

Aus dem
Institut für Molekularbiologie und Biochemie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. Werner Reutter
Universitätsklinikum Benjamin Franklin

**Nachweis und Charakterisierung der
Endopeptidase-Aktivität der
Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Felix BERPPOHL
aus München

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Reutter**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Körber**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität

Promoviert am 13. September 2002

Zusammenfassung

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV, CD 26) ist ein dimeres Typ II-Membranprotein, das in zahlreichen Geweben und Zellen von Säugetieren vorkommt. Innerhalb des Clans SC der nicht-klassischen Serinpeptidasen wird die DPP IV der Prolyl-Oligopeptidase-Familie (S9) zugerechnet. Sie weist eine gut charakterisierte Exopeptidase-Aktivität mit bevorzugter Spaltung hinter Prolin und Alanin auf. Ob die DPP IV darüber hinaus auch eine Endopeptidase-Aktivität besitzt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Zunächst wurde aktive DPP IV in einem dreistufigen Reinigungsverfahren, das als letzten Schritt eine Immunaffinitätschromatographie enthielt, isoliert. Das gereinigte Enzym wurde sowohl in einem Zymographie-Assay als auch in einem löslichen proteolytischen Assay zum Nachweis der spezifischen Endopeptidase-Aktivität der DPP IV eingesetzt. Dabei konnten die denaturierten fibrillären Kollagene der Typen I, II, III und V als Substrate der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität identifiziert werden. Pro min wurden durch 1 mg der eingesetzten DPP IV-Präparation ungefähr $7,0 \times 10^{-6}$ μmol der Typ I-Kollagen-Alpha-Ketten abgebaut, womit die Spaltungsrate als relativ niedrig zu bewerten ist. Denaturiertes Basalmembran-Kollagen (Typ IV) wurde deutlich langsamer hydrolysiert, während natives Kollagen, Albumin, Fibronectin und DPP IV selbst nicht verdaut wurden. Die höchste DPP IV-Endopeptidase-Aktivität wurde im physiologischen pH-Bereich bei 37°C beobachtet. Spaltprodukte wurden im Immunblot als relativ zahlreiche und diffuse Zwischenbanden sichtbar, so dass die DPP IV offenbar die Ketten des denaturierten Kollagens an zahlreichen Stellen spaltet. Bei Einsatz verschiedener Peptidase-Inhibitoren im löslichen proteolytischen Assay ergab sich für die Exo- und die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV ein weitgehend übereinstimmendes Inhibitionsprofil, was auf ein gemeinsames katalytisches Zentrum schließen lässt. In immunhistochemischen Untersuchungen mit Anti-Kollagen I-Antikörpern wurden bei DPP IV-negativen Fischer 344-Ratten im Disse'schen Raum der Leber vermehrt faserartige Strukturen nachgewiesen, bei denen es sich wahrscheinlich um retikuläre Fasern handelt, deren Abbau offenbar infolge der fehlenden DPP IV-Expression gestört ist. Als mögliche biologische Funktionen der hier erstmals gezeigten DPP IV-Endopeptidase-Aktivität kommen eine Beteiligung am Kollagenkatabolismus, an Zelladhäsionsprozessen, an der Translokation von Zellen sowie an der Resorption von prolinhaltigen Peptiden in Frage.

