

1. Einleitung

1.1 Dipeptidylpeptidase IV

1.1.1 Vorkommen

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV/CD26) ist eine Serinprotease mit der katalytischen Triade Serin, Asparagin und Histidin (48, 140). Sie spaltet Dipeptide vom N-terminalen Ende anderer Proteine, sofern es sich bei der vorletzten Aminosäure um Prolin oder Alanin handelt (144). Ihre Bezeichnung in der Klasse der Exopeptidasen ist EC 3.4.14.5 oder nach der Merops-Klassifikation S09.003 (176). Eine Endopeptidaseaktivität in Form einer Gelatinaseaktivität im selben aktiven Zentrum wird kontrovers diskutiert (15, 17, 80, 117). Ghersi et al. (2002) propagieren einen FAP α -DPPIV/CD26-Komplex mit der Fähigkeit zur Gelatinbindung und Gelatinaseaktivität (76). Die DPPIV/CD26 wurde sowohl aus Eukaryonten (16, 128) einschließlich Hefen (58, 208), als auch Bakterien (122, 207) isoliert. Erstmals wurde die DPPIV/CD26 im Jahr 1966 als Glycyl-prolyl-naphthylamidase beschrieben (99). Die DPPIV/CD26 wird ubiquitär in mammalischen Geweben als integrales Membranprotein exprimiert (16, 128), als auch auf Lymphozyten (8, 147), im Serum (60, 61, 104, 162) und anderen Körperflüssigkeiten wie Sperma (184) gefunden. Die Sequenzierung hat ergeben, daß die DPPIV/CD26 dem humanen Lymphozyten-Antigen CD26 entspricht (47, 195, 200).

1.1.2 Struktur

Die Primärstruktur der Ratten-DPPIV/CD26 wurde 1989 von Ogata et al. (96, 162) bestätigt, wonach das Protein aus einer Sequenz von 767 Aminosäuren besteht. Die komplette cDNA der humanen DPPIV/CD26 isoliert von T-Lymphozyten wurde 1992 publiziert und weist eine Sequenz von 766 Aminosäuren auf (47). Nach Tanaka et al. 1992 zeigt die cDNA der humanen DPPIV/CD26 eine 85 %ige Homologie zur Ratten-cDNA (195). Die Primärstruktur der Maus-DPPIV/CD26 ist zu 85 % identisch zur Human-DPPIV/CD26 und 92 % zur Ratten-DPPIV/CD26 (140). Die Verankerung in der Doppellipidschicht besteht aus einem hydrophoben Segment aus 22 Aminosäuren am N-terminalen Ende als Fortsetzung eines zytoplasmatisch gelegenen sechs Aminosäuren langen Anteils (97, 98, 162, 195). Extrazellulär

hängt das Protein an einem flexiblen Stiel und besteht aus einer hoch glykosylierten Region, einer Cystein-reichen Region und C-terminal aus der funktionellen katalytischen Domäne. Daher handelt es sich bei der DPPIV/CD26 um ein Typ II integrales, membranäres Protein (Abbildung 1.1 A). Die N-Glykosylierung beziehungsweise die Zuckerseitenketten sind wichtig für die Stabilität des Moleküls (Fan et al. 1997, (63)). Die zahlreichen Cysteinreste haben Bedeutung für die Bildung der Disulfidbrücken, sowie für die funktionelle Konformation (Dobers et al. 2000, (55)). Bei der löslichen Serum-DPPIV/CD26 der Ratte fehlt das 35 Aminosäuren lange N-terminale Fragment, welches bei der transmembranären Ratten-DPPIV/CD26 als Signalpeptid zur Translokation und Verankerung in die Mikrosomenmembran dient (98, 162). Bei Ratte und Mensch unterscheidet sich weder der funktionelle extrazelluläre Teil der mDPPIV/CD26 noch die Enzymaktivität von der sDPPIV/CD26 (162, 175).

