

**Struktur-Funktionsuntersuchungen
von humaner Dipeptidylpeptidase IV und Prolylendopeptidase
in Bezug auf die Hydrolyse von artifiziellen und physiologischen Substraten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(Fachbereich Biochemie/Biotechnologie)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom Biotechnologen Joachim Wolfgang Bär
geb. am: 19.07.1974 in Kassel

Halle (Saale), den 14.04.2005

Gutachter: Prof. Milton T. Stubbs (Halle)
Prof. Dietmar Schomburg (Köln)

Verteidigungsdatum: 24.11.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009430

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009430>]

I Inhaltsverzeichnis

II Abkürzungsverzeichnis

Kurzschreibweise der Aminosäuren

1 Einleitung	1
1.1 Dipeptidylpeptidase IV.....	2
1.1.1 Vorkommen	2
1.1.2 Struktureller Aufbau der DP IV	2
1.1.3 Katalytisches Zentrum und Substrathydrolyse	4
1.1.4 Biologische Bedeutung.....	8
Rolle der enzymatischen Aktivität der DP IV	8
DP IV als Bindungspartner	11
1.2 Prolylendopeptidase	12
1.2.1 Vorkommen	12
1.2.2 Molekulare und katalytische Eigenschaften	13
1.2.3 Biologische Bedeutung.....	15
1.3 Aufgabenstellung.....	17
2 Methoden	18
2.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	18
2.1.1 Sequenzierung des DP IV-Gens vom Schwein	18
2.1.2 Sequenzierung von Aminosäuresequenzen und Basensequenzen.....	18
2.1.3 PCR.....	18
2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	19
2.1.6 Restriktion von DNA	20
2.1.7 Ligation von DNA.....	20
2.1.8 Anzucht und Stammhaltung von <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i> -Zellen.....	20
2.1.9 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	20
2.1.10 Transformation von <i>P. pastoris</i> -Zellen.....	21
2.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA.....	21
2.2 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden.....	21
2.2.1 Expressionstests.....	21
2.2.2 Hefekonzentration- und Biotrockenmassebestimmung.....	21
2.2.3 Fermentation von Hefezellen.....	22
2.2.4 Expression der PEP.....	22
2.2.5 Chromatographiemethoden	23
Metallchelataffinitätschromatographie	23
Größenausschlusschromatographie.....	23
Ionenaustauschchromatographie	23
Hydrophobe Interaktionschromatographie	23
2.2.6 Dialyse und Proteinkonzentrierung.....	24
2.2.7 Isolierung der rekombinanten humanen DP IV (rhDP IV)	24

2.2.8	Isolierung der rekombinanten humanen PEP (rhPEP).....	24
2.2.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
2.2.10	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.2.11	Proteinfärbemethoden	25
	Färbemethode mit <i>Coomassie blue</i>	25
	Färbemethode mit Silbernitrat	25
	Aktivfärbung.....	25
2.2.12	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	26
2.2.13	Immunodetektion von immobilisierten Proteinen.....	26
2.2.14	Isoelektrische Fokussierung der DP IV	26
2.2.15	Spektralphotometrische DP IV-Aktivitätsbestimmung	27
2.2.16	Fluorimetrische DP IV-Aktivitätsbestimmung	27
2.2.17	Grundlage zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m und K_i ...	28
2.2.18	Bestimmung der kinetischen Parameter K_i , K_m , k_{cat} , und IC_{50}	28
	K_m -Wert Bestimmung.....	28
	k_{cat} -Wert Bestimmung	29
	IC_{50} -Bestimmung	29
	K_i -Wert Bestimmung	29
	Ermittlung von K_m -Werten mittels Plattenmessgerät (TECAN)	29
	Ermittlung von K_m -Werten mittels HPLC-MS/MS	30
	Ermittlung von k_{cat} -Werten für Peptidsubstrate.....	30
2.2.19	Kapillaronenelektrophorese	30
2.2.20	MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Molekulargewichtsbestimmung	31
	und zur qualitativen Bestimmung der Hydrolyse potentieller Peptidsubstrate	
2.2.21	Biomolekulare Interaktionsanalyse mittels Plasmoresonanzmessung.....	32
2.2.22	Messung der Aktivität der Prolylendopeptidase	33
2.2.23	Analyse der katalytischen Aktivität von PEP gegenüber Humanin	33
2.2.24	Präparation von U343-Zellextrakt.....	34
2.2.25	Kristallisation der rhDP IV.....	33
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Klonierung der humanen DP IV.....	35
3.2	Optimierung der Expression und Isolierung der rhDP IV	35
3.2.1	Charakterisierung von His-Tag Varianten der rhDP IV	35
3.2.2	Expression und Fermentation der rhDP IV	36
3.2.3	Isolierung der rhDP IV	37
3.2.4	Optimierung der Fermentationsstrategie.....	38
3.3	Charakterisierung der rhDP IV	41
3.3.1	Sequenzierung und Analyse der DP IV vom Schwein	41
3.3.2	Bestimmung des Molekulargewichts der rhDP IV	43
3.3.3	Isoelektrische Fokussierung	44
3.3.4	Enzymkinetische Charakterisierung mittels Dipeptidderivaten.....	45
3.3.5	Interaktionsstudien mittels Plasmoresonanzmessung	46
3.4	Prozessierung des Pancreatic Polypeptids und Exendin-3 durch DP IV <i>in vitro</i>	47

3.5	„Sekundäre“ Wechselwirkungen zwischen DP IV und Peptidhormonen	49
3.6	Enzym-Substrat-Wechselwirkungen im katalytischen Zentrum der DP IV	54
3.6.1	Kinetische Charakterisierung der rhDP IV-Varianten.....	54
	Kinetische Charakterisierung mit Dipeptidderivaten	54
	Kinetische Charakterisierung mit Inhibitoren.....	54
3.6.2	Kinetische Daten ermittelt mit rhDP IV-Varianten von verschiedenen	56
	DP IV-Substraten und –Inhibitoren	
	Kinetische Parameter, ermittelt mit rhDP IV-Wildtypenzym.....	56
	Kinetische Parameter der R125A-rhDP IV	56
	Kinetische Parameter der R125K-rhDP IV	57
	Kinetische Parameter der N710A-rhDP IV	58
	Kinetische Parameter der N710Q-rhDP IV.....	58
	Kinetische Parameter der N710D-rhDP IV	59
	Kinetische Parameter der Y631F-rhDP IV.....	59
	Untersuchung der rhDP IV-Variante Y547A.....	60
	Kinetische Parameter der W629A-rhDP IV	60
	Kinetische Parameter der E205A- und E206L-rhDP IV.....	61
3.6.3	Hydrolyse von Diprotin B (Val-Pro-Leu) durch rhDP IV-Varianten.....	62
3.6.4	Untersuchung der Hydrolyse von Peptidhormonen durch rhDP IV-Varianten	62
	Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeiten von Peptidhormonen mittels	63
	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	
	Bestimmung der K_i -Werte für Peptidhormone mit rhDP IV-Varianten.....	64
	Bestimmung der K_m -, k_{cat} - und k_{cat}/K_m -Werte für die Hydrolyse von.....	64
	Peptidhormonen durch rhDP IV-Varianten	
3.7	Kristallisation der rhDP IV.....	66
3.8	Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der PEP anhand eines potentiellen	68
	physiologischen Substrates	
3.8.1	Expression und Isolierung der rekombinanten humanen PEP	68
3.8.2	Untersuchung der Substrathydrolyse von Humanin durch PEP	68
3.8.3	Post-Cystein spezifische Prozessierung durch DP IV	74
4	Diskussion	75
4.1	Expression, Isolierung und Charakterisierung der rhDP IV.....	75
4.1.1	Expression der löslichen Δ 1-36 rhDP IV mit His-Tag	75
4.1.2	Biochemische Charakterisierung der rhDP IV.....	77
4.1.3	Kinetische Charakterisierung der rhDP IV.....	78
4.1.4	Prozessierung des Pancreatic Polypeptids und Exendin-3.....	80
	durch DP IV <i>in vitro</i>	
4.2	„Sekundäre“ Wechselwirkungen zwischen DP IV und Peptidhormonen	82
4.3	Enzym-Substrat-Wechselwirkungen im katalytischen Zentrum der DP IV	86
4.3.1	Vergleich von K_m - und scheinbaren K_i -Werten der DP IV-katalysierten.....	88
	Substrathydrolyse von Peptidsubstraten	

4.3.2	Charakterisierung der rhDP IV-Varianten R125, N710, Y631, W629, Y547,..... E205 und E206	89
	Einfluss der Aminosäure R125 auf die Substrathydrolyse durch DP IV.....	89
	Einfluss der Aminosäure N710 auf die Substrathydrolyse durch DP IV	92
	Einfluss der Aminosäure Y631 auf die Substrathydrolyse durch DP IV	94
	Einfluss der Aminosäure Y547 auf die Substrathydrolyse durch DP IV	94
	Einfluss der Aminosäure W629 auf die Substrathydrolyse durch DP IV	95
	Einfluss der Aminosäuren E205 und E206 auf die Substrathydrolyse..... durch DP IV	95
4.4	Kristallisation der rhDP IV.....	97
4.5	Inaktivierung von Humanin durch PEP.....	97
5	Zusammenfassung.....	102
6	Summary.....	105
7	Literaturverzeichnis.....	108

III Anhang

Sequenz der DP IV vom Schwein
Klonierungsschema der humanen DP IV in den Hefevektor pPICZ α C
Geräte
Materialien
Verwendete Oligonukleotide
Puffer und Lösungen
Medien

II Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Erklärung
ACN	Acetonitril
AD	<i>Alzheimer Disease</i> (Alzheimer Krankheit)
ADA	Adenosindeaminase
AE	Acylenzym
AMC	7-Amido-4-Methlycoumarin
AOX	Alkoholoxidase
Apaf1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
A β	Amyloid β
Bax	Bcl-2-assoziiertes X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BMGY	gepuffertes Minimalmedium mit Glycerol
BMMY	gepuffertes Minimalmedium mit Methanol
bp	Basenpaare
cam	Chloramphenicol
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleisäure
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Da, kDa	Dalton, Kilo-Dalton
DAHC	di-Ammoniumhydrogencitrat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DHAP	2',6'-Dihydroxyacetophenon
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Enzym-Substratkomplex
Fa.	Firma
FAD	Familäre Alzheimer Erkrankung
FAP- α	<i>Fibroblast Activation Protein-α</i>
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
fs	Femtosekunde
GIP	<i>Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
gp	Glykoprotein
GRF	<i>Growth hormone Releasing Factor</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure]
His ₆	6 · Histidin
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HN	Humanin
HP1	Hexapeptid 1, [TFTSDY (Glukagon 5-10)]
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IC ₅₀	halb-maximale Hemmkonstante
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IGFBP-3	<i>Insulin Growth Factor Binding Protein-3</i>
IL-2	Interleukin-2
IPTG	Isopropyl-(D-Thiogalactosid)
K	Kelvin
k _{cat}	Wechselzahl
k _{cat} /K _m	2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstante oder Spezifitätskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
K _i	Hemmkonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
k _{obs}	Geschwindigkeitskonstante pseudo erster Ordnung
LB-Medium	Luria-Bertani Medium

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Erklärung
LC	<i>Liquid Chromatographie</i>
m/z	Masse/Ladung
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation</i> (Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation)
MeOH	Methanol
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NP Y	Neuropeptid Y
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	Produkt
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
P32/98	Isoleucyl-Thiazolidin (Di-[2S,3S]-2-Amino-3-Methyl-Pentansäure-1,3-Thiazolidin Fumarat)
P59/99	Isoleucyl-(2)-Cyanopyrrolidin (1-(2-Amino-3-Methyl-Pentanoyl)-(2)-Cyanopyrrolidin)
PACAP	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG(3350)	Polyethylenglycol (Durchschnittliches Molekulargewicht = 3350)
PEP	Prolylendopeptidase, Prolyl oligopeptidase
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
pNA	4-Nitroanilin
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
rhDP IV	rekombinante humane DP IV
rhPEP	rekombinante humane Prolylendopeptidase
RMS	<i>Root Mean Square</i> (quadratischer Mittelwert)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-PCR</i>
RU	<i>Resonance Units</i> (Resonanz Einheiten)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAM	<i>Senescence-Accelerated Mouse</i>
SDF-1 α	<i>Stromal-Cell-Derived Factor 1α</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
ssDP IV	<i>sus scrofa domesticus</i> -DP IV (DP IV aus Schwein)
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TOF	<i>Time Of Flight</i> (Flugzeit)
TRIM11	Tripartit Motiv
U	<i>Units</i> (Einheiten)
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
v/S	Geschwindigkeit / Substratkonzentration
Vh	Voltstunden
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>
V _{max}	(maximale) Umsatzgeschwindigkeit
Xaa	eine der 20 proteinogenen Aminosäuren
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Medium</i>
ZW164	Fmoc-Ala-Pyrr-CN (9H-fluoren-9-ylmethyl N-[2-(2-Cyano-1-Pyrrolidin)-1-methyl-2-oxoethyl]carbamate)
ZW215	unveröffentlicher Vertreter einer Klasse von PEP-Inhibitoren

Kurzschreibweisen der Aminosäuren

Alanin	Ala, A	Leucin	Leu, L
Arginin	Arg, R	Lysin	Lys, K
Asparagin	Asn, N	Methionin	Met, M
Asparaginsäure	Asp, D	Phenylalanin	Phe, F
Cystein	Cys, C	Prolin	Pro, P
Glutamin	Gln, Q	Serin	Ser, S
Glutaminsäure	Glu, E	Threonin	Thr, T
Glycin	Gly, G	Tryptophan	Trp, W
Histidin	His, H	Tyrosin	Tyr, Y
Isoleucin	Ile, I	Valin	Val, V

1 Einleitung

Die enorme Vielfalt biochemischer Reaktionen wird vor allem von biologischen Katalysatoren vermittelt – den Enzymen. Enzyme weisen oftmals hohe Substratspezifitäten auf. Das bedeutet, dass Enzyme gezielt mit Substraten in Wechselwirkung treten können, die in deren aktives Zentrum "passen". Im aktiven Zentrum sind ganz bestimmte Aminosäureseitenketten exponiert, die an der katalytischen Umsetzung des Substrates mitwirken. Röntgenkristalluntersuchungen ergaben, dass die Substratbindungsstellen der meisten Enzyme bereits vorgeformt sind. Enzym und Substrat sind in der Lage, im Sinne des „*Induced fit*“ gegenseitig Konformationsänderungen herbeizuführen, die dadurch zu einander komplementär werden (Stryer, 1990; Voet und Voet 1992). Zum genaueren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat und damit auch der Substratspezifität, sind Untersuchungen der Struktur- und Funktionsbeziehungen notwendig. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können dann insbesondere zur Entwicklung von spezifischen Inhibitoren verwendet werden.

