

4 Zusammenfassung

Um die molekularen Grundlagen der Struktur und Funktionen von DPPIV/CD26 aufzuklären, wurde zu Beginn dieser Arbeit die bislang nicht vollständig geklärte Primärstruktur der DPPIV/CD26 durch cDNA-Klonierung und Sequenzierung ermittelt. Dies ermöglicht es, die funktionellen Domänen und biochemischen Eigenschaften des Proteins durch Mutagenese *in vitro* gezielt zu untersuchen. Das katalytische Zentrum wurde zuerst anhand von CHO-Transfektanten charakterisiert. Es ist im C-Terminus der extrazellulären Domäne des Proteins lokalisiert und wird durch die drei Aminosäuren Ser631, Asp709 und His741 gebildet, die sogenannte katalytische Triade der Ratten-Dipeptidylpeptidase IV. Das katalytische Zentrum ist nicht als selbständige Domäne aufzufassen, sondern hängt von der korrekten Expression der Domänen in der Nachbarschaft des Reaktionszentrums im extrazellulären Teil der DPPIV/CD26 ab. Wir haben gefunden, dass die DPPIV/CD26 nach ihrer Expression auf der Zelloberfläche eine weitere Translokation (Recycling) in Endosomen durchführt, wobei die *N*-Glykanseitenketten der DPPIV/CD26 weiter modifiziert (Reprocessing) werden. An diesem Modell-Glykoprotein konnte die Rolle der *N*-Glykosylierung für die Proteinfaltung erhärtet werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die *N*-Glykane der DPPIV/CD26 an der Adhäsion auf Kollagen in wesentlichem Maße beteiligt sind. Außerdem wurde die Funktion der 12 Cysteinreste der DPPIV/CD26 bei der Ausbildung der funktionellen Konformation, besonders durch die Bildung von Disulfidbrücken, aufgeklärt.

Im Laufe jahrzehntelanger Forschung wurde DPPIV/CD26 als multifunktionelles Membranglykoprotein betrachtet. Um die Frage zu beantworten, wie die einzelnen Funktionen des Moleküls miteinander verknüpft sind, wurden die Beteiligung der DPPIV/CD26 an der Zelladhäsion und die DPPIV/CD26-vermittelte T-Zell-Aktivierung jeweils mittels CHO- bzw. Jurkat-Transfektanten untersucht. Die initiale Adhäsion der DPPIV/CD26⁺-CHO-Zellen an Kollagen I ist gegenüber nicht-transfizierten CHO-Zellen deutlich gesteigert. Die Enzymaktivität der DPPIV/CD26 ist offenbar nicht für ihre Adhäsion auf dem Kollagen I und auch nicht für ihre kostimulatorische Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung notwendig. Bei der DPPIV/CD26-vermittelten T-Zell-Aktivierung ist die Adenosindesaminase (ADA) nicht an der Stimulation der IL-2-Sekretion beteiligt, während die Wechselwirkung zwischen den Kollagenen und DPPIV/CD26 die DPPIV/CD26-vermittelten zellulären Signale beeinflusst. Wir haben erstmals in Jurkat-Zellen nachgewiesen, dass die DPPIV/CD26-vermittelte IL-2-Ausschüttung stark von adhärierendem

Kollagen Typ I (> 80%) blockiert wird, während sie schwächer vom Kollagen Typ XIV (52%), Typ II (38%), Typ VI (32%) und Typ III (20%) inhibiert werden kann.

Weiterhin wurde die biologische Funktion der DPPIV/CD26 *in vivo* mittels DPPIV/CD26-Knock-out-Mäusen untersucht (in Zusammenarbeit mit Prof. D. Marguet, Marseille-Luminy). Obwohl die DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse keinen auffälligen Phänotyp zeigen, hat die Ausschaltung des DPPIV/CD26-Gens jedoch einen Einfluss auf die Entwicklung, Reifung und Migration von CD4⁺-, NK- und CD4⁺-NKT-Zellen. Nach der Stimulation der Mäuse mit PWM (pokeweed mitogen) wurde die Wirkung der DPPIV/CD26 auf die Cytokin-Sekretion und die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion deutlich. Am ausgeprägtesten war die auf das 2,5- bis 3,4-Fache verminderte Sekretion von IL-4 in den Lymphozyten der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse. Im Gegensatz zu den IgM wurde nach der Immunisierung mit PWM die Produktion von IgG bzw. von IgG1 und IgG2, sowie von IgE bei DPPIV/CD26-Knock-out-Mäusen stark verringert. Die Rolle der DPPIV/CD26 bei Krankheiten, wie z. B. Infektionskrankheiten (Tuberkulose), allergische Krankheiten (Asthma) und Autoimmunerkrankungen (EAE: Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis), wurde und wird in Tiermodellen untersucht. Nach der Immunisierung und anschließenden Aerosolaufnahme des Ovalbumins wurde eine ausgeprägte Eosinophilie und gesteigerte Entzündung in den Atemwegen der DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse beobachtet. Der Einfluss der DPPIV/CD26 auf Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen wird in nächster Zukunft ermittelt.

Schließlich gelang uns kürzlich die Aufklärung der 3D-Struktur der Ratten-DPPIV/CD26 mittels Cryo-Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (Cryo-TEM) und der 3D-Struktur und Kristallstruktur des Komplexes aus humaner DPPIV/CD26 (hDPPIV/CD26) und Adenosindesaminase des Rindes (bADA) (in Zusammenarbeiten mit Dr. Böttcher und Dr. Ludwig bzw. Dr. Weihofen und Prof. Saenger). Grundlage für diese Arbeiten war die Etablierung einer Methode zur Herstellung von mg-Mengen reiner DPPIV/CD26. Die Ratten-DPPIV/CD26 zeigt eine homodimere Organisation. Zwei Monomere liegen zueinander in einer ungewöhnlich verkippten Anordnung vor. Besonders hervorzuheben ist der Nachweis einer zweiten seitlichen Öffnung in der DPPIV/CD26, die mit der ersten Öffnung im Bereich der β -Propellerdomäne durch einen das Monomer durchziehenden Kanal verbunden ist. Bei dem hDPPIV/CD26-bADA-Komplex bindet sich die bADA an den äußeren Kanten zwischen Blatt IV und Blatt V der β -Propellerdomäne der hDPPIV/CD26, während hDPPIV/CD26 sich an die α -Helix des bADA-Moleküls bindet. Ein direkter Kontakt zwischen 14 Aminosäuren

aus hDPPIV/CD26 und 13 Aminosäuren aus bADA ermöglicht die Bindung beider Proteine. Zusätzlich ist die *N*-Glykaseitenkette an Position Asn229 von hDPPIV/CD26 an der Bindung zu bADA beteiligt. Nach der Bindung sind die Konformationen beider Proteine nicht verändert; der Eintritt der Substrate ist nicht beeinflusst. Die Aufklärung der 3D-Struktur und Kristallstruktur der DPPIV/CD26 und des DPPIV/CD26-ADA-Komplexes erlaubt es uns, den katalytischen Mechanismus, die Wechselwirkung der DPPIV/CD26 mit ADA und möglicherweise anderen Proteinen, sowie funktionelle Mechanismen dieses multifunktionellen Membranglykoproteins besser zu verstehen.