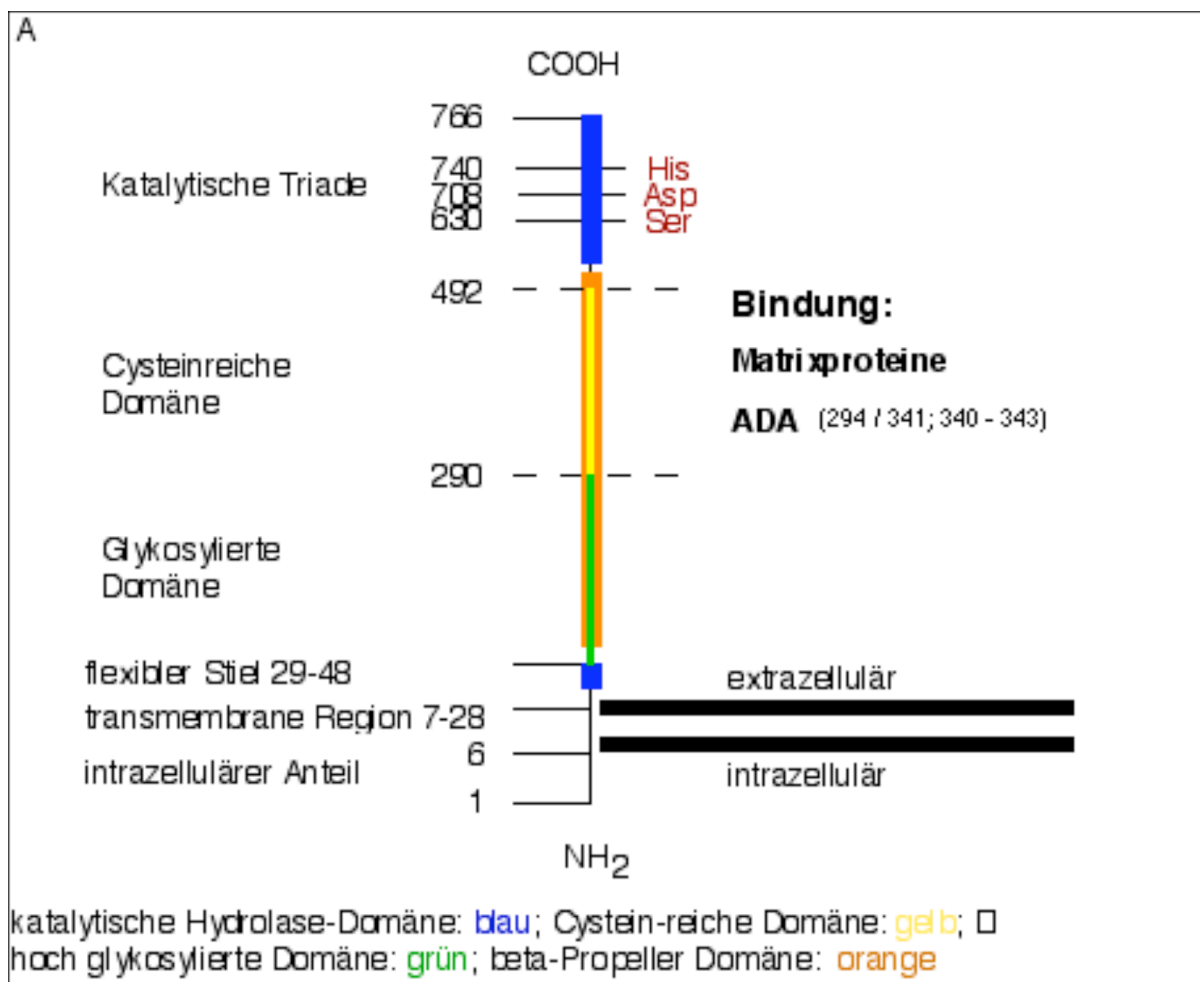
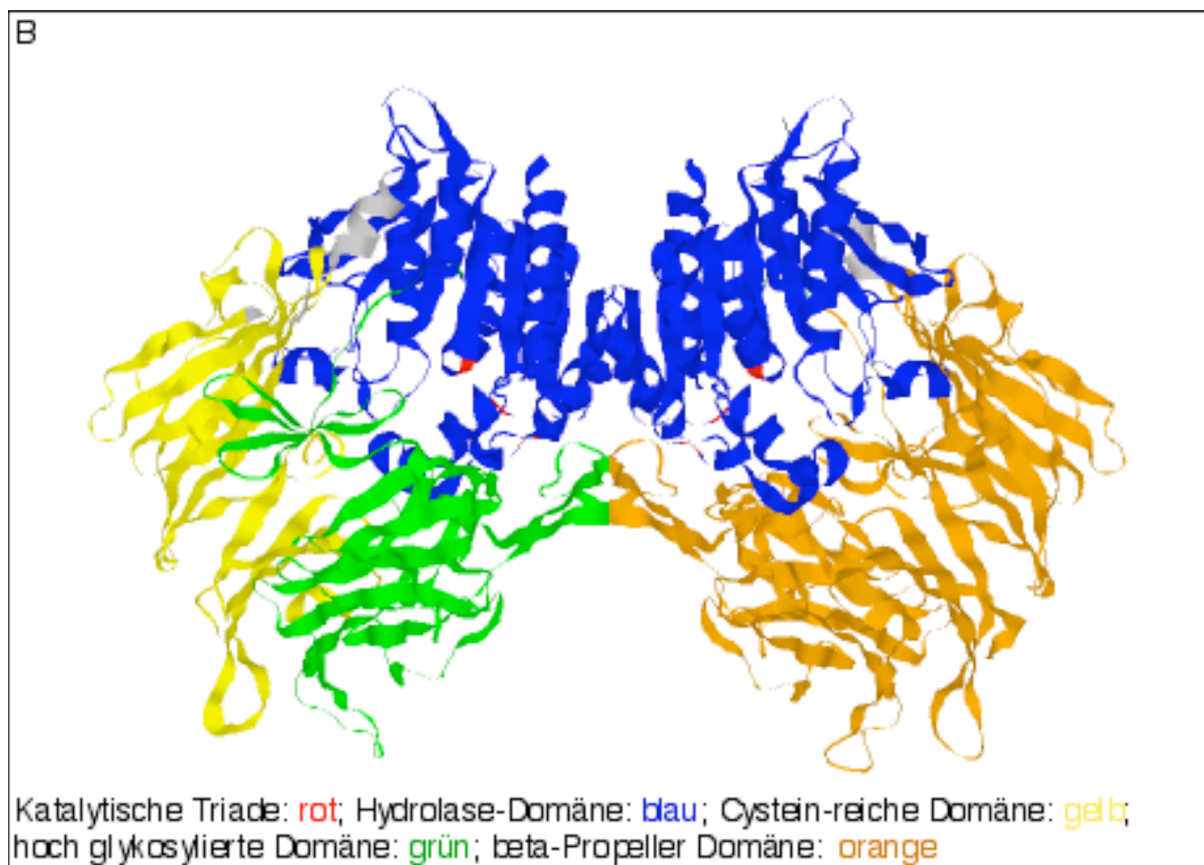


Abbildung 1.1: Schematische Primärstruktur und Quartärstruktur der humanen DPPIV/CD26

In Bild **A** ist schematisch die Primärstruktur der humanen DPPIV/CD26 dargestellt (50, 130). Bild **B** zeigt die von Rasmussen et al. (2003) beschriebene Quartärstruktur löslicher Human-DPPIV/CD26 (175). Es sind die α/β -Hydrolase-Domäne der Positionen 39-51 und 506-766: blau, katalytische Triade: rot, die acht-blättrige β -Propeller Domäne der Positionen 55-497: orange, die Cystein-reiche Region: gelb und die hoch-glykosylierte Region: grün dargestellt.



