *N*-Glykosylierungsprocessings durch 1-Desoxymannojirimycin die Aktivität der GABA-Aufnahme

stark reduziert wurde, aber die Stabilität und intrazelluläre Translokation nicht beeinflusst wurden. Ferner wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Schwarz (MPI für Biophysik, Frankfurt/M) nachgewiesen, dass die *N*-Glykane den GABA-Transport durch den Einfluss auf die Affinität zu Na⁺-Ionen, die mit dem GABA-Transport verknüpft sind, regulieren (Cai et al., 2004).

Die Aufreinigung verschiedener intrazellulärer Kompartimente von DPPIV/CD26-überexprimierenden Zellen ermöglicht die Untersuchung des intramolekularen heterogenen Turnovers der DPPIV/CD26, eines Prozesses, bei dem die terminalen und präterminalen Zuckerreste der *N*-Glykanketten rascher als der Proteinanteil entfernt werden (Kreisel et al., 1980; Tauber et al., 1983). Der intramolekulare heterogene Turnover der *N*-Glykane der DPPIV/CD26 wurde in stabil transfizierten CHO-Zellen untersucht. Die terminalen Strukturen der DPPIV/CD26-Oligosaccharide wurden nach der Translokation auf der Zelloberfläche Schritt für Schritt vom Man9GlcNAc2-Typ zu Man8-, Man7-, bis Man5GlcNAc2-Typ verändert. Das bedeutet, dass die DPPIV/CD26 nach ihrer Expression auf der Zelloberfläche weitere Modifikationen der Oligosaccharide erfährt (Reprocessing). Der Prozess kann nicht durch den Inhibitor Swainsonin blockiert werden, wurde aber komplett durch 1-Desoxymannojirimycin inhibiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Reprocessing der DPPIV/CD26 durch eine 1-Desoxymannojirimycin-empfindliche/Swainsonin-resistente Mannosidase durchgeführt wird (Ergebnisse nicht publiziert). Unser Ergebnis stimmt mit den Befunden aus Hepatozyten und Hepatom-Zellen aus Ratten überein (Porwoll et al., 1998).

Anschließend wurde die subzelluläre Lokalisation und das Recycling der DPPIV/CD26 in stabil transfizierten BHK-Zellen untersucht. Es wurde von uns erstmals nachgewiesen, dass die DPPIV/CD26 eine Endocytose in Endosomen durchmacht (Horstkorte et al., 1996). Daher kann man vermuten, dass Endosomen an der Regulation des Reprocessings beteiligt sind. Das Recycling der DPPIV/CD26 wurde unter Verwendung von chimärem Protein (TfR/DPPIV), welches aus dem intrazellulären Teil des Transferrinrezeptors und dem extrazellulären Teil der DPPIV/CD26 besteht, weiterhin untersucht. Beim Studium der Endocytose fanden wir, dass die cytosolische und transmembranäre Domäne der DPPIV/CD26 das Signal für die Endocytose vermitteln, während der extrazelluläre Teil der DPPIV/CD26 die Stabilität des Proteins determiniert (Kiesewalter, 1997).

Die Primärsequenz der DPPIV/CD26 enthält zwölf Cysteinreste. Durch chemische Titrationsexperimente und molekularbiologische Arbeiten konnten wir zeigen, dass mindestens sechs

der zwölf Cysteinreste sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen nicht in freier Form vorliegen. Alle zwölf Cystein-Codons wurden jedes für sich durch ortsspezifische Mutagenese mutiert. Sieben der Mutanten (C326G, C337S, C445S, C455G, C473S, C448S, C552S) waren instabil, sie wurden nicht auf der Zelloberfläche exprimiert, bildeten keine Dimerform und besaßen keine enzymatische Aktivität, während die anderen fünf Mutanten (C229G, C383G, C395S, C650G, C763S) keine deutliche Änderung der biologischen Eigenschaften aufwiesen. Bei membranständigen oder sekretorischen Proteinen werden Disulfidbrücken gebildet, welche wichtig für deren Stabilität und zur Erlangung der korrekten Struktur sind. Offenbar sind die Cysteinreste C326, C337, C445, C455, C437, C448 und C552 an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt und für die korrekte Faltung und das intrazelluläre Trafficking essentiell. Offensichtlich besitzt die Ratten-DPPiV/CD26 mindestens drei funktionell bedeutsame intramolekulare Disulfidbrücken (Dobers et al., 2000; Fan et al., 2001). Nach Lambeir et al. ist eine der drei Domänen im extrazellulären Teil der DPPiV/CD26 stark durch Disulfidbrücken stabilisiert (Lambeir et al., 1997). Diese Domäne ist identisch mit dem Bindungsbereich für Kollagens (Löster et al., 1995) und für ADA (Dong et al., 1997).

