

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung und Charakterisierung von DPP IV aus der Nierenrinde von Wistar-Ratten

3.1.1 Reinigung von aktiver DPP IV

Für die Untersuchung einer möglichen Endopeptidase-Aktivität musste DPP IV zunächst unter nativen, die enzymatische Aktivität erhaltenden Bedingungen isoliert werden. Um einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erzielen, wurde ein sequenzielles Reinigungsverfahren (siehe Tab. 1) gewählt, das als letzten Schritt die Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers (mAk) 13.4 enthielt. Als Ausgangsmaterial wurde Nierenrinde gewählt, welche die höchste DPP IV-Konzentration aller Gewebe im Organismus aufweist.

Tabelle 1: Reinigung von DPP IV aus einer Rattenniere. Die Proteinbestimmung erfolgte mit der BCA-Methode. Die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität wurde mit dem Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-Assay bestimmt.

Reinigungs-schritt	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-aktivität (Units)	Ausbeute aktiver DPP IV (%)	Spezifische Aktivität (mU/mg)	Anreich. bez. spez. Akt. (-fach)
Homogenat	1170	333,6	100	285	1
Rohmembranen	729	257,0	77	353	1,2
Rohmembran-Solubilisat	555	219,8	66	396	1,4
Con A-Eluat	35,6	162,4	49	4556	16,0
Immunaffi-Eluat	0,56	25,5	7,6	45365	160

Zu Beginn der Reinigung wurden Nierenrinden homogenisiert und bei 20000 min^{-1} zentrifugiert. Die Überstände (lösliche, zumeist zytosolische Proteine) wurden verworfen, während die Pellets (Rohmembranfraktion) in Solubilisationspuffer (10 ml/l Triton X 100) aufgenommen wurden, mit dem sich die integralen Membranproteine intakt aus den Membranen herauslösen lassen. Nach erneuter Zentrifugation (20000 min^{-1}) befanden sich die solubilisierten Proteine im Überstand. Das Solubilisat wurde nun der Affinitätschromatographie über Concanavalin A-Sepharose unterzogen, wodurch Proteine mit mannosereichen Kohlenhydratketten, u. a. DPP IV, angereichert werden. Im letzten Reinigungsschritt wurde das Con A-Eluat durch Immunaффinitätschromatographie an mAk 13.4-Sepharose gereinigt. Die Immunaffi-Elutionsfraktionen wurden im Anschluss an die Elution sofort umgepuffert, um (weitere) pH-bedingte Aktivitätsverluste zu verhindern.

Bei pH > 10,5 büßt die DPP IV zunehmend an Aktivität ein, während eine komplette Elution von Immunaффinitätssäulen erst bei pH 11,5 zu erreichen ist. Daher wurde für die Elution ein Gradient von pH 10,5 nach pH 11,5 gewählt. Wie aus Abb. 1 (SDS-PAGE ausgewählter Elutionsfraktionen unter nicht-denaturierenden Bedingungen) ersichtlich ist, wurde bei pH 10,5 hauptsächlich ein 160 kD-Protein eluiert, während mit steigendem pH zunehmend ein 105 kD-Protein auftauchte, bis schließlich in den letzten Fraktionen (pH 11,5) nur noch dieses 105 kD-Protein zu finden war. Offenbar stellt die 160 kD-Bande die aktive Form des DPP IV-Monomers dar, während die denaturierte und somit inaktive Form des DPP IV-Monomers als 105 kD-Bande erscheint.

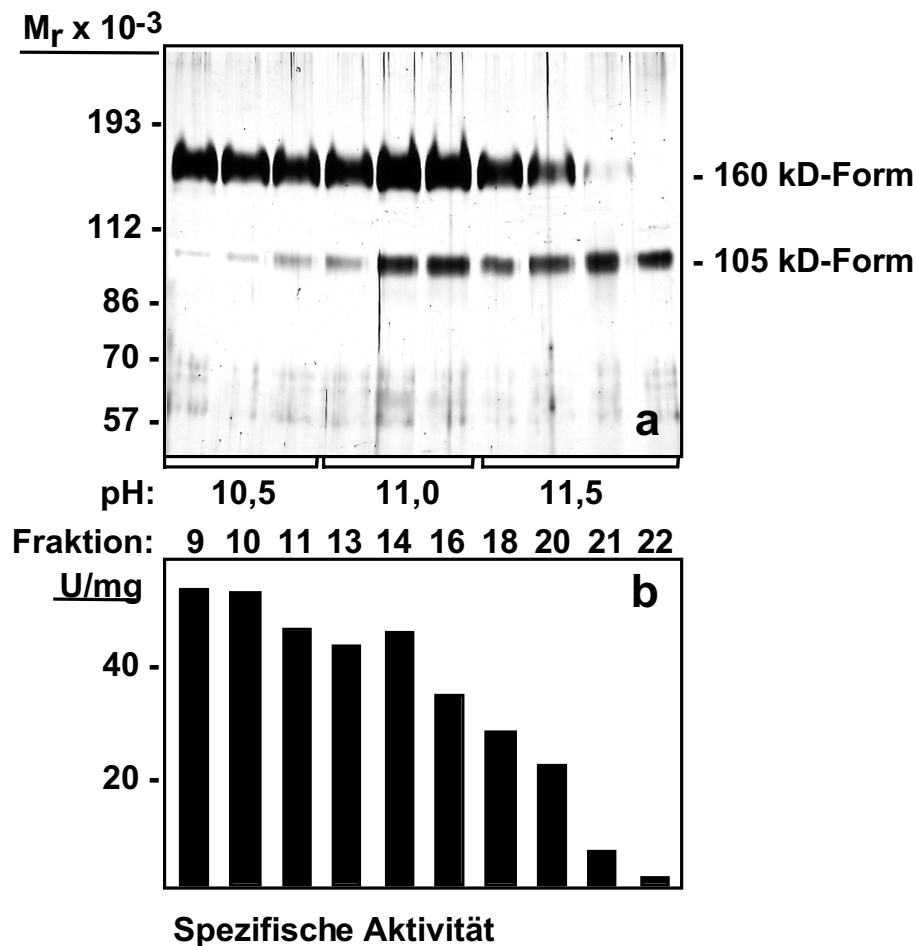


Abb. 1: Elution der mAK 13.4-Immunaффinitätschromatographiesäule unter einem pH-Gradienten (pH 10,5 - pH 11,5).

a) Ausgewählte Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE (7,5 %; reduzierende, nicht-denaturierende Bedingungen) aufgetrennt und anschließend silbergefärbt.

b) Spezifische Aktivität der Fraktionen in U/mg. Die Werte wurden mit Hilfe des Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-Assays und der BCA-Methode zur Proteinbestimmung ermittelt.

Tab. 1 fasst die Reinigung von DPP IV aus Rattenniere zusammen. Das Reinigungsverfahren erbrachte eine Ausbeute aktiver DPP IV von 7,6 % bei einer spezifischen Aktivität der gereinigten DPP IV von 45,4 U/mg. Der Anreicherungsfaktor bezüglich der spezifischen Enzymaktivität betrug 160.

Durch SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen (mit anschließender Silberfärbung) wurde der Grad der Reinigung kontrolliert (Abb. 2). Aufgetragen wurden je 50 µg Homogenat, Rohmembranen, Rohmembransolubilisat und Con A-Eluat sowie 10 µg Immunaffi-Eluat, so dass sich der Reinigungsprozess in den Bahnen des Gels von links nach rechts nach-vollziehen lässt. Wie bei denaturierenden Elektrophoresebedingungen zu erwarten ist, erscheint die DPP IV-Probe im Gel als 105 kD-Bande (inaktive Form). Die in Tab. 1 berichtete Zunahme der spezifischen Enzymaktivität stimmte mit der Zunahme des 105 kD-Proteins gegenüber dem Gesamtprotein im Gel überein. Zusätzlich zum 105 kD-Protein wurde im Immunaffi-Eluat ein 60 kD-Protein angereichert. Weitere Proteinbanden wurden nicht sichtbar.

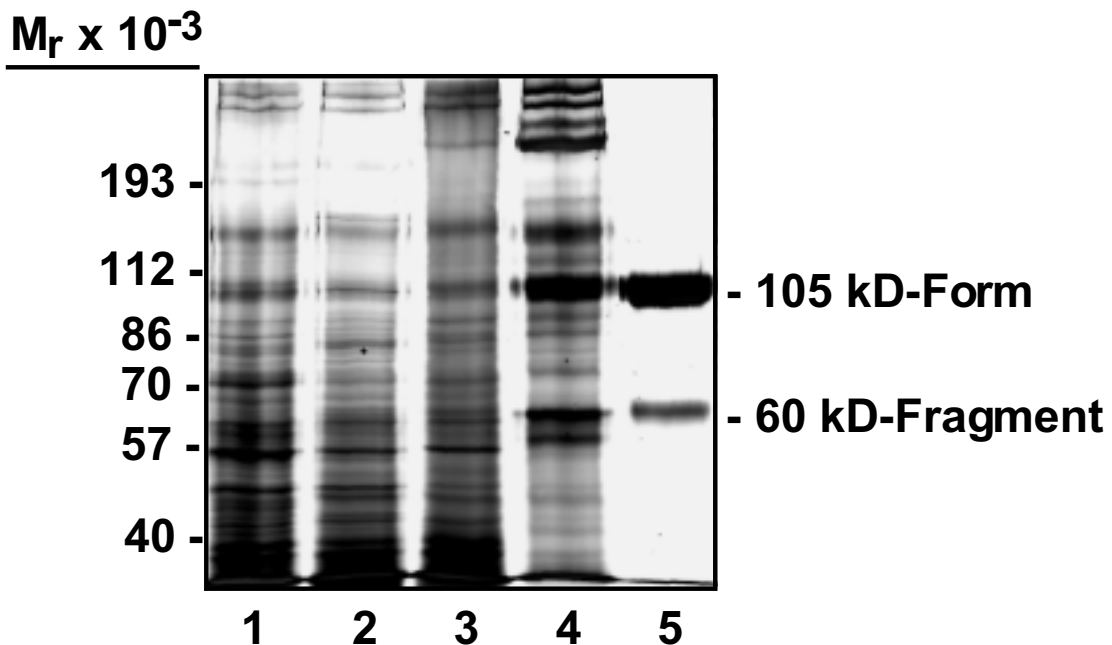


Abb. 2: Reinigung von DPP IV aus der Rattennierenrinde. Je 50 µg Homogenat (1), Rohmembranen (2), Rohmembransolubilisat (3) und Con A-Eluat (4) sowie 10 µg Immunaffi-Eluat (5) wurden durch SDS-PAGE (7,5 %) unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und silbergefärbt.

3.1.2 Darstellung von DPP IV-Formen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Wie Abb. 1a bereits zeigte, kann die DPP IV in der SDS-PAGE in verschiedenen Banden erscheinen. Da die SDS-PAGE fester Bestandteil der nachfolgend geplanten *in vitro*-Endopeptidase-Assays war, sollte systematisch untersucht werden, in welchen Formen sich die DPP IV in der SDS-PAGE darstellen konnte. Dazu wurde die DPP IV-Präparation unter verschiedenen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3) und anschließend mittels Silberfärbung (A), Immunblot mit dem monoklonalen Antikörper (mAk) 13.4 (B) und Enzymaktivitäts-Blot mit Substratfärbung (C) sichtbar gemacht. Folgende DPP IV-Formen ließen sich dabei ermitteln:

Unter allen angewandten Elektrophorese-Bedingungen zeigte sich im Silbergel eine kräftige 105 kD-Bande. Diese Bande wurde im Immunblot vom mAk 13.4 erkannt, war im Enzymaktivitäts-Blot aber nicht in der Lage, das Substrat umzusetzen. Wie im Zusammenhang mit Abb. 1a bereits festgestellt, handelt es sich bei der 105 kD-Bande offenbar um die inaktive monomere Form der DPP IV.

Wenn die DPP IV nicht denaturiert wurde, zeigte sich eine 160 kD-Bande, die sich auch in Immunblot und Enzymaktivitäts-Blot darstellte. Wie im Zusammenhang mit Abb. 1a bereits gesagt, handelt es sich hierbei offenbar um die aktive monomere Form der DPP IV.