Die Kristallstruktur der Human-DPPIV/CD26 konnte von Rasmussen et al. (2003) vorgestellt werden (175) (Abbildung 1.1 B). Demnach liegt die DPPIV/CD26 sowohl als aktives Enzym, als auch in kristalliner Form, als ein Homodimer vor (80). Ein einzelnes DPPIV/CD26-Monomer besteht aus zwei Domänen, einer α/β -Hydrolase-Domäne 39-51, 506-766 und einer acht-blättrigen β -Propeller-Domäne 55-497. Die katalytische Triade befindet sich innerhalb der α/β -Hydrolase-Domäne, während die Cystein-reiche Domäne und die überwiegenden Glykosylierungen in der β -Propeller-Domäne zu finden sind (Abbildung 1.1). Zwischen den

beiden Domänen befindet sich eine Höhle von 30-45 Å. Es gibt zwei unterschiedliche Öffnungen, die größere seitlich zwischen der β -Propeller und Hydrolase-Domäne, sowie durch einen Tunnel innerhalb der β -Propeller-Domänen nahe der Bindungsstelle zum zweiten Monomer. Die Öffnungen bieten Zugang zum katalytischen Zentrum innerhalb der Höhle. In früheren Studien hat man die DPPIV/CD26 mit der homologen, strukturverwandten Prolyloligopeptidase (POP) verglichen, da deren dreidimensionale Struktur vorher bekannt wurde (3, 22, 72, 179). Rasmussen et al. (160, 175) beschreiben strukturelle Unterschiede, welche Einfluß auf die Regulation der Enzymaktivität nehmen. Aufgrund von räumlichen Beziehungen innerhalb der Höhle ist es vermutlich nur gestreckten, entfalteten Peptiden möglich das aktive Zentrum zu erreichen, weshalb die meisten natürlichen Substrate weniger als 80 Aminosäuren besitzen oder aber ein entfaltetes N-terminales Ende aufweisen. Einen weiteren Regulationsmechanismus bieten Glu 205 und Glu 206, welche Teil der Andockstelle sind, bevor das Substrat gespalten wird (2, 175). Ein ausgestreckter Arm aus der β -Propeller Domäne nimmt neben weiteren Sequenzen, 658-661, 713-736, 746-757, an der Stabilisierung des Dimers teil. Dieser ist jedoch in unmittelbarer Nähe zur zentralen Öffnung zum aktiven Zentrum lokalisiert und stellt zusammen mit einem weiteren Faltblatt einen möglichen Verschluss-/Öffnungsmechanismus dar. Bei der DPPIV/CD26 ist noch nicht geklärt, welcher der beiden Zugänge das Substrat bevorzugt. Bei der POP ist das aktive Zentrum nur über eine zentral gelegene Tunnelöffnung mit einem untypischen β -Propeller für das Substrat erreichbar (72). Die 3D-Struktur der Ratten-DPPIV/CD26, nach cryo-TEM-Analyse, zeigt keinen wesentlichen Unterschied zu den Strukturanalysen der humanen DPPIV/CD26 (138).

1.1.3 Biologische Funktionen der DPPIV/CD26

Die DPPIV/CD26 spaltet aufgrund ihrer Peptidylpeptidaseaktivität verschiedene bioaktive Substrate (130). Pharmazeutische Relevanz findet die Inhibition der DPPIV/CD26 in der Behandlung von Diabetes mellitus infolge Verbesserung der Glukosetoleranz und des geringeren Risikos einer Hypoglykämie (156). Reimer et al. (2002) bestätigen die Wirkung bei normalen und glukoseintoleranten Mäusen (177). Neben ihrer katalytischen Exopeptidaseaktivität besitzt die DPPIV/CD26 verschiedene Liganden, deren Bindung an der Außenseite des Moleküls teilweise beschrieben wird (50). Dazu zählt die Bindung zu Matrixproteinen wie Fibronectin und Kollagen (15, 85, 86, 137, 171). Die DPPIV/CD26 wird

auf T-Lymphozyten exprimiert und zeigt eine Überexpression nach Aktivierung (130, 195, 196). Wechselwirkungen der DPPIV/CD26 mit der Adenosin-Desaminase (26, 50, 57, 65, 66) und die Bindung zu CD45 (106, 150, 198) nehmen Einfluß auf die Aktivierung von T-Lymphozyten. Welche Rolle DPPIV/CD26 beim Eindringen des HIV in CD4⁺-Lymphozyten spielt wird noch untersucht (83, 91, 149). Expressionsveränderungen der DPPIV/CD26 werden mit hämatologischen (54, 55) als auch epithelialen Neoplasien (202, 211) in Verbindung gebracht. Analog werden Veränderungen der Tumorinvasion mit der DPPIV/CD26 assoziiert (78, 115, 170). Aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungen und ubiquitären Lokalisation entspricht die DPPIV/CD26 einem multifunktionalem Protein, dessen Funktion folgend näher beschrieben wird.

1.1.4 Exopeptidase-Aktivität und Substrate

Die DPPIV/CD26 spaltet aufgrund ihrer spezifischen Exopeptidaseaktivität nicht nur Proteine am N-terminalen Ende (117, 144), sondern die Exopeptidase zeigt auch eine unterschiedliche Spaltungsgeschwindigkeit. Wird Prolin N-terminal an vorletzter Position durch Alanin ersetzt, so verringert sich die Spaltungsgeschwindigkeit des Exopeptidasezentrums. Analog erfolgt eine weitere Verringerung der Spaltungsgeschwindigkeit mit Serin, Glycin, Leucin und Valin an vorletzter Position (21, 141). Aufgrund der großen Spezifität der DPPIV/CD26 gibt es eine Reihe potentieller bioaktiver Substrate. Zu den Substraten zählen Peptidhormone, Neuropeptide, Chemokine, Cytokine und weitere bioaktive Substanzen (9, 130).