Die Ausbildung der Disulfidbrücken erfolgt kotranslational im Lumen des ER in der Reihenfolge der Translation und kann in dieser Verknüpfung bestehen bleiben. Wenn diese Art der Brückenbildung zu instabilen Strukturen führt, werden sie im ER durch die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) wieder aufgebrochen und neu verknüpft. Am Ende dieser Umlagerungen steht die thermodynamisch stabilste Struktur. Es stand bislang noch nicht fest, welches Cystein sich mit welchem zu einer Disulfidbrücke verknüpft. Es wurde später durch die Aufklärung der DPPiV/CD26-Kristallstruktur nachgewiesen, dass außer den von uns bestimmten 6 Cysteinresten C326, C337, C445, C448, C455, C473 die Cysteinreste C383, C395, C650 und C763 auch an der Ausbildung der Disulfidbrücken beteiligt sind (Rasmussen et al., 2003). Die Cysteinreste C326, C337, C445, C448, C455 und C473 bilden der Reihenfolge nach jeweils eine Disulfidbrücke in den β -Propeller-Domänen 5, 7, 8, während die Cysteinpärchen 383 und 395 in der β -Propeller-Domäne 6 und Cysteine 650 und 763 in der Hydrolase-Domäne jeweils eine Disulfidbrücke bilden. Das Fehlen einer dieser beiden Disulfidbrücken hat offenbar keinen großen Einfluss auf die biochemischen Eigenschaften des Proteins.

3.3 DPPIV/CD26-vermittelte Zelladhäsion

Die Beteiligung der DPPIV/CD26 an der Zelladhäsion wurde durch DPPIV/CD26-transfizierte CHO-Zellen untersucht. Die initiale Adhäsion der DPPIV/CD26⁺-CHO-Zellen an Kollagen I ist gegenüber nicht-transfizierten CHO-Zellen deutlich beschleunigt (Reutter et al., 1995). Zur Aufklärung der Bindungsdomäne bzw. Bindungsmechanismen wurden Adhäsionsassays mit verschiedenen DPPIV/CD26-Mutanten durchgeführt. Die spezifische Adhäsionskapazität wurde nach den Proteinmengen von DPPIV/CD26-Wildtyp oder -Mutanten an den Zelloberflächen genau errechnet. Da die enzymatisch inaktiven DPPIV/CD26-Mutanten (S631A, D709N) in transfizierten CHO-Zellen eine ähnliche Geschwindigkeit der Kollagen I-Adhäsion zeigten, bedeutet dies, dass die enzymatische Aktivität der DPPIV/CD26 nicht notwendig für die Kollagen I-Adhäsion ist. Im Gegensatz dazu reduzierten *N*-Glykosylierungsmutanten diese Adhäsion. Das bedeutet, dass die *N*-Glykane der DPPIV/CD26 an diesem Prozess beteiligt sind (Fan et al., 2001). Die DPPIV/CD26-vermittelte Kollagen I-Adhäsion kann durch den monoklonalen Antikörper 13.4 blockiert werden. Dies stimmt mit früher durchgeführten *in vitro*-Kollagenbindungsassays überein (Löster et al., 1995). Zusätzlich wurde herausgefunden, dass die Cystein-Mutationen im Bereich des Reaktionszentrums (C650 und C763) keinen Einfluss auf die DPPIV/CD26-vermittelte Kollagen I-Adhäsion hatten. Im Gegensatz dazu reduzierten die Cystein-Mutationen im zentralen Bereich der extrazellulären Domäne (C299G, C383G und C395S) die Adhäsion zwischen 20 und 50 %. Insbesondere die Mutation des C299 vermindert die Adhäsion auf Kollagen I um 50 % (Ergebnisse noch nicht publiziert). Nach heutiger Erkenntnis wissen wir, dass die Cysteine 383 und 395 an der β -Propeller-Domäne 6 eine Disulfidbrücke bilden (Rasmussen et al., 2003). Mutationen an diesen Cysteinen können zu einer lokalen Strukturveränderung führen. Das kann als Ursache für die reduzierte Adhäsion dieser Mutanten angesehen werden. Im Gegensatz dazu ist Cystein 299 nicht an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt. Daher vermuten wir, dass das Cystein 299 als ein freies Cystein direkt an der Bindung an Kollagen I beteiligt ist.

Zur Ermittlung, ob DPPIV/CD26 als ein funktioneller Rezeptor für Kollagen zur Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten dient, wurde die DPPIV/CD26 abhängige T-Zell-Aktivierung unter der Verwendung von verschiedenen Kollagen-Typen sowie Fibronectin untersucht (Ergebnisse s. nächstes Kapitel).

3.4 DPPIV/CD26 bei der T-Zell-Aktivierung

Die DPPIV/CD26 ist sowohl ein Ko-Stimulator bei der T-Zell-Aktivierung, als auch eine Dipeptidylpeptidase, ein Rezeptor für ADA und ein Rezeptor für Kollagen. Um herauszufinden, inwiefern die oben genannten Funktionen mit der kostimulatorischen Wirkung der DPPIV/CD26 bei der T-Zell-Aktivierung gekoppelt sind, wurde die DPPIV/CD26-abhängige T-Zell-Aktivierung mittels DPPIV/CD26-transfizierter Jurkat-Zellen (humane T-Zelllinie, DPPIV/CD26 negativ) untersucht. Nach der Stimulation mit Anti-CD3-Antikörpern konnte die DPPIV/CD26-vermittelte Signaltransduktion durch Messung der IL-2-Sekretion nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass sowohl humane DPPIV/CD26 als auch Ratten-DPPIV/CD26 zur Steigerung der IL-2-Sekretion der Jurkat-Zellen führten. Es bedeutet, dass die Ratten-DPPIV/CD26 auch als Ko-Stimulator für die humane T-Zell-Aktivierung dienen kann. Da die Ratten-DPPIV/CD26 nicht in der Lage ist, sich an die humane ADA zu binden, ist ADA offensichtlich an der Stimulation der IL-2-Sekretion nicht beteiligt (Fan et al., 2003).

