

1 Einleitung

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)/CD26 wurde erstmals von Hopsu-Havu und Glenner als „Glycyl-Prolyl-Naphthylamidase“ beschrieben (Hopsu-Havu & Glenner, 1966). Als Exopeptidase spaltet sie Dipeptide mit der Sequenz X-Pro oder X-Ala vom aminoterminalen Ende von Peptiden oder Proteinen ab. Das Enzym wurde später aufgrund dieser Eigenschaft Dipeptidylpeptidase IV oder Dipeptidylaminopeptidase IV genannt (Callahan et al., 1972; Kenny et al., 1976). DPPIV/CD26 ist eine Serinprotease aus der Klasse der Exopeptidasen (EC 3.4.14.5). Eine Endopeptidaseaktivität in Form einer Gelatinaseaktivität im selben aktiven Zentrum wird kontrovers diskutiert (Kenny et al., 1976; Bempohl et al., 1998;). Die DPPIV/CD26 kommt im Tierreich weit verbreitet vor. In Säugetieren ist sie ubiquitär, besonders jedoch auf den epithelialen und endothelialen Zelloberflächen verteilt (Gossrau, 1985). Durch Wechselwirkung von Hepatozyten mit der extrazellulären Matrix wurden Hinweise auf eine Beteiligung der DPPIV/CD26 im Zelladhäsionsprozess gefunden. Das betrifft die Bindung von DPPIV/CD26 an Kollagen bzw. Fibronectin (Hanski et al., 1985; Bauvois, 1988; Hanski et al., 1988; Piazza et al., 1989). Im Jahr 1990 wurde der T-Zell-Aktivierungsmarker CD26 als DPPIV identifiziert (Hegen et al., 1990; Dang et al., 1991). Mit der Aufklärung der Primärstruktur konnte bewiesen werden, dass das in Tieren gefundene Enzym mit dem humanen T-Zell-Aktivierungsmarker CD26 identisch ist (Misumi et al., 1992; Tanaka, 1993), der eine Bedeutung bei der Aktivierung von T-Lymphozyten hat (Ansorge & Schön, 1987; Schön et al., 1987; Knapp et al., 1989; Tanaka et al., 1993). Dabei führt DPPIV/CD26 durch die Interaktion mit der Protein-Tyrosinphosphatase CD45 zu einer Aktivierung der Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) und einer Reihe weiterer Signaltransduktionskomponenten, wie z. B. der ζ -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR), dem $p56^{\text{lac}}$ und $p59^{\text{fyn}}$ der src-Tyrosinkinase-Familie, dem ZAP-70 der syk-Tyrosinkinase-Familie, sowie der Phospholipase $C\gamma$ (PLC γ) (Torimoto et al., 1991; Hegen et al., 1997; von Bonin et al., 1998; Huhn et al., 2000). Eine weitere Bedeutung kommt der DPPIV/CD26 als Rezeptor der Adenosindesaminase (ADA) zu (Kameoka et al., 1993; De Meester et al., 1994), die Adenosin irreversibel zu Inosin abbaut. Adenosin hemmt die Lymphozytenproliferation. Das hereditäre Fehlen der ADA führt zu dem generalisierten Immundefekt SCIDS (severe combined immunodeficiency syndrome). Durch die Wechselwirkung der DPPIV/CD26 mit der ADA und CD45 ist das Protein an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Aufgrund ihrer Exopeptidaseaktivität, der vielfältigen Wechselwirkungen und der ubiquitären Lokalisation entspricht die DPPIV/CD26 einem multifunktionellen Protein (Abbildung 1) (Dong et al., 1997).

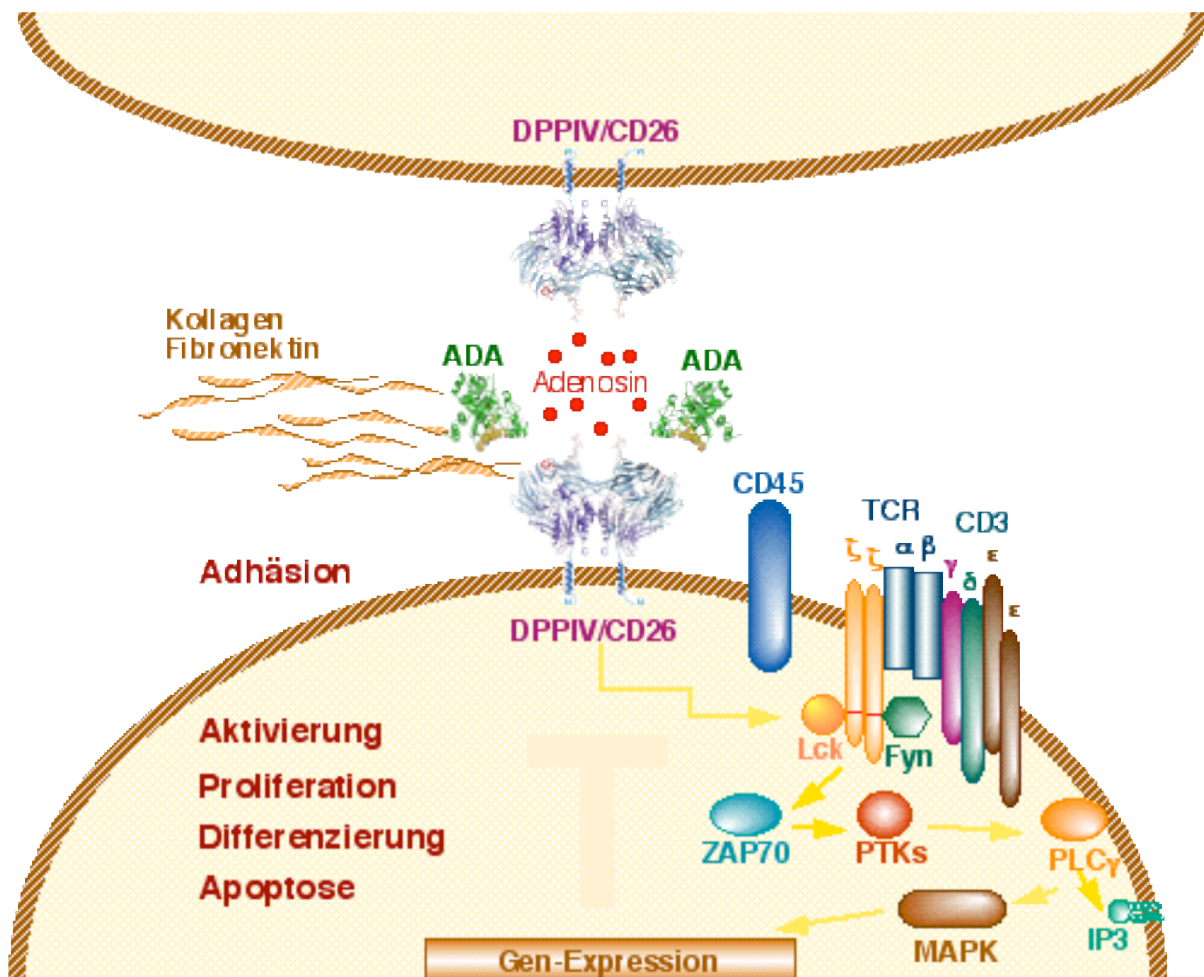


Abbildung 1: DPPIV/CD26 ist ein multifunktionelles Membranglykoprotein. Es wird als ein Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert.