In vivo Substrate aus der Familie der Peptidhormone sind GIP (Glucose-Dependent-Insulinotropic-Polypeptide), GLP-1 und GLP-2 (Glucagon-Like-Peptides) (134, 144). Weiterhin werden *in vivo* die Neuropeptide Y, YY (143, 144, 145) nach deren Sekretion und Substanz P während ihrer Zirkulation im Blut gespalten (5, 92, 160). Die Neuropeptide VIP (vasoaktives intestinales Peptid), PACAP (pituitary adenylyl cyclase-activating peptide), GRP (gastrin-releasing peptide) (66), β -Casomorphin (121, 126) und Endomorphin-2 (185) stellen weitere mögliche Substrate der DPPIV/CD26 dar. Neben einer Reihe von Chemokinen (131, 144) wird das Chemokin RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) *in vivo* in seiner Funktion durch die DPPIV/CD26 moduliert (164).

1.1.5 Rolle der DPPIV/CD26 in Adipositas und Diabetes mellitus

Verschiedene Autoren propagieren eine indirekte Rolle der Dipeptidylpeptidase IV (CD26) in der Regulation des Insulinspiegels (Glukosetoleranzstörungen, Diabetes mellitus) und in der Entstehung von Übergewicht (37).

Die Peptidhormone GIP (Glucose-Dependent-Insulinotropic-Polypeptide) und GLP-1 (Glucagon-Like-Peptide-1) werden nach Nahrungsaufnahme sezerniert und erhöhen die Sekretion von Insulin (6). Zirkulierende DPPIV/CD26 führt zu einer schnellen Inaktivierung dieser Hormone. Pala et al. (2003) konnten eine erhöhte Expression der DPPIV/CD26, sezerniert aus Endothelzellen, nach gesteigerter Glukosezufuhr nachweisen (134). Die Hemmung der DPPIV/CD26-Exopeptidaseaktivität der GIP- und GLP-1-Spaltung führt indirekt zu einer verbesserten Glukosetoleranz. Die pharmakologischen Möglichkeiten in der Therapie von Glukosetoleranzstörungen und Diabetes mellitus Typ II werden noch untersucht (49, 156, 169, 177, 213).

Leptin-defiziente, adipöse Mäuse zeigen bei Kiely et al. (2003) veränderte intestinale metabolische Enzymaktivitäten. So wurde in Leptin-Mangel-Mäusen eine verstärkte Sucrase-Aktivität im Ileum, welche die Absorption von Kohlenhydraten fördert, nachgewiesen. Diese zeigen jedoch eine geringere ApN- (Aminopeptidase N) und DPPIV/CD26-Aktivität im Jejunum, sodaß von einer geringeren Proteinabsorption ausgegangen wird. Kiely vermutet, daß die erhöhte Kohlenhydratabsorption auch verantwortlich für die Entstehung von Adipositas und Diabetes mellitus in Leptin-Mangel-Mäusen ist (119).

1.1.6 DPPIV/CD26 als Rezeptor der Adenosin-Desaminase (ADA)

ADA katalysiert die irreversible Desamination von Adenosin, sowie 2'-Deoxyadenosin zu Inosin und 2'-Deoxyinosin. Ein hereditärer Mangel des Enzyms geht mit einem schweren humoralen und zellulären Immundefekt einher (10, 93).

Human-DPPIV/CD26 ist in der Lage die Adenosin-Desaminase (ADA) (51, 116, 152) sowohl als Monomer, als auch als Dimer (39) zu binden. Die Bindung hat keinen Einfluß auf die Enzymaktivität beider Proteine (51, 56). ADA ist Bindungspartner der DPPIV/CD26 des Menschen, von Rindern und Kaninchen, jedoch nicht bei Ratten, Mäusen oder Meerschweinchen (54, 107, 183). Das Fehlen der DPPIV/CD26-ADA-Bindung bei Nagetieren könnte mit der bei

Nagern vorkommende ADA mit einem kleineren Molekulargewicht zusammen hängen (54). Postulierte ADA-Bindungsstellen auf der humanen DPPIV/CD26 sind nach Dong et al. (1997) Leu 340-Arg 343 mittels Punktmutation (57), sowie nach Abbott et al. und Gorrell et al. (1999/ 2000) Leu 294/Val 341 mittels Punktmutation und Leu 340-Arg 343/Thr 440-Lys 441 mittels monoklonaler Antikörper (3, 79, 80) festgestellt worden. Aufgrund von Strukturuntersuchungen des Human-DPPIV/CD26-ADA-Komplexes konnten Ludwig et al. (2003, persönliche Mitteilung) nachweisen, daß im Gegensatz zu Leu 294/Val 341 die Bindungsstellen Thr 440/Lys 441 nicht an der ADA-Bindung beteiligt sind. Es wird angenommen, dass die Interaktion zwischen ADA und DPPIV/CD26 (26, 50) zu einem indirekten ko-stimulatorischen Signal für T-Lymphozyten führt, da das antiproliferativ wirkende Adenosin-Substrat durch ADA inaktiviert wird (71).

1.1.7 DPPIV/CD26 als Zelladhäsionsmolekül auf extrazellulärer Matrix (ECM)

Die DPPIV/CD26 ist durch ihre Fähigkeit, an Komponenten der ECM zu binden, ein Zelladhäsionsmolekül, lokalisiert auf Zellen und im Plasma (15, 32, 86, 137, 171). Es wurde kontrovers diskutiert, ob DPPIV/CD26 als ein funktioneller Rezeptor für Kollagen zur Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten dient (43, 64, 142, 186). Dang et al. (1990) propagierten, daß die Aktivierung von CD4⁺-Zellen durch Kollagen vermittelt wird und DPPIV/CD26 als Kollagen-Bindungspartner an dieser Interaktion unterstützend beteiligt ist (43). Fan et al. (2003) konnten jedoch nachweisen, daß die Interaktion verschiedener Kollagentypen mit DPPIV/CD26 die T-Zell-Aktivierung hemmt (64).