Ein weiterer Gegenstand der Arbeiten betraf die Frage, inwieweit die enzymatische Aktivität der DPPIV/CD26 für die T-Zell-Aktivierung notwendig ist. Unter Verwendung von enzymatisch inaktiven Mutanten konnten wir nachweisen, dass der Austausch von Ser631 gegen Ala (S631A) die DPPIV/CD26-abhängige Stimulation der Sekretion von IL-2 verringerte, während die Mutation D709N, die ebenso zum Verlust der Enzymaktivität der DPPIV/CD26 führt, keine Auswirkungen auf die DPPIV/CD26 vermittelte T-Zell-Aktivierung zeigte. Daraus schlussfolgern wir, dass die Enzymaktivität der DPPIV/CD26 für die DPPIV/CD26-vermittelte Ausschüttung von IL-2 nicht notwendig ist. Die Beziehung zwischen der Enzymaktivität und DPPIV/CD26-vermittelter T-Zell-Aktivierung ist bisher in der Literatur widersprüchlich diskutiert worden. Ein großer Teil der Untersuchungen wurde unter Verwendung von Substratanalogen oder Inhibitoren der enzymatischen Aktivität durchgeführt (Hegen et al., 1993). Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Substanzen unspezifisch wirken. Tanaka et al. behaupten, dass die DPPIV/CD26-abhängige Ko-Stimulation eine enzymatische Aktivität benötigt (Tanaka et al., 1993). Bei diesem Experiment wurde humane DPPIV/CD26 durch Mutation von S630A inaktiviert, was zu einer starken Herabsetzung der DPPIV/CD26-vermittelten T-Zell-Aktivierung führte. Unsere Ergebnisse bestätigen diesen Befund. Wir schlussfolgern dennoch aus den Ergebnissen der zweiten enzymatisch inaktiven Mutante D709N, dass der Einfluss der Mutation S630A auf die DPPIV/CD26-vermittelte T-Zell-Aktivierung nicht mit dem

Verlust der enzymatischen Aktivität in Zusammenhang gebracht werden kann, sondern vielmehr von Struktur/Konformationsänderungen am Molekül abhängt.

Weiterhin wurde der Einfluss der Wechselwirkung zwischen DPPIV/CD26 und Kollagen auf die T-Zell-Aktivierung untersucht. Wir haben erstmals bei Jurkat-Zellen nachgewiesen, dass die DPPIV/CD26-vermittelte IL-2-Ausschüttung stark vom Kollagen Typ I (> 80 %) blockiert wurde, während sie schwächer vom Kollagen Typ XIV (52 %), Typ II (38 %), Typ VI (32 %) und Typ III (20 %) inhibiert wurde. Im Gegensatz zum Kollagen Typ I zeigten Fibronectin, Kollagen Typ IV und Typ V keinen deutlichen Einfluss auf die IL-2-Sekretion. Bei der Analyse der α 1- und α 2-Ketten des Kollagens Typ I erwies sich die α 1-Kette als stärkster Inhibitor (> 95 %), während die α 2-Kette weniger als 40 % Inhibition aufwies. Zusätzlich wurde nach V8-Verdau des Kollagen I die Inhibitionswirkung auf ca. 65 % reduziert, während nach Trypsinverdau fast keine Inhibitionswirkung mehr vorhanden war (Fan et al., 2003). Die unterschiedlichen Inhibitionswirkungen von verschiedenen Kollagen-Typen stimmen mit der Bindungsaffinität der DPPIV/CD26 zu verschiedenen Kollagenen überein, die früher gemessen wurden (Löster et al., 1995). Die Bindung der DPPIV/CD26 an Kollagen wird durch den monoklonalen Antikörper 13.4 blockiert. Dieser ist ebenfalls in der Lage, die DPPIV/CD26-vermittelte IL-2-Sekretion zu blockieren (Fan et al., 2003). Vermutlich ist die Kollagen-Bindungsdomäne der DPPIV/CD26 mit dem Epitop des monoklonalen Antikörpers 13.4 gekoppelt. Zur Wechselwirkung der DPPIV/CD26 mit Proteinen der extrazellulären Matrix gibt es bisher nur wenige Arbeiten. Lediglich von Dang et al. wurde eine kostimulierende Wirkung von Kollagen bei der DPPIV/CD26-abhängigen Proliferation von Lymphozyten beobachtet (Dang et al., 1990). Matthern et al. propagierten, dass DPPIV/CD26 keine Rolle bei der Adhäsion der humanen Lymphozyten auf den Endothelzellen oder Fibroblasten spielt (Mattern et al., 1998). Durch unsere Versuche konnten wir zeigen, dass die Interaktion zwischen DPPIV/CD26 und Kollagenen die zellulären Signale beeinflussen kann.