Abstract

Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV, CD26) is a homodimeric type II membrane protein that is found on the cell surface of many solid tissues and different subtypes of lymphocytes in mammals. DPP IV is a member of the prolyl oligopeptidase family (S9) within the clan SC of non-classical serine peptidases. DPP IV is known to exhibit a well characterized exopeptidase activity specific for proline residues. This doctoral thesis describes a novel, specific endopeptidase activity of DPP IV. The enzyme was isolated in a three step purification procedure that included concanavalin A chromatography and immunoaffinity chromatography. The purified DPP IV was submitted to both a gelatin zymography assay and a soluble proteolytic assay in order to demonstrate and investigate its endopeptidase activity. Substrate specificity was detected for denatured fibrillar collagens (types I, II, III and V). Denatured basement membrane collagen type IV was also cleaved, but at a lower rate, whereas native collagens, albumin, fibronectin and the enzyme itself were not digested by DPP IV at all. 1 mg DPP IV was found to degrade 7×10^{-6} μmol of denatured type I collagen per min under optimal conditions of 37°C at pH 7.4. Cleavage products were detected on immunoblots as multiple peptide bands in a stepladder pattern, suggesting that DPP IV recognises multiple cleavage sites within the collagen chains. Endo- and exopeptidase activities of DPP IV showed the same peptidase inhibitor profile, including similar inhibition by DFP, PMSF and diprotin A and B, which suggests that both activities of DPP IV reside in a single active site. Immunohistochemical studies using anti-collagen-pAb revealed an accumulation of fibrillar collagen structures in the space of Disse of DPP IV-deficient Fischer-344-rats, indicating a disturbed collagen metabolism in these animals. The biological relevance of DPP IV endopeptidase activity should be seen in context with other collagenases and gelatinases, as well as with DPP IV exopeptidase activity. Therefore, DPP IV might participate in processes such as final collagen degradation, cellular adhesion to collagens, cellular translocation through the ECM and resorption of proline containing peptides.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADA	Adenosindesaminase
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. Bidest.	Bidestilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin)
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Con A	Concanavalin A
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
E.C.	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FAP	Fibroblast-Activation-Protein alpha
GIP	Glucose-abhängiges insulinotropes Polypeptid bzw. Gastrisches inhibitorisches Polypeptid
GLP	Glucagon-like-peptide
GRH	Growth hormone-releasing hormone (= Somatoliberin)
HPLC	High performance liquid chromatography
IP	Interferon-gamma-inducible protein
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MCP	Monocyte chemotactic protein
MDC	Macrophage-derived chemokine
MMP	Matrix-Metallopeptidasen
MNA	4-Methoxy-2-Naphthylamid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
NEM	N-Ethylmaleimid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POP	Prolyl-Oligopeptidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDF	Stromal cell-derived factor
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TPCK	Tosyl-L-phenylalanin-chlormethylketon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Reutter, der mich als Chef wissenschaftlich und menschlich beeindruckt hat. Mit der Themenstellung hat er einen guten Forscherinstinkt bewiesen. Für die Bereitstellung optimaler Rahmenbedingungen, die anregenden Diskussionen und die vielfältige anderweitige Förderung bin ich ihm dankbar.

Besonderen Dank schulde ich meinem Betreuer Herrn Dr. Oliver Baum. Er lehrte mich wissenschaftliches Denken und Arbeiten, lenkte meinen Blick immer wieder auf das Wesentliche und steuerte wertvolle Ideen bei. Selbst nachts um zwei Uhr war er bereit und in der Lage, Schlüsselfragen der Arbeit zu beantworten.

Herrn Dr. Klemens Löster danke ich für die Co-Betreuung zu Beginn der Experimente. Von ihm lernte ich Sorgfalt und Beharrlichkeit bei der Laborarbeit.

Herr Werner Hofmann hat mir zahlreiche proteinbiochemische Arbeitstechniken beigebracht. Ich danke ihm, dass er all die Tricks und Kniffe, die er sich im Laufe der Jahre angeeignet hat, bereitwillig an uns Junge weitergegeben hat.

Herrn Prof. Dr. Reinhart Gossrau danke ich für fruchtbare Diskussionen sowie die Unterstützung bei der Durchführung der histochemischen Experimente im Institut für Anatomie.

Ich möchte mich namentlich noch bei Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schuppan für das Anti-Prokollagen III-Kaninchenserum, Herrn Prof. Dr. H. J. Merker für das Anti-Kollagen I-Kaninchenserum, Herrn Dr. C. Weise für die N-terminale Sequenzierung des 60 kD-Fragments, Frau H. Richter für die Unterstützung bei den histochemischen Experimenten und Herrn T. Junek sowie Herrn P. de Souza für phototechnische Hilfen bedanken. Frau G. und Herrn U. Stenneke danke ich für das gründliche Korrekturlesen, Herrn K. Ostermann für seine kompetente Hilfe im EDV-Bereich.