Die Ausbreitung von Hepatozyten auf nativem Kollagen kann durch Anti-DPPIV/CD26-Antikörper verhindert werden. Währenddessen hat die Bindung keinen Einfluss auf die DPPIV/CD26-Enzymaktivität (85). Piazza et al. (1989) behaupten eine direkte Interaktion der Ratten-DPPIV/CD26 mit Fibronectin und gehen von einer Bindungsstelle außerhalb des aktiven Zentrums aus (171). Löster et al. (1995) propagieren eine DPPIV/CD26-Bindung zu Kollagen, jedoch nicht zu Laminin und Fibronectin (137). Er bestätigt eine Bindung der DPPIV/CD26 zu Kollagen, welche nicht über das aktive Zentrum vermittelt wird, sondern in der Cystein-reichen Domäne der DPPIV/CD26 lokalisiert ist. Die Kollagen-Bindung erfolgt zwischen den Positionen 236 und 491 der DPPIV/CD26. Darüberhinaus beschreibt er unterschiedliche Affinitäten der DPPIV/Kollagen-Bindung, am besten zu Kollagen I und III, etwas schwächer zu Kollagen II, IV und V, schwache Bindung zu Kollagen VI.

Cheng et al. (1998) propagieren eine klinische Relevanz der DPPIV/CD26 auf Lungenkapillarendothelien als Zelladhäsionsmolekül für metastatische Brustkrebszellen (31). Nach Applikation löslicher DPPIV/CD26 wird eine Verringerung der Adhäsion von Ratten-Brustkrebszellen an endotheliale-DPPIV/CD26 in der Lunge um bis zu 80 % beschrieben (4, 31), sodaß ein DPPIV/CD26-Fibronectin-Mechanismus für die Tumorzelladhäsion und Lungenmetastasierung vermutet wird (31, 32, 33, 120).

Auch andere Autoren unterstützen die Annahme, dass DPPIV/CD26 als Zelladhäsionsmolekül von zirkulierenden, metastasierenden Tumorzellen erkannt wird (111).

Eine weitere mögliche klinische Rolle der DPPIV/CD26 als Zelladhäsionsmolekül und Immunmodulator wird in Osteoarthritis-Patienten vermutet (133).

1.1.8 Rolle der DPPIV/CD26 in Malignomen

Verschiedene Autoren propagieren eine positive Korrelation der DPPIV/CD26-Expression in einer Reihe epithelialer Tumorzellpopulationen mit dem Grad der phänotypischen Differenzierung. Dagegen fand sich in undifferenzierten Tumoren eine niedrige DPPIV/CD26-Expression beziehungsweise der totale Verlust der DPPIV/CD26 (47, 87, 115, 152). Es ist bekannt, daß Melanozyten DPPIV/CD26 *in vitro* und *in vivo* exprimieren (101). Während der malignen Transformation von Melanozyten in Melanomzellen geht die Fähigkeit der Zellen DPPIV/CD26 zu exprimieren verloren. Gleichzeitig nimmt die Abhängigkeit von Wachstumshormonen ab (7, 101, 152, 202). In Melanom-Metastasen ist keine DPPIV/CD26-Expression mehr nachweisbar (202). Das Gen der humanen DPPIV/CD26 ist auf Chromosom 2q 24.3 lokalisiert. Zudem weisen 35 % der Melanome eine Deletion auf Chromosom 2 auf (1, 46, 69).

Kajiyma et al. (2002) demonstrierten, daß Ovarialzellkarzinome mit einer höheren DPPIV/CD26-Expression weniger invasiv sind. Er beobachtete nach DPPIV/CD26-Re-Expression die morphologischen Veränderungen von einem fibroblastischen, undifferenzierten Phenotyp hin zu einem epithelialen Phenotyp (114, 115). Weiterhin resultierte aufgrund der DPPIV/CD26-Reexpression ein geringeres Migrations- und Invasionsverhalten. Im Tierexperiment zeigte sich beim Ovarialkarzinom nach DPPIV/CD26-Transfektion eine geringere peritoneale Dissemination und eine längere Überlebenszeit (115). Die Expression von

E-Cadherin und β -Catenin standen in positiver Korrelation zur DPPIV/CD26-Überexpression in selbigen Ovarialkarzinomen (114). Im Gegensatz zu normalen endometrialen Drüsenzellen fanden Khin et al. (2003) eine mit dem Malignitätsgrad abnehmende Expression der DPPIV/CD26 in endometrialen Adenokarzinomzellen (118). Weiterhin wurde DPPIV/CD26 in Zellen des Gastrointestinaltraktes als ein Marker der Differenzierung beschrieben (38, 47, 218). Man vermutet, daß DPPIV/CD26 eine Rolle in der Regulation der neoplastischen Transformation, Progression und Proteolyse bioaktiver Substrate spielt.

Eine Reihe weiterer Malignome geht mit Veränderungen der DPPIV/CD26-Expression einher. Dazu zählt das humane hepatozelluläre Karzinom (124, 190), welches durch eine quantitativ und qualitativ gestörte DPPIV/CD26-Expression gekennzeichnet ist. Hanski et al. beschrieben schon 1989 die im Vergleich zu Hepatozyten fehlende DPPIV/CD26-Expression in Morris-Hepatoma-Zellen (87). In papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen zeigte sich dagegen eine Korrelation der DPPIV/CD26-Expression mit dem Grad der Malignität (125, 219). In der Brustdrüse wurden von Atherton et al. (1992) eine DPPIV/CD26-Expression in interlobulären Fibroblasten und in gutartigen Firoadenomen gefunden (12). Im Pankreas konnten Grodin et al. (1999) DPPIV/CD26 in sekretorischen Granula der A-Zellen DPPIV/CD26 nachweisen (82).