3.5 Rolle der DPPIV/CD26 in der Immunantwort

Die Bedeutung der DPPIV/CD26 im Rahmen der Immunregulation *in vivo* oder der Pathogenese von Krankheiten ist bisher unklar. In *in vitro*-Modelle lassen spezifische Fragestellungen zu und erlauben feine Analysen von einzelnen Faktoren und Reaktionsschritten, sie sind jedoch nicht für die Analyse von immunologischen Veränderungen geeignet. Die

Immunstimulation und die Differenzierung der Immunzellen lassen sich nur durch *in vivo*-Versuche sinnvoll ermitteln.

In Zusammenarbeit mit Prof. D. Marguet (Marseille-Luminy), der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse zur Verfügung gestellt hat, wurde die Rolle der DPPIV/CD26 bei der Immunregulation untersucht (Yan et al., 2003). Die DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse haben keinen auffälligen Phänotyp, jedoch ist in der Lymphozytenpopulation aus der Milz (MSLs) die Prozentzahl der CD4⁺-Zellen deutlich niedriger (um 25 %), während die Prozentzahl der natürlichen Killer-Zellen (NK), im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, um 67 % höher ist. In den peripheren Blut-Lymphozyten (MPBLs) zeigen DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse einen deutlich verminderten Anteil von CD4⁺NKT-Zellen. Das bedeutet, dass die DPPIV/CD26 an der Regulation der Entwicklung, Reifung und Migration von CD4⁺-, NK- und CD4⁺NKT-Zellen beteiligt ist (Fan et al., 2003; Yan et al., 2003; Yan et al., 2004). Eine negative Wirkung auf die Ansteuerung des Standortes (homing) und die Migration der hämatopoetischen Stammzellen durch die Expression der DPPIV/CD26 auf der Zelloberfläche dieser Zellen wurde jüngst von Christopherson et al. beobachtet (Christopherson et al., 2004).

Die Ausschaltung des DPPIV/CD26-Gens wirkte sich *in vitro* auf die Cytokinproduktion von Maus-Milz-Lymphozyten (MSL-Zellen) nach der PWM (pokeweed mitogen)-Stimulation aus. Am deutlichsten ausgeprägt war die auf das 2,5- bis 3,4-Fache verminderte Sekretion von IL-4 in den Lymphozyten der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse. Die IFN- γ - und IL-10-Produktion stieg jedoch an. Die IL-2-, IL-5-, IL-6- und IL-13-Sekretionen blieben unverändert. Nach der Immunisierung mit PWM war die gesamte Immunglobulin-Konzentration im Serum von DPPIV/CD26-Knock-out-Mäusen wesentlich niedriger als im Serum von Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz zu den IgM wurde die Produktion von IgG bei DPPIV/CD26-Knock-out-Mäusen stark verringert. Durch die Analyse der Immunglobulin-Isotypen fanden wir, dass die Konzentration bei der IgG-Isotype IgG1 und IgG2, sowie die IgE-Konzentration deutlich vermindert war. Die Messung der Cytokin-Konzentrationen ergab nach Immunisierung mit PWM eine Absenkung der IL-4- und IL-2-Konzentrationen im Serum der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse verglichen mit Wildtyp-Mäusen, während die Sekretion von IFN- γ verzögert wurde (Fan et al., 2003; Yan et al., 2003; Yan et al., 2004). Unser Ergebnis stimmt mit dem Befund bei humanen Lymphozyten überein. Die Hemmung der DPPIV/CD26 durch Antikörper oder Inhibitoren führt zu einer Reduktion der IL-2- und

IL-6-Sekretion von humanen mononucleären Zellen des peripheren Blutes (HPBM) nach der Stimulation mit PWM (pokeweed mitogen) (Reinhold et al., 1993). Ein Einfluss der DPPIV/CD26⁺-T-Lymphozyten auf die Produktion der Immunglobuline von B-Lymphozyten wurde früher auch von Gruber et al. beobachtet (Gruber et al., 1988). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die DPPIV/CD26 an der Regulation der Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten beteiligt ist, die wiederum Einfluss auf die Cytokin-Sekretion und T-Zell-abhängige Antikörper-Produktion hat.

Um die Rolle der DPPIV/CD26 bei Krankheiten zu ermitteln, wurden DPPIV/CD26-Knock-out- und Wildtyp-Mäuse mit verschiedenen Antigenen behandelt, wie z. B. BCG (Bacille-Calmette-Guérin), OVA (Ovalbumin) und MOG (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein), mit der Absicht, eine Infektionskrankheit (Tuberkulose), Allergie-Krankheit (Asthma) und Autoimmunerkrankungen (EAE: experimentelle autoimmune Encephalo-myelitis) am Tier-Modell hervorzurufen. Wir haben herausgefunden, dass der Verlust von DPPIV/CD26 einen Einfluss auf die Antigen-stimulierte Immunreaktion hat. Nach der Immunisierung mit BCG wurde im Serum der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse eine 6-fach höhere IL-4-Konzentration nachgewiesen, während die IFN- γ -Konzentration um 50 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen war. Nach der Immunisierung mit OVA produzierten DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse im Serum deutlich geringere Mengen von sowohl IgM als auch IgG bzw. IgG1 und IgG2 als Wildtyp-Mäuse (Yan et al., 2004). Nach der Immunisierung mit MOG zeigten DPPIV/CD26 Knock-out-Mäuse eine verzögerte Ausprägung der EAE-Krankheit (sichtbar durch verzögertes Eintreten der Symptome, wie z. B. der Lähmung der Hinter- bzw. Vorderbeine). Das bedeutet, dass DPPIV/CD26 auch einen Einfluss auf die Antigen-stimulierte Immunantwort hat (Ergebnisse noch nicht publiziert).