1.1 Vorkommen und Verteilung der Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)/CD26

Die DPPIV/CD26 wurde erst aus Leber und Nieren von Ratten isoliert, tritt jedoch auch in einer Vielzahl von anderen Geweben auf (Hartel-Schenk et al., 1990; Hildebrandt et al., 1991). In der Leber findet sich die DPPIV/CD26 vornehmlich am Gallenpol der Hepatozyten und in der luminalen Membran der Gallengangsepithelzellen. In der Niere findet sich dieses Enzym hauptsächlich in der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen. In der Lunge beschränkt sich die Expression der DPPIV/CD26 auf Alveolarmakrophagen und das Interstitium; die Auskleidung der Luftwege und der Alveolen weist keine DPPIV/CD26-Aktivität auf (Hartel et al., 1988; Hartel et al., 1988; Matsumoto et al., 1992). Eine ebenfalls luminal orientierte DPPIV/CD26 findet sich in Endothelien auf (Mentlein & Heymann, 1982). Das Enzym findet sich weiterhin in den A-Zellen des Pankreas in sekretorischen Granula (Grondin et al., 1999). Eine DPPIV/CD26-Expression befindet sich zusätzlich in der Membran nicht polarisierter Zellen wie Fibroblasten (Bauvois, 1988; Atherton et al., 1992).

Die DPPIV/CD26 kommt auch auf Lymphozyten vor. Sie wird vornehmlich auf T-Zellen exprimiert. Eine erhöhte Expression der DPPIV/CD26 wurde nach der T-Zell-Aktivierung beschrieben (Mentlein et al., 1984; Mentlein et al., 1986; Fleischer, 1987; Schön et al., 1987).

In der Endometriumschleimhaut und dem Ovar unterliegt die Expression der DPPIV/CD26 einer zyklusabhängigen Regulation (Fujiwara et al., 1992). Auch in der Plazenta findet sich eine deutlich nachweisbare DPPIV/CD26-Aktivität, die im Verlauf der Schwangerschaft ansteigt (Nausch et al., 1990; Imai et al., 1994). In der Brustdrüse der Frau enthielten nur die intralobulären Fibroblasten DPPIV/CD26 (Atherton et al., 1992). Eine Beschränkung der DPPIV/CD26-Expression auf die epithelialen Anteile findet sich in der Prostata; in den Fibroblasten des Stromas ließ sich die DPPIV/CD26 nicht nachweisen (Bogenrieder et al., 1997).

Im Gegensatz zu der membranständigen Expression der DPPIV/CD26 in den bisher beschriebenen Zell- und Gewebetypen wurde auch eine lösliche Form der DPPIV/CD26 beschrieben, insbesondere im Serum, aber auch in anderen Körperflüssigkeiten (Hartel et al., 1988; Iwaki-Egawa et al., 1998).

1. 2 Enzymatische Aktivität, Substrate und damit verbundene biologische Prozesse der DPPIV/CD26

Als Exopeptidase spaltet DPPIV/CD26 Dipeptide vom N-terminalen Ende eines Oligo- oder Polypeptides, welches Prolin an vorletzter Stelle seines N-Terminus trägt, ab (Hopsu-Havu & Glenner, 1966; Barth et al., 1974; Wolf et al., 1978). Wird Prolin N-terminal an vorletzter Position durch Alanin ersetzt, so verringert sich die Spaltungsgeschwindigkeit des Exopeptidasezentrums. Nur in ganz geringem Ausmaß werden Dipeptide von N-Termini mit Serin, Glycin, Leucin, Threonin oder Valin an vorletzter Position abgespalten (Demuth et al., 1989; Martin et al., 1993; Demuth & Heins, 1995).

Aufgrund der hohen Spezifität der DPPIV/CD26 gibt es eine Reihe potentieller bioaktiver Substrate, die durch Prolin-Zyklisierung am N-Terminus vor unspezifischer proteolytischer Spaltung geschützt und durch die Spaltung durch DPPIV/CD26 inaktiviert bzw. aktiviert werden (Vanhoof et al., 1995; Mentlein, 2004). Zu den Substraten zählen Peptidhormone, Neuropeptide, Chemokine, Zytokine und weitere bioaktive Substanzen (De Meester et al., 1999; Mentlein, 1999; Lambeir et al., 2003), die in der Tabelle 1 aufgelistet werden.

In vivo-Substrate, die in der Familie der Peptidhormone gefunden wurden, sind GIP (glucose dependent insulinotropic polypeptide), GLP-1 und GLP-2 (glucagon like peptide) (Mentlein et al., 1993; Kieffer et al., 1995; Drucker et al., 1997; Lambeir et al., 2002). GIP und GLP werden als Antwort auf eine erhöhte Kohlenhydratkonzentration im Darm freigesetzt und stimulieren die Ausschüttung von Insulin; sie werden durch die DPPIV/CD26 inaktiviert. Ein weiteres Peptidhormon, welches von DPPIV/CD26 inaktiviert wird, ist das hypothalamische GRH (growth hormone releasing hormone) (Frohman et al., 1989; Bongers et al., 1992). Zu den vasoaktiven Peptidhormonen, die von der DPPIV/CD26 gespalten werden, gehören die Neuropeptide Y (PY) und YY (PYY) (Mentlein et al., 1993; Mentlein, 1999). Der Abbau von PYY (1-36) zu PYY (3-36) verändert die Rezeptorspezifität des Hormons (Grandt et al., 1993). Des Weiteren wird *in vivo* die Substanz P während ihrer Zirkulation im Blut durch die DPPIV/CD26 gespalten. Das Neuropeptid reguliert die lokale Vaskularisierung. Die Spaltung der Substanz P (1-11) zur Substanz P (3-11) und anschließend zur Substanz P (5-11) durch DPPIV/CD26 führte zu einem raschen Abbau des Peptides durch eine weitere Plasma-peptidase: Aminopeptidase M (Heymann & Mentlein, 1978; Ahmad et al., 1992). Hemmung der DPPIV/CD26-Enzymaktivität führt zu einer Gefäßerweiterung, erhöht den Blutfluss im Skelettmuskel und vermindert den durch Substanz P bedingten Gefäßwiderstand (Russell et al., 1996). Auch das Processing der Substanz P durch DPPIV/CD26 spielt eine Rolle bei der Modulierung der Wirkung der Substanz P auf die T-Zell-Funktion (Covas et al., 1997). Die Neuropeptide VIP (vasoaktives intestinales Peptid), PACAP (pituitary adenylyl cyclase-activating peptide), GRP (gastrin releasing peptide) (Lambeir et al., 2001), β -Casomorphin (Kreil et al., 1983; Kikuchi et al., 1988) und Endomorphin-2 (Shane et al., 1999) stellen weitere mögliche Substrate der DPPIV/CD26 dar. β -Casomorphin gehört zu der Familie der exogenen Opioidpeptide und hat eine Wirkung auf die Entwicklung des Nervensystems. Die Stimulationswirkung des β -Casomorphins-5 erfolgt durch die Bindung an die G-Proteingekoppelten Mikro-Opioid-Rezeptoren. Es wird durch Spaltung durch DPPIV/CD26 inaktiviert (Sakaguchi et al., 2003). Endomorphin-2 ist ein Tetrapeptid, es besitzt eine hohe Affinität zu den Mu-Opioid-Rezeptoren und dämpft dadurch die Schmerzen (Analgesie). Nach der Proteolyse durch DPPIV/CD26 verliert das Neuropeptid seine Wirkung (Shane et al., 1999).