1.1.9 DPPIV/CD26-Expression in T-Zell Malignomen

Die DPPIV/CD26-Expression ist auf besonders aggressiven T-Zell-Neoplasien wie lymphoblastisches Lymphom (LBL), akute lymphatische Leukämie (ALL), anaplastisches, großzelliges Lymphom (ACL) beschränkt und geht mit einer schlechteren Prognose einher (30, 180, 205). In einem *in vitro* - und *in vivo* -Maus-Modell wurden mit einem monoklonalen Anti-CD26-Antikörper Antitumor-Effekte im Wachstum eines anaplastischen, großzelligen T-Zell-Lymphoms erreicht (94). Hinter dem Mechanismus der hämatologischen Entartung wird das Zusammenwirken des DPPIV/CD26-ADA-Komplexes vermutet (94, 205). In einem Phase II-Versuch wurde der Effekt von Pentostatin, ein ADA-Inhibitor mit bekannter antineoplastischer Wirkung, auf T-Zell-Neoplasien (rezidivierendes T-non-Hodgkin Lymphom, T-NHL), in Relation zu DPPIV/CD26-Expression des Tumors untersucht (41, 205). Die lymphopenischen Nebenwirkungen des Pentostatin auf gesunde CD26+ Lymphozyten führten jedoch zu signifikanten Komplikationen (41).

Aytac et al. (2001) propagierten eine erhöhte Sensitivität lymphatischer Jurkat-Zellen auf Doxorubicin mit Apoptose nach exogen zugeführter, löslicher DPPIV/CD26 (13), sowie eine

erhöhte Aktivität von Etoposid auf DPPIV/CD26-überexprimierende Jurkat-Zellen (14). Es ist bekannt, dass eine erhöhte Expression der Topoisomerase II α mit einer besseren Medikamenten-Ansprechbarkeit einhergeht (139). Interessanterweise korreliert die DPPIV/CD26-Überexpression in Jurkat-Zellen mit der Expression der Topoisomerase II α (14). Obwohl DPPIV/CD26 als ein potentieller diagnostischer Marker gehandelt wird, weiterhin in DPPIV/CD26 eine wichtige Rolle in der Behandlung verschiedener Malignome vermutet wird, findet sich noch keine Veröffentlichung einer erfolgreichen, klinischen Anwendung in der Tumorthherapie.

1.1.10 DPPIV/CD26 im Immunsystem

Schon 1984 beschreiben Fox et al. die DPPIV/CD26 als nützlichen Marker der T-Zell-Aktivierung (70). Verschiedene Autoren propagieren eine Rolle der DPPIV/CD26 in der Antigen-induzierten Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten, NK-Zellen und B-Zellen (42, 43, 45, 68, 108, 113, 150, 154). Die DPPIV/CD26-Expression auf humanen T-Zellen erscheint erst spät während der Differenzierung im Thymus (150). DPPIV/CD26 wird überwiegend auf aktivierten $CD4^+$ (56% der $CD4^+$) und $CD8^+$ (35% der $CD8^+$) T-Lymphozyten aus der peripheren Blutbahn exprimiert, findet sich jedoch nur schwach auf ruhenden T-Zellen (42, 45, 70, 151, 154). Eine besonders hohe Expression der CD26 wird auf den Th1/Th0-Subpopulationen gefunden. Th2-Lymphozyten zeigen dagegen eine niedrige CD26-Expression (214).

Weiterhin beschreiben Dang et al. (1991) eine überwiegende DPPIV/CD26-Expression auf $CD3^+$ Zellen (44). Crosslinking-Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen CD26 und CD3 beweisen eine direkte ko-stimulatorische Funktion der DPPIV/CD26 (45, 89, 197). Anti-CD26 führt nicht nur zu einer Modulation der Oberflächenexpression der DPPIV/CD26, sondern führt auch, vermittelt über den Aktivierungsweg TCR/CD3, zu einer erhöhten Proliferation humaner T-Zellen und einer gesteigerten Interleukin-2-Sekretion (44, 89, 198). Es ist bewiesen, daß die alleinige Stimulation der CD26 bzw. der ζ -Kette zur Interleukin-2-Sekretion nicht ausreichen (209), sondern der Aktivierungsweg TCR/CD3 eines DPPIV/CD26 vermittelten ko-stimulatorischen Signals bedarf (67, 75, 146, 209). Die Zytotoxizität von NK-Zellen bleibt durch DPPIV/CD26 unbeeinflusst (27).

Die Notwendigkeit einer DPPIV/CD26-Peptidaseaktivität zur Aktivierung von T-Lymphozyten wurde kontrovers diskutiert (68, 90, 113, 192, 196, 197). Kähne et al. konnten

nach Hemmung der DPPIV/CD26-Peptidaseaktivität gleichzeitig die PMA-stimulierte Induktion der T-Zellen inhibieren (112, 113). Tanaka et al. (1993) publizieren, daß die DPPIV/CD26-Proteaseaktivität nicht ausschließlich für die ko-stimulatorische Wirkung der DPPIV/CD26 in der T-Zell-Aktivierung verantwortlich ist. Während die DPPIV/CD26-negative Kontrolle keinen Effekt zeigte, wurde jedoch in enzymatisch inaktiven Mutant-DPPIV/CD26-Jurkat-Zellen eine geringere Aktivität als in Wildtyp-DPPIV/CD26-Jurkat-Zellen beobachtet (197). Bei Steeg et al. (1995) ließ sich in enzymatisch inaktiven DPPIV/CD26-Mutanten dennoch keine T-Zell-Aktivierung bestätigen (192). Fan et al. 2003 konnten jedoch nachweisen, daß der ko-stimulatorische Effekt auf die IL-2- Sekretion der T-Zellen nicht von der Enzymaktivität abhängt (64).

Anhand von Ergebnissen mit DPPIV/CD26-knock-out-Mäusen konnten Yan et al. (2003) nachweisen, dass es mit Verlust der DPPIV/CD26 zu einer eingeschränkten Entwicklung und Reifung der CD4-T-Zellen und CD4-NK-T-Zellen mit einer eingeschränkten Immunantwort auf PWM (pokeweed mitogen) kommt (64, 217). Nach PWM-Immunisierung der DPPIV/CD26-knock-out-Mäuse wurden im Vergleich zu DPPIV/CD26-positiven Tieren geringere IgG- und IgE-Konzentrationen im Blut gemessen. Die Produktion der Zytokine IL-4, IL-2 war erniedrigt, während IFN- γ verzögert anstieg (217).