Weiterhin wurden die funktionellen Mechanismen der DPPIV/CD26 bei Asthma untersucht. OVA induziert Asthma in Mäusen. Nach der Immunisierung und anschließender Aerosolaufnahme wurde eine gesteigerte Gewebeimmunantwort in den Lungen der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse beobachtet. Um die Gefäße herum und im Parenchym zeigte sich ein zunehmendes Lungeninfiltrat mit ausgeprägter Eosinophilie. In der bronchoalveolären Waschflüssigkeit (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse fanden sich ca. 6,5-fach mehr Eosinophile als in den Wildtyp-Mäusen. Durch Analyse der Expression der Cytokin-mRNA haben wir herausgefunden, dass eine zunehmende Expression von lokalen Th2-Cytokinen, IL-4, IL-5 und IL-13 verantwortlich für

die gesteigerte Entzündung im Atemweg der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse ist (Publikation in Vorbereitung). Die Rolle der DPPIV/CD26 bei Infektionskrankheit und Autoimmunerkrankungen befindet sich am Beginn des Verstehens.

Zahlreiche Experimente, die sowohl *in vivo* unter der Verwendung von DPPIV/CD26-Inhibitoren als auch *in vitro* anhand von DPPIV/CD26 transfizierten Jurkat-Zellen durchgeführt wurden, zeigten, dass DPPIV/CD26 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielt (Morimoto & Schlossman, 1998; von Bonin et al., 1998; De Meester et al., 1999). Die gewonnenen Ergebnisse waren oft widersprüchlich. Das lag vermutlich an der starken Tyrosinphosphorylierung der Jurkat-Zellen und an der möglichen unspezifischen Wirkung der Inhibitoren. Die Verfügbarkeit der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse eröffnet uns die Möglichkeit, die Rolle der DPPIV/CD26 bei der Immunregulation *in vivo* zu untersuchen. Unsere Ergebnisse haben neue Erkenntnisse über die Funktion der DPPIV/CD26 *in vivo* bei der Entwicklung der T-Lymphozyten, Cytokin-Sekretion und Immunglobulin-Produktion gebracht. Es ist zu klären, ob und welche Komponenten bei der Signaltransduktion hieran beteiligt sind. Die Knock-out-Mäuse eröffnen weiterhin die Möglichkeit, die Beteiligung dieses integralen Typ II-Membranglykoproteins bei Erkrankungen des Immunsystems zu untersuchen. Zur Aufklärung der Funktionen und Mechanismen der DPPIV/CD26 bei diesen Prozessen müssen genaue biochemische und immunologische Versuche im Zusammenhang mit pathophysiologischen Untersuchungen durchgeführt werden.

3.6 Herstellung von großen Mengen (mg) von DPPIV/CD26-Protein, Ermittlung der 3D-Struktur der Ratten-DPPIV/CD26 und Ermittlung der 3D- und Kristallstrukturen des Komplexes aus humaner DPPIV/CD26 und Rinder-ADA

Die Expression von Ratten- und humaner DPPIV/CD26 wurde in Sf9-Insektenzellen etabliert. Humane DPPIV/CD26-cDNA wurde in den Baculovirus-Transfervektor pFASTBAC integriert, welcher die Expression von rekombinantem Protein in *Spodoptera frugiperda*-Zellen (Sf9) erlaubt. Durch Transformation von rekombinantem Plasmid in *E.coli* wurde rekombinantes Bacmid erzeugt. Nach der Transfektion der rekombinanten Bacmid-DNA in Sf9-Insektenzellen wurden optimale Expressionsbedingungen über zeit- und virus-titerabhängige Kinetiken analysiert. Mit einer Multiplicity-of-Infection (MOI) von 0.75-1 konnten nach 48 h Infektionsdauer ca. 5 mg des Membranglykoproteins je Liter Zellkultur gewonnen werden. Die spezifische enzymatische Aktivität der DPPIV/CD26 aus Insekten-

zellen liegt über 20 Units/mg (aufgereinigte DPPIV/CD26) und ist vergleichbar mit DPPIV/CD26 aus CHO-Zellen. Um homogene, dimere und enzymatisch aktive DPPIV/CD26 zu isolieren, wurde ein Reinigungsprozess in zwei Schritten mit Immunaffinitätschromatographie, welche mit dem anti-DPPIV/CD26 polyklonalen IgG gekoppelt wurde, sowie SE-FPLC (size-exclusion FPLC) etabliert (Dobers et al., 2002). Wir waren als erste in der Lage, die DPPIV/CD26 in großer Menge gentechnologisch herzustellen und als aktives Enzym rein zu gewinnen. Dies ermöglicht die Aufklärung der 3D- bzw. Kristallstruktur der DPPIV/CD26. Wegen der großen Bedeutung der DPPIV/CD26 bei Diabetes mellitus haben in den letzten Jahren viele Forschungsinstitutionen und pharmazeutische Unternehmen ein neues Therapieprinzip konzipiert, das auf der Hemmung des Abbaus von GLP (glucagon-like-peptide) durch Inhibierung der Aktivität der DPPIV/CD26 beruht, die die Insulinsekretion stimulieren. Unser Know-how der DPPIV/CD26-Reinigung ermöglicht daher auch das Screening und Untersuchungen einer Vielzahl von DPPIV/CD26-Inhibitoren.