Als natürliche Substrate der DPPIV/CD26 mit immunologischer Funktion konnten kürzlich die Chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) (Oravecz et al., 1997), SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1) (Proost et al., 1998; Shioda et al., 1998), Eotaxin (Struyf et al., 1999), LD78 β (Proost et al., 2000), MIP-1 β (macrophage

inflammatory protein-1 β) (Guan et al., 2004), MCP-2 (monocyte chemotactic protein-2), IP-10 (Interferon-Inducible Protein 10) und MDC (macrophage-derived chemokine) identifiziert werden (De Meester et al., 1999; Lambeir et al., 2001). Eotaxin, MDC und SDF-1 α werden durch die DPPIV/CD26 inaktiviert. Im Falle von RANTES führt die Abspaltung der ersten zwei Aminosäuren (Ser-Pro) nicht zu einer völligen Inaktivierung. Es geht zwar die Bindung zum Chemokinrezeptor CCR1 verloren, doch behält das prozessierte Chemokin RANTES (3-68) immer noch die Bindung zum Chemokinrezeptor CCR5, und es kommt zu einer Erhöhung der Anti-HIV-1-Kapazität (Oravec et al., 1997; Proost et al., 1998). Auch eine Reihe von Cytokinen tragen N-terminale Sequenzen, die eine Proteolyse durch die DPPIV/CD26 *in vitro* nahe legen. Dazu zählen IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , TNF- β und der Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor (G-CSF), bei denen diese Proteolyse *in vivo* aber nicht bestätigt werden konnte (Hoffmann et al., 1993). Ein weiteres potentielles Substrat ist die α -Kette des Fibrins. *In vitro* konnte eine Spaltung des N-Terminus der Fibrin- α -Kette beobachtet werden, die eine Vernetzung des Fibrins verhinderte. Ein antikoagulatorischer Effekt der DPPIV/CD26 *in vivo* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Mentlein & Heymann, 1982).

Wesentliche biologische Funktionen, die der DPPIV/CD26 zugeschrieben werden, stehen möglicherweise im Zusammenhang mit ihrer proteolytischen Aktivität. Im Lauf der mittlerweile jahrzehntelangen Forschung zur physiologischen Bedeutung der DPPIV/CD26 ergaben sich Hinweise auf ihre Mitwirkung an so unterschiedlichen Prozessen wie enterale Proteinresorption, renale Peptidrückgewinnung, Regulation der Insulinproduktion, Chemotaxis von Monozyten, Blutgerinnung, Blutdruckregulation, perinatale Schmerzempfindung, Speichelsekretion, Ovulation, Wundheilung und Immunregulation.

Tabelle 1: Bioaktive Peptide als Substrate der Dipeptidylpeptidase IV

Peptide	N-Terminus	AS	Analyse	Effekt
Peptidhormone				
GRH (1-44)	Tyr-Ala-Asp-Ala-	44	<i>in vitro</i>	Inaktivierung
GIP	Tyr-Ala-Glu-Gly-	42	<i>in vitro, in vivo</i>	Inaktivierung
GLP-1	His-Ala-Glu-Gly-	30	<i>in vitro, in vivo</i>	Inaktivierung
GLP-2	His-Ala-Asp-Gly-	33	<i>in vitro</i>	Inaktivierung
PHM	His-Ala-Asp-Gly	27	<i>in vitro</i>	Inaktivierung
Enterostatin	Val-Pro-Asp-Pro-Arg	5	<i>in vitro</i>	Inaktivierung
Chemokine				
RANTES	Ser-Pro-Tyr-Ser-	68	<i>in vitro</i>	Inaktivierung für CCR1, CCR3 aber nicht für CCR5 Steigerung der anti-HIV-Aktivität
GCP-2	Gly-Pro-Val-Ser-	73	<i>in vitro</i>	keine
SDF-1 α	Lys-Pro-Val-Ser-	68	<i>in vitro</i>	Inaktivierung für CXCR4
SDF-1 β	SDF-1 β	72	<i>in vitro</i>	Inaktivierung für CXCR4
MDC	Gly-Pro-Tyr-Gly-	69	<i>in vitro</i>	Inaktivierung für CCR4
MCP-2	Gln-Pro-Asp-Ser-	76	<i>in vitro</i>	Inaktivierung
Eotaxin	Gly-Pro-Ala-Ser-	74	<i>in vitro, in vivo</i>	Inaktivierung für CCR3
IP-10	Val-Pro-Leu-Ser-	77	<i>in vitro</i>	Unbekannt
LD78 β	Ala-Pro-Leu-Ala-	70	<i>in vivo</i>	Steigerung der Chemotaxis- Aktivität für CCR5 und anti-HIV- Aktivität
MIP-1 β	Ala-Pro-Met-Gly-	69	<i>in vivo</i>	Steigerung der Chemotaxis- Aktivität für CCR1, 2 und 5.
Neuropeptide				
Tyr-melanostatin	Tyr-Pro-Leu-Gly	4	<i>in vitro</i>	Inaktivierung
Endomorphin 2	Tyr-Pro-Phe-Phe	4	<i>in vivo</i>	Inaktivierung
β -Casomorphin	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-	5-9	<i>in vivo</i>	Inaktivierung
Substanz P	Arg-Pro-Lys-Pro-	11	<i>in vitro, in vivo</i>	unklar
Gastrin-Releasing-Peptide	Val-Pro-Leu-pro-Ala-	27	<i>in vivo</i>	keine
Neuropeptide Y	Tyr-Pro-Ser-Lys-	36	<i>in vitro,</i>	Inaktivierung für Y1-Rezeptor
Peptide YY	Tyr-Pro-Ile-Lys-	36	<i>in vitro</i>	Inaktivierung zum Y1-Rezeptor

Abkürzung: AS: Menge der Aminosäurereste. GRH (growth hormone-releasing hormone); GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide); GLP (glucagon-like peptide); PHM (peptide histidine methionine); RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted); SDF (stromal cell-derived factor); MIP (macrophage inflammatory protein); MDC (macrophage-derived chemokine); GCP (granulocyte chemotactic protein); IP (interferon-inducible protein 10), MCP (monocyte chemotactic protein); PACAP (pituitary adenyl cyclase-activating peptide); GRP (gastrin-releasing peptide).

Tabelle enthält Angaben von MENTLEIN (Mentlein, 1999), De MEESTER (De Meester et al., 1999) und HILDEBRANDT (Hildebrandt et al., 2000), modifiziert.

1.3 Dipeptidylpeptidase IV/CD26 als Zelladhäsionsmolekül

Es konnte gezeigt werden, dass die DPPIV/CD26 neben ihrer katalytischen Exopeptidaseaktivität eine hohe Affinität zu den Matrixproteinen wie Fibronectin und Kollagen besitzt (Hanski et al., 1985; Bauvois, 1988; Piazza et al., 1989), wobei die physiologische Bedeutung dieser Wechselwirkung noch nicht eindeutig geklärt ist. So wurde bewiesen, dass DPPIV/CD26 die Adhäsion von Ratten-Hepatocyten auf einer Kollagenmatrix initiiert. Die Ausbreitung von Hepatozyten auf nativem Kollagen kann durch Anti-DPPIV/CD26-Antikörper verhindert werden. Mit dem in unserer Arbeitsgruppe erzeugten monoklonalen Antikörper 13.4 wird die Bindung von löslicher DPPIV/CD26 an Kollagen I stark gehemmt, während weder Substrate noch Inhibitoren der DPPIV/CD26 diese Interaktion beeinträchtigen können (Hanski et al., 1985; Hanski et al., 1988). Offenbar ist die Bindung der DPPIV/CD26 mit Kollagen von der enzymatischen Aktivität der DPPIV/CD26 unabhängig. Unterschiedliche Affinitäten der DPPIV/CD26 zu verschiedenen Kollagentypen wurden beschrieben. Die beste Bindung erfolgt an Kollagen I und III, besonders an die $\alpha 1(I)$ -Kette des Kollagens I. Die Bindung zu Kollagen II, IV und V ist etwas schwächer, und die Bindung zu Kollagen VI ist sehr schwach (Löster et al., 1995).

Piazza (1989) berichtete von einer direkten Interaktion der Ratten-DPPIV/CD26 mit Fibronectin und geht von einer Bindungsstelle außerhalb des aktiven Zentrums aus (Piazza et al., 1989). Cheng (1998) vermutete eine klinische Relevanz der DPPIV/CD26 auf Lungenkapillaren als Zelladhäsionsmolekül für metastatische Brustkrebszellen (Cheng et al., 1998). Nach Applikation von löslicher DPPIV/CD26 wurde eine Verringerung der Adhäsion von Ratten-Brustkrebszellen an endothelialer DPPIV/CD26 in der Lunge um bis zu 80 % beschrieben (Abdel-Ghany et al., 1998), sodass ein Mechanismus durch Interaktion zwischen der DPPIV/CD26 und Fibronectin für die Tumorzelladhäsion und Lungenmetastasierung vermutet wird (Cheng et al., 1999; Cheng et al., 2003; Kajiyama et al., 2003). Auch andere Autoren beobachteten, dass DPPIV/CD26 eine Rolle als Zelladhäsionsmolekül von zirkulierenden, metastasierenden Tumorzellen spielt (Johnson et al., 1993).