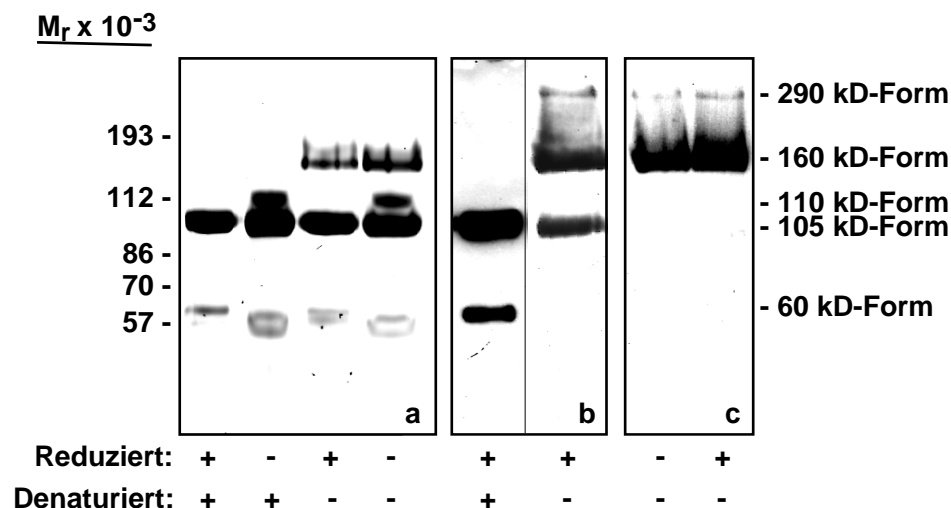


Abb. 3: Auftrennung von DPP IV durch SDS-PAGE (7,5 %) unter verschiedenen Elektrophoresebedingungen.

a) Silberfärbung

b) Immunblot mit dem monoklonalen Antikörper 13.4

c) Enzymaktivitäts-Blot mit dem Substrat Gly-Pro-4-Methoxy-beta-naphthylamid

Unter nicht-denaturierenden Bedingungen erschien in Immunblot und Enzymaktivitäts-Blot außerdem eine schwache 290 kD-Bande. Sie repräsentiert wahrscheinlich die aktive dimere Form der DPP IV.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde die 105 kD-Bande bisweilen durch eine 110 kD-Bande zu einer Doppelbande ergänzt (Abb. 3a). Diese 110 kD-Bande wurde nicht regelmäßig und nur unmittelbar nach der Reinigung beobachtet. Es handelt sich wahrscheinlich um eine instabile inaktive Form der DPP IV, die rasch in die 105 kD-Form übergeht.

Die bereits in Abb. 2 beobachtete 60 kD-Bande wurde im Silbergel (Abb. 3a) unter allen Elektrophorese-Bedingungen sichtbar. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen erschien sie als Doppelbande, unter nicht-denaturierenden Bedingungen war sie schwächer (Abb. 3a) oder gar nicht zu sehen (Abb. 1, Abb. 3b). Während sie im Immunblot (nicht-denaturierende Bedingungen) vom mAk 13.4 gebunden wurde, stellte sie sich im Enzymaktivitäts-Blot nicht dar. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die 60 kD-Bande ein inaktives Fragment der DPP IV repräsentiert.

3.1.3 N-terminale Sequenzierung des 60 kD-Proteins

Im Hinblick auf die nachfolgend geplanten *in vitro*-Endopeptidase-Assays war auszuschließen, dass es sich bei dem 60 kD-Protein um eine kopurifizierte Peptidase handelt. Dazu wurde das 60 kD-Protein durch Edman-Abbau vom N-terminalen Ende her ansequenziert. Es wurden 5 Aminosäuren identifiziert (Abb. 4). Die ermittelte Teilsequenz stimmt mit den Positionen 281 bis 285 der Aminosäuresequenz der DPP IV überein. Also ist das 60 kD-Protein ein Fragment der DPP IV, beginnend mit Position 281. Damit wurden die Ergebnisse von Iwaki-Egawa et al. (1993) bestätigt.

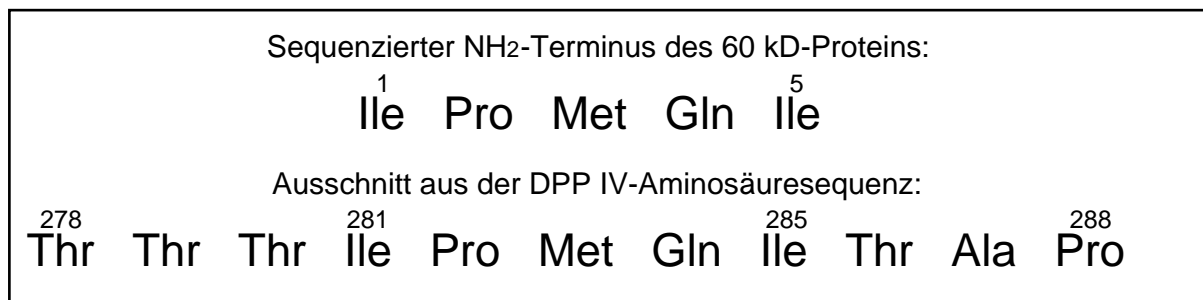


Abb. 4: N-Terminale Sequenzanalyse des 60 kD-Proteins und Vergleich mit der Aminosäuresequenz der DPP IV.

3.2 Etablierung zweier Assays zur Untersuchung gelatinolytisch aktiver Peptidasen

Nachdem reine DPP IV gewonnen worden war, waren Assays zu entwickeln, mit denen sich eine DPP IV-Endopeptidase-Aktivität nachweisen und gegebenenfalls näher charakterisieren ließ. Als Substrat für diese Assays wurde Kollagen (nativ und denaturiert) eingesetzt. Bei Verdauung von denaturiertem Kollagen durch DPP IV wäre eine Endopeptidase-Aktivität des Enzyms bewiesen. Zur Etablierung der Assays wurde anstelle von DPP IV zunächst kommerzielle *Clostridium histolyticum*-Kollagenase verwandt, bei der man sicher sein konnte, dass sie mit hoher Spaltungsrate Kollagen verdaut.

3.2.1 Gelatin-Zymographie

Zum direkten Nachweis der Spaltung von denaturiertem Kollagen eignet sich die Gelatin-Zymographie (Abb. 5). Bei diesem Verfahren werden Peptidasen und Peptidasegemische unter nicht-denaturierenden Bedingungen einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen, bei der Gele zum Einsatz kommen, in deren Matrix Gelatin integriert ist.

3.2.1.1 Herstellung von Gelatingelen

Zur Herstellung eines Zymographiegels wurde gängigen Gel-Lösungen denaturiertes säurelösliches Kollagen I (Gelatin) zu einer endgültigen Konzentration von 0,5 g/l zugesetzt, bevor das Gel gegossen wurde. Im Zuge der Polymerisation des Acrylamids integrierte sich das Gelatin so fest in die Gel-Matrix, dass es bei anschließender Elektrophorese nicht wanderte. Färbt man ein solches Gelatingel mit Coomassie-Blau (Abb. 5a, Bahn 1), so stellt es sich komplett dunkel dar, da die gesamte Gel-Matrix von Gelatin durchsetzt ist. Aufgetragene Proteinproben, wie z. B. Marker, können als noch dunklere Banden nachgewiesen werden.

Wie Abb. 5a zeigt, muss Kollagen denaturiert werden, bevor es zur Herstellung von Zymographiegelen verwandt werden kann. Wird den Gel-Lösungen anstelle von Gelatin natives säurelösliches Kollagen zugesetzt, so präzipitiert es und bildet Kollagenflocken in der Gel-Matrix, so dass sich das Gel zur Zymographie nicht mehr eignet.

3.2.1.2 Gelatin-Zymographie mit *Clostridium histolyticum*-Kollagenase

Die Gelatin-Zymographie wurde mit 1,0 µg aktiver Kollagenase durchgeführt (Abb. 5b). Die Elektrophorese erfolgte mit relativ niedriger Spannung (100 V) bei 5 °C. So wurde wärmebedingtem Aktivitätsverlust der Kollagenase vorgebeugt.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mehrfach in Puffer gewaschen, um das im Probenpuffer enthaltene SDS, das Kollagenase reversibel inhibiert, aus dem Gel zu beseitigen. Dann erfolgte eine Inkubation für 6 h bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure inaktivierte die Kollagenase.

Abb. 5b zeigt das entstandene Gelatin-Zymogramm der Kollagenase. In Negativ-Färbung stellten sich die Bereiche dar, in denen die Kollagenase das Gelatin gespalten hatte. In diesen proteolytischen Bereichen waren während der Inkubation sowohl die Gelatinfragmente als auch die Kollagenase aus dem Gel herausgewaschen worden, so dass eine Anfärbung mit Coomassie-Blau nicht bzw. nur vermindert eintrat. Das ungespaltene Gelatin hingegen konnte während der Inkubation nicht aus dem Gel diffundieren, da es in die Gel-Matrix eingebaut war. Es wurde mit Coomassie-Blau angefärbt.

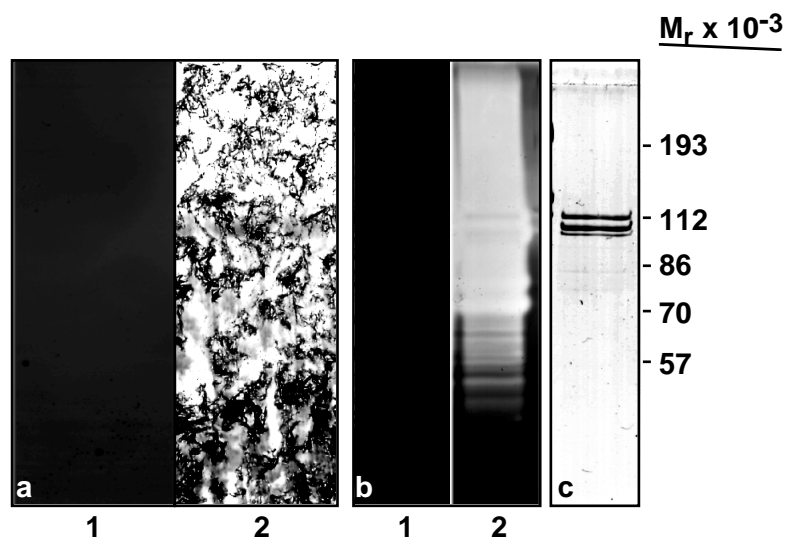


Abb. 5: Etablierung des Zymographie-Assays mit Kollagenase.

- a) Zymographiegele ohne Kollagenase. Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen, bei denen Gelatin (1) bzw. natives Kollagen (2) kopolymerisiert wurden (je 0,5 g/l).
- b) Gelatin-Zymographie mit 1 µg Kollagenase. Die Elektrophorese erfolgte mit 100 V bei 5 °C. Das Gel wurde wie im Text beschrieben gewaschen, bei 37 °C für 8 h im Schüttler inkubiert und mit Coomassie-Blau gefärbt. Zymogramm ohne (1) und mit (2) Kollagenase.
- c) Kontrolle. Gewöhnliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 1 µg Kollagenase. Gel (7,5 %) ohne Gelatin.

Das Zymogramm der Kollagenase zeigte unscharf mehrere Banden in einer diffusen proteolytischen Zone, welche den gesamten Gel-Bereich oberhalb von 50 kD durchzog. Die unscharfen Banden wurden vermutlich durch die verschiedenen Subtypen der benutzten *Clostridium histolyticum*-Kollagenase erzeugt (Bond et al. 1984). Die diffuse Zone ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass die Kollagenase das Gelatin bereits während der Wanderung durch das Substratgel verdaute. Offenbar reichten der inhibitorische Effekt des SDS im Probenpuffer und die niedrige Elektrophorese-Temperatur von 5 °C nicht aus, um die vorzeitige Gelatinspaltung zu verhindern. Wie groß der Verdauungseffekt der Kollagenase während der Elektrophorese ist, ließe sich durch einen Anschlussversuch nachweisen, in dem die Kollagenase unmittelbar nach der Elektrophorese durch Essigsäure inaktiviert würde. Daraufhin würde man das Zymogramm ebenfalls für 6 h inkubieren, damit die Spaltprodukte aus dem Gel diffundieren könnten. Da bei der DPP IV von einer deutlich schwächeren Gelatinase-Aktivität auszugehen und daher während der Elektrophorese (5°C) eine beträchtliche Gelatinspaltung nicht zu erwarten war, wurde auf diesen Anschlussversuch verzichtet.

3.2.2 Löslicher proteolytischer Assay mit *Clostridium histolyticum*-Kollagenase

Zur quantitativen und qualitativen Untersuchung gelatinolytisch aktiver Enzyme eignet sich der lösliche proteolytische Assay, bei dem die Peptidasen mit säurelöslichem Kollagen gemischt und inkubiert werden. Der Ansatz wird anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und gefärbt.