In Zusammenarbeit mit Dr. Böttcher und Dr. Ludwig konnten erstmals dreidimensionale Abbildungen der Ratten-DPPIV/CD26 und des Komplexes aus der humanen DPPIV/CD26 und Rinder-ADA erzeugt werden. Durch die Cryo-Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (Cryo-TEM) mit anschließender dreidimensionaler Bildverarbeitung konnte die Struktur der Ratten-DPPIV/CD26 aus 11121 interaktiv ausgewählten Einzelmolekülen bei 14 Å-Auflösung rekonstruiert werden (Ludwig et al., 2003). Die Rekonstruktion bestätigte die prognostizierte homodimere Organisation des Proteins. Jedoch zeigte sie, dass die Monomere, entgegen der ursprünglich favorisierten Vermutung, in einer ungewöhnlich verkippten Anordnung zueinander vorliegen. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen DPPIV/CD26 und der verwandten Serinpeptidase Prolylolo-peptidase (POP) wurden schon seit längerem vermutet. Auf der Basis dieser erwarteten Struktur motive wurde eine Ankopplungs-Berechnung durchgeführt. Die Struktur der DPPIV/CD26 steht in guter Übereinstimmung mit der Kristallstruktur der homologen Prolylolo-peptidase POP (Fülöp et al., 1998). Der bedeutendste Unterschied zu POP war jedoch, dass in der DPPIV/CD26 neben einer Öffnung (wie bei POP erwartet) im Bereich der vorausgesagten β -Propellerdomäne eine zweite seitliche Öffnung in jedem Monomer existiert. Die seitliche Öffnung ist mit ersterer Öffnung durch einen das Monomer durchziehenden Kanal verbunden. Die zentrale Kavität des DPPIV/CD26 ist ungefähr 1.4-fach größer als die von POP. Beide Öffnungen bieten Zugang zum katalytischen Zentrum in der zentralen Kavität. Es ließ sich keine strukturelle Entsprechung der seitlichen Öffnung, die bei der DPPIV/CD26 gefunden wurde, für POP

finden. Das bedeutet, dass Substratspezifität und Bindungskinetik vermutlich bei beiden Enzymen verschiedenen Mechanismen folgen (Ludwig et al., 2003). Sie war die erste Struktur von DPPIV/CD26, die mittels Cryo-TEM bestimmt wurde. Mit der durch Rasmussen et al. (Rasmussen et al., 2003) gefundenen Kristallstruktur von humaner DPPIV/CD26 wurden die gefundenen Ergebnisse eindrucksvoll bestätigt. Im Vergleich mit der humanen DPPIV/CD26-Struktur auf ähnlichem Auflösungs-niveau zeigt die Ratten-DPPIV/CD26-Struktur trotz der hohen Sequenzübereinstimmung von ca. 84.9 % einige markante Unterschiede. Am auffallendsten sind der flachere Winkel, in dem die Monomere zu einem Dimer verbunden sind, sowie jeweils eine größere Öffnung im Bereich der β -Propellerdomäne der Ratten-DPPIV/CD26-Monomere.

Durch Immunaффinitätschromatographie gewonnene humane DPPIV/CD26 (hDPPIV/CD26) wurde auf eine Konzentration von 2 g/l gebracht und dann mit verschiedenen Mengen von Rinder-ADA (bADA) gekoppelt. Die Bindungsprodukte wurden durch Gel-Elektrophorese und Western-Blots unter nativen Bedingungen analysiert und anschließend mittels FPLC mit einer Superdex 200-Säule von den nicht gebundenen Proteinen getrennt und isoliert. Unsere Ergebnisse zeigten, dass sich bADA, je nach gegebenen Bedingungen, sowohl mit einem als auch mit zwei Molekülen an homodimere hDPPIV/CD26 binden kann (Ludwig et al., 2004).