Es wurde diskutiert, ob DPPIV/CD26 als ein funktioneller Rezeptor für Kollagen zur Aktivierung von $CD4^+$ -T-Lymphozyten dient (Dang et al., 1990; Shimizu & Shaw, 1991) (Mattern et al., 1998). In dieser Hinsicht wurde propagiert, dass die Aktivierung von $CD4^+$ -T-Zellen durch Kollagen vermittelt wird und DPPIV/CD26 als Kollagen-Bindungspartner an dieser Interaktion unterstützend beteiligt ist (Dang et al., 1990). Im Unterschied zur

Unempfindlichkeit der Kollagenbindung gegenüber Inhibitoren der Enzymaktivität ist dagegen die DPPIV/CD26-abhängige, Kollagen-kostimulierte T-Zell-Aktivierung durch DPPIV-Substrate hemmbar (Dang et al., 1990). Eine weitere mögliche klinische Rolle der DPPIV/CD26 als Zelladhäsionsmolekül und Immunmodulator wird bei Osteoarthritis-Patienten vermutet (Lapadula et al., 1995).

1.4 DPPIV/CD26 im Immunsystem

DPPIV/CD26 wird vorwiegend auf aktivierten T- und B-Lymphozyten sowie in geringeren Mengen auf Makrophagen und NK-Zellen exprimiert (Fox et al., 1984; Mentlein et al., 1984; Scholz et al., 1985). Die DPPIV/CD26-Expression auf humanen T-Zellen erscheint erst spät während der Differenzierung im Thymus (Morimoto & Schlossman, 1998). Sie 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 (Fleischer, 1987; Dang et al., 1990; Schön & Ansorge, 1990; Flentke et al., 1991; Munoz et al., 1992). Eine besonders hohe Expression der DPPIV/CD26 wird auf den Th1/ThO-Subpopulationen gefunden. Th2-Lymphozyten zeigen dagegen eine niedrige DPPIV/CD26-Expression (Willheim et al., 1997). Die verstärkte Expression auf aktivierten Lymphozyten ließ schon früh auf ihre Funktion bei der T-Zell-Aktivierung schließen (Kähne et al., 1998; Morimoto & Schlossman, 1998; Iwata et al., 1999).

Die Bindung eines Antigens an den T-Zellrezeptor TCR/CD3 ist nötig, aber nicht ausreichend zur Aktivierung von T-Helferzellen. Es bedarf eines kostimulatorischen Signals, welches von DPPIV/CD26 vermittelt werden kann. Crosslinking-Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen DPPIV/CD26 und CD3 beweisen eine direkte kostimulatorische Funktion der DPPIV/CD26 (Dang et al., 1990; Tanaka et al., 1993). Bei der Aktivierung von T-Lymphozyten vermittelt DPPIV/CD26 ein Transmembransignal und induziert ein funktionelles Programm der Tryrosylphosphorylierung cytosolischer Proteine, was zur Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺, der Sekretion von Interleukin-2 und schließlich zur T-Zell-Proliferation führt (Dang et al., 1991; Torimoto et al., 1991; Hegen et al., 1997).

Der durch DPPIV/CD26 vermittelte Aktivierungsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. DPPIV/CD26 besitzt nur eine 6 Aminosäuren lange cytoplasmatische Domäne, und diese Aminosäuresequenz schließt dort eine Phosphorylierung als Antwort auf die

Antikörper-Stimulation aus (Bristol et al., 1992). Es konnte eine Assoziation der Tyrosin-Phosphatase CD45 mit DPPIV/CD26 nachgewiesen werden. DPPIV/CD26 könnte die Aktivität von CD45 und damit dessen Einfluss auf die TCR-vermittelte T-Zell-Aktivierung modulieren. Komponenten des klassischen Signaltransduktionsweges sind in die DPPIV/CD26-vermittelte Signaltransduktion involviert, wie z. B. Tyrosinkinasen p56lck und p59fyn der src-Familie, Tyrosinkinase ZAP-70 der syk-Familie, Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) und Phospholipase C γ (PLC γ) (Torimoto et al., 1991; Hegen et al., 1997; von Bonin et al., 1997; Ishii et al., 2001). Die Aktivierung ist an das Vorhandensein eines intakten T-Zell-Rezeptors gekoppelt, wobei die ζ -Kette das Signalmolekül darstellt, welches DPPIV/CD26-abhängig phosphoryliert wird. Transfektanten, welche die ζ -Kette alleine oder nur den funktionellen T-Zellrezeptor exprimieren, sind nicht DPPIV/CD26-abhängig stimulierbar (Fleischer, 1994; von Bonin, 1995). Zur Interleukin-2-Sekretion reicht die alleinige Stimulation der DPPIV/CD26 oder der ζ -Kette auch nicht aus. Der Aktivierungsweg TCR/CD3 bedarf jedoch eines DPPIV/CD26-vermittelten kostimulatorischen Signals (von Bonin et al., 1997; von Bonin et al., 1998; Huhn et al., 2000). Die Beteiligung der Peptidaseaktivität der DPPIV/CD26 bei der Kostimulation ist umstritten. Studien von Kähne et al. zeigten, dass bei spezifisch inhibierter DPPIV/CD26-Aktivität die PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)-induzierte Stimulation der T-Zellen vermindert wurde (Kähne et al., 1995; Kähne et al., 1998). Bei Jurkat-Transfektanten wurde bewiesen, dass die enzymatisch inaktive DPPIV/CD26-Mutante (S631A), im Vergleich zum DPPIV/CD26-Wildtyp, eine stark verminderte Wirkung auf die IL-2-Sekretion der Jurkat-Zellen hat. Daher propagierten Tanaka et al., dass die enzymatische Aktivität der DPPIV/CD26 für ihre kostimulatorische Wirkung notwendig ist (Tanaka et al., 1993). Andererseits konnte in BW5147-Zellen, einer Thymom-Zelllinie, bei der enzymatisch inaktiven humanen DPPIV/CD26-Mutante (S630A) eine normale T-Zell-Aktivierung beobachtet werden (Stegg et al., 1995).

Als Rezeptor der extrazellulären Adenosindesaminase (ADA) spielt DPPIV/CD26 offenbar eine immunregulatorische Rolle (Kameoka et al., 1993; De Meester et al., 1994). ADA ist ein lösliches 41 kD-Protein, das in allen Geweben und besonders in Lymphozyten exprimiert ist (Daddona & Kelley, 1977). ADA ist Bindungspartner der DPPIV/CD26 des Menschen, von Rindern und Kaninchen, jedoch nicht bei Ratten, Mäusen oder Meerschweinchen (Dinjens et al., 1989; Schrader et al., 1990; Iwaki-Egawa et al., 1997). Das Enzym wird intrazellulär deutlich exprimiert, möglicherweise gelangt es auch an die Zelloberfläche. Da ADA selbst keinen Membrananker besitzt, erfolgt die Fixierung an der Zellmembran nur über die