Ubiquitär verbreitete hochspezifische Proteasen wie die Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) weisen eine hohe Substratelektivität auf, wodurch sie in unterschiedlicher Weise in lokale oder systemspezifische Regulationskaskaden eingreifen und außerdem entscheidend am Zusammenspiel der verschiedenen Organsysteme (neurales System, gastrointestinales System, Immunsystem, kardiovaskuläres System) beteiligt sind (Lambeir *et al.*, 2003). Ähnliches gilt für die intrazellulär lokalisierte Prolylendopeptidase (PEP). Dem Enzym wird ebenfalls eine Rolle bei der Regulation und Vernetzung wichtiger zellulärer und extrazellulärer Regulationskaskaden wie z.B. neurodegenerativen- oder Lern- und Gedächtnisprozessen zugeschrieben (Polgar, 2002; Schulz *et al.*, 2002).

Aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen stellen DP IV und PEP potentielle therapeutische Ziele bei einer Reihe von Erkrankungen dar. Enzym-spezifische Inhibitoren bieten die Möglichkeit, regulierend in diese Prozesse einzugreifen. Im Unterschied zur Inhibierung hochspezifischer Proteasen von Krankheitserregern (HIV-Protease) besteht bei der Hemmung solcher körpereigenen Enzyme jedoch immer die Gefahr, in weitere Regulationskaskaden einzugreifen und damit unerwünschte Nebenwirkungen zu erzielen. Deshalb ist ein möglichst umfassendes Wissen über die molekularen Eigenschaften und die physiologische Rolle dieser Proteasen Voraussetzung für eine zielgerichtete und nebenwirkungsarme Therapie. Dieser Forderung stellt sich die vorliegende Arbeit.

1.1 Dipeptidylpeptidase IV

1.1.1 Vorkommen

Dipeptidylpeptidase IV [EC 3.4.14.5 (DP IV, CD26, ADAbp)] wurde erstmals aufgrund ihrer Fähigkeit, Naphthylamin aus Gly-Pro-2-Naphthylamid freizusetzen, beschrieben (Hopsu-Havu und Glenner, 1966). Das Enzym konnte später aus einer Reihe verschiedener Organismen, u.a. aus Bakterien, Hefen, Insekten und Pflanzen isoliert werden (Bordallo *et al.*, 1984; Kreil *et al.*, 1980; Nardi *et al.*, 1991; Stano *et al.*, 1994; Yoshimoto und Tsuru, 1982). Im Säugerorganismus ist DP IV ubiquitär verbreitet und lässt sich in verschiedenen Geweben und Flüssigkeiten nachweisen, wie z.B. Plazenta, Niere, Leber, Lymphozyten, Urin und Serum (Akrawi und Bailey, 1976; Feller und Parwaresch, 1980; Iwaki-Egawa *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1978a; Puschel *et al.*, 1982). DP IV ist identisch mit dem Zelloberflächen-Glykoprotein CD26 auf T-Lymphozyten, aktivierten B-Lymphozyten und NK-Zellen, wo es erstmals von Lojda beschrieben wurde (Lojda, 1977). Die Expression von CD26 korreliert dabei streng mit dem Aktivierungs- und Proliferationsstatus der T-Zellen (Lojda, 1988). Zudem ist DP IV/CD26 auf vielen epithelialen und einigen spezialisierten mesodermalen Zellen lokalisiert (Mentlein, 1999).

Die für DP IV kodierenden DNA-Bereiche wurden unter anderem von Ratte (Ogata *et al.*, 1989), Maus (Marguet *et al.*, 1992), Mensch (Darmoul *et al.*, 1992; Misumi *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992), *Flavobacterium meningosepticum* (Kabashima *et al.*, 1995), *Xanthomonas maltophila* (Kabashima *et al.*, 1996) und *Xenopus laevis* (Vlasak *et al.*, 1997) kloniert bzw. sequenziert. Durch Sequenzvergleich innerhalb der Klasse der Mammalia konnten relativ hohe DNA-Homologien von bis zu 90 % nachgewiesen werden [Ratte – Mensch: ca. 85 % Homologie (Misumi *et al.*, 1992), Maus – Mensch: ca. 89 % Homologie (Darmoul *et al.*, 1992)]. Zwischen pro- und eukaryontischer DP IV ergaben sich dabei Sequenzhomologien von bis zu 30 % (Kabashima *et al.*, 1996; Kiyama *et al.*, 1998).

1.1.2 Struktureller Aufbau der DP IV

Dipeptidylpeptidase IV wird als Typ II Membranprotein auf der Oberfläche von Zellen exponiert. Das Enzym wurde auch in löslicher Form in verschiedenen Körperflüssigkeiten ohne Transmembrananker gefunden (Vanhoof *et al.*, 1992). In Abhängigkeit von der Spezies, dem Gewebe und dem zellulären Differenzierungsstatus hat das monomere Enzym ein Molekulargewicht von ca. 100 bis 150 kDa. Diese Heterogenität ist vermutlich auf Unterschiede im Glykosylierungsgrad zurückzuführen (Smith *et al.*, 1998). Nativ besteht DP IV aus zwei katalytisch voneinander unabhängigen identischen Untereinheiten, die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind. Die Kristallstruktur der DP IV wurde im 2003 erstmals publiziert (Abb. 1.1) (Engel *et al.*, 2003; Hiramatsu *et al.*, 2003; Oefner *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003, Thoma *et al.*, 2003). Inzwischen sind eine Reihe von Strukturen mit verschiedenen Substraten und Inhibitoren der rekombinanten humanen- und nativen Schweine-DP IV veröffentlicht (Aertgeerts *et al.*, 2004a; Aertgeerts *et al.*, 2004b; Weihofen *et al.*, 2004).

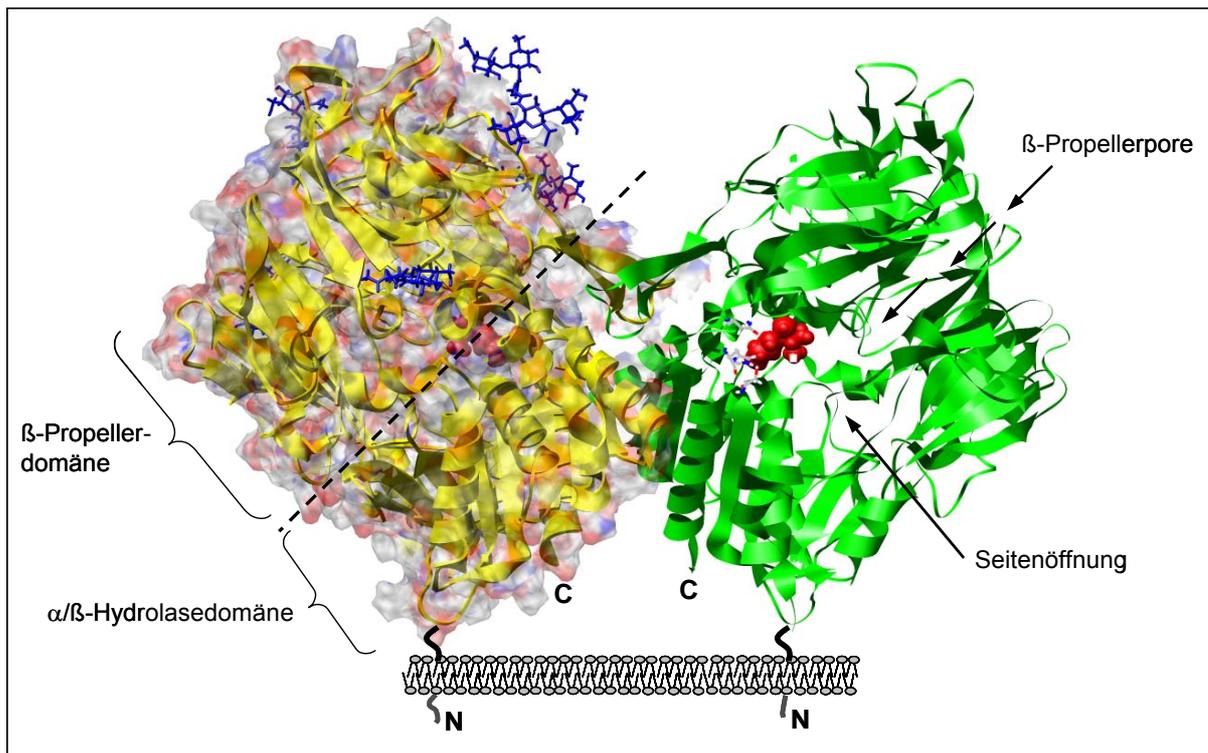


Abb. 1.1: Strukturmodell der humanen DP IV. Darstellung eines auf der Zelloberfläche mittels Transmembrananker (schematisch dargestellt) fixierten DP IV-Homodimers. In grün bzw. gelb sind für jedes Monomer die sekundären Faltungsmotiven dargestellt. Im linken Monomer ist zusätzlich die Proteinoberfläche angedeutet und die sich darauf befindlichen Glykosylierungsreste (blau). Außerdem ist der N- und C-Terminus des Proteins, die Unterteilung des Enzyms in die zwei Domänenstrukturen und die beiden potentiellen Substrateintrittstellen gekennzeichnet. In „spacefill“ und rot ist der im katalytischen Zentrum (S630, H708, D740, in „CPK“ und „wire“ im rechten Monomer dargestellt) gebundene Inhibitor Valin-Pyrrolidid gezeigt. [Abbildung erstellt anhand der Kristallstruktur 1N1M (Rasmussen *et al.*, 2003)].

Die DP IV gliedert sich strukturell in mehrere Regionen (Abb. 1.1). Der aus sechs Aminosäuren bestehenden N-terminale Bereich ist intrazellulär lokalisiert. Das Enzym wird durch einen Transmembrananker (Aminosäuren 7-28) auf der Zelloberfläche fixiert. Die Aminosäuren 29-39 bilden einen kurzen flexiblen Stiel zwischen Zellmembran und der α/β -Hydrolasedomäne. Bei der löslichen Form der DP IV fehlen der intrazelluläre und der Transmembranbereich, hier beginnt die Sequenz zwischen den Aminosäuren 29 und 39 (Fan *et al.*, 1997; Iwaki-Egawa *et al.*, 1998; Vanhoof *et al.*, 1992). Das Protein wird strukturell in eine α/β -Hydrolasedomäne (katalytische Domäne) und eine β -Propellerdomäne untergliedert. Die α/β -Hydrolasedomäne wird von den Aminosäuren 39-51 und 506-766 gebildet und beinhaltet die katalytische Triade des Enzyms bestehend aus S630, D708 und H740. Diese Domäne besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, welches von α -Helixen umgeben ist (Engel *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003).

Die β -Propellerdomäne (Aminosäuren 55-497) besteht aus acht β -Faltblättern, die jeweils aus vier antiparallelen β -Strängen aufgebaut sind (Abb. 1.1). Die acht β -Faltblätter formen zusammen eine Pore, die sich über dem Eingang zu einem trichterartigen „Tunnel“ befindet. Die Pore stellt einen möglichen Substratzugang zu dem in einem Hohlraum im Inneren des Enzyms befindlichen katalytischen Zentrum dar. Dieser „Tunnel“ weist einen Durchmesser

von 9 bis 15 Å und eine Länge von ca. 28 Å auf (Rasmussen *et al.*, 2003). Es ist denkbar, dass die Flexibilität von Teilen des β -Propellers (Bewegung des ersten β -Faltblatts) ein Schliessen oder Öffnen des Substratzuganges erlaubt. Einen zweiten und kürzeren Weg des Substrateintritts stellt eine ovale, so genannte „Seitenöffnung“ zwischen dem β -Propeller und der α/β -Hydrolasedomäne mit einem Durchmesser von 15 - 22 Å dar.