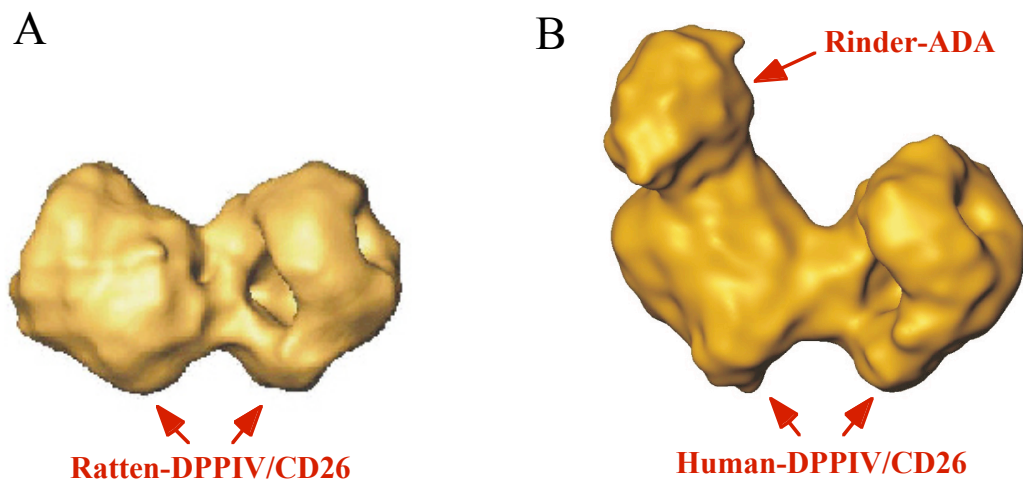


Abbildung 4: A. Die dreidimensionale Struktur des Ratten-DPPIV/CD26.

B. Die dreidimensionale Struktur des hDPPIV/CD26-bADA-Komplexes

Die dreidimensionale Struktur des hDPPIV/CD26-bADA-Komplexes wurde durch Cryo-TEM und Einzelpartikelanalyse bis zu einer Auflösung von 22 Å erhalten (Zusammenarbeit mit Dr. Böttcher und Dr. Ludwig). Das Ergebnis der TEM-Struktur zeigt die räumliche Zuordnung und die Bindungsstellen von beiden Enzymen. Die bADA bindet sich an den äußeren Kanten der β -Propeller der hDPPIV/CD26. Bei einer Ankopplungs-Berechnung wurden die hDPPIV/CD26- und bADA-Kristallstrukturen in die EM-Dichtekarte des Komplexes einbezogen. Das zeigte, dass sich die Bindungsstelle der bADA quer durch die β -Propellerblätter IV und V der hDPPIV/CD26 ausbreitet. Es konnte bestätigt werden, dass die aus Voruntersuchungen für die Bindung als relevant prognostizierten Aminosäuren Leu294 und Val341 der hDPPIV/CD26 direkt peripher an der Bindungsregion lokalisiert sind, die ebenfalls als relevant befundenen Aminosäuren T440 und K441 (Abbott et al., 1999), jedoch deutlich außerhalb der Bindungsdomäne liegen. Deshalb können wir schlussfolgern, dass die Aminosäuren Thr 440/Lys 441, im Gegensatz zu Leu 294/Val 341, nicht an der bADA-Bindung beteiligt sind (Ludwig et al., 2004).

In Zusammenarbeit mit Dr. Weihofen und Prof. Saenger wurde die Kristallstruktur des hDPPIV/CD26-bADA-Komplexes bei einer Auflösung von 3,0 Å aufgeklärt (Weihofen et al., 2004). Die Kristallstruktur des Komplexes von hDPPIV/CD26 und bADA ähnelt einem Schmetterling und zeigt, dass zwei Moleküle bADA mit jeweils einer β -Propellerdomäne der homodimeren hDPPIV/CD26 verknüpft sind. Zusätzlich bindet sich hDPPIV/CD26 an die α -Helix des bADA-Moleküls. Die Bindungsstelle liegt zwischen Blatt IV und Blatt V jeder β -Propellerdomäne von hDPPIV/CD26, so dass die beiden Öffnungen der hDPPIV/CD26 für den Eintritt von Substraten offen sind. Die Aufnahme des durch ADA gebildeten Adenosins wird somit nicht gestört. Es konnte zusätzlich bestätigt werden, dass der direkte Kontakt zwischen 14 (hDPPIV/CD26) und 13 (bADA) Aminosäuren die Bindung ermöglicht, auch ist die *N*-Glykanseitenkette an Position Asn229 von hDPPIV/CD26 an der Bindung zu bADA beteiligt (Weihofen et al., 2004).

Die Cryo-TEM-Struktur zeigt die räumliche Zuordnung und die Bindungsstellen von beiden Enzymen. Die Kristallstruktur liefert detaillierte Informationen über die Wechselwirkung zwischen einzelnen Atomen beider Moleküle. Die Cryo-TEM- und Kristallstrukturen zeigen, dass sich die Konformationen sowohl von hDPPIV/CD26 als auch von bADA nach der Bindung nicht ändern. Dies stimmt mit den biochemischen Analysen überein, die keine Veränderung der Enzymaktivität zeigten. Die Bindungsstelle der DPPIV/CD26 an ADA ist

ähnlich wie die Bindungsstelle der DPPIV/CD26 an einem weiteren Molekül DPPIV/CD26 (im Tetramer) (Engel et al., 2003). Wir vermuten, dass sich durch die Konkurrenz um die Bindungsstelle zwischen DPPIV/CD26 und ADA, die Zell-Zell-Adhäsion und Lymphozyten-Aktivierung gegenseitig beeinflussen können.