Bindung zur DPPIV/CD26. ADA-Mangel führt zur Akkumulation von toxischen Purinmetaboliten, die die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten durch Hemmung der Ribonukleotidreduktase blockieren und Defekte der zellulären Immunantwort (severe combined immunodeficiency disease, SCID) auslösen (Apasov et al., 2001). Die funktionelle Bedeutung der Wechselwirkung von DPPIV/CD26 mit ADA ist bisher ungeklärt. Es wurde nachgewiesen, dass die enzymatische Aktivität von DPPIV/CD26 nicht für die Wechselwirkung mit ADA benötigt wird. Andererseits führt die Hemmung der Enzymaktivität der ADA zur Minderung der CD3/TCR-vermittelten Signale. Daher wird die enge Beziehung zwischen ADA und T-Zell-Aktivierung diskutiert, da das extrazelluläre Adenosin und 2'-Desoxyadenosin, welche die Proliferation der Lymphozyten inhibieren können, als Regulatormoleküle dienen könnten (Buc et al., 1990; Hashikawa et al., 2004). Es wird angenommen, dass die Interaktion zwischen ADA und DPPIV/CD26 zu einem indirekten kostimulatorischen Signal für T-Lymphozyten führt (Franco et al., 1998; De Meester et al., 1999), da die Ko-Expression der Adenosinaminase mit DPPIV/CD26 zu einer Aufhebung der inhibitorischen und antiproliferativen Wirkung des Adenosins führt (Dong et al., 1997). Die lokale Konzentration von Adenosin oder 2'-Desoxyadenosin könnte durch das Verhältnis aus freier bzw. DPPIV/CD26-gebundener ADA reguliert werden und möglicherweise als Signalübermittler zwischen Lymphozyten agieren. Durch die Wechselwirkung mit ecto-ADA könnte DPPIV/CD26 als Regulator und Modulator der Aktivität des Immunsystems fungieren (von Bonin et al., 1998)

Zunehmend gibt es Hinweise darauf, dass DPPIV/CD26 an mehreren immunologischen Vorgängen bzw. der Regulation der Immunantwort beteiligt ist (Morimoto & Schlossman, 1998). Andererseits scheint ein Verlust der Expression der DPPIV/CD26 im Rattenstamm Fischer 344 gut kompensierbar zu sein. Untersuchungen an diesem Rattenstamm zeigten, dass DPPIV/CD26 in ihrer Struktur verändert und als inaktives Enzym im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und vorzeitig abgebaut wird (Thompson et al., 1991). Bei dem Fischer 344-Stamm wurden nur einige Veränderungen der Proteinresorption und renalen Proteinrückgewinnung beschrieben (Tirupathi et al., 1993). Die klinischen Auswirkungen des Defekts sind jedoch minimal, und die Lebenserwartung der Tiere ist nicht verkürzt. Dennoch zeigten klinische Untersuchungen eine Reihe von Krankheiten im Zusammenhang mit der Veränderung der Expression und enzymatischen Aktivität und den Funktionen der DPPIV/CD26 (siehe nächstes Kapitel). Die Rolle der DPPIV/CD26 *in vivo* bei der Immunregulation, besonders bei verschiedenen Krankheiten, ist bislang noch sehr wenig

verstanden. In Mäusen führt eine wiederholte Injektion der DPPIV/CD26-Inhibitoren AlaboroPro und Pro-boroPro zu einer signifikant geringeren Antikörperbildung nach der Immunisierung mit BSA (bovine serum albumin) (Kubota et al., 1992). Die DPPIV/CD26-Inhibitoren TMC-2a und TSL-225 zeigten eine antiinflammatorische Wirkung in einem Arthritis-Modell (Tanaka et al., 1998).

1.5 DPPIV/CD26 bei Krankheiten

Eine Reihe von Krankheiten fand sich im Zusammenhang mit der Veränderung der Expression oder enzymatischen Aktivität der DPPIV/CD26, die in Tabelle 2 zusammengefasst werden. Eine erhöhte DPPIV/CD26-Aktivität im Serum fand sich bei Erkrankungen, die mit einer hepatobiliären Obstruktion einhergingen, wie etwa die Leberzirrhose oder das Gallengangskarzinom (Hino et al., 1976). Patienten mit Darm- oder Pankreaskarzinomen sowie einer Reihe hämatologischer Tumoren, wie akute lymphatische Leukämie und M. Hodgkin, wiesen dagegen erniedrigte Serumwerte auf (Haacke et al., 1986; Cordero et al., 2000; Verstovsek et al., 2000). Einige, zum Teil gegenläufige Veränderungen von DPPIV/CD26-positiven Lymphozyten fanden sich in Blut, Synovialflüssigkeit oder Liquor von Patienten mit Autoimmunerkrankungen. Zu diesen gehören die multiple Sklerose (Constantinescu et al., 1995; Jensen et al., 2004), Basedow-Krankheit (Graves' disease) (Kotani et al., 1991; Tanaka et al., 1995) und rheumatische Arthritis (Kullertz & Boigk, 1986; Gerli et al., 1996), Lupus erythematoses (Fujita et al., 1978; Stancikova et al., 1992), Down-Syndrom (Bertotto et al., 1994), primäre biliäre Zirrhose (Adler et al., 1993) und AIDS (Blazquez et al., 1992; Vanham et al., 1993). Die erhöhte Anzahl von DPPIV/CD26⁺-T-Zellen in entzündeten Geweben bzw. in der peripheren Blutbahn bei multipler Sklerose, Basedow-Krankheit (Graves' disease) und rheumatoider Arthritis lässt eine wichtige Rolle bei chronischen Entzündungen vermuten (Reinhold et al., 2000; Steinbrecher et al., 2000). Eine Beteiligung des DPPIV/CD26-ADA-Adenosin-Mechanismus könnte mit dem Effekt der exaggenierten Immunaktivierung in Verbindung gebracht werden (Morimoto & Schlossman, 1998).

Tabelle 2: DPPIV/CD26 bei Krankheiten

Effekt und Krankheiten:	Expression auf der Zelloberfläche	Aktivität im Serum
Rheumatoide Arthritis (Human, Maus)	↑	
Multiple Sklerose (Human)	↑	
Morbus Basedow (Human)	↑	
Hashimoto Thyreoiditis	↑	
Sarkoidose	↑	
Psychologischer Stress	↑	
Diabetes mellitus	↑	↓
Granulomatose	↑	
HCV(s)	↑	
Leberzirrhose	↑	
Transplantatabstoßung	↑ Lymphozyten	↑
Leukämie, Hodgkin Lymphome		↑
Gallen- oder Pankreaskrebs		↑
Hepatom (Human, Ratte, Huhn)	↓	↑
Nieren - Transplantationsabstoßung (Ratte)		↑
MRL/1 (Maus)		↑
Enzephalitis (EAE; SJL Maus)		↑
Osteoporose (Human)		↑
Magersucht (Anorexia nervosa)	↓ Lymphozyten	↑
Orales Plattenzellkarzinom (Human)		↓
Schwere Depression (Human)		↓
HIV (Human)	↓ Lymphozyten	↓
Gastrointestinale Neoplasmen, nicht hepatisch		↓
Immunsuppression (Ratte)		↓
Down Syndrom	↓ Lymphozyten	
Melanom	↓	↓
Systemischer Lupus erythematodes		↓
Akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie		↓
Schizophrenie		↓

HCV (Hepatitis C Virus); HIV (Human immunodeficiency virus), ALL (Akute lymphoblastische Leukämie); CLL (Chronische lymphozytische Leukämie)

Tabelle enthält Angaben von De MEESTER et al., (De Meester et al., 1999), HILDEBRANDT et al. (Hildebrandt et al., 2000), GORRELL et al., (Gorrell et al., 2001), und BAUVOIS (Bauvois, 2004), modifiziert.