Welcher der beiden Wege der Substrateingang ist oder ob es substratspezifische Eingänge und / oder Ausgänge gibt wird kontrovers diskutiert (Aertgeerts *et al.*, 2004b; Engel *et al.*, 2003). Für PEP und die Tricorn-Protease, die eine ähnliche β -Propellerstruktur aufweisen, konnte der Substrateintritt durch einen „Tunnel“ im β -Propeller nachgewiesen werden (Brandstetter *et al.*, 2002; Fülöp *et al.*, 2000).

β -Propellermotive von Proteinen sind potentielle Interaktionsstellen mit anderen Proteinen (Fülöp und Jones, 1999). Besonders intensiv ist die Interaktion der DP IV mit Adenosindeaminase (ADA) untersucht worden, welche unabhängig von der katalytischen Funktion beider Enzyme stattfindet. Dabei kommt es zu einer Protein-Protein Kopplung mit dem vierten und fünften „ β -Propellerblatt“ (Aminosäuren 282-295 und 322-350 der DP IV) vorrangig an den hydrophoben Aminosäuren L294 und V341 der DP IV (Ludwig *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden Aminosäuren des β -Propellers als Bindungsstellen für „*human immunodeficiency virus*“ (HIV)-gp (Glykoprotein) 120, Kollagen (Aminosäureresten 238 und 495), Plasminogen (Aminosäureresten 313-319) und Fibronectin (Aminosäurereste 469-479) beschrieben (De Meester *et al.*, 1999; Lambeir *et al.*, 2003).

Die N-Glykosylierung spielt eine Rolle bei Faltung, Transport und Stabilität der DP IV, ist aber auch relevant in physiologischen und pathologischen Prozessen (Fan *et al.*, 1997). Die DP IV aus Säugern enthält zwischen 8 und 11 potentielle N-Glykosylierungsstellen. Der Kohlenhydratanteil kann 18-25 % des Molekulargewichtes der DP IV betragen (Aertgeerts *et al.*, 2004a; Fan *et al.*, 1997; Fukasawa *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 2002; Marguet *et al.*, 1992; Nishimura *et al.*, 1999; Ogata *et al.*, 1989). Strukturelle Analysen der Oligosaccharide von Ratten-DP IV weisen auf hohe Heterogenitäten innerhalb einzelner Strukturen hin. Durch die analytische isoelektrische Fokussierung der DP IV konnten, aufgrund des unterschiedlichen Anteils an Säuregruppen in der Kohlenhydratstruktur, Isoformen mit isoelektrischen Punkten zwischen 3,0 und 6,4 nachgewiesen werden (Fukasawa *et al.*, 1983; Kähne *et al.*, 1996; Mentlein, 1999; Puschel *et al.*, 1982). Die Anzahl der Isoformen ist sowohl von der Spezies, dem Gewebe, als auch vom Zellalter und dem Differenzierungsgrad abhängig.

1.1.3 Katalytisches Zentrum und Substrathydrolyse

DP IV ist in der Lage, die Freisetzung N-terminaler Dipeptide von Oligopeptiden und Polypeptiden zu katalysieren. Eine Voraussetzung dafür ist, dass sich in vorletzter Position der Peptidkette ein Prolin oder Alanin befindet (Heymann und Mentlein, 1978; Kato *et al.*, 1978b). Die Iminosäure Prolin hat unter den 20 proteinogenen Aminosäuren einen Sonderstatus. Prolin limitiert den Rotationswinkel von Peptidbindungen und führt so zu einer Fixierung der Peptidkette an dieser Position (Yaron und Naider, 1993). Aufgrund des

Pyrrolidinrings enthält Prolin weniger funktionelle Gruppen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, was unter anderem dafür verantwortlich ist, dass diese Aminosäure selten in α -Helix- bzw. β -Faltblattstrukturen vorkommt. Wegen dieser Besonderheiten sind nur wenige Proteasen in der Lage, die Hydrolyse von Peptidbindungen zu katalysieren, an denen Prolin beteiligt ist (Mentlein, 1988; Yaron, 1987).

Voraussetzung für eine DP IV katalysierte Hydrolyse ist: ein protonierter N-Terminus, Aminosäuren in P_1^* - und P_2 -Position die sich in trans-Konfiguration befinden, keine D-Aminosäuren in P_1 - oder P_1' -Position und kein Prolin oder Hydroxyprolin in P_1' -Position. Neben Prolin und Alanin in P_1 -Position akzeptiert DP IV zusätzlich Hydroxyprolin, Serin und Glycin (Abb. 1.2) (Demuth und Heins, 1995). Die Präferenz für Prolin und Alanin in P_1 -Position gegenüber anderen Aminosäuren wird durch einen Vergleich der k_{cat}/K_m -Werte deutlich (k_{cat}/K_m zwischen $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Prolin in P_1 -Position und $4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Leucin in P_1 -Position) (Bongers *et al.*, 1992). Für Aktivitätsassays werden Substrate wie Xaa-Pro-AMC und Xaa-Pro-pNA genutzt, wobei durch DP IV-Aktivität chromogene [pNA (4-Nitroanilin)] bzw. fluorogene Abgangsgruppen [AMC (7-Amido-4-Methylcoumarin)] freigesetzt und detektiert werden (Kato *et al.*, 1978b).

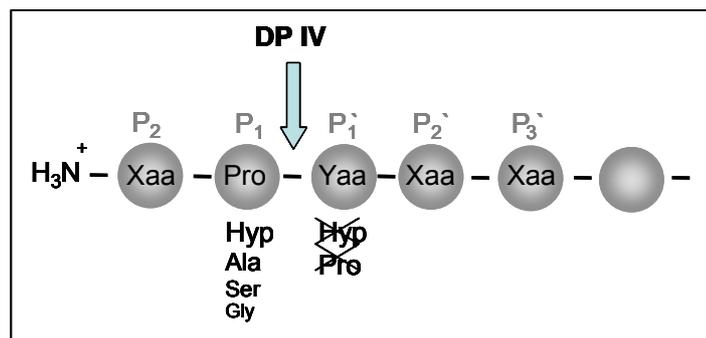


Abb. 1.2: Substratspezifität der DP IV (Demuth und Heins, 1995). Aufgelistet sind Aminosäuren, welche (in abnehmender Reihenfolge der Substratspezifität) die enzymatische Spaltung begünstigen (in P_1 -Position) oder eine Hydrolyse verhindern (in P_1' -Position, durchgestrichelt).

DP IV ist eine ubiquitär verbreitete Serinprotease, die durch den klassischen Serinproteaseinhibitor Diisopropylfluorophosphat (DFP) hemmbar ist. Durch Punktmutationen konnte innerhalb des stark konservierten C-terminalen Bereichs die katalytische Triade S630, D708, H740 identifiziert werden (David *et al.*, 1993; Ogata *et al.*, 1992) und später über Co-Kristallisation bei Bindung von Substraten bzw. Inhibitoren bestätigt werden (Brenner, 1988; Fülöp und Jones, 1999; Goettig *et al.*, 2002; Polgar, 1992; Rasmussen *et al.*, 2003). Serinproteasen, Esterasen und Lipasen weisen die typische Konsensus-Sequenz Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly um den aktiven Serylrest auf. Im Gegensatz zu den klassischen Serinproteasen der Subtilisine (Familie S8; D, H, S) und Chymotrypsine (Familie S1; H, D, S) unterscheidet sich DP IV, bezogen auf die Anordnung der Aminosäurereste der katalytischen

* Die Bezeichnung der Aminosäurereste des Substrates erfolgt nach Schechter und Berger (Schechter und Berger, 1967). Danach befindet sich die Aminosäure, deren Aminogruppe an der zu hydrolysierenden Peptidbindung beteiligt ist, in P_1' -Position. Die Aminosäure, die die Carbonylgruppe dieser Bindung beiträgt, befindet sich in P_1 -Position. In N-terminaler Richtung wird die Nummerierung mit P_2, P_3, \dots, P_n und in Richtung des C-Terminus mit P_1', P_2', \dots, P_n' fortgesetzt. Die entsprechenden Bindungsstellen im Enzym werden mit S_n bezeichnet.

Triade (S, D, H). Aufgrund dieser Anordnung und des α/β -Hydrolase-Motivs im Enzym gehört DP IV zur Prolyloligopeptidase-Familie (S9), gemeinsam u. a. mit Prolylendopeptidase und der Acylaminoacylpeptidase (Barrett und Rawlings, 1992; Polgar und Szabo, 1992). Kürzlich wurden in derselben Unterfamilie S9b weitere Enzyme identifiziert, wozu neben DP IV und Fibroblastenaktivierungsprotein alpha (FAP- α) auch Dipeptidylpeptidase 9, Dipeptidylpeptidase 8 und die inaktiven Dipeptidylpeptidase IV ähnlichen Proteine 1 (DPL 1, DP 6, DPX) und 2 (DPL 2, DP 10) zählen (Rosenblum und Kozarich, 2003; Sedo und Malik, 2001).

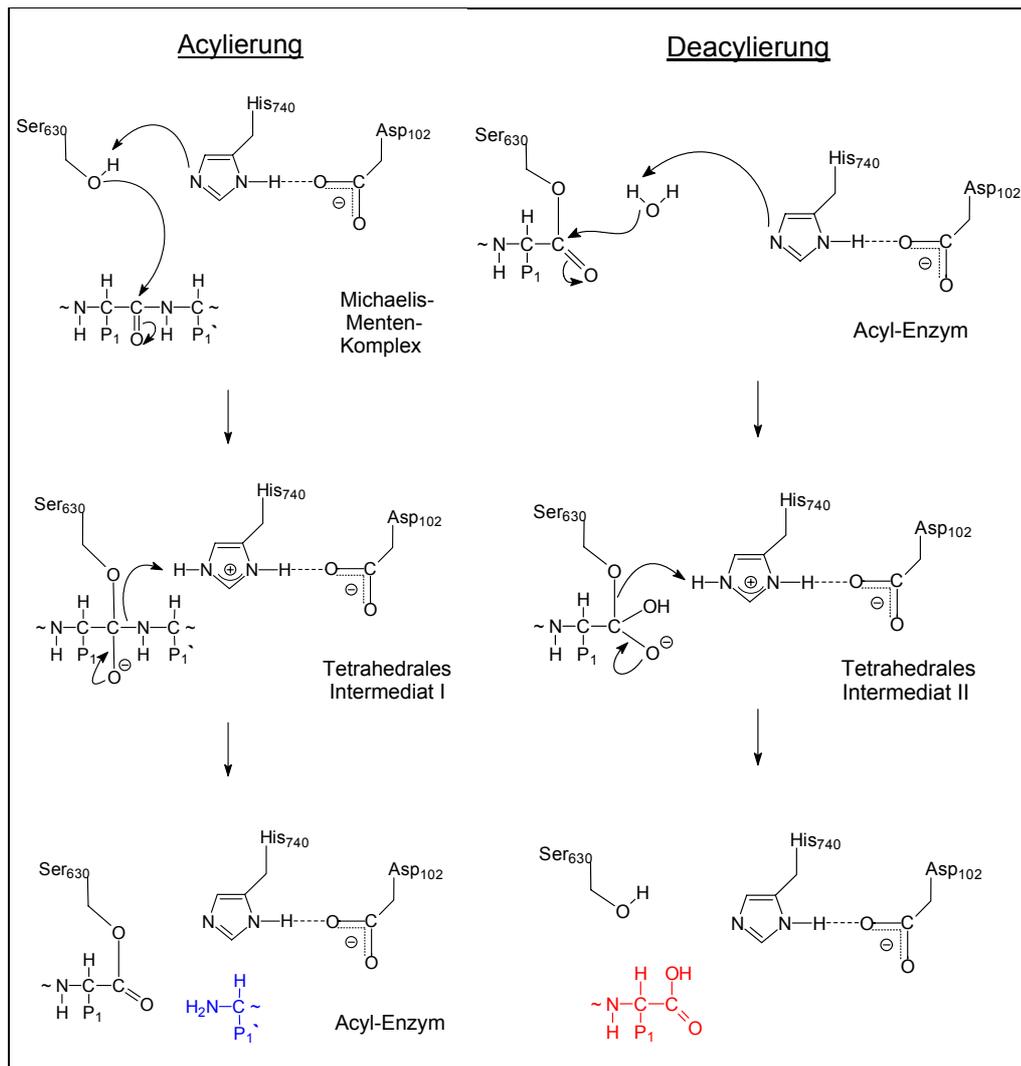


Abb. 1.3: Katalysemechanismus der DP IV. Im Michaelis-Menten-Komplex erfolgt der nukleophile Angriff von S630 auf die Carbonylgruppe der zu spaltenden Amidbindung. Der als Base fungierende Imidazolring des H740 abstrahiert das Proton unter Bildung eines Imidazolium-Ions, was durch das Carboxylat-Ion des D102 begünstigt wird. Es kommt zur Ausbildung des tetrahedralen Intermediats I. Das tetrahedrale Intermediat I zerfällt in das Acyl-Enzym und das Amin (blau dargestellt). Die Deacylierung, welche als Umkehrung der Acylierungsreaktion verläuft, startet mit dem nukleophilen Angriff von Wasser auf das Acyl-Enzym. Hierbei fungiert H740 wiederum als Base. Das gebildete tetrahedrale Intermediat II zerfällt unter Freisetzung der Carbonsäure (rot dargestellt) und der katalytischen Reste der Triade entsprechend des Ausgangszustandes.