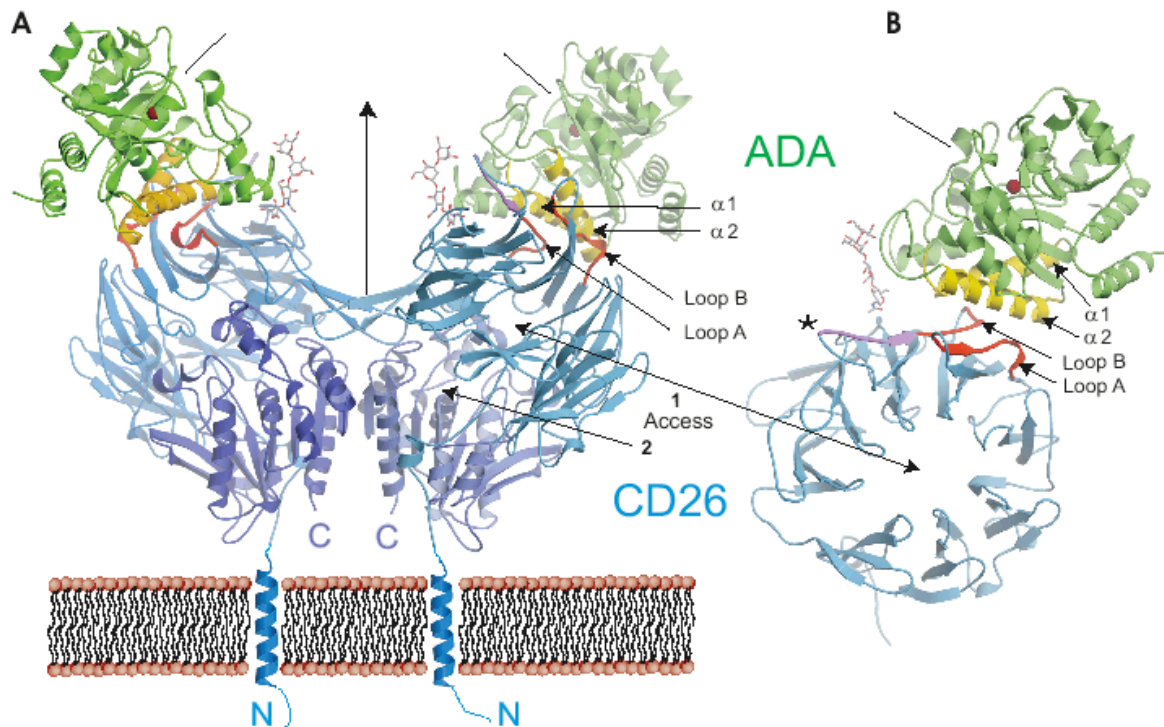


Abbildung 5: Die Kristallstruktur des hDPPIV/CD26-bADA-Komplexes

A. Vertikale Darstellung der Kristallstruktur des hDPPIV/CD26-bADA-Komplexes

Die α/β Hydrolase der hDPPIV/CD26 ist in violett, die β -Propellerdomäne der hDPPIV/CD26 ist in blau, die bADA ist in grün dargestellt. Die Oligosaccharide an der Asn229 der hDPPIV/CD26 wird als Zweig gezeigt. Das Sternchen zeigt die Asn281-Position der hDPPIV/CD26. Der Pfeil 1 (Access 1) zeigt die Öffnung an der β -Propellerdomäne, während der Pfeil 2 (Access 2) die seitliche Öffnung angibt. An der Bindungsstelle wird die Schleife A und B (Loop A und B) der hDPPIV/CD26 in rot und α -Helices, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, der bADA in gelb dargestellt.

B. Horizontale Darstellung der Kristallstruktur des hDPPIV/CD26-bADA-Komplexes

Die Aufklärung der Kristallstruktur der DPPIV/CD26 hat die Ermittlung des Katalyse-Mechanismus der DPPIV/CD26 ermöglicht. Nach der Auffindung der zweiten Öffnung des Enzyms ist nun zu klären, durch welche der beiden Öffnungen die Substrate in das aktive Zentrum gelangen. Synthetische Peptide, deren Sequenzen dem N-Terminus des HIV-1-TAT-Proteins nachempfunden wurden, hemmen die Enzymaktivität von DPPIV/CD26. Durch Ko-Kristallisation der DPPIV/CD26 mit diesem Peptid und anschließende Röntgen-

kristallographische Untersuchung sind wir in der Zwischenzeit der Beantwortung dieser Frage näher gekommen. Des Weiteren kann man durch Ko-Kristallisierung der DPPIV/CD26 mit geschickt ausgewählten Peptiden Informationen über den Reaktionsablauf sowie Reaktionszwischenstufen erhalten, die einen detaillierten Einblick in die Mechanismen der Reaktion erlauben. Außerdem fungiert DPPIV/CD26 bei mehreren biologischen Prozessen durch Wechselwirkung mit anderen Membrankomponenten, wie z. B. CD45, Kollagen I, gp120 (HIV-Hüllprotein) und TAT (HIV1-Transaktivierungsprotein). Um die funktionellen Mechanismen der DPPIV/CD26 zu ermitteln, sollen die Wechselwirkungen der DPPIV/CD26 mit diesen Proteinen auf struktureller, biochemischer und immunologischer Ebene weiter untersucht werden.