Der ko-stimulatorische Aktivierungsmechanismus der DPPIV/CD26 ist nicht eindeutig geklärt. In der Regulation des Immunsystems werden nach extrazellulärer Stimulation der DPPIV/CD26 Interaktionen der intrazytoplasmatischen Domäne mit DPPIV/CD26-assoziierten Strukturen vermutet (150, 198). Als Antwort auf die Antigenstimulation ist die Phosphorylierung der DPPIV/CD26 selbst, aufgrund der Aminosäuresequenz der intrazytoplasmatischen Domäne mit 6 Aminosäuren, ausgeschlossen (23).

Hegen et al. (1997) weisen in Antikörper-induzierten cross-linking Studien der DPPIV/CD26 die Thyrosinphosphorylierung einiger intrazellulärer Proteine, p59 fyn, ZAP-70, MAP-Kinase, c-Cb1 und Phospholipase C- γ , nach.

Torimoto et al. (1991) assoziieren CD45 RO, eine membrangebundene Tyrosinphosphatase, mit DPPIV/CD26 auf humanen T-Zellen (198). Zu den Substraten der CD45-PTPase gehört die Tyrosinkinase p56 lck (155, 166, 167). Es wird eine Beteiligung der p56 lck an der Phosphorylierung der TCR- ζ -Kette vermutet (204). Torimoto et al. (1991) gehen davon aus, daß die Wechselwirkungen zwischen DPPIV/CD26 und CD45 RO zu einer erhöhten

Phosphorylierung der Proteinkinase p56 lck, sowie der TCR- ζ -Kette, zwei wichtigen Komponenten der T-Zell-Aktivierung, führen (198).

Einen indirekten Mechanismus in der Regulation der Immunantwort vermuten Dong et al. (1997) in der Ko-Expression der Adenosindesaminase mit DPPIV/CD26 (57). Diese führt zu einer Aufhebung der inhibitorischen und antiproliferativen Wirkung des Adenosins, sodaß es zur T-Zell-Proliferation, sowie IL-2-Sekretion kommt (57, 108).

Die erhöhte Anzahl CD26⁺ T-Zellen im entzündeten Gewebe beziehungsweise in der peripheren Blutbahn bei multipler Sklerose, Basedow-Krankheit (Graves`disease) und rheumatoider Arthritis läßt eine wichtige Rolle im Rahmen chronischer Entzündungen vermuten (62, 84, 159). Eine Beteiligung des CD26-ADA-Adenosin-Mechanismus wird mit dem Effekt der exagierten Immunaktivierung in Verbindung gebracht (150).

Zu den natürlichen Substraten der DPPIV/CD26 mit immunologischer Funktion gehört RANTES. Nach spezifischer Dipeptidspaltung durch DPPIV/CD26 verändert sich dessen Rezeptorspezifität nur für bestimmte Chemokinrezeptoren. Daher vermutet man in der DPPIV/CD26 vermittelten Proteolyse einen integrierten Mechanismus für die Regulation der Spezifität von RANTES auf die Zielzelle (164). Zu den bekannten *in vitro* Substraten der DPPIV/CD26 gehören die Zytokine, IL-1 β , IL-2, TNF- β und IL-6 (95).

1.1.11 DPPIV/CD26 in der HIV-Infektion

Der wichtigste Rezeptor in der HIV-Infektion von T-Lymphozyten ist CD4 (91, 123). CD4⁺-Lymphozyten in HIV-1 infizierten Patienten zeigen nicht nur einen intrinsischen Defekt in der Fähigkeit, Antigene zu erkennen, sondern es kommt auch zu einem Abfall der CD4⁺-Zellen (24). Verschiedene Autoren konnten in HIV-positiven Individuen eine abnehmende Expression der CD26⁺ -Zellen, abhängig vom Krankheitsstadium, nachweisen (20, 24, 53, 81, 203). Weiterhin ist die Expression der DPPIV/CD26 überwiegend auf CD45 RO⁺-T-Zellen beschränkt (203). Die plasmatische sDPPIV/CD26-Enzymaktivität bleibt während der HIV-Infektion dennoch unverändert (100, 203).

DPPIV/CD26 wurde von Callebaut et al. (1993) als ein Kofaktor für das Eindringen des HIV in CD4⁺-Zellen vorgeschlagen (29). Die Blockierung der DPPIV/CD26 mit Antikörpern führte zu einer 64 % geringeren Infektionsrate (29, 110).

Dennoch wurden die Chemokin-Rezeptoren CCR5 (35, 52, 215) und CXCR4 (161, 174) als ursächliche Ko-Rezeptoren für das Eindringen des HIV-1 in die Zelle identifiziert. An diesem Mechanismus wird außerdem die Beteiligung des viralen Hüllproteins gp120 beschrieben (35). Der CCR5-Rezeptor wird sowohl auf CD4⁺-, als auch CD8⁺-Lymphozyten exprimiert und korreliert mit der DPPIV/CD26-Expression auf CD45 RO⁺-T-Zellen (215). Das virale Hüllprotein gp120 führt zusammen mit SDF-1 α (stromal-cell-derived factor-1 α) zur Ausbildung von Pseudopodien auf CD4⁺-Zellen (91, 109). Darüberhinaus ist gp120 in der Lage, DPPIV/CD26 im Komplex mit CXCR4 auf CD4⁺-Zellen zu binden (91). Zusätzlich wird durch gp120 die DPPIV/CD26-ADA-Bindung gehemmt (19, 91, 201). Der DPPIV/CD26-CXCR4-Komplex bildet eine funktionelle Einheit, in welcher DPPIV/CD26 die chemotaktische und antivirale Potenz des Chemokins SDF-1 α (stromal-cell-derived factor-1 α , Ligand von CXCR4) zu moduliert (91, 163, 174). Die DPPIV/CD26-Konzentration, ähnlich aktivierten T-Zellen, führt in CD4⁺/CXCR4⁺-Zellen zu einer erhöhten HIV-Infektion mit Apoptose der Zellen, während eine besonders hohe und niedrige DPPIV/CD26-Konzentration zu einer niedrigeren Apoptoserate führt (28, 165). Die Blockierung der Chemokin-Rezeptoren durch Bindung einiger Chemokine wirkt dagegen protektiv gegen die HIV-1 Infektion (74). So führt die Prozessierung durch DPPIV/CD26 zu einer verbesserten antiviralen Aktivität von RANTES, einem Chemokin des CCR5-Rezeptors, gegenüber HIV-1-infizierten CD4⁺-Zellen (36, 59, 173, 182). Ein weiteres Chemokin ist LD78 β , welches nach DPPIV/CD26 Prozessierung entsteht und eine noch größere antivirale Potenz aufweist (193).