1.5.1 DPPIV/CD26 bei Adipositas und Diabetes mellitus

Die beiden gastrointestinalen Hormone GIP (glucose dependent insulinotropic polypeptide) und GLP-1 (glucagon like peptide I) erwiesen sich als Substrate der DPPIV/CD26 (Mentlein et al., 1993; Kieffer et al., 1995). GIP und GLP-1 werden als Antwort auf eine erhöhte Kohlenhydratkonzentration im Darm freigesetzt und stimulieren die Ausschüttung von Insulin. Zirkulierende DPPIV/CD26 führt zu einer schnellen Inaktivierung dieser Hormone. In Pankreas konnte DPPIV/CD26 in den A-Zellen in sekretorischen Granula nachgewiesen werden (Grondin et al., 1999). Durch den Einfluss der DPPIV/CD26 auf die Blutzuckerhomöostase sind die Expression und subzelluläre Lokalisation in diesen Zellen von besonderer Bedeutung. Die Relevanz dieses Mechanismus *in vivo* konnte anhand des Fischer 344-Rattenstammes gezeigt werden, der eine leicht eingeschränkte Glukosetoleranz aufweist (Pederson et al., 1996). Auch DPPIV/CD26-Knock-out-Mäuse sind vor Hyperglykämie geschützt (Conarello et al., 2003). Man fand bei der Behandlung von Diabetes mellitus eine Verbesserung der Glukosetoleranz und ein geringeres Risiko einer Hyperglykämie durch die Inhibition der DPPIV/CD26 (Pauly et al., 1996). Ähnliche Befunde wurde bei normalen als auch bei glukoseintoleranten Mäusen erhalten (Nagakura et al., 2001). Der Einsatz dieser DPPIV/CD26-Inhibitoren hat sich als neues Medikament bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ II bereits bewährt (Holst & Deacon, 1998). Durch DPPIV/CD26-Katalyse werden die Inkrete GIP, GLP-1 und GLP-2 inaktiviert. Durch Hemmung der DPPIV/CD26-Aktivität bleibt die Aktivität von GLP-1 erhalten und dadurch wird die Konzentration der Glucose im Blut erniedrigt. Es kann daraus gefolgert werden, dass DPPIV/CD26 ein Regulator der physiologischen Glukosehomöostase ist und bei der Therapie des Diabetes mellitus II eine Bedeutung darstellt (Wiedeman & Trevillyan, 2003; Weber, 2004). Die pharmakologischen Möglichkeiten in der Therapie von Glukosetoleranzstörungen und Diabetes mellitus Typ II werden noch untersucht (Hinke et al., 2000; Demuth et al., 2002; Pospisilik et al., 2003).

1.5.2 DPPIV/CD26 bei Tumorerkrankungen

Verschiedene Autoren propagierten eine Korrelation zwischen der DPPIV/CD26-Expression in einer Reihe epithelialer Tumorzellpopulationen und dem Grad der phänotypischen Differenzierung (Darmoul et al., 1992; Schlagenhauff et al., 1992). DPPIV/CD26 wird besonders deutlich in den Nieren, der Leber und dem Herzen exprimiert. Bei den Morris-Hepatomzellen

der Ratten ist sie nun stark vermindert exprimiert, was mit einer verminderten Adhäsion an Matrixproteine einhergeht (Hanski et al., 1988; Reutter et al., 1989). Bei einer Reihe weiterer Malignome ist die DPPIV/CD26-Expression vermindert. Im Gegensatz zu normalen endometrialen Drüsenzellen findet sich eine mit dem Malignitätsgrad abnehmende Expression der DPPIV/CD26 in endometrialen Adenokarzinomzellen (Khin et al., 2003). In Melanomen und Basaliomen geht die maligne Transformation mit einem Verlust an DPPIV/CD26-Aktivität einher (Morrison et al., 1993; Van den Oord, 1998). *In vitro* konnte eine deutliche Korrelation mit dem Differenzierungsgrad dieser Zelle beobachtet werden. In undifferenzierten Melanomen fand sich eine niedrige DPPIV/CD26-Expression beziehungsweise der totale Verlust der DPPIV/CD26 (Morrison et al., 1993). Bei etwa 50 % der von Prostatakarzinomen ausgehenden Metastasen kommt es im Rahmen der Entdifferenzierung zu einem Verlust der DPPIV/CD26 (Bogenrieder et al., 1997). Auch eine Reihe hämatologischer Tumoren, wie akute lymphatische Leukämie und M. Hodgkin, sind durch niedrige DPPIV/CD26-Aktivitäten im Serum gekennzeichnet (Carbone et al., 1995; Verstovsek et al., 2000). Weiterhin wurde DPPIV/CD26 in Zellen des Gastrointestinaltraktes als ein Marker der Differenzierung beschrieben (Cordero et al., 2000). Man vermutet, dass DPPIV/CD26 eine Rolle bei der neoplastischen Transformation, Progression und Proteolyse bioaktiver Substrate spielt.

Umso bemerkenswerter fällt eine stark erhöhte Enzymaktivität der DPPIV/CD26 im Serum bei humanen hepatozellulären Karzinomen auf (Kojima et al., 1987; Stecca et al., 1997). Im Gegensatz zu den squamösen oder kleinzelligen Bronchialkarzinomen, in denen sich keine DPPIV/CD26 befindet, ist eine erhöhte Expression der DPPIV/CD26 in Lungen-Adenokarzinomen (Asada et al., 1993) zu finden. In Schilddrüsenkarzinomen, papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen zeigte sich eine Korrelation zwischen DPPIV/CD26-Expression und Grad der Malignität (Aratake et al., 1991; Zoro et al., 1996). Auch in der Differentialdiagnose der Schilddrüsenkarzinome kann die DPPIV/CD26 hilfreich sein, da nur papilläre und follikuläre Karzinome, nicht jedoch medulläre und anaplastische Karzinome DPPIV/CD26 exprimieren. In gutartigen Adenomen und normalem Schilddrüsengewebe lässt sich die DPPIV/CD26 ebenfalls nicht nachweisen (Kotani et al., 1992).

Im Tierexperiment zeigten sich beim Ovarialkarzinom nach der DPPIV/CD26-Transfektion eine geringere peritoneale Dissemination, eine längere Überlebenszeit und die morphologischen Veränderungen von einem fibroblastischen, undifferenzierten Phänotyp hin zu einem epithelialen Phänotyp. Weiterhin resultierte aufgrund der DPPIV/CD26-Reexpression

ein geringeres Migrations- und Invasionsverhalten der Ovarialkarzinomzellen (Kajiyama et al., 2003). Auch durch Transfektion und Reexpression der DPPIV/CD26 in entdifferenzierten Melanomzellen wurde eine Rückkehr zu einem differenzierteren Phänotyp bewirkt. Die Transfektion einer enzymatisch inaktiven Variante der DPPIV/CD26 induzierte eine weit geringere „Redifferenzierung“ als das aktive Enzym (Wesley et al., 1999).

1.5.3 DPPIV/CD26 bei HIV

Verschiedene Autoren konnten in HIV-positiven Individuen eine verringerte Expression der DPPIV/CD26⁺-T4-Zellen, abhängig vom Krankheitsstadium, nachweisen (Vanham et al., 1993; Gougeon et al., 1996; Brostrom et al., 1998). DPPIV/CD26 wurde als ein Ko-Faktor für das Eindringen des HIV in CD4⁺-T-Zellen vorgeschlagen (Callebaut et al., 1993). Dennoch wurden die Chemokin-Rezeptoren CCR3 und CCR5 (Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Wu et al., 1997) und CXCR4 (Oberlin et al., 1996; Proost et al., 1998) 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 (Choe et al., 1996). Darüber hinaus ist gp120 in der Lage, DPPIV/CD26 im Komplex mit CXCR4 auf CD4⁺-Zellen zu binden (Herrera et al., 2001). Zusätzlich wird durch gp120 die DPPIV/CD26-ADA-Bindung gehemmt (Valenzuela et al., 1997; Blanco et al., 2000). Dadurch könnte die Konzentration von Adenosin ansteigen und die T-Zellfunktion konsekutiv inhibiert werden (Herrera et al., 2001).