Die katalytische Triade der DP IV ist in einem relativ großen Hohlraum zwischen der α/β -Hydrolase- und der β -Propellerdomäne lokalisiert. Bei der Substratkatalyse greift S630 nach Bildung des Michaelis-Menten-Komplexes die Carbonylgruppe des zu spaltenden

Peptides nukleophil an (Abb. 1.3.). Hierbei handelt es sich um eine kovalente Katalyse, das heisst, es entsteht ein tetraedrisches Zwischenprodukt durch kovalente Bindung des Kohlenstoffs der zu spaltenden Bindung an die Hydroxylgruppe des S630. Der Imidazolring des H740 nimmt das abgespaltene Proton unter Bildung eines Imidazolium-Ions auf (allgemeine Basenkatalyse). Die Protonierung des H740 wird dabei durch den Feldeffekt, der vom Carboxylat-Ion des D102 ausgeht, begünstigt.

Das tetraedrische Zwischenprodukt zerfällt unter Deprotonierung des H740 in das Acyl-Enzym-Zwischenprodukt (allgemeine Säurekatalyse). Die Deacylierung verläuft im Wesentlichen als Umkehrung der Acylierung. Durch Wasser als angreifendes Nukleophil wird das Carboxylat-Produkt (die zwei N-terminalen Aminosäuren der geschnittenen Peptidkette) freigesetzt (Abb. 1.3) (Voet und Voet, 1992). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse ist abhängig von der Aminosäure in P₁-Position des Substrates. Für die Hydrolyse von Prolin-Substraten (Prolin in P₁-Position) ist die Deacylierung, für Alanin-Substrate (Alanin in P₁-Position) die Acylierungsreaktion geschwindigkeitsbestimmend (Rahfeld *et al.*, 1991a).

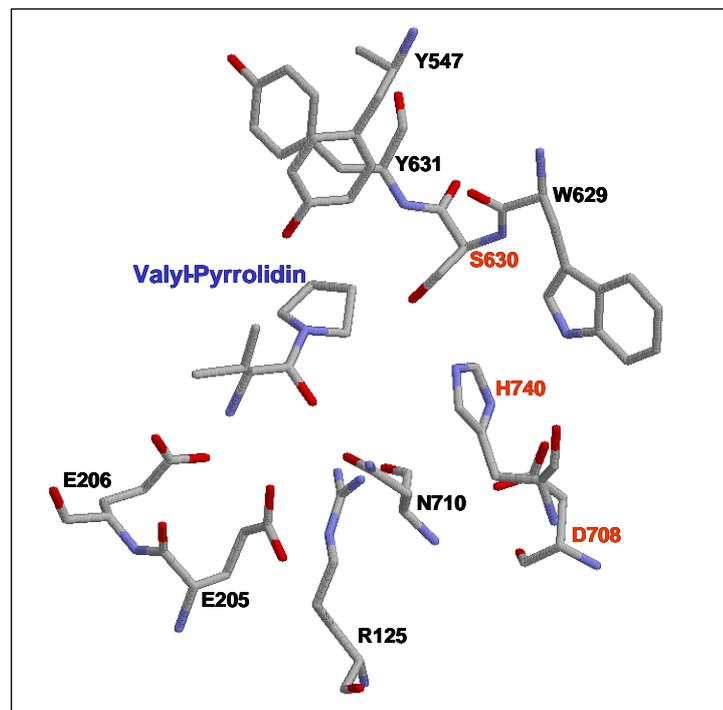


Abb. 1.4: Darstellung des katalytischen Zentrums von humaner DP IV mit dem gebundenen Inhibitor Valyl-Pyrrolidin („stick“ Modus, „CPK“) [Abbildung erstellt anhand der Kristallstruktur 1N1M (Rasmussen *et al.*, 2003)]. Gezeigt sind die Aminosäuren („stick“ Modus, „CPK“) der katalytischen Triade (S630, D708 und H740 mit Beschriftung in rot), E205 und E206 welche mit dem protonierten N-Terminus von Substraten interagieren, R125 und N710 die mit dem Peptidrückgrad Wechselwirkungen eingehen, W629 die mit dem P₂-Bereich des Substrates interagiert und Y547 und Y631, welche vermutlich an der Bindung des Oxyanion-Lochs beteiligt sind.

In der Umgebung der katalytischen Triade befinden sich Aminosäuren, welche für die Formation einer prolinspezifischen hydrophoben S₁-Erkennungstasche verantwortlich sind. Die Aminosäuren V656, W659, Y662, Y666 und V711 definieren die S₁-Bindungstasche. Darüber hinaus wird durch Y631 und Y547 das sogenannte Oxyanion-Loch gebildet (Abb. 1.4). In die

sich ergebende kleine Tasche passen außer dem hydrophoben Prolin nur Aminosäuren mit kurzen Seitenketten. Dies erklärt die bevorzugte Bindung von Prolin und spiegelt sich in der Reihenfolge der P_1 -Aminosäuren bei der Selektivität der Katalyse wieder (Abb. 1.2) (Mentlein, 1999). Generell werden alle Aminosäuren in P_2 -Position akzeptiert, bevorzugt aber Aminosäuren mit großen- und langen- gegenüber sauren- Seitengruppen (Engel *et al.*, 2003). Eine weitere Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt über die Ausbildung von Salzbrücken zwischen dem Substrat-N-Terminus und zwei negativ geladenen Seitenketten von E205 und E206 (Abb. 1.4). Beide Aminosäuren gehören zur β -Propellerdomäne des Enzyms. Ein Aminosäureaustausch von einer der zwei Glutaminreste führt zur Inaktivierung des Enzyms gegenüber Dipeptidsubstraten (Abbott *et al.*, 1999). Das Peptidrückgrad wird durch die zwei Aminosäuren N710 und R125 stabilisiert. Des Weiteren bildet R125 eine Salzbrücke zusammen mit E205 und justiert damit dessen Position.

Die S_1 -Bindungsstelle wird als flach und wenig ausgeprägt beschrieben. Es konnten keine Substrat-Enzym Interaktionen gezeigt oder die Präferenz für bestimmte Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Aminosäurereste in P_1 - und P_2 -Position sind im tetrahedralen Komplex dem Hohlraum um das katalytische Zentrum, zugewandt. Durch Co-Kristallisation des Substratfragments NP Y(1-10) (Neuropeptid Y) mit DP IV konnte von Aertgeerts *et al.* gezeigt werden, dass Lysin in P_2 -Position in direktem Kontakt mit der Seitenkette von W629 steht (Aertgeerts *et al.*, 2004b). Über diese Interaktion hinaus konnten keine weiteren Enzym-Substrat Wechselwirkungen innerhalb der ersten zehn Aminosäuren von NP Y(1-10) mit DP IV nachgewiesen werden.

In den letzten Jahren wurde ein breites Spektrum von DP IV-Inhibitoren entwickelt und in Tierversuchen bis zur dritten klinischen Phase getestet und angewendet. Viele Inhibitoren wirken kompetitiv und stellen Produktanaloge, z.B. Lys[Z(NO(2))]-pyrrolidine und Valpyrrolidine oder Substratanaloga (NVP DPP728) dar. Ebenfalls kompetitiv inhibieren Oligopeptide der Struktur Xaa-Xaa-Pro-, z.B. das HIV1-TAT-Protein oder N-terminale Peptide von rekombinanten Zytokinen [wie Met-IL-2 (1-6) (Interleukin-2)] (Gutheil *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1995). Zudem kommt es zu einer kompetitiven Hemmung durch Hydrolyseprodukte von DP IV-Substraten wie z.B. Xaa-Pro- oder Xaa-Ala-Dipeptide. Als irreversibel wirkender Inhibitor ist Pro-Pro-Diphenylphosphonatester bekannt, der das aktive Serin phosphoryliert und eine Deacylierungs-Halbwertszeit von fünf Stunden aufweist.

1.1.4 Biologische Bedeutung

Rolle der enzymatischen Aktivität der DP IV

Häufig sind Proline an einer für die Regulation der biologischen Aktivität dieser Polypeptide entscheidenden Position zu finden und nur wenige proteolytische Enzyme sind in der Lage, Peptide, an denen C- oder N-terminal ein Prolin vorkommt, zu hydrolysieren. Diese Prolylreste schützen vor unspezifischem proteolytischem Abbau und eröffnen die Möglichkeit, durch limitierte Proteolyse die biologische Wirkung zu kontrollieren. Eine der wenigen hochspezialisierten, prolinspezifischen Proteasen ist DP IV (Mentlein *et al.*, 1988; Yaron und

Naider, 1993). Die in Tabelle 1.1 beschriebenen Substrate kommen *in vivo* in Konzentrationen im nano- bis picomolaren Bereich vor. Die Bedeutung der DP IV Katalyse *in vivo* kann mit Hilfe des kinetischen Parameters für die spezifische Aktivität k_{cat}/K_m eingeschätzt werden.

Tab. 1.1: DP IV-Substrate, aufgelistet, innerhalb der jeweiligen Substratfamilie, in der Reihenfolge der ermittelten spezifischen Aktivität. Pfeile markieren die durch DP IV hydrolysierte Peptidbindung.

Peptide	Aminosäuren	Aminosäuren am N-Terminus	k_{cat}/K_m [$10^6 M^{-1}s^{-1}$]	Effekt der DP IV Prozessierung	Referenz
Pancreatic Polypeptid					
Neuropeptide Y	36	YP↓SKPD...	0,76 / 12	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Peptide YY	36	YP↓IKPE...	1,9	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
GRF/Glukagon-Familie					
[Ala ¹⁵]GRF(1-29)NH ₂	44 / 29	YA↓DAIF...	2	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
GLP-1	30	HA↓EGTF...	0,43 / 2,3 / 1,1	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
GIP	42	YA↓EGTF...	0,22 / 13 / 0,56	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Glukagon	29	HS↓QGTF...	0,19	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
PHM	27	HA↓DGVF...	0,19	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Oxyntomodulin	37	HS↓QGTF...	0,15	Inaktivierung	(Zhu <i>et al.</i> , 2003)
PACAP38	38	HS↓EG↓VF...	0,024	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
GLP-2	33	HA↓EGSF...	0,02	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
VIP	59	HS↓DA↓VF...	0,012 / 0,0017	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
PACAP27	27	HS↓EG↓VF...	0,0042	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Chemokine					
SDF-1 α	68	KP↓VLSL...	5	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
SDF-1 β	72	KP↓VLSL...	5	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
MDC (69)	69	GP↓YG↓AN...	4	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Eotaxin	74	GP↓ASVP...	1,9	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
IP-10	77	VP↓LSRT...	1,8	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
I-TAC	73	FP↓MFKR...	1,2	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
MDC (67)	67	GP↓YG↓AN...	0,5	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Mig	10	TP↓VVRK...	0,34	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
RANTES	68	SP↓YSSD...	0,04	Rezeptorsselektivität	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Neuropeptide					
β -casomorphin	7	YP↓FVEPI	4,1	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Substance P	11	RP↓KP↓Q...	0,91	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Endomorphin-1	4	YP↓FF	n.b.	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Endomorphin-2	4	YP↓WF	n.b.	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Enterostatin	5	VP↓DPR	n.b.	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Tyr-MIF-1	4	YP↓LG	n.b.	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Morphiceptin	4	YP↓FP	n.b.	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Kentsin	4	TP↓RK	n.b.	Inaktivierung	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Weitere					
GRP	27	VP↓LP↓AG..	1,8 / 2,1	unbekannt	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Vasostatin 1	76	LP↓VNSPM...	n.b.	unbekannt	(Lambeir <i>et al.</i> , 2003)
Trypsinogen pro-peptide	8	FP↓T...	n.b.	unbekannt	(Bird <i>et al.</i> , 2001)
Aprotinin	58	RP↓D...	n.b.	unbekannt	(Bird <i>et al.</i> , 2001)
Procalcitonin	116	AP↓FRSA...	n.b.	unbekannt	(Wrenger <i>et al.</i> , 2000)

Für viele Peptidhormone [(wie z.B. GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*), GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*), GRF (*Growth hormone Releasing Factor*)] (Frohman *et al.*, 1989; Siegel *et al.*, 1999; Yip und Wolfe, 2000), Chemokine [wie z.B. RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), SDF-1 α (*Stromal-Cell-Derived Factor 1 α*)] (De Meester *et al.*, 1999) und Neuropeptide [wie z.B. Neuropeptid Y (NP Y), Enterostatin, Substanz P, PP (Pancreatic Polypeptid), PYY]] (Ahmad *et al.*, 1992; Bouras *et al.*, 1995; Heymann und Mentlein, 1978; Mentlein *et al.*, 1993) mit Prolin oder

Alanin an aminoterminal vorletzter Position ist ein intakter N-Terminus essentielle Voraussetzung für die Bindung an spezifische Rezeptortypen und die damit verbundene Auslösung spezifischer Signalkaskaden (Tab. 1.1).