DPPIV/CD26 beeinträchtigt die inflammatorische und hämatopoietische Potenz verschiedener Chemokine und spielt dabei eine wechselseitige Rolle in der HIV-Infektion (174).

Die Interaktion und Hemmung der DPPIV/CD26 durch das HIV-1-Tat-Protein, ein Transaktivator viraler Proteine mit immunsuppressiver Wirkung, wird kontrovers diskutiert (83, 103, 206). Smith et al. (1998) konnten zeigen, daß die Hemmung der DPPIV/CD26 durch Tat 1 von der Sialylierung der DPPIV/CD26 abhängt (187).

1.2 Induzierbares Tet-On Gen - Expressionssystem (Clontech)

Das Tetrazyklin-abhängige Tet-On Expressionssystem reguliert dosisabhängig die reversible Expression eines Zielproteins. Das System besteht aus dem Regulationsplasmid pTet-On und dem Antwortplasmid pTRE2.

Ein auf pTet-On gelegener Promotor des Zytomegalievirus P_{CMV} führt zu einer konstanten Expression des regulatorischen Transaktivatorproteins (rtTA, mit den Domänen VP16 und rtetR). Das Plasmid pTRE2 beinhaltet neben der Sequenz des Zielproteins ein Tet-Responsive-Element (TRE), welches oberhalb eines ruhenden Promotors des Zytomegalievirus (P_{minCMV}) gelegen ist. Die Anwesenheit von Doxycyclin führt zu einer Bindung der rtetR-Domäne des Transaktivatorproteins rtTA mit dem Tetrazyklin-Responsive-Element (TRE) und zu einer Aktivierung des Promotors (P_{minCMV}) mit anschließender Transkription der Zielsequenz. Sobald Doxycyclin wieder aus dem Medium entfernt wird, schaltet die Transkription der Zielsequenz ab.

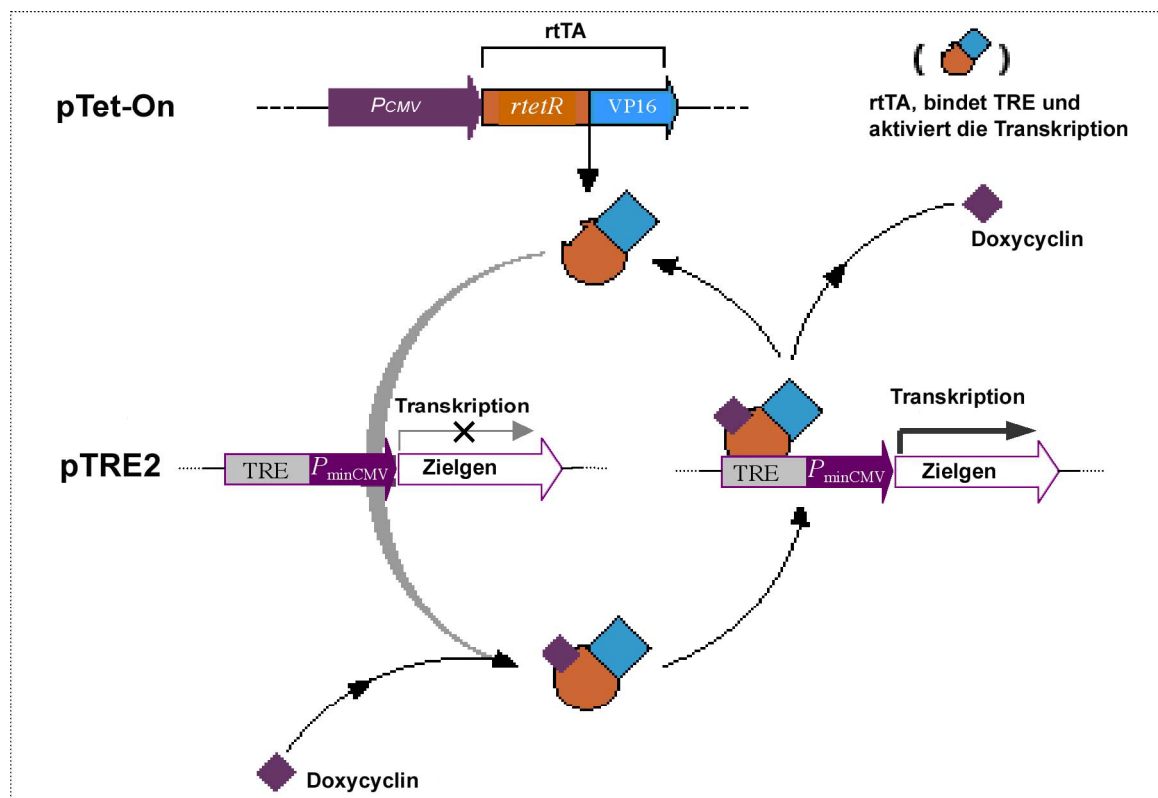


Abbildung 1.2: Darstellung der Regulation des Tet-On-Gen-Expressionssystems

Die Induktion mit Doxycyclin führt über das regulatorische Transaktivatorprotein rtTA des Regulationsvektors Tet-On zu einer Aktivierung des Tet-responsive-Element TRE des Antwortvektors pTRE2 mit Transkription des Zielgens und Expression des Zielproteins.