DPPIV/CD26 beeinträchtigt die inflammatorische und hämatologische Potenz verschiedener Chemokine und spielt dabei eine wechselseitige Rolle bei der HIV-Infektion (Proost et al., 1998). Durch proteolytische Spaltung durch DPPIV/CD26 konnte die Anti-HIV-1- und chemotaktische Aktivität der humanen SDF-1 α und SDF-1 β (stromal cell derived factor, Ligand von CXCR4) beseitigt werden; dagegen zeigte die durch DPPIV/CD26 prozessierte RANTES (3-68) zehnfach stärkere Aktivität als intaktes RANTES (1-68), die HIV-1-Infektion der mononukleären Zellen zu inhibieren (Oravec et al., 1997; Proost et al., 1998; Ohtsuki et al., 2000;). Der DPPIV/CD26-CXCR4-Komplex bildet eine funktionelle Einheit, in welcher DPPIV/CD26 die chemotaktische und antivirale Potenz des Chemokins SDF-1 α moduliert (Herrera et al., 2001). Ein weiteres Chemokin ist LD78 β (3-70), welches nach DPPIV/CD26-Prozessierung entsteht und eine noch größere antivirale Potenz aufweist (Proost et al., 2000; Struyf et al., 2003).

Die Interaktion der DPPIV/CD26 mit dem HIV-1-Tat-Protein, ein Transaktivator viraler Proteine mit immunsuppressiver Wirkung (Viscidi et al., 1989), wurde berichtet (Gutheil et al., 1994). Durch die Bindung des Tat-Proteins an DPPIV/CD26 konnte die DPPIV/CD26-Enzymaktivität gehemmt werden. Nachfolgend konnte der Beweis erbracht werden, dass DPPIV/CD26 den inhibitorischen Effekt des Tat-Proteins auf die DNA-Synthese und Cytokinproduktion moduliert (Wrenger et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der DPPIV/CD26 mit dem Tat-Protein von der Sialylierung der DPPIV/CD26 abhängt (Smith et al., 1998).

1.6 Biochemische Eigenschaften und Biogenese

Die DPPIV/CD26 wird als ein Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert (Kreisel et al., 1982). Das Molekulargewicht der DPPIV/CD26 ist Organ- und Spezies- abhängig und liegt zwischen 210 und 280 kD (Kenny et al., 1976). Sie ist ein hoch glykosyliertes Membranglykoprotein. Ihre Primärsequenz enthält 8 (Ratte) oder 9 (Mensch) *N*-Glykan-Akzeptorsequenzen (Asn-X-Ser/Thr), die alle glykosyliert sind (Ogata et al., 1989; Tanaka et al., 1992). O-Glykosylierungen wurden nicht nachgewiesen. Der reine Polypeptidanteil hat ein relatives Molekulargewicht von 84 kD und die verschiedenen glykosylierten Formen der Monomere zeigen ein Gewicht zwischen 90 bis 150 kD. Das M_r des Zuckeranteils variiert zwischen 8 % und 30 %, je nach Spezies und Organ (Püschel et al., 1982; Erickson et al., 1983; Petell et al., 1987).

Die Halblebenszeiten der DPPIV/CD26 sind abhängig von der Zelllinie. In Caco-2-Zellen beträgt die Halblebenszeit der DPPIV/CD26 acht bis zehn Tage (Yoshioka et al., 1991). *In vivo* liegt in Hepatozyten und in Morris Hepatom 7777 die Halblebenszeit bei 60-80 h (Tauber et al., 1983), während *in vitro* in Hepatozyten und Morris-Hepatom-Zellen die Halblebenszeit nur 45 h beträgt (Loch et al., 1992). In CHO-Zellen exprimierte rekombinante DPPIV/CD26 zeigt eine ähnliche Stabilität mit einer Halblebenszeit von ca. 40 h (Hong et al., 1989). Im Gegensatz zum Proteinanteil wurde für die Glykanketten der Leber-DPPIV/CD26 jedoch eine Halblebenszeit von nur 15-24 h beschrieben (Kreisel et al., 1980; Volk et al., 1983). Dieser Mechanismus, als intramolekularer heterogener Turnover oder Reprocessing bezeichnet, ist nicht nur auf die DPPIV/CD26 beschränkt, sondern auch bei anderen Membranglykoproteinen gefunden worden (Tauber et al., 1983; Tauber et al., 1989).

Die Biosynthese der DPPIV/CD26 läuft am endoplasmatischen Retikulum (ER) ab. Kotranslational werden typische Asparaginreste (Asn-X-Ser/Thr) glykosyliert (*N*-Glykosylierung) (Kiely et al., 1976; Rothman et al., 1978). Dabei werden vorgefertigte Oligosaccharide von einem Dolicholpyrophosphat durch eine Oligosaccharyltransferase auf die Asparaginreste übertragen (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Sobald das Oligosaccharid auf das neu synthetisierte Protein übertragen ist, fängt die Modifikation des Oligosaccharides an. Die Entfernung der drei Glukosereste scheint Voraussetzung zu sein für den Weitertransport der Proteine in den Golgi-Komplex (Lemansky et al., 1984). Die Modifikation von Oligosacchariden wird im Golgi-Apparat weiter fortgeführt (Processing). Vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) werden Plasmamembran-Glykoproteine dann zur Zelloberfläche oder zu den Endosomen und weiter in die Lysosomen sortiert. Über die Zelloberfläche können Proteine durch Endozytose wieder in das Zellinnere aufgenommen werden. Von den reifen Endosomen ist der Transport zu den Lysosomen, dem zentralen Organell für nicht-spezifische Proteolyse, oder eine Rückkehr (Recycling) zur Zelloberfläche möglich (Kornfeld & Mellman, 1989). Dieses Recycling kann direkt zur Oberfläche oder, wie für den Transferrinrezeptor gezeigt, über das TGN erfolgen (Bishop, 2003; Maxfield & McGraw, 2004).

Obwohl nahezu alle Membranproteine glykosyliert sind, ist die Rolle der Glykane für die Proteinstruktur, Funktionen und biochemischen Eigenschaften noch nicht vollständig geklärt. Bei der DPPIV/CD26 ist die Rolle ihrer Oligosaccharid-Seitenketten bislang wenig bekannt. Neueste Ergebnisse zeigen, dass die Oligosaccharid-Seitenketten die biophysikalischen und biologischen Eigenschaften von Glykoproteinen modulieren können, wie z. B. Proteinfaltung, -Stabilität, -Translokation, sowie die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion. Somit spielen die Glykane eine vielfältige Rolle bei der Entwicklung, dem Wachstum, den Funktionen und dem Überleben von Organismen (Kobata, 1992; Lis & Sharon, 1993; Varki, 1993; Helenius, 1994; Fiedler & Simons, 1995).

Die Primärstruktur der DPPIV/CD26 enthält 12 Cysteinreste. Zehn der 12 Cysteinreste befinden sich im zentralen Bereich der extazellulären Domäne. Dieser Bereich wurde als Bindungsstelle sowohl für ADA als auch für Kollagen nachgewiesen (Löster et al., 1995; Dong et al., 1997). Die physiko-chemischen Analysen wiesen die Existenz von mindestens zwei funktionell unabhängigen Domänen nach, von denen eine durch Cysteinbrücken stabilisiert ist (Lambeir et al., 1997). Bei sekretorischen oder membranständigen Proteinen werden Disulfidbrücken gebildet, welche für die Stabilität und zur Erlangung der korrekten

Struktur dieser Proteine wichtig sind. Bei cytosolischen Proteinen treten keine Cysteinbindungen auf, da im Cytosol durch die hohe Konzentration von Glutathion (0,01 M) ein reduzierendes Milieu vorliegt. Die Verknüpfung der Disulfidbrücken geschieht kotranslational im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die Ausbildung der Disulfidbrücken erfolgt kotranslational und kann in dieser Verknüpfung bestehen bleiben. Wenn diese Art der Brückenbildung zu instabilen Strukturen führt, werden sie im ER durch die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) wieder aufgebrochen und neu verknüpft. Am Ende dieser Umlagerungen steht die thermodynamisch stabilste Struktur. Viele Membranproteine treten als Oligomere auf. Die Oligomerisierung kann kovalent über Disulfidbrücken oder nicht kovalent über van der Waals-Wechselwirkungen erfolgen und geschieht sehr häufig bereits im ER (Reddy & Corley, 1998). Die DPPIV/CD26 liegt unter physiologischen Bedingungen als Homodimer vor, wobei die Dimerisierung vermittelnden Regionen des Proteins unbekannt sind. Durch ortsspezifische Mutagenese sollten in dieser Arbeit Aussagen über den Einfluss einzelner Cysteinreste auf die strukturelle und funktionelle Integrität der DPPIV/CD26 getroffen werden.