NP Y gehört zu den am intensivsten untersuchten biologisch aktiven Substraten der DP IV. Für NP Y wurden bisher fünf verschiedene Rezeptortypen beschrieben, die in unterschiedliche Prozesse involviert sind (Gehlert, 1998). Aus der Abspaltung des N-terminalen Dipeptides Tyr-Pro entsteht aus einem Y1-Rezeptor-Agonisten (Insulinausschüttung, Glukoseaufnahme) eine Verbindung, die bevorzugt an den Y2- und Y5-Rezeptor bindet (Blomqvist und Herzog, 1997).

GIP gehört neben GLP-1 zu den Inkretinen, die einen zu Glukagon inversen Effekt auf die Blutglukosekonzentration haben. Die Aufnahme insbesondere kohlenhydratreicher Nahrung und der damit verbundene Anstieg der Blutglukosekonzentration erfordern eine schnelle Reaktion des Organismus auf diesen hyperglykämischen Zustand. Die Sekretion von GIP, GLP-1 und PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide*) im Magen-Darm-Trakt stimuliert die Insulinfreisetzung, die verstärkte Aufnahme von Glukose in die Körperzellen und führt letztendlich im gesunden Organismus zu einer Normalisierung des Blutglukosespiegels. In den letzten Jahren wurde das therapeutische Potential der Hormone GLP-1 und GIP für die Behandlung von Typ 2 Diabetes (Altersdiabetes, *Non-insulin dependent diabetes mellitus* - NIDDM) erkannt (Deacon *et al.*, 1998; Demuth *et al.*, 2004; Holst und Deacon, 1998; Marguet *et al.*, 2000; Nauck, 1996; Nauck *et al.*, 1997; Nauck *et al.*, 1998). GLP-1 und GIP besitzen jeweils einen Alaninrest an Position zwei des N-Terminus. Im Plasma zirkulierende DP IV katalysiert die Abspaltung der beiden N-terminalen Aminosäuren und überführt die Inkretine in eine biologisch inaktive Form. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Lebensdauer für aktives GLP-1 und GIP durch die Inhibierung der DP IV verlängert wird und damit einen therapeutischen Ansatz für die Senkung des Blutzuckerspiegels bei Typ 2 Diabetes darstellt (Abb. 1.5) (Holst und Deacon, 1998; Marguet *et al.*, 2000; Mentlein, 1999; Pederson *et al.*, 1998).

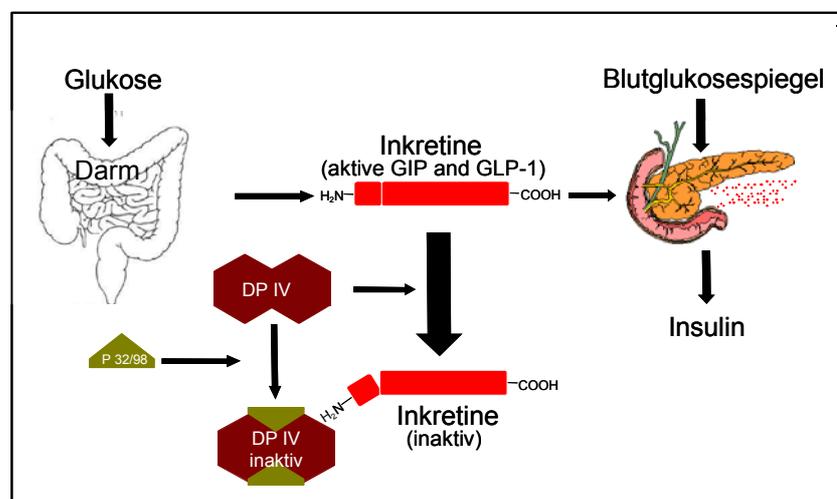


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Wirkung der DP IV und des Inhibitors P32/98 (Isoleucyl-Thiazolidin) auf Glukosespiegel und Insulinausschüttung.

DP IV als Bindungspartner

Unabhängig von der enzymatischen Aktivität ist DP IV/CD26 als Assoziationsmolekül bzw. Vermittler von Zell-Matrix-Adhäsionsprozessen beschrieben. Kameoka *et al.* gelang der Nachweis, dass lymphozytäre DP IV/CD26 auf der Zelloberfläche mit ADA assoziiert (Kameoka *et al.*, 1993). ADA katalysiert die irreversible Deaminierung des Adenosins und 2'-Desoxyadenosins zu Inosin bzw. 2'-Desoxyinosin. Adenosin hemmt die T-Zell-Proliferation, folglich wird durch die Senkung der lokalen Adenosinkonzentration durch ADA die T-Zell-Proliferation verstärkt. Eine immunregulatorische Bedeutung durch die DP IV/CD26-ADA-Assoziation im humanen Organismus wird angenommen. Demgegenüber konnte Iwaki-Egawa *et al.* und De Meester *et al.* nur eine geringe Bindungsaffinität von ADA zu DP IV/CD26 der Ratte und Maus nachgewiesen (De Meester *et al.*, 1995; Iwaki-Egawa *et al.*, 1997).

Es wurde kürzlich gezeigt, dass DP IV Komplexe mit Na^+/H^+ -Austauschern in der Niere bildet, die in ihrer Funktion über DP IV-Inhibitoren beeinflusst werden können (Girardi *et al.*, 2004).

Es wird vermutet, dass DP IV eine Rolle in der Tumorgenese spielt. So konnte gezeigt werden, dass auf endothelialen Lungenzellen von Ratten exponierte DP IV als Adhäsionsmolekül für Brustkrebszellen dient und dadurch die Besiedlung der Lunge durch diese Zellen ermöglicht. Dieser Prozess wird vorrangig durch Fibronectin vermittelt, was assoziiert mit der Oberfläche von Tumorzellen als Hauptbindungspartner der DP IV fungiert (Cheng *et al.*, 1998). DP IV aus Rattenleber und Maus-Fibroblasten zeigt außerdem Wechselwirkungen mit Kollagen (Hanski *et al.*, 1988) und Fibronectin (Piazza *et al.*, 1989). Konträr zu früheren Arbeiten konnte aber auch gezeigt werden, dass DP IV-Aktivität negativ mit dem Fortschritt bei Tumorerkrankungen korreliert (Khin *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2002).

Die biologische Funktion der DP IV/CD26 als Oberflächenprotein von T-Lymphozyten wurde erstmals von Feller und Pawaresch beschrieben (Feller und Parwaresch, 1980). Im Immunsystem wird dem Enzym eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten zugeordnet. Für die Aktivierung der T-Zellen sind zwei Signale notwendig. Zunächst muss der T-Zell-Rezeptor-Komplex durch spezifische Peptidantigene oder Antikörper stimuliert werden. Das zweite Signal kann durch verschiedene kostimulatorische Oberflächenmoleküle ausgelöst werden, so beispielsweise durch Zytokinrezeptoren, Zell-Zell-Kontakte oder auch Zell-Matrix-Kontakte. Die kostimulatorischen Eigenschaften der DP IV/CD26 wurden intensiv *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass DP IV/CD26 direkt mit CD45, einer Protein-Tyrosin-Phosphatase interagiert (Torimoto *et al.*, 1991). Durch Hemmung von T-Zellfunktionen (u.a. Proliferation, IL-(Interleukin) 2-Produktion) mit Hilfe von DP IV-Inhibitoren zeigte sich, dass DP IV eine Rolle in diesen Regulationsprozessen spielt (Tanaka *et al.*, 1993). Bei Autoimmunerkrankungen wurde häufig eine hohe Zahl an DP IV/CD26⁺ Zellen am Entzündungsort gefunden. Auch wenn einige der durch CD26^{bright}-T-Zellen vermittelten Effekte nicht direkt mit der Expression der DP IV/CD26 zusammenhängen ist dennoch anzunehmen, dass einige Immunfunktionen indirekt über DP IV/CD26 beeinflusst werden (De Meester *et al.*, 1999).

Bühling *et al.* konnten die Expression der DP IV/CD26 auf aktivierten B-Lymphozyten und NK-Zellen nachweisen (Bühling *et al.*, 1994). Neben der Funktion als Aktivierungsmarker wurde die Notwendigkeit einer kostimulatorischen Aktivität der DP IV/CD26, die zu einer Erhöhung der Ausschüttung von Interleukin-2 bei der T-Zell-Aktivierung und Proliferierung führt, kontrovers diskutiert (Fleischer, 1994; Hegen *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1993).

Im Zusammenhang mit dem Infektionsmechanismus des HIV-1 wird eine Beteiligung der DP IV/CD26 beim Eintritt des Virus in seine Wirtszelle kontrovers diskutiert. Callebaut *et al.* postulierten, dass DP IV/CD26 als Kofaktor von CD4 an der Bindung des gp 120 (virales Protein) und so an der viralen Infektion beteiligt ist (Callebaut *et al.*, 1993). Andere Autoren konnten dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen (Broder *et al.*, 1994; Lazaro *et al.*, 1994; Morimoto *et al.*, 1994). Wahrscheinlicher ist eine indirekte Beteiligung der DP IV/CD26 durch die Interaktion mit dem natürlichen DP IV-Inhibitor HIV-Tat-(Transaktivator) Protein (Gutheil *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1995; Viscidi *et al.*, 1989) bzw. durch die proteolytische Modifizierung der Chemokine RANTES und SDF-1 α . RANTES(3-68), das durch DP IV-katalysierte Hydrolyse entsteht, ist ein potenterer Inhibitor der HIV-1-Infektion als das intakte RANTES. Das N-terminal verkürzte RANTES(3-68) konkurriert mit dem HIV-1 um die Bindung am CCR5-Rezeptor (der von dem Virus zum Eintritt in die Wirtszelle genutzt wird) und hemmt somit den viralen Infektionsmechanismus (De Meester *et al.*, 1999; Ohtsuki *et al.*, 2000).

1.2 Prolylendopeptidase

1.2.1 Vorkommen

Prolylendopeptidase [EC 3.4.21.26 (Prolyloligopeptidase, PEP)] wurde erstmalig 1971 aus humanem Uterus isoliert und als ein Oxytocin abbauendes Enzym beschrieben (Walter und Shlank, 1971). 1976 isolierten Koida und Walter das Enzym aus Nierenhomogenaten und bezeichneten es als „*Post-prolin-cleaving enzyme*“, da es in der Lage war die Hydrolyse der Pro-Arg-Bindung von Vasopressin zu katalysieren (Koida und Walter, 1976). Bis dato wurden homologe Prolylendopeptidasen in einer Vielzahl von Organismengruppen wie Säugern, Pilzen, Insekten und Bakterien beschrieben (Diefenthal *et al.*, 1993; Ohtsuki *et al.*, 1997; Rennex *et al.*, 1991; Yoshimoto *et al.*, 1997). PEP ist bei der Klasse der Mammalia ubiquitär verbreitet (Kato *et al.*, 1980) und konnte z.B. in Muskel-, Nieren-, Hoden-, Lungen- und Gehirngewebsproben nachgewiesen werden (Goossens *et al.*, 1996; Irazusta *et al.*, 2002). Dabei wurden im Gehirn, speziell im Cortex und im Neostriatum, die höchsten PEP-Aktivitäten gemessen (Gallegos *et al.*, 1999; Irazusta *et al.*, 2002; Mentlein *et al.*, 1990). Zur subzellulären Lokalisation existieren in der aktuellen Literatur unterschiedliche Angaben. Aufgrund von Aktivitätsmessungen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurde PEP als zytosolisches (Dresdner *et al.*, 1982), nukleäres (Ishino *et al.*, 1998), synaptosomales (O'Leary *et al.*, 1996) sowie als extrazelluläres Protein beschrieben (Goossens *et al.*, 1992). Anhand der Aminosäuresequenz kann eine zytosolische Lokalisation des Enzyms angenommen werden (Hasebe *et al.*, 2001). In den letzten Jahren wurde die cDNA der PEP aus einer Vielzahl von Organismen und Geweben kloniert. So sind in der Datenbank des „*National Institutes of*

Health“ (USA, <http://www.nhi.org>) die Proteinsequenzen für humane PEP aus verschiedenen Quellen verfügbar (T-Zellen, Hirn). Des Weiteren konnten die Aminosäuresequenzen für die Enzyme aus Schweinehirn (Rennex *et al.*, 1991), Rinderhirn (Yoshimoto *et al.*, 1997), Maus (Ishino *et al.*, 1998), *Aeromonas hydrophila* (Kanatani *et al.*, 1993), *Flavobacterium meningosepticum* (Diefenthal *et al.*, 1993), *Aeromonas punctata* (Li *et al.*, 2000), sowie aus *Dictyostelium* (Williams *et al.*, 1999) und *Sphingomonas capsulata* (Kabashima *et al.*, 1998) aufgeklärt werden.

1.2.2 Molekulare und katalytische Eigenschaften

PEP ist ein monomeres Enzym dessen Polypeptidkette ein Molekulargewicht von 80 kDa aufweist (humane PEP). Aufgrund der Hemmbarkeit mit DFP wurde PEP als Serinprotease klassifiziert und in die Prolyloligopeptidase Familie (S9) eingeordnet. Im Gegensatz zu DP IV ist PEP eine Endopeptidase und in der Lage, innerhalb von Peptidketten Bindungen zu hydrolysieren. Wie bei DP IV wird dabei die Hydrolyse von Peptidbindungen bevorzugt auf der Carboxylseite von Prolin und - mit geringerer Effizienz - von Alanin katalysiert.