Für einen Spaltansatz mit Kollagenase wurde natives säurelösliches Kollagen I mit aktiver Kollagenase in sterilem TBS bei pH 5,6 inkubiert. Die proteolytische Reaktion wurde durch Aufkochen in reduzierendem SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt. Die Verdauung des Kollagens ließ sich durch SDS-PAGE des Spaltansatzes und anschließende Coomassie-Blau-Färbung indirekt nachweisen: Die Banden der Kollagenketten nahmen mit zunehmender Verdauung an Intensität ab (Abb. 6,8,9). Als Kontrolle dienten analoge Ansätze ohne Kollagen bzw. ohne Kollagenase.

3.2.2.1 Einfluss der Kollagenasemenge auf die Kollagenspaltung

Um das geeignete Mischungsverhältnis von Kollagen zu Kollagenase zu finden, wurde im Spaltansatz (10 s bei 37 °C) die Kollagenasekonzentration variiert (Abb. 6). Mit zunehmender Konzentration von Kollagenase beobachtete man eine Abnahme der Kollagenketten. Bei einem Mengenverhältnis von Kollagen zu Kollagenase von 32:1 (Aliquot mit 4 µg Kollagen und 125 ng Kollagenase) war das Kollagen weitgehend verdaut. Spaltprodukte wurden nur andeutungsweise sichtbar.

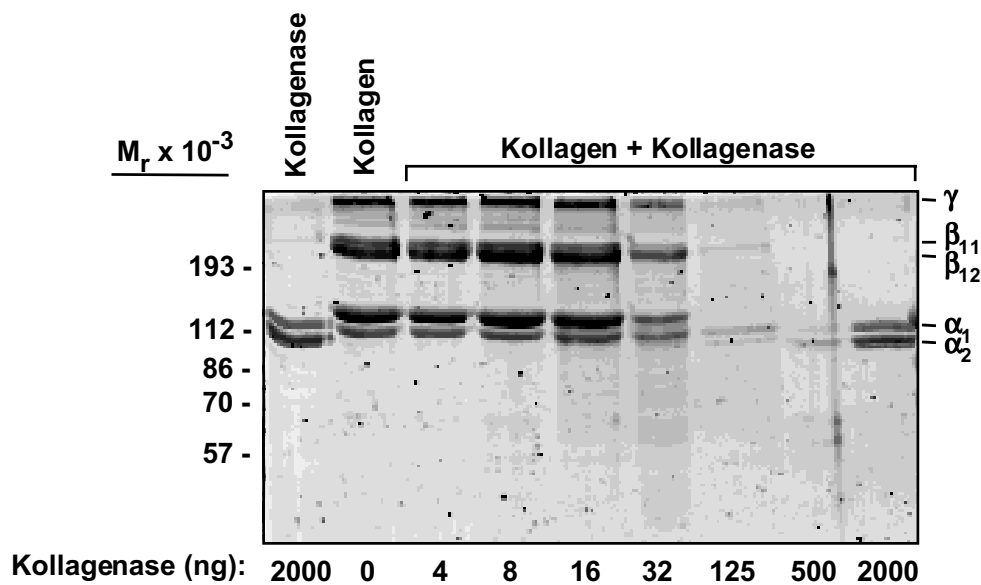


Abb. 6: Variation der Kollagenasemenge im löslichen proteolytischen Assay. Die Inkubation erfolgte für 10 s bei 37 °C. Anschließend erfolgte die Auftrennung durch SDS-PAGE. Die aufgetragenen Aliquots enthielten Spaltansätze mit jeweils 4 µg Kollagen sowie der angezeigten Kollagenase-Menge.

3.2.2.2 Nachweis von niedermolekularen Spaltprodukten durch Dünnschichtchromatographie

Um niedermolekulare Spaltprodukte auftrennen und sichtbar machen zu können, die in der Lauffront des 7,5%igen Polyacrylamidgels vermutet wurden, wurden die Ansätze der Kollagenspaltung durch Kollagenase auf einem 12,5%igen Gel aufgetrennt und anschließend eine Coomassie- sowie eine Silberfärbung durchgeführt (ohne Abb.). Diese Versuche blieben ebenso erfolglos wie die Bemühungen, niedermolekulare Spaltprodukte mit Hilfe von HPLC und MALDI nachzuweisen (ohne Abb.). Ein eindeutiger Nachweis von niedermolekularen Spaltprodukten gelang schließlich durch Dünnschichtchromatographie (Abb. 7). Dazu wurde in einem präparativen Ansatz natives Kollagen mit Kollagenase im Mengenverhältnis von 40:1

für 5 h bei 37 °C inkubiert, so dass eine weitgehende Verdauung des Kollagens zu erwarten war. Die Probe wurde anschließend filtriert, gereinigt und konzentriert, auf einem Kieselgel dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und mit Ninhydrin gefärbt. Die Spaltprodukte erschienen bei Einsatz des gewählten Laufmittels ungefähr auf gleicher Höhe wie Glycin (Abb. 7) und andere Aminosäuren (Prolin, Alanin; ohne Abb.), die als Bezugssubstanzen eingesetzt worden waren. Offenbar handelte es sich bei den nachgewiesenen Spaltprodukten der Kollagenase um ein Gemisch von einzelnen Aminosäuren. Größere Spaltprodukte wurden nicht sichtbar. Die Kontrollproben mit Kollagen bzw. Kollagenase zeigten keine Banden.

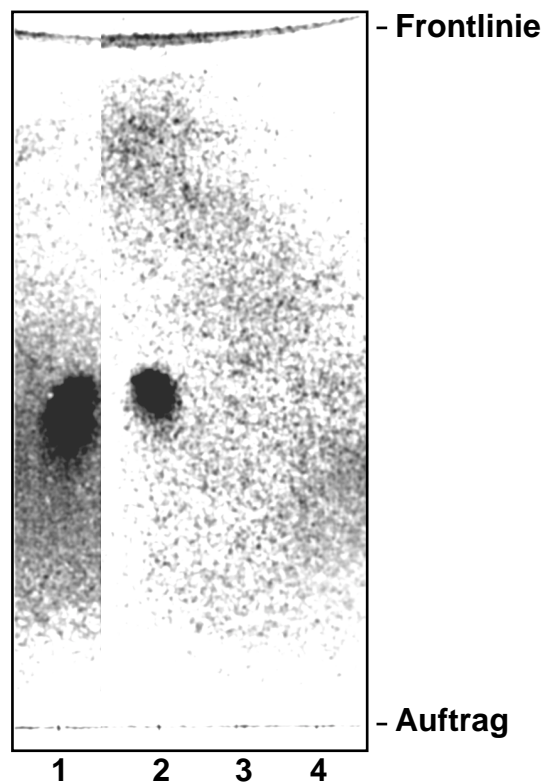


Abb. 7: Dünnschichtchromatogramm der Spaltprodukte des löslichen proteolytischen Assays mit Kollagenase. Als Kontrolle des Spaltansatzes (2) dienen Glycin (1) und Ansätze ohne Kollagenase (3) bzw. ohne Kollagen (4).

3.2.2.3 Nachweis von höhermolekularen Spaltprodukten bei niedrigeren Inkubationstemperaturen

Größere Spaltprodukte waren bereits im SDS-Polyacrylamidgel von Abb. 6 in Spuren zu erkennen gewesen. Um diese Spaltprodukte besser sichtbar zu machen, wurden Kolloidal-, TCA-CBB- und Silber-Färbung ausprobiert (ohne Abb.), von denen man sich eine höhere Sensitivität für Kollagenfragmente versprach. Diese drei Färbemethoden zeigten sich jedoch der routinemäßig genutzten Coomassie-Blau-Färbung nicht überlegen.

Wie sich aus der Temperaturabhängigkeit des löslichen proteolytischen Assays ergab (Abb. 8), muss der Spaltansatz bei niedrigeren Temperaturen inkubiert werden, um größere Mengen von höhermolekularen Spaltprodukten darstellen zu können. Bei 4 °C, 16 °C und 21 °C wurden hochmolekulare Kollagenfragmente in Form von Zwischenbanden sichtbar, während bei 37 °C und 56 °C der Abbau der Kollagen-Fragmente offenbar so schnell vonstatten geht, dass keine signifikanten Mengen von Zwischenprodukten anfallen. Je niedriger die Inkubationstemperatur gewählt wurde, desto langsamer wurde das Kollagen abgebaut.

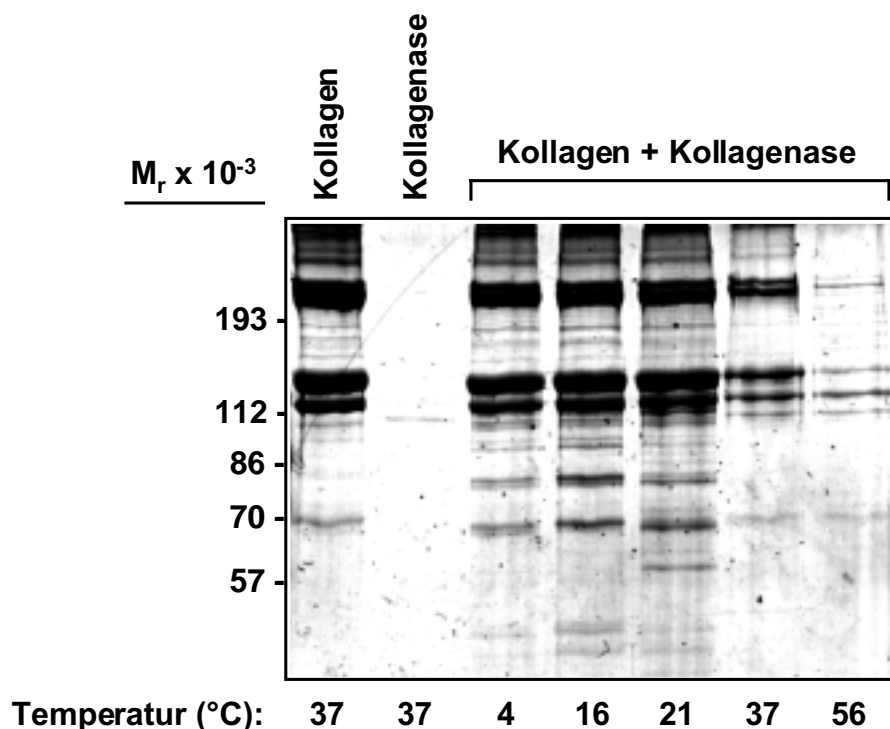


Abb. 8: Kollagenspaltung durch Kollagenase bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. In den löslichen proteolytischen Assay wurden Kollagen und Kollagenase in einem Mengenverhältnis von 64:1 eingesetzt. Die Inkubationsdauer wurde mit 1 h so gewählt, dass bei Reaktionsstop die Proteolyse noch voll im Gange und damit eine gute Vergleichbarkeit der Spaltansätze gegeben war.

3.2.2.4 Zeitabhängigkeit der Kollagenspaltung

Um das Auftreten von größeren Spaltprodukten während der Kollagenspaltung zu untersuchen, wurde der lösliche proteolytische Assays bei 16 °C mit unterschiedlicher Inkubationsdauer durchgeführt (Abb. 9). Im SDS-Polyacrylamidgel zeigte sich dabei eine Leiter von Zwischenprodukten, die sich mit zunehmender Inkubationsdauer in den niedermolekularen Bereich verschob. Offenbar greift die Kollagenase bestimmte Stellen im Kollagen bevorzugt an, so dass bei der Spaltung definierte Fragmente entstehen, die sich im Gel als distinkte Banden darstellen.

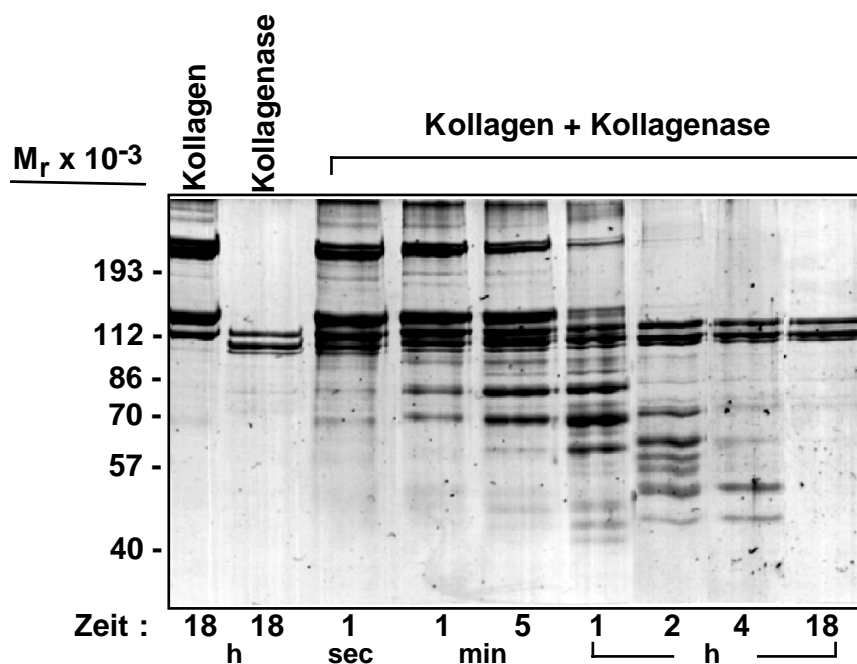


Abb. 9: Kollagenspaltung durch Kollagenase als Funktion der Zeit. Der lösliche proteolytische Assay wurde mit einer Inkubationstemperatur von 16 °C und einem Mengenverhältnis von Kollagen zu Kollagenase von 1:8 durchgeführt. Die Banden der Kollagenase und der Alpha-2-Kette des Kollagens überlagern sich, da sie auf gleicher Höhe laufen.