1.7 Strukturelle Eigenschaften und funktionelle Domänen

Zur Aufklärung der Struktur von DPPIV/CD26 wurden bereits umfangreiche Untersuchungen durchgeführt. Die Primärstruktur der Ratten-DPPIV/CD26 wurde im Jahr 1987 als ein „bile canaliculus domain-specific membrane glycoprotein“ (gp110) mit 792 Aminosäuren aus der Rattenniere ermittelt (Hong & Doyle, 1987) und später mit geringen Abweichungen bestätigt (Ogata et al., 1989). Diesen Veröffentlichungen zufolge ist die Ratten-DPPIV/CD26 nur 767 Aminosäuren lang. Der Hauptunterschied ergibt sich in der cDNA-Sequenz von Hong et al. aus dem Vorhandensein einer Insertion eines C an der Position 2296 des kodierenden Anteils, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt und zu einer Verlängerung von 25 Aminosäuren des Proteins. Auch die Sequenzen der menschlichen DPPIV/CD26 (766 Aminosäuren) und Mäuse-DPPIV/CD26 (760 Aminosäuren) sind inzwischen bekannt (Marguet et al., 1992; Misumi et al., 1992). Durch Aufklärung der Primärstruktur wurde bewiesen, dass das in Tieren gefundene Enzym mit dem humanen T-Lymphozyten CD26-Antigen identisch ist (Tanaka, 1993). Die Primärstruktur der Maus-DPPIV/CD26 ist zu 84,9 % identisch mit der menschlichen DPPIV/CD26 und zu 92 % mit der von Ratten-DPPIV/CD26. Auch außerhalb des Tierreiches sind Proteine mit DPPIV/CD26-Spezifität

entdeckt worden. Teilweise ist ihre Primärstruktur aufgeklärt. Die bei Marguet et al. (1992) angegebene Sequenz der Dipeptidylaminopeptidase B aus Hefe zeigt etwa 30 % Homologie mit der Mäuse-DPPIV/CD26 (Marguet et al., 1992).

Durch physiko-chemische Strukturanalyse wurde nachgewiesen, dass 45 % des Proteins aus β -Faltblattstrukturen bestehen und der extrazelluläre Teil des Moleküls in drei unabhängige Domänen aufgeteilt werden kann, von denen eine Domäne durch Disulfidbrücken stabilisiert ist. Alle drei Domänen werden durch flexible Regionen verbunden (Lambeir et al., 1997). Molekular-Modelling-Analysen haben ergeben, dass die Peptidasedomäne möglicherweise die α/β -Hydrolase-Faltung enthält (Medrano et al., 1998). Die Struktur der *N*-glykanreichen sowie der cysteinreichen Domäne ist bis dahin unbekannt; es ist aufgrund von starken Sequenzhomologien zur bereits kristallisierten Prolyl-Oligopeptidase denkbar, dass ein atypischer β -Propeller vorliegt (Fülöp et al., 1998).

Als Exopeptidase spaltet DPPIV/CD26 Dipeptide der Sequenz X-Pro/Ala- vom N-Terminus von Proteinen und Peptiden ab und beeinflusst dadurch ihre biologische Funktion. Die DPPIV/CD26 ist eine Serinprotease, zeigt jedoch keine Homologie zu den klassischen Vertretern der Serinproteasen (Neurath, 1984). Die Primärstruktur der Ratten-DPPIV/CD26 enthält über 60 Serylreste, aber nur viermal die Konsensussequenz (Gly-X-Ser) für normale Serinproteasen. Von diesen vier ist eine Sequenz in Position 629-633 durch Y-Gly verlängert, sodass sie dem Sequenzmotiv (Gly-X-Ser-Y-Gly) von Proteasen des Chymotrypsintyps entspricht. Darum wurde zuerst getestet, ob der Serinrest 631 für die katalytische Aktivität der DPPIV notwendig ist. Im Falle von Ratten wurde festgestellt, dass Ser631 essentiell für die katalytische Aktivität der DPPIV/CD26 ist (Ogata et al., 1992). Bei der Maus bilden Ser624, Asp702 und His734 die katalytische Triade der DPPIV/CD26 (David et al., 1993).

Im vergangenen Jahr wurde die Kristallstruktur von menschlicher sowie Schweine-DPPIV/CD26 aufgeklärt (Rasmussen et al., 2003; Engel et al., 2003; Hiramatsu et al., 2003; Oefner et al., 2003; Thoma et al., 2003; Aertgeerts et al., 2004). Die DPPIV/CD26 liegt in kristalliner Form als Homodimer vor. Das Monomer besteht aus zwei Domänen, einer α/β -Hydrolase-Domäne (Aminosäuren 39 bis 51 sowie 506 bis 766) und einer achtblättrigen β -Propeller-Domäne; die cysteinreiche Domäne und der hochglykosylierte Bereich ist in der β -Propeller-Domäne gelagert. Zwischen beiden Domänen befindet sich eine Höhle von 30 bis 45 Å. Es wurden zwei unterschiedliche Öffnungen nachgewiesen, eine größere seitlich zwischen der β -Propeller- und der Hydrolase-Domäne, sowie ein Tunnel durch die β -

Propeller-Domäne nahe der Bindungsstelle zum benachbarten Monomer. Die Öffnungen bieten Zugang zum jeweiligen katalytischen Zentrum in den Höhlen. Aufgrund der räumlichen Gegebenheiten innerhalb des Tunnels ist es vermutlich nur gestreckten, entfalteten Peptiden möglich, das aktive Zentrum zu erreichen; daher ist erklärlich, weshalb die meisten Substrate dieses Enzyms weniger als 80 Aminosäuren aufweisen oder einen entfalteten N-Terminus besitzen. Für die Einleitung der Enzymkatalyse bieten sich Glu205 und Glu206 als Andockstellen für die zu spaltenden Peptide an. Ein ausgestreckter Arm aus der β -Propeller-Domäne könnte an der Stabilisierung des Dimers und/oder am Verschluss/Öffnungs-mechanismus des Tunnels beteiligt sein. Bei der strukturell sehr verwandten Prolyl-oligopeptidase (POP) ist das aktive Zentrum nur über eine zentral gelegene Tunnelöffnung mit einem untypischen β -Propeller zu erreichen. Bei der DPPIV/CD26 ist noch nicht vollständig geklärt, welchen der beiden Zugänge das Substrat bevorzugt.

1.8 Zielsetzung:

Ziel dieser Arbeit ist es, die biochemischen Eigenschaften, wie das Recycling und Reprocessing, zu analysieren, die molekulare Basis der bisher bearbeiteten biologischen Funktionen sowie die funktionelle Domäne der DPPIV/CD26 zu ermitteln, die biologische Bedeutung von *N*-Glykosylierung und Cysteinresten zu untersuchen, die Signaltransduktions-mechanismen der DPPIV/CD26 bei der T-Zell-Aktivierung und bei der Zelladhäsion zu charakterisieren und die Rolle der DPPIV/CD26 bei der Immunregulation besser verstehen zu lernen. Da die DPPIV/CD26 ein multifunktionelles Protein ist, stellt sich die Frage, inwiefern die einzelnen Funktionen des Moleküls miteinander gekoppelt sind. Durch Aufklärung der 3D- und Kristallstrukturen der DPPIV/CD26 und der DPPIV/CD26-Protein-Komplexe können die Beziehungen zwischen einzelnen Funktionen und der Struktur besser ermittelt werden.