Fülöp *et al.* gelang 1998 die Kristallisation und Strukturaufklärung der PEP isoliert aus dem Schweinemuskel (Fülöp *et al.*, 1998). Das lösliche Enzym ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer C-terminalen katalytischen (α/β -Hydrolasedomäne) und einer N-terminalen, sogenannten β -Propellerdomäne (Abb. 1.6).

Die katalytische Domäne des Enzyms umfasst die Bereiche der Aminosäurereste 1 bis 72 und 428 bis 710 und weist in diesem Bereich eine sequentielle Identität von 21 % mit DP IV auf. Die katalytische Triade (S554, H680 und D641) befindet sich wie bei DP IV innerhalb eines Hohlräume im Inneren des Enzyms. Eine S_1 -Bindungstasche gewährleistet eine hydrophobe Umgebung und eine optimale Passform für den Prolylrest des Substrates. In Übereinstimmung mit der Familie der α/β -Hydrolasen wird das Oxyanion einerseits durch die Aminogruppe des dem katalytischen Serin benachbarten N555 und – im Unterschied zu α/β -Hydrolasen – andererseits durch die Hydroxylgruppe des Y473 stabilisiert (Szeltner *et al.*, 2000). Die Oxyanion-Bindungsstelle ist eine essentielle Voraussetzung für den Katalysemechanismus von Serinproteasen. Das negativ geladene Oxyanion entsteht im Zuge der Katalyse aus dem Carbonylsauerstoff der zu hydrolysierenden Bindung und wird durch zwei Wasserstoffbrücken zu Aminosäuren im aktiven Zentrum der PEP stabilisiert. Das P_2 -Carbonylsauerstoffatom geht Interaktionen mit der Aminosäure R643 ein. Diese Funktion übernehmen bei DP IV die Aminosäuren R125 und N710 (Engel *et al.*, 2003). Bei der Endopeptidase PEP findet aber im Gegensatz zu der Exopeptidase DP IV keine Fixierung des Substrat-N-Terminus über ein Glu-Glu-Motiv statt (E205/E206 bei DP IV) (Thoma *et al.*, 2003).

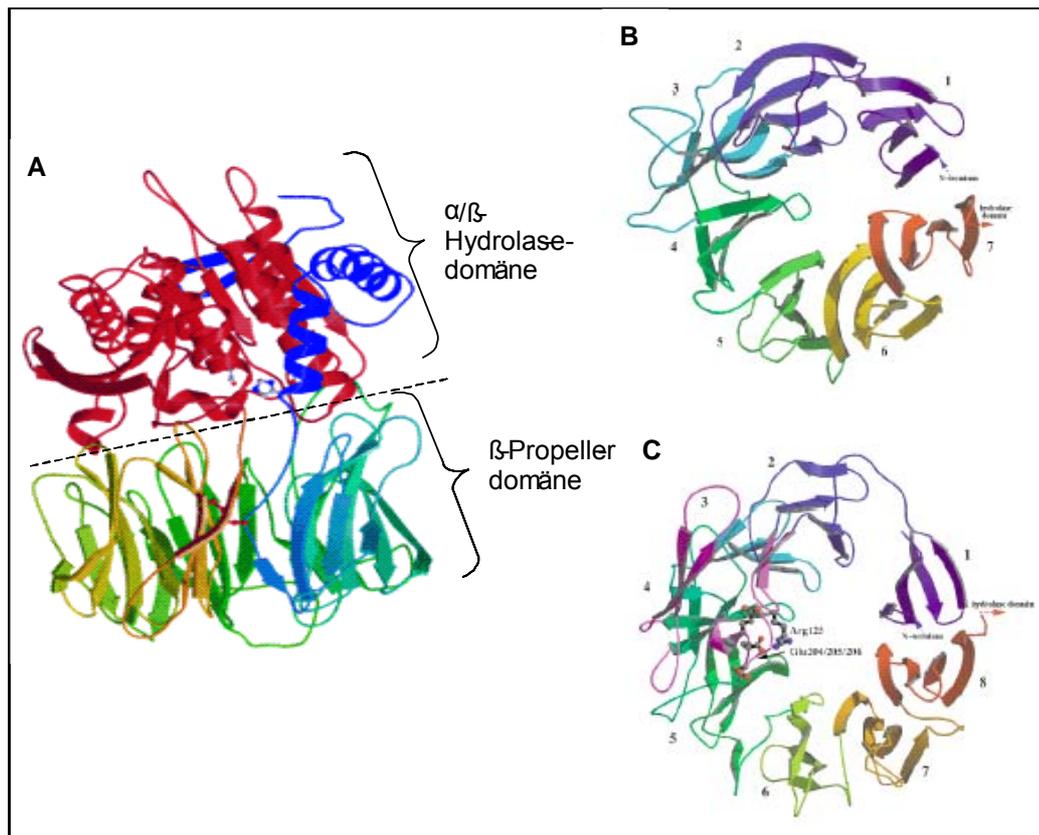


Abb. 1.6: Strukturmodell von PEP [Abbildung nach Fülöp *et al.* (Fülöp *et al.*, 1998)] und DP IV [Abbildung nach Thoma *et al.* (Thoma *et al.*, 2003)]. A) Frontalansicht des gesamten PEP-Moleküls. B) Aufsicht auf die β -Propellerdomäne der PEP mit den sieben „ β -Propellerblättern“ und dem in der Mitte befindlichen zentralen Substrateintrittskanal. C) Im Vergleich, Aufsicht auf die acht-blättrige β -Propellerdomäne der DP IV.

Untersuchungen zum Katalysemechanismus der PEP zeigen, dass Tripeptide die minimale Substratstruktur darstellen (Bordusa und Jakubke, 1998). Aus einer Verlängerung der Peptidkette über die P_4 -Position hinaus resultierte keine weitere Steigerung der enzymatischen Aktivität. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Substratbindungsstelle der PEP aus drei Aminosäurebindungsregionen besteht (S_3 bis S_1).

Der N-terminale Teil des Proteins bildet im Gegensatz zu dem achtblättrigen β -Propeller der DP IV eine siebenblättrige Struktur. Die sieben „ β -Propellerblätter“, bestehend aus den Aminosäureresten 73 bis 427, formen einen zentralen Kanal, der direkt zum katalytischen Zentrum führt (Abb. 1.6). Aufgrund des Kanals und der Anordnung zur katalytischen Domäne wird postuliert, dass die β -Propellerdomäne als „Zugangfilter“ für Substrate zum katalytischen Zentrum fungiert (Fülöp *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu anderen Proteinen, wie der β -Untereinheit von G-Proteinen oder der Kollagenase, ist die Struktur des β -Propellers sowohl der PEP, als auch der DP IV aufgrund fehlender Wasserstoff- und Disulfidbrückenbindungen nicht starr geschlossen, sondern variabel. Die Porenöffnung der PEP kann nur einen Durchmesser von 4 Å erreichen (bei DP IV zwischen 9 und 15 Å). Die Funktion der β -Propellerdomäne als aufgesetztes Selektionsmodul für die katalytische Aktivität konnte mit Hilfe von gerichteten Mutageneseexperimenten gezeigt werden (Fülöp *et al.*, 2000).

Durch *in vitro*-Versuche konnte nachgewiesen werden, dass PEP vornehmlich Peptide mit bis zu 30 Aminosäuren hydrolysiert (Tab. 1.2) (Polgar, 2002). Eine Hydrolyse höhermolekularer Substrate kann aber nicht ausgeschlossen werden (Hasebe *et al.*, 2001). Es ist grundsätzlich möglich, dass lange N-Termini ohne bzw. mit leicht gefalteter Sekundärstruktur durch den zentralen Kanal an die S₁-Position gelangen können.

Tab. 1.2: Durch PEP inaktivierte Neuropeptide. Die PEP-vermittelte Hydrolyse erfolgt an der durch einen Pfeil gekennzeichneten Peptidbindung (Auszug aus Cunningham und O'Connor, 1997).

Neuropeptid	Aminosäuresequenz	Referenz
Angiotensin I	D-R-V-Y-I-H-P↓F-H-L	(Moriyama <i>et al.</i> , 1988)
Bradykinin	R-P-P-G-F-S-P↓P-R	(Greene <i>et al.</i> , 1982)
Substanz P	R-P-L-P↓Q-Q-F-F-G-L-M	(Moriyama <i>et al.</i> , 1988)
Neurotensin	pQ-L-Y-Q-N-L-P↓R-R-P↓Y-I-L	(Camargo <i>et al.</i> , 1984)
Luliberin	pQ-H-W-S-Y-G-L-R-P↓G	(Mendez <i>et al.</i> , 1990)
Vasopressin	C-Y-F-Q-N-C-P↓R-G	(Moriyama <i>et al.</i> , 1988)
Oxytocin	C-Y-I-Q-N-C-P↓L-G	(Walter und Shlank, 1971)
Thyroliberin	pQ-H-P↓NH ₂	(Griffiths <i>et al.</i> , 1982)

1.2.3 Biologische Bedeutung

Im Gegensatz zur Struktur, zum katalytischen Mechanismus und zur Substratselektivität (Fülöp *et al.*, 1998; Polgar, 1991; Polgar *et al.*, 1993; Welches *et al.*, 1993) ist die physiologische Funktion der PEP noch weitgehend unklar. Aktuelle Untersuchungen basieren auf spezifischen PEP-Inhibitoren (Tab. 1.3) oder dem Nachweis veränderter PEP-Aktivitäten in verschiedenen Krankheitsbildern. Es konnte gezeigt werden, dass die PEP-Aktivität bei Patienten mit psychischen und neurodegenerativen Erkrankungen gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen erhöht bzw. erniedrigt ist. Die Erniedrigung der Aktivität bei einer Anzahl von Erkrankungen wie Alzheimer Erkrankung (AD), Parkinsonsche Erkrankung und Chorea Huntington Erkrankung weist darauf hin, dass PEP in neurodegenerative Prozessen involviert ist (Mantle *et al.*, 1996). Interessant ist, dass eine erhöhte PEP-Aktivität im Serum, durch die Gabe des Stimmungsstabilisators Valproinsäure und des Antidepressivums Fluoxetin auf das ursprüngliche Niveau abgesenkt werden kann (Maes *et al.*, 1995).

Zur Hemmung der hydrolytischen Aktivität der PEP existieren eine Anzahl von spezifischen Inhibitoren (Aoyagi *et al.*, 1991; Aoyagi und Muraoka, 1993; Bal *et al.*, 2003; Barelli *et al.*, 1999; Demuth *et al.*, 1993; Goossens *et al.*, 1997; Ohmori *et al.*, 1994; Tezuka *et al.*, 1999; Wallen *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von spezifischen PEP-Inhibitoren neurodegenerative Erkrankungen sowie Lern- und Gedächtnisprozesse beeinflusst werden können (Tab. 1.3).

Tab. 1.3: Neuroprotektive und neurotrophe Effekte durch PEP Inhibierung.

Inhibitor	Effekt	Modellorganismus	Referenz
Eurystatin A und B	Revertiert Scopolamin-induzierte Amnesie	Ratte	(Kamei <i>et al.</i> , 1992)
Y-29794	Reduziert die Bildung von Amyloidplaques im SAM ^a -Modellsystem	Maus	(Kato <i>et al.</i> , 1997)
ONO-1603	Verzögert die Alters-induzierte Apoptose von Neuronen	Primärkultur neuronaler Zellen der Ratte	(Katsube <i>et al.</i> , 1999)
S 17092	Verbessert die kognitiven Fähigkeiten bei MPTP ^b -induziertem Parkinsonismus	Langschwanzmakaken oder Javaneraffe	(Schneider <i>et al.</i> , 2002)

^aMPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine

^bSAM: "senescence-accelerated mouse"

So konnten z.B. mittels des Inhibitors ONO-1603 die gleichen neuroprotektiven und neurotrophen Wirkungen erzielt werden, wie mit dem AD-Antidemenzwerkstoff Tetrahydroaminoacridin (Katsube *et al.*, 1996). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die γ -Sekretase-spezifische Prozessierung von APP (*Amyloid Precursor Protein*) und die Bildung von Amyloidplaques durch PEP-Inhibitoren gehemmt bzw. verringert wird (Kato *et al.*, 1997; Shinoda *et al.*, 1997). Hinsichtlich von Lern- und Gedächtnisprozessen können mit Hilfe von PEP-Inhibitoren Gedächtnisstörungen, die z.B. durch Scopolamin oder Elektroschock induziert wurden, teilweise oder vollständig revertiert werden (Nanri und Kaneto, 1987; Yoshimoto *et al.*, 1987). Dabei konnte teilweise eine Konzentrationserhöhung von Neuropeptiden wie Substanz P oder Vasopressin in verschiedenen Gehirnregionen von Inhibitor-behandelten Versuchstieren nachgewiesen werden (Atack *et al.*, 1991; Miura *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1992; Shinoda *et al.*, 1999). Außerdem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Inhibierung der PEP und dem Anstieg des Inositol(1,4,5)P₃-Spiegels (der wiederum mit der Wirkung von Substanz P auf Lern- und Gedächtnisprozesse in Verbindung gebracht wird) in der Zelle (Schulz *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2002). Für den eventuellen Einsatz als „kognitive Verstärker“ wurden PEP-Inhibitoren bereits in klinischen Studien der Phase I getestet (Morain *et al.*, 2000; Umemura *et al.*, 1997; Umemura *et al.*, 1999). Allerdings sind die molekularen Mechanismen für den Einfluss der PEP auf die oben erwähnten Prozesse vollständig ungeklärt.