3.2.2.5 Verschiedene Substrate im löslichen proteolytischen Assay

Der lösliche proteolytische Assay eignet sich, die Substrat-Spezifität einer Peptidase zu testen. So ließ sich im Spaltansatz natives Kollagen durch Albumin, Fibronectin und denaturiertes Kollagen ersetzen. Wie aus Abb. 10 ersichtlich ist, wurden Albumin und Fibronectin durch Kollagenase nicht verdaut. Denaturiertes Kollagen wurde deutlich schneller verdaut als natives (ohne Abb.).

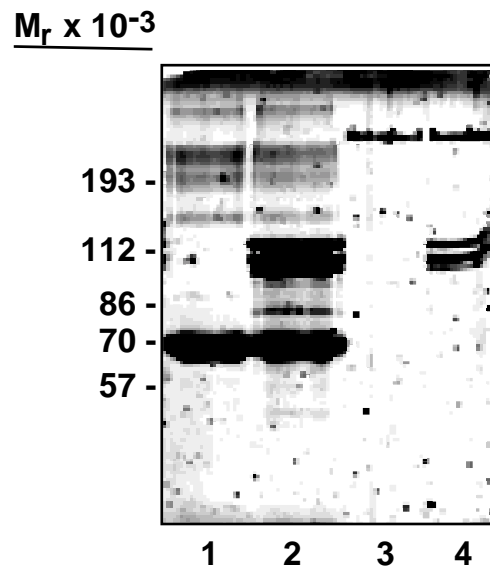


Abb. 10: Variation des Substrates im löslichen proteolytischen Assay mit Kollagenase. Albumin wurde im Mengenverhältnis von 8:1, Fibronectin im Mengenverhältnis von 4:1 mit Kollagenase angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 24 h. (1) Albumin, (2) Albumin + Kollagenase, (3) Fibronectin, (4) Fibronectin + Kollagenase.

3.2.2.6 Einsatz von Inhibitoren im löslichen proteolytischen Assay

Der lösliche proteolytische Assay eignet sich ebenfalls, die inhibitorische Wirkung verschiedener Substanzen auf eine Peptidase zu testen. So wurden EDTA und das Tripeptid Diprotin A, das als DPP IV-spezifischer Inhibitor gilt, dem Spaltansatz zugefügt. Wie Abb. 11 zeigt, hemmte EDTA die Kollagenase, während Diprotin A keinen Einfluss auf die Kollagenspaltung hatte. Die Spaltbedingungen wurden im Ansatz mit Diprotin so gewählt, dass bei Reaktionsstopp erst ein Teil des Kollagens verdaut und damit eine gute Vergleichbarkeit der Spaltansätze mit und ohne Diprotin A gegeben war.

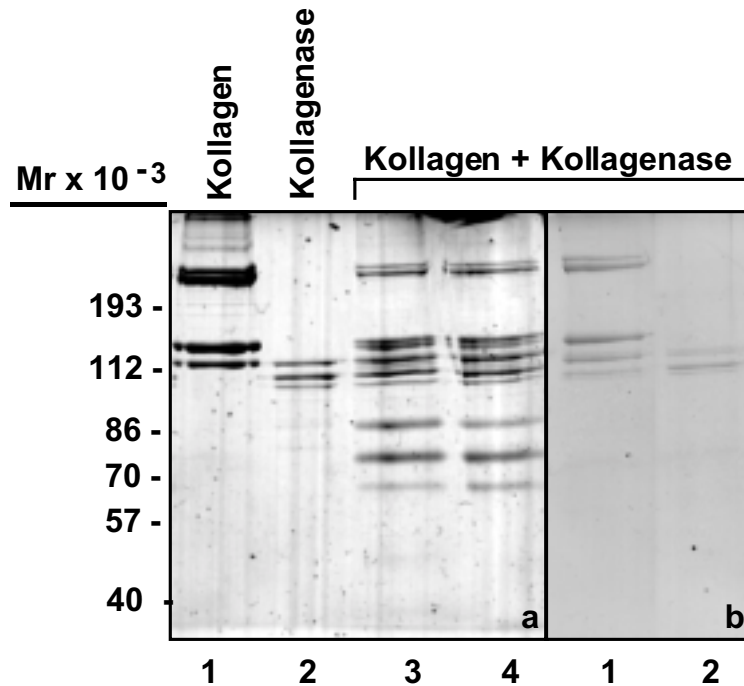


Abb. 11: Verwendung von Inhibitoren im löslichen proteolytischen Assay mit Kollagenase.
 a) Diprotin A (30 mM): Inkubation bei 16 °C für 2 h. (1) Kollagen-Kontrolle; (2) Kollagenase-Kontrolle; (3) Spaltansatz mit Diprotin A, (4) Spaltansatz ohne Diprotin A
 b) EDTA (30 mM): Inkubation bei 37 °C für 15min. Spaltansatz mit (1) und ohne (2) EDTA.

3.2.2.7 Densitometrische Quantifizierung von Kollagenbanden

Mit Hilfe eines Scanners und entsprechender Software lassen sich Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen densitometrisch quantifizieren. Angewandt auf Gele des löslichen proteolytischen Assays, sollte dieses Verfahren eine quantitative Untersuchung der Kollagenspaltung ermöglichen.

Um die Genauigkeit dieses Quantifizierungsverfahrens zu überprüfen, wurde die Verdünnungsreihe einer Kollagenprobe bekannter Konzentration durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 12a). Das Gel wurde mit einem AGFA ARCUS II-Scanner gescannt und mit IP Lab Gel H-Software densitometrisch bearbeitet. Das Densitogramm der Banden der Alpha1-Kette des Kollagens findet sich in Abb. 12b, zusätzlich die vom Computer errechneten Integralwerte, welche die densitometrisch ermittelten relativen Kollagenmengen repräsentieren. Die Kollagenmenge der konzentriertesten Probe wurde dabei als 100 % definiert. Wie ein Vergleich der aufgetragenen Kollagenmengen mit den Messwerten zeigt, handelt es sich um ein geeignetes Verfahren, Kollagenbanden zu quantifizieren.

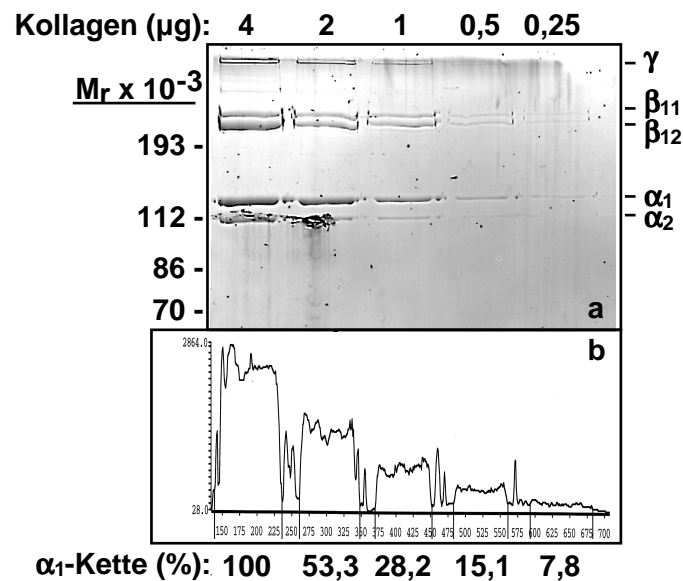


Abb. 12: Densitometrische Quantifizierung von Kollagenbanden.

a) SDS-PAGE (7,5 %) der Verdünnungsreihe einer Kollagenprobe. Die Auftrennung erfolgte unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen, die Färbung mit Coomassie-Blau. Die angegebenen Kollagenmengen wurden durch BCA-Proteinbestimmung ermittelt.

b) Densitogramm der Banden der Alpha1-Kette mit den daraus errechneten relativen Mengen von Alpha1-Ketten. Die Menge der konzentriertesten Probe wurde als 100 % definiert.

3.3 Nachweis der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität durch Gelatin-Zymographie

Nachdem mit Hilfe von Kollagenase zwei Assays zur Untersuchung von Kollagen- bzw. Gelatinspaltung etabliert worden waren, sollte in diese Assays nun gereinigte DPP IV anstelle von Kollagenase eingesetzt werden. Zum direkten Nachweis einer DPP IV-Gelatinase-Aktivität wurde der Zymographie-Assay mit DPP IV durchgeführt. Gelatinspaltung durch DPP IV sollte als Beweis für eine Endopeptidase-Aktivität des Enzyms dienen.

3.3.1 Einsatz der DPP IV-Präparation in den Zymographie-Assay

Zunächst wurde das Zymographie-Verfahren mit 3,2 µg aktiver DPP IV genau so angewandt, wie es sich mit 1,0 µg Kollagenase bewährt hatte. Dabei zeigten sich im Zymogramm (Abb. 13, Bahn 1) zwei hochmolekulare schmale Banden und eine dritte breite Bande, die ungefähr den Molekulargewichtsbereich von 110-160 x 10⁻³ abdeckte und wie eine Doppelbande aussah. Dieses Bandenmuster legte eine Kontamination mit anderen Peptidasen nahe, weil es nicht dem Bandenmuster entsprach, das die DPP IV gewöhnlich erzeugt (s. Abb. 3). Im oberen Bereich der breiten Bande wurde die aktive monomere Form der DPP IV vermutet, eine der

beiden hochmolekularen schmalen Banden repräsentierte eventuell die aktive dimere Form der DPP IV.

Die DPP IV ist eine Serinpeptidase, während die meisten Kollagenasen und Gelatinasen der Gruppe der Metallopeptidasen angehören. Um die Kontamination mit einer Metallopeptidase auszuschließen, wurde dem Inkubationspuffer 10 mM EDTA hinzugefügt. Im Zymogramm (Abb. 13, Bahn 2) erschien jetzt nur noch eine 160 kD-Bande, der untere Bereich der breiten Bande und die beiden hochmolekularen schmalen Banden waren nicht mehr zu sehen. Bei der 160 kD-Bande handelte es sich offenbar um die aktive monomere Form der DPP IV. Die anderen Banden hingegen waren wohl auf eine Kontamination der DPP IV-Probe zurückzuführen. Spuren hochaktiver Metallopeptidasen waren offenbar bei der Immunaffinitätschromatographie nicht entfernt worden und im Kontroll-Silbergel (Abb. 2) nicht nachweisbar gewesen. Diese Kontamination konnte durch Zugabe von 10 mM EDTA komplett inhibiert werden. Deshalb wurde dem Zymographie-Puffer bei späteren Versuchen routinemäßig 10 mM EDTA zugesetzt.

Eine weitere Beobachtung unterstützte die Hypothese, dass die 160 kD-Bande auf die DPP IV-Aktivität in der aufgetragenen Probe zurückzuführen war. Erstellte man Zymogramme einer DPP IV-Probe, die mit dem Serinpeptidase-Inhibitor DFP (1 mM) behandelt worden war, so ließ sich bei Anwesenheit von 10 mM EDTA keine Proteolyse mehr beobachten (Abb. 13, Bahn 3). Inkubierte man ohne EDTA, so stellten sich die Metallopeptidasen ohne DPP IV dar (Abb. 13, Bahn 4). Die kontaminierenden Peptidasen waren also durch DFP nicht inhibierbar.