Viele Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Molekularbiologie und Biochemie haben durch Diskussionen, Anregungen, Hilfestellungen und eine gute Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herzlich danken möchte ich meiner Frau, die mir in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit liebevoll zur Seite stand.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern, welche die Entstehung dieser Arbeit mit großem Interesse und Zuspruch verfolgt haben. Ihnen widme ich diese Arbeit.

INHALT

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	6
1.1 Die proteolytischen Enzyme	6
1.2 Aufbau, Vorkommen und Funktion der DPP IV	9
1.2.1 Die Struktur der DPP IV.....	9
1.2.2 Die Gewebeverteilung der DPP IV.....	10
1.2.3 Die Exopeptidase-Aktivität der DPP IV.....	12
1.2.4 Die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV.....	15
1.3 Die Großfamilie der Kollagene	16
1.3.1 Das Bauprinzip der Kollagene.....	16
1.3.2 Die Kollagentypen.....	17
1.3.3 Der Kollagenkatabolismus.....	19
1.4 Zielsetzung	21
2 VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Versuchstiere	22
2.2 Material	22
2.2.1 Geräte.....	22
2.2.2 Chemikalien und Verbrauchswaren.....	23
2.2.3 Antikörper.....	23
2.2.4 Puffer.....	23
2.3 Methoden	23
2.3.1 Proteinchemische Methoden.....	23
2.3.1.1 Allgemeine proteinbiochemische Verfahren.....	23
2.3.1.1.1 Proteinbestimmung.....	23
2.3.1.1.2 Bestimmung der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität.....	24
2.3.1.2 Verfahren zur Isolierung von Membranfraktionen.....	24
2.3.1.2.1 Gewinnung von Rohmembranen aus Nierenrinden.....	24
2.3.1.2.2 Solubilisierung von Membranproteinen.....	24
2.3.1.3 Chromatographische Verfahren.....	25
2.3.1.3.1 Dünnschichtchromatographie.....	25
2.3.1.3.2 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose.....	25
2.3.1.3.3 Immunaффinitätschromatographie an mAk 13.4-Sepharose.....	26
2.3.1.3.3.1 Kopplung des mAk 13.4 an Protein G-Sepharose.....	26
2.3.1.3.3.2 Immunaффinitätschromatographie an mAk 13.4-Sepharose.....	27
2.3.1.4 Elektrophoretische Verfahren.....	28
2.3.1.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.3.1.4.2 Western-Blotting.....	29
2.3.1.5 Färbungen von PAGE-Gelen.....	30
2.3.1.5.1 Coomassie-Blue G-250.....	30
2.3.1.5.2 Silberfärbung.....	30