Viele Neuropeptide wie z.B. Substanz P, Thyrotropin-releasing hormone, Oxytocin und Vasopressin enthalten einen Prolylrest in ihrer Sequenz (Tab. 1.2) (Vanhoof *et al.*, 1995; Yaron und Naider, 1993). Der Nachweis der *in vitro* Spaltung dieser Peptide durch zytosolische Prolylloleptidasen (Brzezinska-Slebozinska und Adamczyk, 1979; Tate, 1981) und die Assoziation der PEP mit synaptosomalen Membranen implizieren eine physiologische Rolle des Enzyms im Metabolismus der Neuropeptide. Neue Untersuchungen bestätigen diese These für Angiotensin und Bradykinin (Dendorfer *et al.*, 1997; Ferrario und Iyer, 1998).

1.3 Aufgabenstellung

Die hochspezifischen Serinproteasen Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5) und Prolylendopeptidase (PEP, EC 3.4.21.26) hydrolysieren vorzugsweise Peptidbindungen am C-Terminus von Prolin. Die Exopeptidase DP IV ist extrazellulär lokalisiert, die Endopeptidase PEP wird intrazellulär beschrieben. Beide sind durch die enzymatische Hydrolysefunktion in die Modulierung der Wirkung von Peptidhormonen involviert.

Ein Forschungsschwerpunkt der Firma probiodrug AG ist es, Effektoren für DP IV und PEP zu entwickeln. Ziel ist es, hochspezifisch die Katalysefunktion der Enzyme zu modulieren und damit in pathophysiologische Prozesse einzugreifen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Expressionssystem für humane rekombinante DP IV etabliert und das daraus gewonnene Protein im Vergleich mit dem aus Schwein isolierten Enzym charakterisiert werden. Dazu sollten die proteinbiochemischen Eigenschaften und Kinetiken in Bezug auf Substrathydrolyse sowie Inhibierungs- und Bindungseigenschaften des rekombinanten Enzyms untersucht werden. Außerdem sollte das Expressionskonstrukt und die Fermentations- und Isolierungsstrategie optimiert werden, um rekombinante humane DP IV in ausreichenden Mengen für weitere Untersuchungen zu Verfügung zu stellen.

Ein breites Spektrum von Neuropeptiden, Chemokinen und Zytokinen sind *in vitro* und *in vivo* Substrate der DP IV. Mit Hilfe des rekombinanten Enzyms und gezielter Aminosäurevariationen im katalytischen Zentrum und dessen Peripherie sollte ein weitergehender Einblick in Struktur- und Funktionsbeziehungen der DP IV, insbesondere bei der Erkennung und Bindung von Peptidsubstraten ermöglicht werden.

Die Substrate und die physiologische Rolle von Prolylendopeptidase sind weitgehend spekulativ. Dem Enzym wird aber eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen, wie auch bei neurodegenerativen Prozessen zugewiesen. In dieser Arbeit sollte durch die kinetische Charakterisierung von Oligopeptidsubstraten der PEP ein Einblick in die Substratspezifität und damit die physiologische Funktion des Enzyms erhalten werden.

2 Methoden

[Die verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte, Enzyme, Kits, Marker, Softwareprogramme, Puffer, Lösungen, Medien und Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet.]

2.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.1.1 Sequenzierung des DP IV-Gens vom Schwein

Für die Sequenzierung des DP IV-Gens vom Schwein wurde mit Hilfe von TRIzol Reagent die Gesamt-RNA aus Schweineniere nach Protokollen von Gibco BRL (Fa. Invitrogen) extrahiert. Die Synthese der cDNA wurde mit dem ThermoScript RT-PCR System (Fa. Invitrogen) unter der Verwendung von „*random hexamer*“ Primern ausgeführt [Protokolle von Gibco BRL (Fa. Invitrogen)]. Die Amplifizierung des Schweine-DP IV-Gens wurde mit Hilfe der „Platinum Taq *High Fidelity*“ Polymerase (Fa. Invitrogen) mit den Primern (a) Schweine-DP IV-Basensequenz 1-908 (Primer E1/E2), (b) Schweine-DP IV-Basensequenz 738-1505 (Primer E3/E4) und (c) Schweine-DP IV-Basensequenz 1375-2051 (Primer E5/E6) (Tab. 2 im Anhang) durchgeführt. Die cDNA-Synthese und -Sequenzierung der Basenpaare 2052-2470 wurde mit einem 3'RACE-System (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) (Fa. Invitrogen) ausgeführt. Die unbekannte-cDNA wurde mit den Primern E7 und AUAP sowie der Basenabschnitt 1879-2298 mit den Primern E7 und E8 amplifiziert (siehe Tab. 2 im Anhang).

2.1.2 Sequenzierung von Aminosäuresequenzen und Basensequenzen

Die Sequenzierung der Basensequenzen von Plasmiden und PCR-Produkten wurde von der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt.

Die N-terminale Sequenzierung der rekombinanten DP IV-Aminosäuresequenz erfolgte bei Herrn Dr. Thorsten Nürnberger im Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) mittels Edman-Abbau.

2.1.3 PCR

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) wird eine ausgewählte DNA-Sequenz gezielt amplifiziert. Dabei können durch Einsatz von Primern, die nicht in ihrer gesamten Sequenz der „*template*“-DNA komplementär sind, Mutationen in das PCR-Produkt eingeführt werden.

Die PCR-Reaktionen wurden mit Primern (0,4 pmol/µl im Reaktionsansatz) der Firma Metabion durchgeführt. Die *Annealing*temperatur wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die unterschiedlichen Anwendungen richteten sich jeweils nach den Angaben der Hersteller.

Die Synthese spezifischer DNA-Fragmente ausgehend von cDNA erfolgte mit Hilfe von Platinum Taq DNA Polymerase *High Fidelity* (Fa. Gibco BRL).

Die PCR-Reaktion zur Amplifizierung bzw. zur Modifizierung von DNA-Konstrukten erfolgte mit Hilfe der Pfu-DNA-Polymerase (500 bp/min) (Fa. Promega). Die Synthesezeit richtete sich nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragmentes.

Die PCR-Reaktion zur Kontrolle isolierter *Escherichia coli*- (*E. coli*) bzw. *Pichia pastoris*- (*P. pastoris*) Klone wurde mit Hilfe von Taq-DNA Polymerase (2800 bp/min) (Fa. Promega) durchgeführt. *P. pastoris*-Klone wurden nach Angaben von Protokollen von Invitrogen erst mit Lyticase aufgeschlossen und diese Suspension in den PCR-Ansatz gegeben. Für die Untersuchung von *E. coli*-Klonen wurden diese mit einer sterilen Pipettenspitze von der Kulturplatte entnommen und im Reaktionsansatz resuspendiert.

Die PCR wurde in einem PCR-Sprint-Gerät der Firma Hybaid durchgeführt. Ein exemplarischer Ansatz ist in Tabelle 2.1 gezeigt.

Tab. 2.1: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit einem Volumen von 15 μ l.

Komponente	Menge
Template DNA	0,5 μ l
Primer 1 (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Primer 2 (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
dNTP (10 mM)	0,25 μ l
10x Polymerasepuffer	1,5 μ l
Polymerase Pfu oder Taq (2 U/ μ l)	0,1 μ l
H ₂ O	12,15 μ l

Für die PCR-Reaktion wurden die in Tabelle 2.2 beschriebenen Temperaturprogramme gewählt.

Tab. 2.2: Exemplarisches PCR-Temperaturprogramm.

Zyklen	Schritt	Zeit	Temperatur
1 Zyklus	Denaturierung	2 min	94 °C
15-30 Zyklen	Denaturierung	45 s	94 °C
	Annealing der Primer	45 s	52 -60 °C *
	Extension	45 s	72 °C (75 °C)
1 Zyklus	Finale Elongation	10 min	72 °C

* in Abhängigkeit von den verwendeten Primern

2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen in Agarosegelen verschiedener Konzentrationen (0,8-2 %) wurde das horizontale DNA/RNA Minigel System GE-B1A (Fa. Hybaid) verwendet. Dazu wurde die Agarose (Fa. Hybaid) mit TBE-Puffer (Zusammensetzung siehe Anhang) erhitzt und anschließend zur Anfärbung von DNA/RNA mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 μ g/ml) versetzt. Die DNA- bzw. RNA-Lösung (ca. 5-50 μ l) wurde mit Probenpuffer (Fa. Promega) versetzt, die Auftrennung erfolgte bei 7-9 V/cm. Die Auswertung und Dokumentation der DNA-Auftrennung im Agarosegel wurde mit Hilfe eines UV-Systems (Fa. Intas) durchgeführt.

2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA im Agarosegel wurde das entsprechende Gelstück, welches die zu isolierende DNA enthielt, mit einem sterilen Skalpell unter UV-Beleuchtung

ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA wurde der „*Gel Extraction Spin Kit*“ (Fa. Genomed) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten laut den detaillierten Anweisungen des Herstellers.

2.1.6 Restriktion von DNA

Die analytische (20 µl Endvolumen) und präparative (50-100 µl Endvolumen) Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den detaillierten Vorschriften des Herstellers (Fa. New England Biolabs).

2.1.7 Ligation von DNA

Für die Ligation von PCR-generierten DNA-Fragmenten wurde der „*PCR-Script Cloning Kit*“ (Fa. Stratagene) eingesetzt. Die Ligation erfolgte laut den detaillierten Anweisungen des Herstellers.

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren wurde unter Verwendung von T4-Ligase (Fa. New England Biolabs) durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wurde dafür gewählt:

linearisierte Vektor-DNA	2 µl	(100-200 ng)
DNA-Fragment	4-6 µl	(300-600 ng)
T4 DNA Ligase	1 µl	(0,4 U)
10-fach Reaktionspuffer	1 µl	(1-fach)
Aqua dest.	auf	10 µl Endvolumen

Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT). Zur Transformation von 200 µl *E. coli*-Zellen (*Epicurian Coli XL-1-Blue*, Fa. Stratagen) wurden 5-10 µl des Reaktionsansatzes eingesetzt.

2.1.8 Anzucht und Stammhaltung von *E. coli* und *P. pastoris*-Zellen

Alle Arbeiten zur analytischen und präparativen Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurden gemäß den Protokollen von Sambrook *et al.* ausgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Als Nährmedium wurde generell LB-Medium (Zusammensetzung siehe Anhang) eingesetzt. Für feste Nährmedien (Agar-Platten) wurden zusätzlich 15 g Agar pro Liter LB-Medium zugefügt. Für die Selektion von Transformanten wurden die Antibiotika Zeocin (Endkonzentration 100 µg/ml), Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) und Chloramphenicol (Endkonzentration 34 µg/ml) verwendet. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 5 ml ÜNK (Übernachtkultur) in LB-Medium (*E. coli*) oder YPD-(*Yeast Extract Peptone Medium*) Medium (*P. pastoris*) angeimpft (Zusammensetzung siehe Anhang) und anschließend 1 ml Kultursuspension mit 8 % (*E. coli*) bzw. 20 % (*P. pastoris*) Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.1.9 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zu 40 µl *E. coli*-Zellen (*Epicurian Coli XL-1-Blue*, Fa. Stratagen) wurden 5-10 µl Ligierungsansatz zugegeben und diese dann für 30 Minuten auf Eis, 45 Sekunden bei 42°C

und abschließend 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300–450 µl LB-Medium (42°C) wurden die Zellen unter Schütteln (150 U/min) für 1 h bei 37°C kultiviert. Danach erfolgte die Ausplattierung von 100 µl Zellsuspension auf Platten mit dem entsprechenden Selektivmedium (Ampicillin 100 µg/ml, Zeocin 20 µg/ml bzw. Kanamycin 50 µg/ml) und die Inkubation bei 37°C ÜN (Übernacht).

2.1.10 Transformation von *P. pastoris*-Zellen

Hefezellen wurden mit linearisierter Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurden die Plasmide unter zu Hilfenahme von *SacI* linearisiert und 1,0-1,5 µg Plasmid nach Protokollangaben von Invitrogen mittels Elektroporation in den *P. pastoris*-Stamm X-33 transformiert. Anschließend wurden die Zellen auf einer zeocinhaltigen (100 µg/ml) Agarplatte ausgestrichen.

2.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mittels „JETquick Spin Column Plasmid Miniprep Kit“ (Fa. Genomed) aus 3 ml ÜNK nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers. Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch ermittelt (1 $A_{260\text{nm}}$ = 50 µg/ml doppelsträngige DNA).

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Expressionstests

Für Expressionstests, zur Selektion der DP IV exprimierenden Klonen, wurden die Hefen in 11,5 ml Röhrchen kultiviert. Als Medium wurde 3 ml BMGY (Glycerin als C-Quelle) oder 3 ml BMMY (Methanol als C-Quelle) (Zusammensetzung siehe Anhang) verwendet und jeweils das Antibiotikum Zeocin (100 µg/ml) zugegeben. Die Kultivierung fand bei 300 U/min und 30°C statt. Nach 24 Stunden Wachstum in BMGY wurden die Zellen bei 1500**g* zentrifugiert und anschließend in BMMY resuspendiert. Durch Zugabe von Methanol (alle 24 Stunden) wurde die Methanolkonzentration auf 0,5 % (v/v) eingestellt. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE, Western-Blot-Analyse oder Aktivitätsbestimmung überprüft.