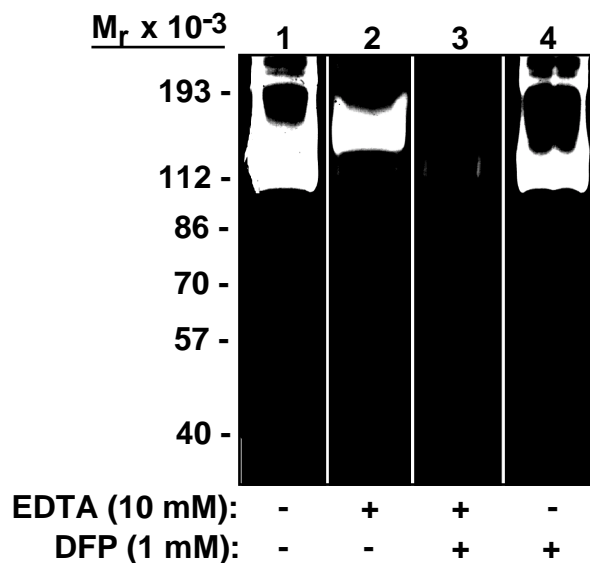


Abb. 13: Gelatin-Zymographie der DPP IV-Präparation unter Zugabe von EDTA und DFP.

3.3.2 Einfluss von Elektrophoresebedingungen und Waschvorgang auf die Gelatinzymographie mit DPP IV

Wandelte man das Zymographieverfahren nur geringfügig ab, so ließ sich häufig keine Spaltung mehr beobachten. Um herauszufinden, welche Faktoren dabei eine Rolle spielten, wurden Elektrophoresebedingungen und Waschvorgang des Zymographie-Assays systematisch variiert.

Wie Abb. 14a zeigt, spielte es keine Rolle, ob die Elektrophorese der DPP IV-Probe unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen stattfand. Setzte man eine hitzedenaturierte DPP IV-Probe ein, so erschien erwartungsgemäß keine Bande.

Wie aus Abb. 14b ersichtlich, musste beim Waschen des Gelatingels die Dauer von 30 min (zweimal 15 min) recht genau eingehalten werden. Wusch man 10 min oder 60 min lang, so wurde anschließend deutlich weniger Proteolyse beobachtet. Vermutlich wurde bei einer Waschdauer von 10 min nicht alles SDS aus dem Gel gewaschen. Das verbleibende SDS inhibierte nach wie vor die DPP IV-Aktivität. Wenn man 60 min lang wusch, wurde durch das Triton X-100 offenbar auch DPP IV aus dem Gel gewaschen.

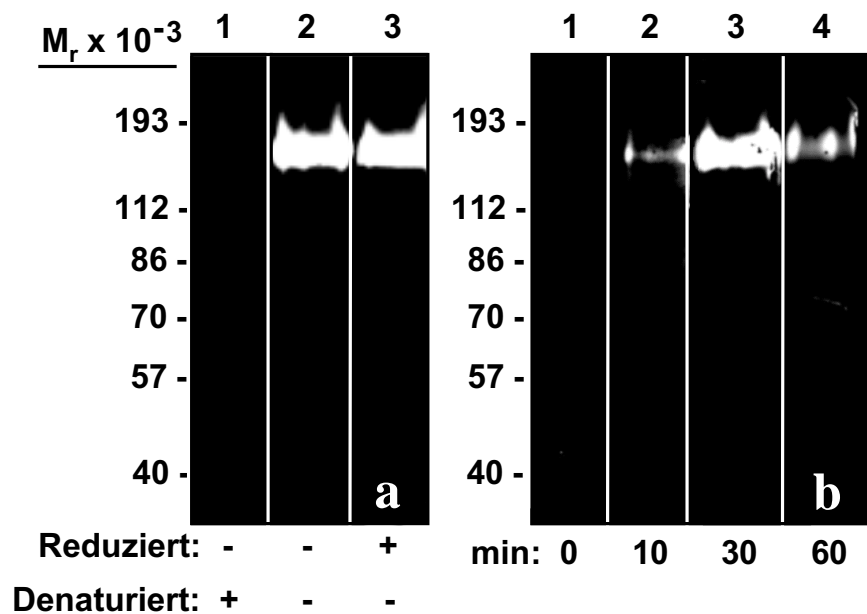


Abb. 14: Optimierung des Zymographie-Assays mit DPP IV.

a) Variation der Elektrophorese-Bedingungen.

b) Variation der Waschdauer in TBS, 25 ml/l Triton X-100. Der Waschpuffer wurde im Laufe der Inkubation jeweils einmal erneuert.

3.3.3 Einfluss von DPP IV-Menge und Inkubationsdauer auf die Gelatinolyse im Zymographie-Assay

Um die Abhängigkeit des Assays von der Menge eingesetzter DPP IV und der Inkubationsdauer zu untersuchen, wurden die Enzymmenge und die Inkubationsdauer variiert (Abb. 15). Mit zunehmender Menge aktiver DPP IV wurde ebenso wie mit zunehmender Inkubationsdauer eine größere proteolytische Zone beobachtet. Um eine deutliche proteolytische Zone zu erzeugen, musste mindestens eine Menge von 1,6 μg aktiver DPP IV eingesetzt werden und 8 h inkubiert werden.

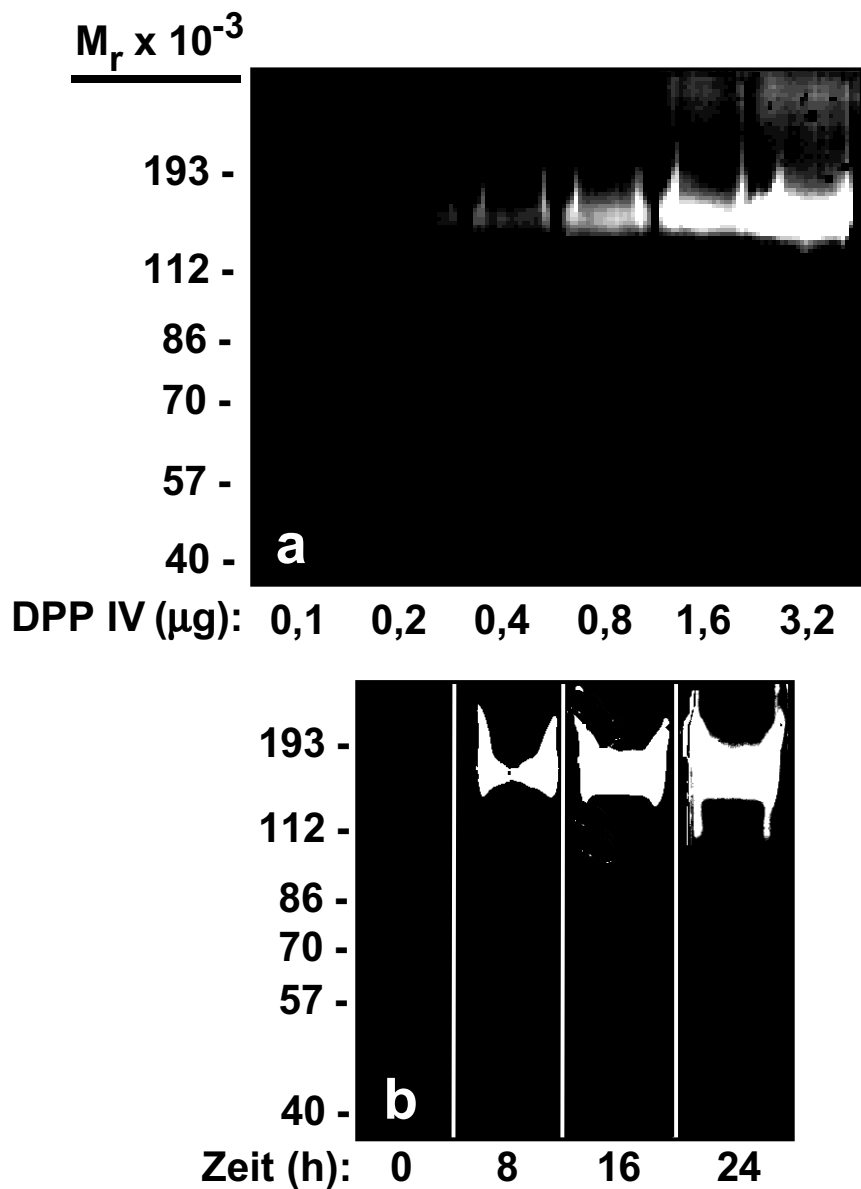


Abb. 15: Gelatin-Zymographie aktiver DPP IV als Funktion der Menge (a) und der Zeit (b).

3.4 Charakterisierung der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität mit Hilfe des löslichen proteolytischen Assays

Nachdem durch Gelatin-Zymographie nachgewiesen worden war, dass DPP IV eine Endopeptidase-Aktivität besitzt, sollte diese Aktivität näher charakterisiert werden. Dafür eignete sich der lösliche proteolytische Assay, der mit relativ geringem Aufwand eine qualitative und quantitative Untersuchung der Proteolyse erlaubt.

Mit leichten Abwandlungen glich der Standardassay mit DPP IV dem Verfahren, das sich für Kollagenase bewährt hatte: Statt pH 5,6 wurde pH 7,4 gewählt. Anstelle nativen Kollagens wurde denaturiertes Kollagen verwandt. Gelatin und DPP IV wurden im Mengenverhältnis von 2,5:1 eingesetzt, da durch DPP IV eine geringere Spaltungsrate als durch Kollagenase zu erwarten war. Daher wurde auch die Inkubationsdauer auf 80 h ausgedehnt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Alle weiteren Untersuchungen dieses Abschnitts stellen Modifikationen dieses Standardassays dar.

3.4.1 Einfluss der EDTA-Konzentration auf den löslichen proteolytischen Assay

Wie sich bei der Gelatin-Zymographie gezeigt hatte, enthielt die DPP IV-Präparation Spuren von Metallopeptidasen, die durch EDTA inhibiert werden konnten. Um geeignete EDTA-Konzentrationen für den löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV zu ermitteln, wurde der Assay mit variierenden EDTA-Mengen durchgeführt (Abb. 16). Nach 24 h war bei bis zu 1 mM EDTA alles Gelatin verdaut. Bei Konzentrationen von 2,5 mM, 5 mM und 10,0 mM

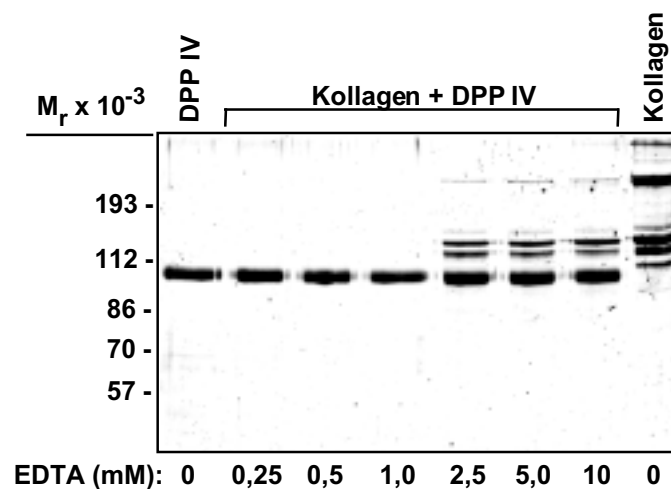


Abb. 16: Variation der EDTA-Konzentration im löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV. Die Reaktion wurde nach 24 h durch Aufkochen gestoppt.

EDTA war hingegen nur ein Teil des Gelatins gespalten, wobei der Spaltvorgang in diesen drei Ansätzen gleich weit fortgeschritten war. Die bei 2,5 mM, 5,0 mM und 10,0 mM EDTA beobachtete Spaltung war offenbar auf DPP IV zurückzuführen, während an der kompletten Spaltung der anderen Ansätze vermutlich auch die Metallopeptidasen beteiligt waren. Die EDTA-Konzentration, die ausreichte, um alle zweiwertigen Ionen zu binden, welche die Metallopeptidasen für ihre Aktivität benötigten, lag offenbar zwischen 1,0 und 2,5 mM. Bei allen weiteren Spaltansätzen mit der DPP IV-Präparation wurde daher EDTA in einer Konzentration von 2,5 mM eingesetzt.

3.4.2 Einfluss des pH auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität

DPP IV entwickelt ihre höchste Exopeptidase-Aktivität etwa bei pH 7,8. Durch Variation des pH wurde untersucht, wie sich die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten verhält. Da in Essigsäure gelöstes Gelatin nur im sauren bis neutralen pH-Bereich löslich bleibt, konnten über pH 7,5 hinaus keine Versuche unternommen werden. Wie aus Abb. 17 ersichtlich, spaltete DPP IV Gelatin am besten im physiologischen pH-Bereich. Mit abnehmendem pH nahm auch die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität ab. Bei pH 5,6 erfolgte fast keine Spaltung mehr.