2.3.1.6 Nachweisverfahren auf Blot-Matrices	31
2.3.1.6.1 Ponceau-Rot	31
2.3.1.6.2 Substratfärbung zum Nachweis aktiver DPP IV	31
2.3.1.6.3 Immunblot	32
2.3.1.7 Enzymatische Verdauungen	33
2.3.1.7.1 Gelatin-Zymographie	33
2.3.1.7.2 Löslicher proteolytischer Assay	34
2.3.2 Histochemische Methoden	35
2.3.2.1 Kryostatschnittherstellung	35
2.3.2.2 DPP IV-Aktivitätshistochemie	36
2.3.2.3 Kollagen-Immunhistochemie mit polyklonalen Primärantikörpern	36
3 ERGEBNISSE	37
3.1 Reinigung und Charakterisierung von DPP IV aus der Nierenrinde	37
3.1.1 Reinigung von aktiver DPP IV	37
3.1.2 Darstellung von DPP IV-Formen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
3.1.3 N-terminale Sequenzierung des 60 kD-Proteins	41
3.2 Etablierung zweier Assays zur Untersuchung gelatinolytisch aktiver Peptidasen	42
3.2.1 Gelatin-Zymographie	42
3.2.1.1 Herstellung von Gelatingelen	42
3.2.1.2 Gelatin-Zymographie mit <i>Clostridium histolyticum</i> -Kollagenase	43
3.2.2 Löslicher proteolytischer Assay mit <i>Clostridium histolyticum</i> -Kollagenase	44
3.2.2.1 Einfluss der Kollagenasemenge auf die Kollagenspaltung	45
3.2.2.2 Nachweis von niedermolekularen Spaltprodukten durch Dünnschichtchromatographie	45
3.2.2.3 Nachweis von höhermolekularen Spaltprodukten bei niedrigeren Inkubationstemperaturen	47
3.2.2.4 Zeitabhängigkeit der Kollagenspaltung	48
3.2.2.5 Verschiedene Substrate im löslichen proteolytischen Assay	49
3.2.2.6 Einsatz von Inhibitoren im löslichen proteolytischen Assay	49
3.2.2.7 Densitometrische Quantifizierung von Kollagenbanden	50
3.3 Nachweis der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität durch Gelatin-Zymographie	51
3.3.1 Einsatz der DPP IV-Präparation in den Zymographie-Assay	51
3.3.2 Einfluss von Elektrophoresebedingungen und Waschvorgang auf die Gelatinzymographie mit DPP IV	53
3.3.3 Einfluss von DPP IV-Menge und Inkubationsdauer auf die Gelatinolyse	54
3.4 Charakterisierung der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität mit Hilfe des löslichen proteolytischen Assays	55
3.4.1 Einfluss der EDTA-Konzentration auf den löslichen proteolytischen Assay	55
3.4.2 Einfluss des pH auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität	56
3.4.3 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität	57
3.4.4 Nachweis von Spaltprodukten durch Immunblotting	58
3.4.5 Untersuchungen zur Substrat-Spezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität	59
3.4.5.1 Natives Albumin, Fibronectin und Kollagen im löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV	59

3.4.5.2 Die Spaltung denaturierten Kollagens der Typen I-V im Vergleich	59
3.4.6 Einfluss von Inhibitoren auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität	61
3.4.6.1 Diprotin A und B	61
3.4.6.2 Aspartat-, Cystein-, Metallo- und Serinpeptidase-Inhibitoren	62
3.5 Untersuchungen zum DPP IV-Defizit deutscher Fischer-344-Ratten	64
3.5.1 Die DPP IV-Expression in Wistar- und Fischer-Ratten	64
3.5.1.1 Analyse der Con A-Eluate des Nierenrinden-Rohmembran-Solubilisats	64
3.5.1.2 Enzymhistochemie	65
3.5.2 Immunhistochemie	65
4 DISKUSSION.....	68
4.1 Die Spaltung von denaturiertem Kollagen durch DPP IV als Beweis der Endopeptidase-Aktivität.....	68
4.2 Ausschluss einer Kontamination	69
4.3 Die Spaltungsrate der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität	71
4.4 Die Spaltprodukte der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität.....	72
4.5 Die Spaltstellenspezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität.....	73
4.6 Die Substratspezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität	74
4.7 Das katalytische Zentrum der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität.....	76
4.8 Die Kollagenbindungsdomäne der DPP IV	77
4.9 Mögliche biologische Funktionen der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität	78
4.9.1 Beteiligung am Kollagenkatabolismus	78
4.9.2 Beteiligung an Zelladhäsionsprozessen.....	79
4.9.3 Beteiligung an der Translokation von Zellen.....	80
4.9.4 Beteiligung an der Resorption von prolinhaltigen Peptiden.....	82
4.9.5 Funktion in Leber, Speicheldrüsen, Pankreasgang und Prostata	83
4.10 Die DPP IV im Kontext anderer proteolytischer Enzyme.....	84
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	88