Bei allen Spaltansätzen von Abb. 17 stellte sich die Lauffront des SDS-Polyacrylamidgels gleichsam als Bande dar. Die Lauffront der Kontrollen mit denaturiertem Kollagen bzw. Kollagenase war dagegen ebenso unauffällig wie die Lauffront von früheren Spaltansätzen mit Kollagenase. Vermutlich sammeln sich in der Lauffront der Spaltansätze mit DPP IV

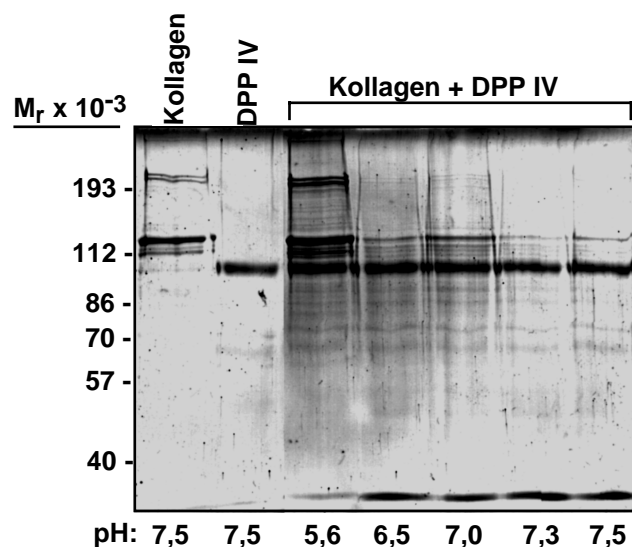


Abb. 17: Variation des pH im löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV.

niedermolekulare Spaltprodukte. Der Versuch, sie in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel zu distinkten Banden aufzutrennen, misslang allerdings (ohne Abb.).

3.4.3 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität

Durch Dünnschichtchromatographie waren Aminosäuren als Spaltprodukte des löslichen proteolytischen Assays mit Kollagenase nachgewiesen worden. Dieses Verfahren ließ sich nicht auf Ansätze mit DPP IV anwenden, da nicht ausreichend DPP IV gewonnen werden konnte. In Assays mit Kollagenase waren größere Spaltprodukte im SDS-Polyacrylamidgel nur dann sichtbar geworden, wenn niedrigere Inkubationstemperaturen gewählt worden waren. Um dieses auch mit DPP IV zu erreichen, wurde die Inkubationstemperatur des Assays mit DPP IV variiert. Wie Abb. 18 zeigt, besitzt die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität ihr Temperaturoptimum bei 37 °C. Bei den anderen Inkubationstemperaturen ließ sich kaum eine Gelatinspaltung beobachten. Wieder wurden kleinere Spaltprodukte in der Lauffront beobachtet, nicht aber größere Spaltprodukte in Form von Zwischenbanden.

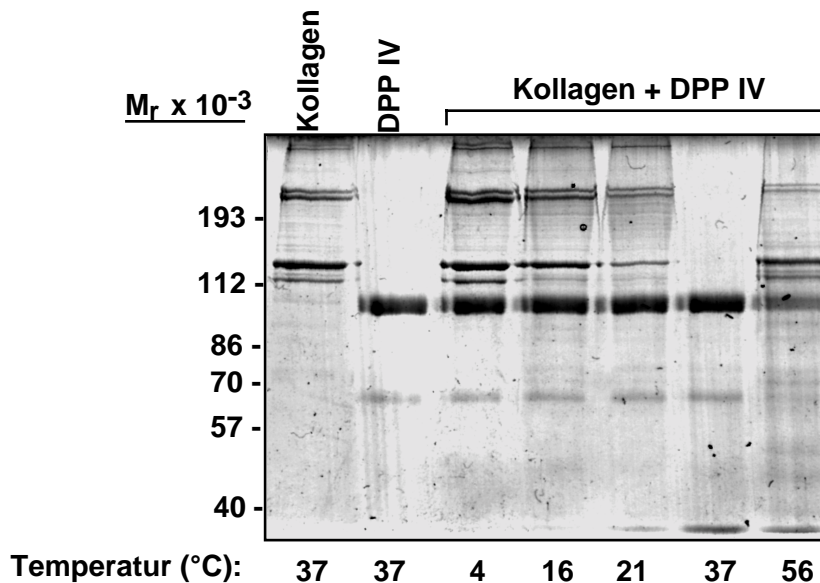


Abb. 18: Variation der Inkubationstemperatur im löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV.

3.4.4 Nachweis von Spaltprodukten durch Immunblotting

Um größere Spaltprodukte mit Hilfe von Anti-Kollagen-Antikörpern zu visualisieren, wurden die Spaltansätze der Immunblot-Analyse unterzogen. Abb. 19 zeigt den löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV als Funktion der Zeit. Verglichen wurde die routinemäßig durchgeführte Coomassie-Blau-Färbung (Abb. 19a) mit einem Immunblot, für den polyklonale Antikörper gegen Prokollagen III eingesetzt wurden (Abb. 19b). Wie in früheren Spaltansätzen mit DPP IV (Abb. 16-18) ließen sich durch Coomassie-Blau-Färbung keine größeren Spaltprodukte sichtbar machen (Abb. 19a). Die Gelatinspaltung äußerte sich nur darin, dass mit zunehmender Inkubationsdauer die Gelatinbanden abnahmen. Im Immunblot hingegen ließen sich größere Spaltfragmente visualisieren (Abb. 19b). Wie schon bei dem Spaltansatz mit Kollagenase beobachtet, verschoben sich die Bruchstücke mit zunehmender Inkubationszeit in den niedermolekularen Bereich. Im Vergleich zum Ansatz mit Kollagenase stellten sich die Fragmente diffuser dar.

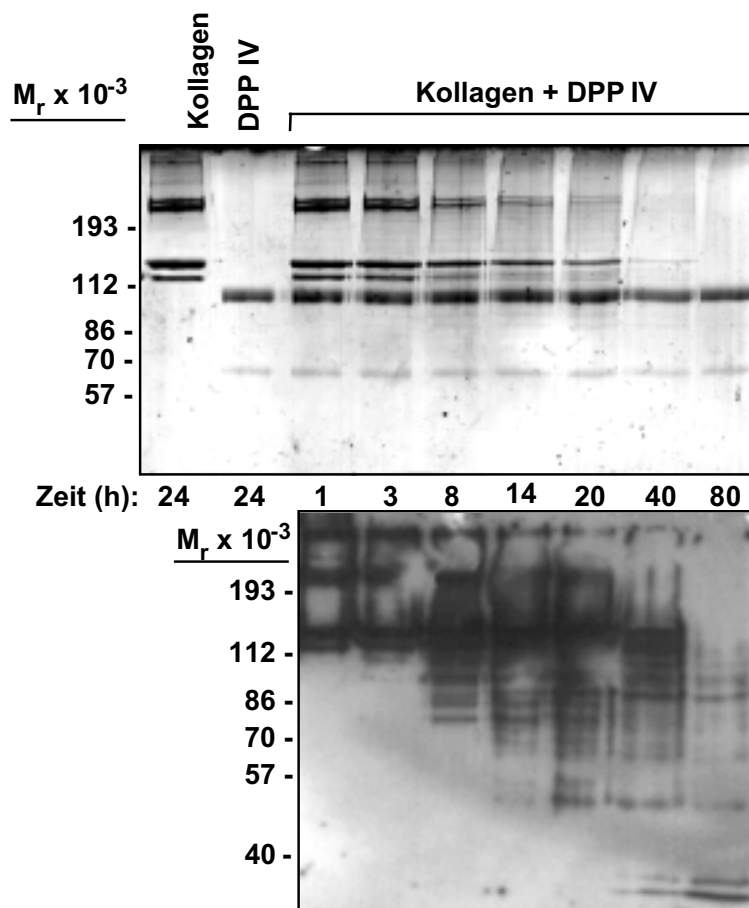


Abb. 19: Darstellung von Spaltprodukten. Im löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV wurde die Inkubationszeit variiert. Die Proteine wurden durch Coomassie-Blau-Färbung (a) bzw. Immunblot mit polyklonalen Antikörpern gegen Pro-kollagen III (b) visualisiert.

3.4.5 Untersuchungen zur Substrat-Spezifität der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität

3.4.5.1 Natives Albumin, Fibronectin und Kollagen im löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV

Um zu prüfen, ob es sich bei der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität um eine unspezifische proteolytische Aktivität handelt, die verschiedenste Proteine abzubauen vermag, wurden natives Albumin, Fibronectin und Kollagen (Typ I) für 80 h mit DPP IV inkubiert. Wie Abb. 20 zeigt, wurde unter den gewählten Bedingungen die Gelatinkontrolle vollständig verdaut, während die DPP IV offenbar natives Albumin, Fibronectin und Kollagen nicht zu spalten vermag. Auch sich selbst verdaut die DPP IV offenbar nicht (vgl. Abb. 19a).

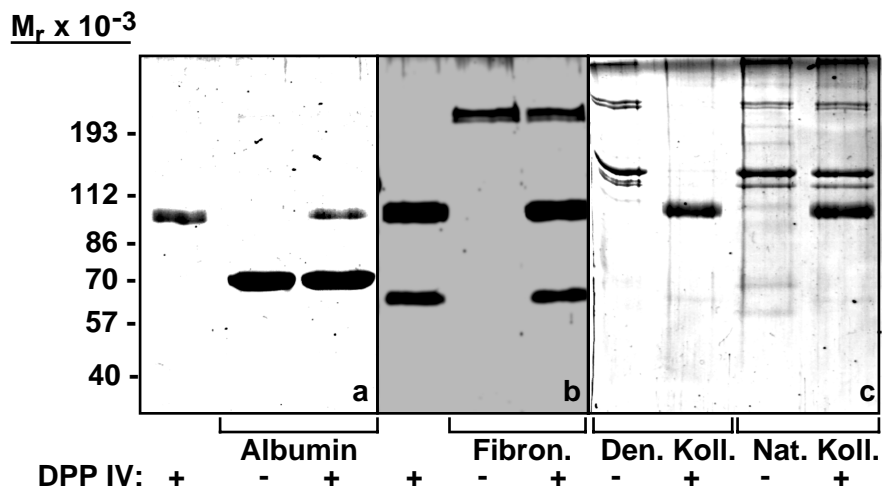


Abb. 20: Substrat-Spezifität der DPP IV im löslichen proteolytischen Assay. a) Albumin (Coomassie-Blau-Färbung); b) Fibronectin (Silberfärbung); c) Denaturiertes und natives Kollagen vom Typ I (Coomassie-Blau-Färbung). Das Mengenverhältnis von Albumin bzw. Kollagen zu DPP IV betrug 2,5:1, das von Fibronectin zu DPP IV 1,2:1.

3.4.5.2 Die Spaltung denaturierten Kollagens der Typen I-V im Vergleich

Um zu untersuchen, welche Typen denaturierten Kollagens die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität bevorzugt spaltet, wurden die Kollagentypen I-V nach Denaturierung jeweils für 5, 10, 20, 40, 60 und 80 h mit DPP IV inkubiert. Die Spaltansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Um die Verdauung der verschiedenen Typen vergleichen zu können, wurde der Abbau der Alpha1-Banden densitometrisch quantifiziert. Dabei wurde der Wert einer Kontrolle ohne DPP IV als 100 %, der Wert einer Kontrolle ohne Gelatin als 0 % definiert. Das Ergebnis der entsprechenden Auswertung zeigt Abb. 21. Die fibrillären Kollagentypen (Typen I, II, III und V) wurden in vergleichbarer Geschwindigkeit

abgebaut, wobei man in den ersten 5 h eine besonders rasche Abnahme der Alpha1-Banden beobachten konnte. Nach 80 h hatten 8 μg aktive DPP IV 20 μg fibrilläres denaturiertes Kollagen weitgehend verdaut. Im Vergleich zum fibrillären wurde das Basalmembran-Kollagen (Typ IV) deutlich langsamer abgebaut. Nach 80 h hatte die DPP IV erst die Hälfte dieses Kollagentyps verdaut.

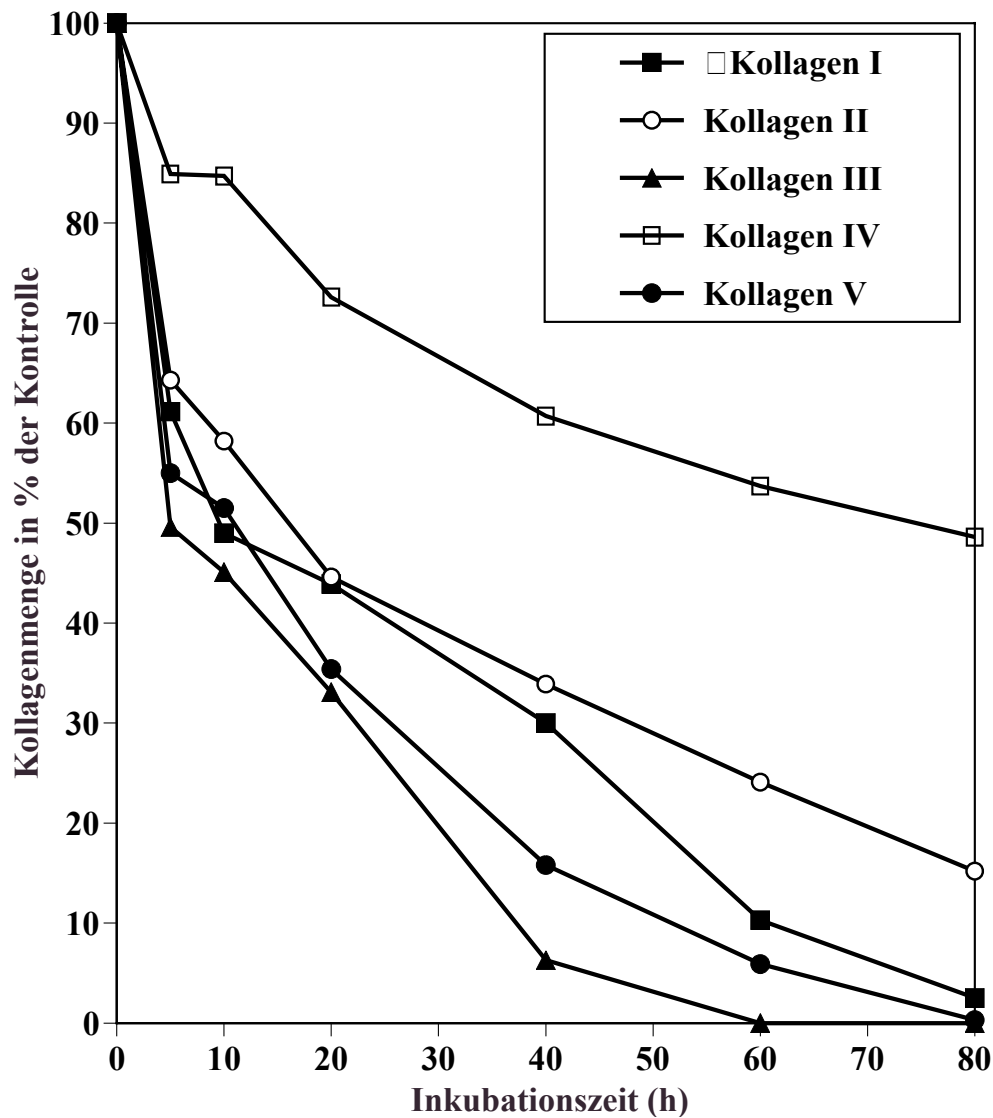


Abb. 21: Verdauung verschiedener Typen denaturierten Kollagens durch DPP IV. Kinetik des löslichen proteolytischen Assays. Der Abbau der Alpha-1-Bande wurde densitometrisch quantifiziert, wobei als 100 % diejenige Menge definiert wurde, die eine entsprechende Kontrolle ohne DPP IV aufwies. 0 % entspricht einem Ansatz ohne Kollagen. Die gezeigten Werte stellen Mittelwerte aus drei separaten Experimenten dar, wobei die Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert durchgehend kleiner als 10 % war.

3.4.6 Einfluss von Inhibitoren auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität

Um das aktive Zentrum der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität näher zu charakterisieren, wurden dem löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV verschiedene Inhibitoren zugesetzt.

3.4.6.1 Diprotin A und B

Diprotin A (H-Ile-Pro-Ile-OH) und Diprotin B (H-Val-Pro-Leu-OH) sind Tripeptide, die als spezifische kompetitive Inhibitoren der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität gelten (Umezawa et al. 1984). Um den Einfluss von Diprotin A und B auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität zu untersuchen, wurde der lösliche proteolytische Assay mit verschiedenen Konzentrationen von Diprotin A und B durchgeführt. Wie Abb. 22 zeigt, wurde mit zunehmender Konzentration von Diprotin A weniger Gelatin verdaut. Diprotin A inhibiert also auch die Endopeptidase-Aktivität der DPP IV. Für Diprotin B ergab sich ein ähnliches Ergebnis (ohne Abb.).

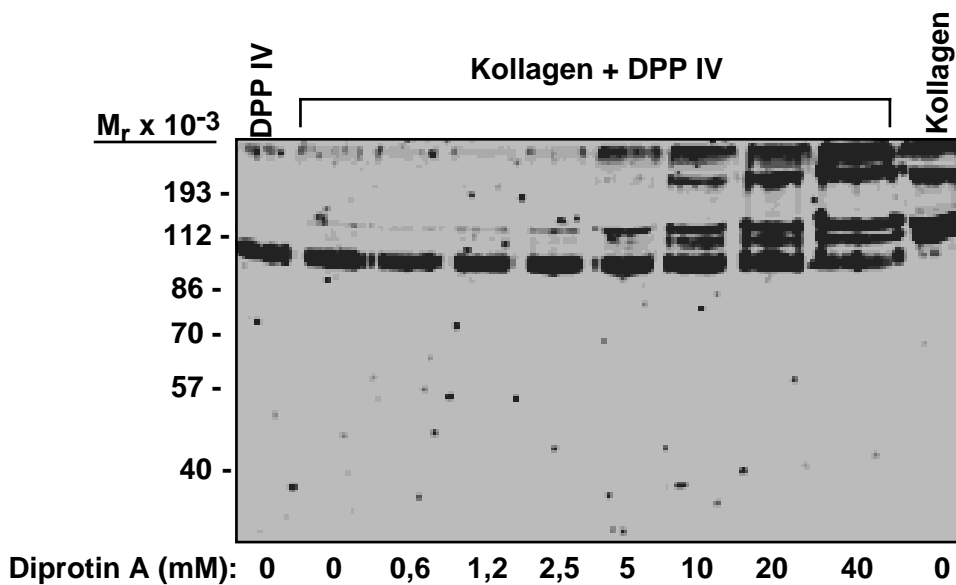


Abb. 22: Verwendung verschiedener Konzentrationen von Diprotin A im löslichen proteolytischen Assay mit DPP IV.

3.4.6.2 Aspartat-, Cystein-, Metallo- und Serinpeptidase-Inhibitoren

Um eine größere Anzahl von Inhibitoren auf ihre Wirkung auf die DPP IV-Endopeptidase-Aktivität untersuchen zu können, wurde bei den weiteren Versuchen auf Verdünnungsreihen verzichtet. Stattdessen wurde nur eine Inhibitorkonzentration eingesetzt, die so hoch gewählt wurde, dass eine Hemmung eintreten musste, sofern die Substanz eine spezifische inhibitorische Wirkung auf die DPP IV-Aktivität ausübte. Die Spaltansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie-Blau gefärbt und densitometrisch ausgewertet. Eine Gelatinkontrolle ohne DPP IV wurde dabei als 0 %, ein Spaltansatz ohne Inhibitor als 100 % definiert, so dass die DPP IV-Aktivität in Prozent ausgedrückt wurde. Zum Vergleich wurde auch die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität der jeweiligen Ansätze bestimmt. Dafür wurde das Substrat Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-tosylat verwandt.

Das Inhibitionsprofil von Endo- und Exopeptidase-Aktivität der DPP IV stimmte weitgehend überein (Tab. 2). Beide wurden sowohl durch Diprotin A und B (jeweils 13 mM) als auch durch die Serinpeptidase-Inhibitoren Diisopropylfluorophosphat (DFP) (0,6 mM) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (9 mM) gehemmt, wobei PMSF erst in einer sehr hohen Konzentration einen deutlichen inhibitorischen Effekt zeigte. Im Gegensatz dazu wurde weder die Endo- noch die Exopeptidase-Aktivität der DPP IV beeinflusst durch den Aspartatpeptidase-Inhibitor Pepstatin (10 g/l), den Metallopeptidase-Inhibitor Phenanthrolin (6 mM) und die Cysteinpeptidase-Inhibitoren Iodacetamid (10 mM), Leupeptin (10 g/l) und N-Ethylmaleimid (NEM) (1 mM). Auch Tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon (TPCK) (10 mM) und Aprotinin zeigten keine signifikante Wirkung auf Endo- oder Exopeptidase-Aktivität, während SDS (10 g/l) beide Aktivitäten komplett inhibierte. Allein Dithiothreitol (DTT) (3 mM) wirkte unterschiedlich auf Endo- und Exopeptidase-Aktivität der DPP IV. Während es die Exopeptidase-Aktivität kaum beeinflusste, reduzierte es die Endopeptidase-Aktivität etwa auf die Hälfte. Die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität wurde durch die Anwesenheit von denaturiertem Kollagen und dessen Spaltprodukten nicht beeinflusst.

Tabelle 2: Wirkung verschiedener Typen von Peptidase-Inhibitoren auf die Endo- und Exopeptidase-Aktivität der DPP IV. Die Werte der DPP IV-Endopeptidase-Aktivität wurden mit Hilfe des löslichen proteolytischen Assays und anschließender densitometrischer Quantifizierung der Alpha-1-Bande ermittelt. Die DPP IV-Exopeptidase-Aktivität wurde gemessen, indem Aliquots der Spaltansätze nach 1 und 80 h dem Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-Assay zugeführt wurden. Die Mittelwerte aus beiden Messungen sind aufgeführt. Als 100 % wurde die DPP IV-Aktivität definiert, die ohne Peptidase-Inhibitor bestimmt wurde. Die gezeigten Werte stellen Mittelwerte aus drei separaten Experimenten dar.

Peptidaseinhibitor (Konzentration)	Endopeptidase- aktivität	Exopeptidase- aktivität
Kontrolle	100,0 %	100,0 %
<u>Aspartat-</u>		
Pepstatin (10 g/l)	95,8 %	91,0 %
<u>Cystein-</u>		
Iodacetamid (10 mM)	101,9 %	94,0 %
Leupeptin (10 g/l)	88,8 %	89,6 %
N-Ethylmaleimid (1 mM)	103,1 %	87,4 %
<u>Metallo-</u>		
1,10-Phenanthrolin (6 mM)	70,7 %	71,9 %
<u>Serin-</u>		
Diisopropylfluorophosphat (0,6 mM)	10,8 %	1,1 %
Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM)	85,8 %	84,4 %
Phenylmethylsulfonylfluorid (9 mM)	14,2 %	12,2 %
Aprotinin (10 g/l)	88,8 %	88,5 %
<u>DPP IV-spezifisch</u>		
Diprotin A (13 mM)	10,5 %	14,3 %
Diprotin B (13 mM)	38,6 %	51,2 %
<u>Andere</u>		
10 g/l Natriumdodecylsulfat	0,1 %	1,2 %
Tosyl-L-phenylalanin- chlormethylketon (10 mM)	90,8 %	102,9 %
Dithiothreitol (3 mM)	51,6 %	84,0 %

3.5 Untersuchungen zum DPP IV-Defizit deutscher Fischer-344-Ratten

Nachdem eine DPP IV-Endopeptidase-Aktivität mit Spezifität für denaturiertes fibrilläres Kollagen nachgewiesen und charakterisiert worden war, sollte untersucht werden, ob sich kollagenes Bindegewebe DPP IV-defizienter Fischer-344-Ratten immunhistochemisch vom Gewebe gewöhnlicher Wistar-Ratten unterscheidet. Da nicht alle Fischer-344-Ratten-Stämme DPP IV-negativ sind (Thompson 1991), mussten die gelieferten deutschen Fischer-344-Ratten zunächst auf ihr DPP IV-Defizit überprüft werden.

3.5.1 Die DPP IV-Expression in Wistar- und Fischer-Ratten

3.5.1.1 Analyse der Con A-Eluate des Nierenrinden-Rohmembran-Solubilisats

Je ein paar Nieren von Fischer- und Wistar-Ratte wurden entmarkt, homogenisiert, solubilisiert und der Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose unterzogen. Die Con A-Eluate wurden in reduzierendem Probenpuffer aufgekocht, durch SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Wie Abb. 23a zeigt, fehlte im Con A-Eluat der Fischer-Ratte die 105 kD-Bande, die bei der Wistar-Ratte als denaturierte monomere Form der DPP IV identifizierbar ist. Entsprechend betrug die spezifische Exopeptidase-Aktivität des Con A-Eluats der Fischer-Ratte nur 11 mU/mg, während für die Wistar-Ratte ein Wert von 4265 mU/mg ermittelt wurde (Abb. 23b). Abgesehen von der 105 kD-Bande, die nur bei der Wistar-Ratte nachweisbar war, zeigten die Con A-Eluate ähnliche Bandenmuster.

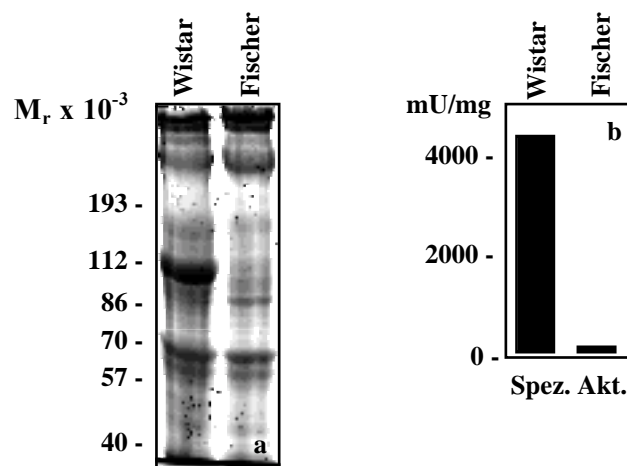


Abb. 23: Vergleich der Con A-Eluate von Fischer- und Wistar-Ratte. a) Je 50 µg Con A-Eluat des Nierenrinden-Rohmembran-Solubilisats von Fischer- und Wistar-Ratte wurden durch SDS-PAGE (7,5%) unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. b) Die Spezifische Aktivität der Con A-Eluate wurde mit dem Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-Assay und der BCA-Methode zur Proteinbestimmung ermittelt.

3.5.1.2 Enzymhistochemie

Auf Gefrierschnitten wurde enzymhistochemisch die Expression der DPP IV in Niere, Leber und Sehne von Wistar- und Fischer-Ratten untersucht. Dazu wurde das Exopeptidase-Substrat Glycyl-prolyl-methoxy-2-naphthylamid eingesetzt, als Kopplungsreagenz diente Fast-Blue B. Wie Abb. 24 zeigt, fand sich bei der Wistar-Ratte eine dunkelrote Reaktion in den proximalen Tubuli und Glomerula der Niere sowie in der Leber am basalen Pol der Hepatozyten. Aber auch in der Sehne der Wistar-Ratte zeigte sich eine deutliche DPP IV-Aktivität. Bei der Fischer-Ratte dagegen erfolgte in allen drei Geweben keine Anfärbung. Bei den untersuchten deutschen Fischer-344-Ratten kann also von einem DPP IV-Defizit ausgegangen werden.

3.5.2 Immunhistochemie

An Gefrierschnitten von Niere, Leber und Sehne wurde immunhistochemisch die Verteilung kollagenen Bindegewebes in Wistar- und Fischer-Ratten untersucht. Der Nachweis erfolgte mit Immunfluoreszenz unter Einsatz von polyklonalen Antikörpern gegen Typ I-Kollagen. Wie aus Immunblots bekannt (ohne Abb.), erkennen diese Antikörper offensichtlich auch andere fibrilläre Kollagentypen, was wohl auf die strukturelle Ähnlichkeit der fibrillären Kollagene zurückzuführen ist. In Niere (Abb. 25 a und b) und Sehne (ohne Abb.) stimmten Verteilung und Intensität der Immunfluoreszenz zwischen Wistar- und Fischer-Ratte weitgehend überein. In der Leber (Abb. 25 c,d,e,f) stellten sich dagegen bei der Fischer-Ratte deutlich faserartige Strukturen dar, bei denen es sich wahrscheinlich um retikuläre Fasern im Disse'schen Raum handelt, die bei der Wistar-Ratte nur vereinzelt sichtbar waren. Offensichtlich liegen retikuläre Fasern im Disse'schen Raum von DPP IV-negativen Ratten vermehrt vor, was auf einen verminderten Abbau bei fehlender DPP IV-Endopeptidase-Aktivität zurückgeführt werden könnte.

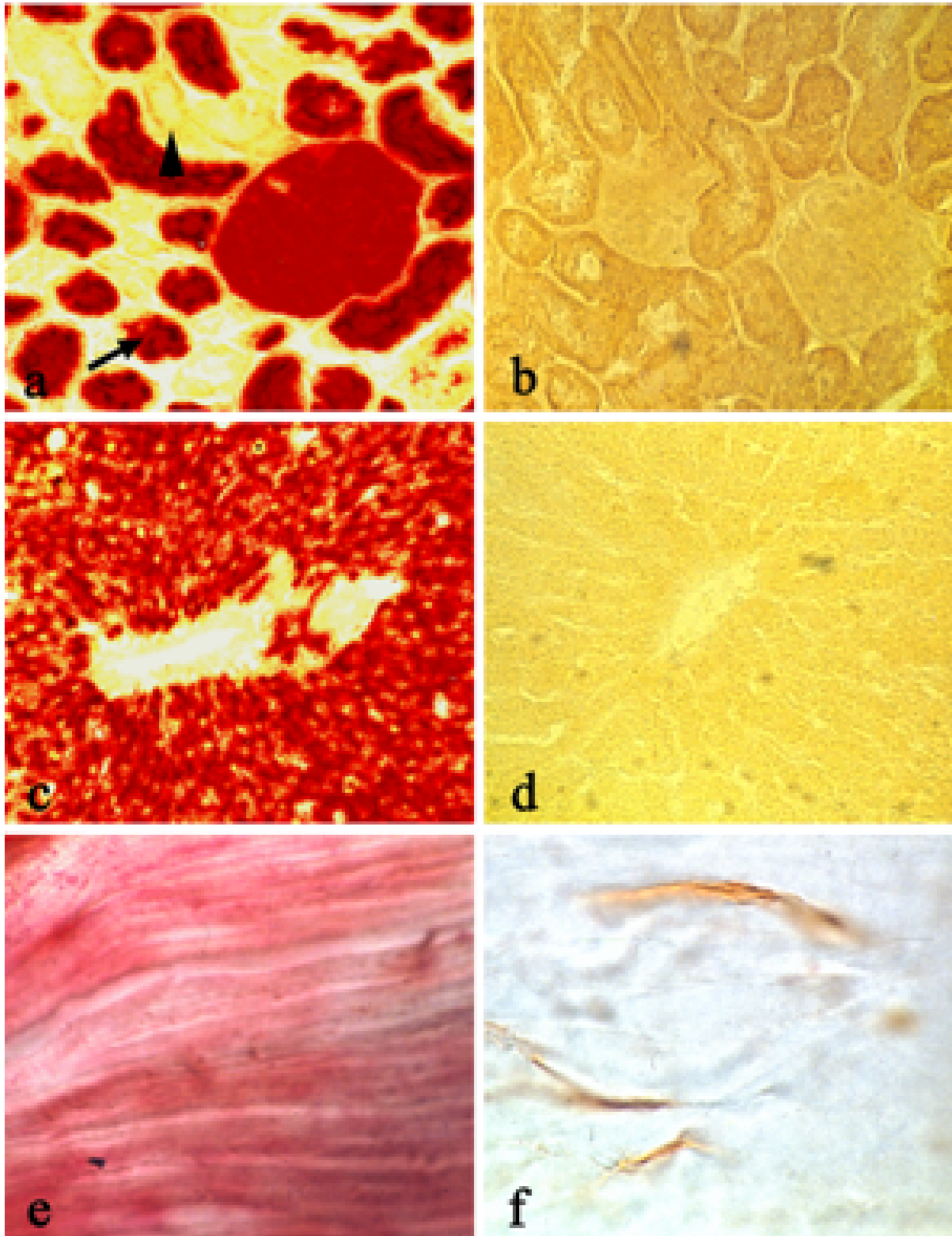


Abb. 24: Verteilung der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität in Wistar- (a,c,e) und Fischer-344-Ratte (b,d,f). Enzymhistochemischer Nachweis an Gefrierschnitten mit dem Substrat Glycyl-prolyl-methoxy-2-naphthylamin:

a) und b) Niere. In der Wistar-Ratte findet sich DPP IV im proximalen Tubulus (Pfeil), nicht jedoch im distalen Tubulus (Pfeilspitze). Vergrößerung 20fach.

c) und d) Leber mit Zentralvene. Vergrößerung 20fach.

e) und f) Sehne. Vergrößerung 100fach.

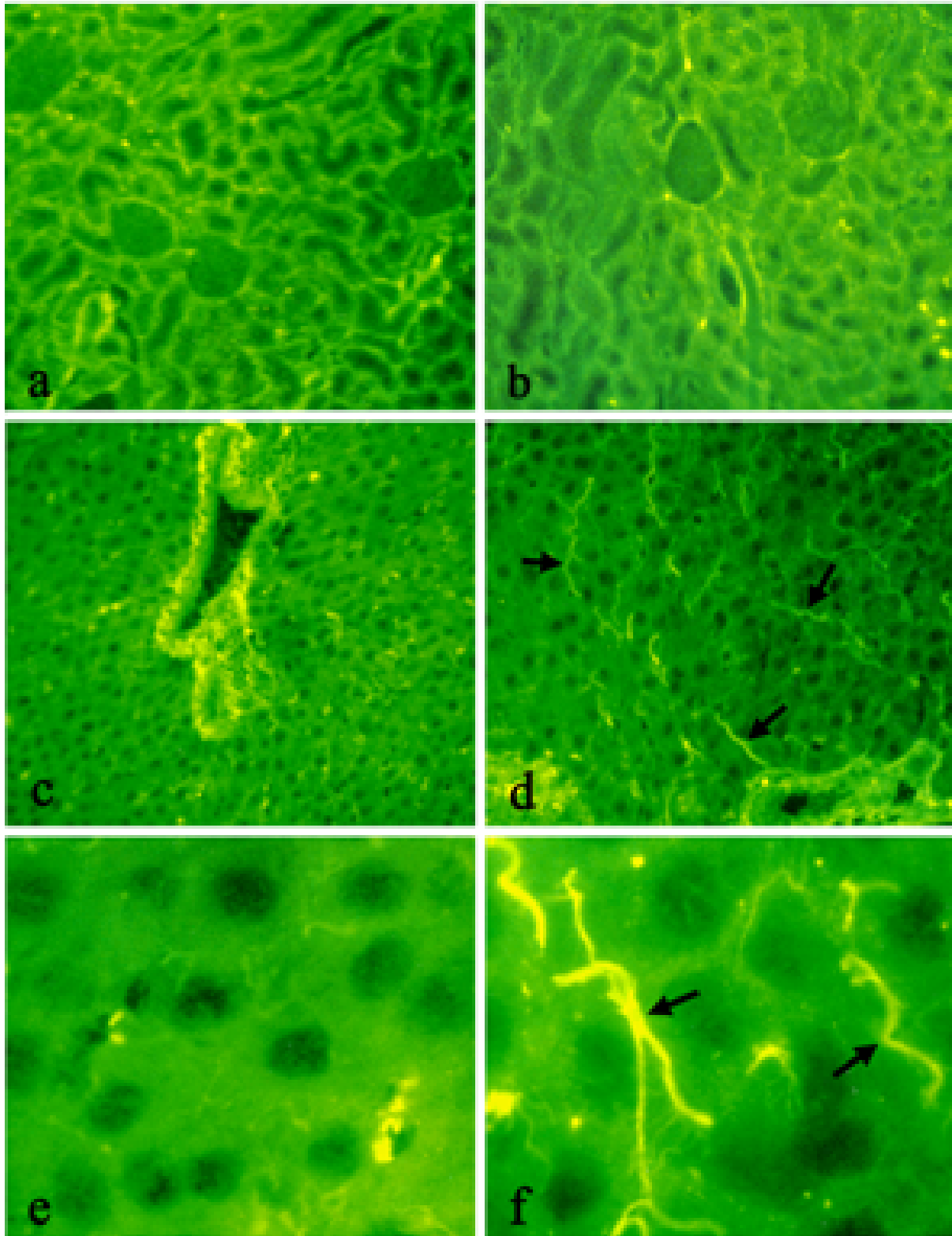


Abb. 25: Verteilung des kollagenen Bindegewebes in Wistar- (a,c,e) und Fischer-344-Ratte (b,d,f). Nachweis mit Immunfluoreszenz (polyklonaler Antikörper gegen Kollagen I):
a) und b) Niere. Vergrößerung 10fach.
c) und d) Leber. Die Pfeile zeigen Kollagenfasern im Disse'schen Raum bei der Fischer-344-Ratte. Vergrößerung 20fach
e) und f) Leber. Die Pfeile zeigen Kollagenfasern im Disse'schen Raum bei der Fischer-344-Ratte. Vergrößerung 100fach.