2.2.2 Hefekonzentrations- und Biotrockenmassebestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung der Hefezellen während der Kultivierung im Fermenter oder im Schüttelkolben wurde die optische Dichte der Hefesuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

Die Biotrockenmasse wurde ermittelt, indem 5 ml Hefesuspension 15 Minuten bei 5000**g* zentrifugiert (Überstand verwerfen) und das Pellet im Trockenschrank bis zur Gewichtkonstanz getrocknet wurde (ca. 3 Tage).

2.2.3 Fermentation von Hefezellen

Eine Hoch-Zell-Dichte Fermentation wurde nach Protokollen von Stratton *et al.* durchgeführt (Stratton *et al.*, 1998). Die Fermentation fand in einem 5 l Fermenter Biostat B bzw. 15 l Biostat ED (Fa. B. Braun Biotech) statt.

Ansatz zum Start der Fermentation: 1,8 l oder 4,75 l Fermentationsmedium (Zusammensetzung siehe Anhang) (im Fermenter sterilisiert); 4 ml/l Spurensalzlösung (Zusammensetzung siehe Anhang).

10 % (v/v) Vorkultur eines *P. pastoris* Klons wurden zum Start der Fermentation eingesetzt. Das gesamte Startvolumen betrug 2 l bzw. 5 l.

Es wurden folgende Betriebsparameter eingestellt: pH-Wert: pH 5,0 (mit Ammoniak eingestellt); Betriebstemperatur: 30°C; Antischaummittel: Polypropylenglycol; Rührgeschwindigkeit: 800 U/min.

Ein pO_2 von mindestens 30 % wurde während der Fermentation über die Zugabe von reinem Sauerstoff erzielt.

Mit Hilfe des Prozeßleitsystems MFCSwin (Fa. B. Braun Biotech) wurde die Luftzufuhr in den Reaktor, Rührgeschwindigkeit, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck im Medium und die zugegebene Menge an Substraten während der Fermentation aufgezeichnet und gesteuert. Der Verlauf der Fermentation wurde durch Entnahme von Proben zu bestimmten Zeiten verfolgt (Messung: OD_{600} der Kulturlösung und DP IV-Aktivität, Biotrockenmasse).

Die Fermentation gliederte sich in drei Abschnitte. Gestartet wurde mit einer ca. 26 Stunden (-26,17-0 Stunden) dauernden Glycerol-batch-Phase. Nach Verwertung der vorgelegten C-Quelle Glycerol wurde in der folgenden Fed-batch-Phase Glycerol zugegeben (Dauer: 5,41 Stunden von 0-5,41 Stunden). Die Zugaberate der Glycerol Fed-batch-Lösung betrug 82 g/h.

Die dritte Phase war eine Methanol-fed-batch-Phase (Dauer: 40,35 Stunden von 5,41-45,77 Stunden). Ein Methanol-Zugabeprofil wurde nach Angaben von Stratton *et al.* angelegt (Stratton *et al.*, 1998). Dabei stieg die zugegebene Menge an Methanol zwischen den unten genannten Zeitpunkten linear an:

0-4 Stunden	0,07–0,10 ml/min
4–10 Stunden	0,10–0,30 ml/min
10–20 Stunden	0,30–0,45 ml/min
20–40,4 Stunden	0,45–0,60 ml/min

Nach 40,4 Stunden Methanolzugabe wurde die Fermentation gestoppt.

2.2.4 Expression der PEP

Die Expression der humanen PEP (das für PEP codierende Gen war in den Vektor pQE-31 (Fa. Qiagen) kloniert) wurde in dem *E. coli* Stamm M15 (Fa. Qiagen) durchgeführt (der Vektor wurde von der probiodrug AG zur Verfügung gestellt). Dafür wurde die cDNA der PEP N-terminal mit einem His-Tag fusioniert. Mediumzusammensetzung und Kultivierung erfolgte nach Vorschriften des Herstellers.

Die Expression der PEP wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG [Isopropyl-(D-Thiogalactosid)] bei einer $OD_{600} = 0,8$ in LB-Medium bei 37°C induziert. Die Kultur wurde nach 4 Stunden Schütteln bei 250 rpm und 37°C zentrifugiert (6000 *g für 5 Minuten bei Raumtemperatur).

2.2.5 Chromatographiemethoden

Metallchelataffinitätschromatographie

Für die Metallchelataffinitätschromatographie wurden zwei verschiedene NiNTA-Agarosegele, zum Einen in gepackten Säulen und zum Anderen ein „*streamline chelating gel*“ in einer Wirbelschichtchromatographiesäule, verwendet (alle Materialien und Säulen wurden von der Fa. Amersham bezogen).

Die NiNTA-Säulen wurden mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,6 äquilibriert. Nach Applikation der Proteinssuspension (5 ml/min bei gepackter Säule, 10 ml/min bei Wirbelschichtbettsäule) wurde die Säule mit demselben Puffer unter Zusatz von 5 mM Imidazol gewaschen. Das Enzym wurde mit steigenden Imidazolkonzentrationen von 5-200 mM innerhalb von drei Säulenvolumen bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert.

Größenausschlusschromatographie

Auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule (Fa. Amersham) wurden 0,5 ml Proteinlösung mit einer Flussrate von 0,25 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 mM NaH_2PO_4 -Puffer pH 7,6 und 300 mM NaCl äquilibriert und eluiert.

Ionenaustauschchromatographie

Die Proteinlösungen wurden gegen 25 mM Tris-Puffer pH 6,8 dialysiert und anschließend auf einen DEAE-Sephacel Anionenaustauscher aufgetragen (Flussrate 5 ml/min). Die Proteinelution wurde mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0-300 mM) über vier Säulenvolumen durchgeführt.

Außerdem wurde eine MonoQ-Säule, ein starker Anionenaustauscher, verwendet. Die Säule wurde mit 25 mM Tris-Puffer, pH 6,8 äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mit einem Gradienten bei steigenden Salzkonzentrationen zwischen 0 und 180 mM NaCl innerhalb von 20 Säulenvolumen eluiert (Flussrate 3 ml/min).

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Bevor eine Proteinlösung mit einer Flussrate von 3 ml/min auf eine Butyl-Sepharose Säule aufgetragen wurde, erfolgte die Zugabe von 1,2 M Ammoniumsulfat zu der Probe. Die Säule wurde mit einem 40 mM KH_2PO_4 -Puffer pH 6,8 und 1,2 M Ammoniumsulfat äquilibriert. Das Protein wurde innerhalb eines Schrittes mit einem 40 mM KH_2PO_4 -Puffer pH 6,8 und 0,73 M Ammoniumsulfat eluiert.

2.2.6 Dialyse und Proteinkonzentrierung

Proteinlösungen wurden mit Hilfe von „VIVASPIN 20 ml CONCENTRATOR“-Röhrchen (Ausschlussvolumen 30 kDa) nach Angaben des Herstellers (Fa. Vivascience) mittels Zentrifugation konzentriert.

Die Dialyse von Proteinlösungen wurde gegen das 100fache Volumen an Puffervolumen bei 8°C über Nacht unter ständigem Rühren durchgeführt (Ausschlussvolumen 8 kDa).

2.2.7 Isolierung der rekombinanten humanen DP IV (rhDP IV)

Die Hefesuspension wurde nach der Fermentation erst bei 5000 *g und anschließend bei 40000 *g für je 20 Minuten und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und filtriert (0,8 µM Nitrozellulosefilter). DP IV wurde im ersten Schritt mittels Metallchelatchromatographie isoliert. Danach wurden die Fraktionen mit DP IV-Aktivität vereinigt und auf 0,5 ml konzentriert. Im Anschluss folgte eine Größenausschlusschromatographie (siehe Abschnitt 2.2.5). Die Fraktionen mit DP IV-Aktivität wurden vereint und konzentriert.

2.2.8 Isolierung der rekombinanten humanen PEP (rhPEP)

Die *E. coli*-Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 *g für 20 Minuten und 4°C abgetrennt und anschließend mit Hilfe einer FRENCH Presse (Fa. Spectronic instruments) aufgeschlossen. Die *E. coli*-Suspension wurde zunächst bei 5000 *g und dann bei 40000 *g für je 20 Minuten und 4°C zentrifugiert und der Überstand filtriert, um Zellfragmente zu entfernen. Im Anschluss wurde eine Metallchelataffinitätschromatographie (NiNTA-Agarosegel, Fa. Amersham) bei 4°C durchgeführt. Die Fraktionen mit der höchsten PEP-Aktivität wurden vereint und gegen 25 mM BisTris-Puffer, pH 6,8, dialysiert und anschließend auf einen DEAE-Sephacel Anionenaustauscher gegeben (Flussrate 5 ml/min). Nach der Elution wurde 1,2 M Ammoniumsulfat zu den Fraktionen mit der höchsten PEP-Aktivität gegeben und anschließend mit 3 ml/min auf eine Butyl-Sepharose Säule aufgetragen. Die Fraktionen mit der höchsten PEP-Aktivität wurden mit Hilfe einer Sephadex25-Säule und einem 25 mM BisTris-Puffer pH 6,8 entsalzt. Abschließend wurden die Fraktionen mit der höchsten PEP-Aktivität vereint und mit einer Flussrate von 3 ml/min auf eine MonoQ-Säule aufgetragen (siehe Abschnitt 2.2.5).

2.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels "Bradford Reagent" (Fa. Sigma) laut den detaillierten Anweisungen des Herstellers (Bradford, 1976). Die Messung der Absorption bei 595 nm wurde mit Hilfe des Photometers SmartSpec 3000 (Fa. BIO-RAD) durchgeführt.

2.2.10 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen mittels einer Vertikalelektrophorese System Mini Protean II (Fa. BIO-RAD) (Laemmli, 1970). Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Anhang) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt (Elektrodenpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Als Referenz wurde der Proteinstandard MultiMark (Fa. Invitrogen) aufgetragen.

2.2.11 Protein-Färbemethoden

Färbemethode mit *Coomassie blue*

Färben und fixieren von SDS-Page-Gelen wurde für 10 Minuten in Färbelösung (Coomassie-Färbung, Zusammensetzung siehe Anhang) und anschließend Entfärben in 10 % Essigsäure für 60 Minuten durchgeführt.

Färbemethode mit Silbernitrat

Die Färbung von SDS-Page-Gelen wurde nach der Methode von Nesterenko *et al.*, durchgeführt (Nesterenko *et al.*, 1994). Die Färbung der Acrylamidgele erfolgte in folgenden Schritten:

- Fixierung (für eine Stunde): 50 % (v/v) Ethanol; 12 % (v/v) Essigsäure; 0,05 % (v/v) 37 % (v/v) Formaldehyd.
- Waschen (3 * 20 min): 50 % (v/v) Ethanol. Vorbehandlung (1 min): 200 µl 5 % (v/v) Na₂S₂O₃ Stammlösung in 100 ml H₂O.
- Färbung (20 min): 0,1 g AgNO₃ und 70 µl Formaldehyd in 100 ml H₂O.
- Spülen (2 * 20 Sekunden): H₂O.
- Entwicklung (max. 10 min): 3 g Na₂CO₃; 50 µl Formaldehyd; 4 µl einer 5 % (v/v) Na₂S₂O₃ Stammlösung in 100 ml H₂O.
- Abstoppen (mindestens 5 min): 0,1 M EDTA.

Aktivfärbung

Zur Aktivfärbung der DP IV nach Transfer von IEF-(Isoelektrische Fokussierung) Agarosegelen auf Nitrozellulosemembranen wurde jeweils 10 mg/ml Gly-Pro-4-methoxy-β-naphtylamid und 10 mg/ml „fast Blue“ in DMF gelöst. 200 µl der Gly-Pro-4-methoxy-β-naphtylamid-Lösung und 100 µl „fast Blue“-Lösung wurden in 3,5 ml PBS gegeben und darin die zu färbenden Gele oder Membranen inkubiert.

2.2.12 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Proteintransfer erfolgte mit Hilfe des TRANS BLOT 5D-Systems (Fa. BIO-RAD) für 90 Minuten bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membranfläche durch ein diskontinuierliches Puffersystem mit folgendem Schichtaufbau von Anode zu Kathode [*Western blotting* (Kyhse-Andersen, 1984)]:

- 5 Lagen Filterpapier G002 (Fa. Schleicher&Schuell) in Anodenpuffer 1 (0,3 M Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4)
- 3 Lagen Filterpapier G002 in Anodenpuffer 2 (0,025 M Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4)
- Nitrozellulosemembran Protran BA83 (Fa. Schleicher&Schuell), mit Aqua dest. äquilibriert
- SDS-Polyacrylamid-Gel (Trenngel)
- 5 Lagen Filterpapier G002 in Katodenpuffer 3 (0,025M Tris/HCl, 0,04 M ϵ -Aminocapron-säure, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4)

Der Transfer wurde mittels des Proteinstandards MultiMark (Fa. Invitrogen) überprüft.

2.2.13 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Nach SDS-PAGE Gelelektrophorese und dem Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte die Immundetektion der immobilisierten Proteine. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran erfolgte die Behandlung mit einer 3 % (w/v) Magermilchlösung, 0,05 % v/v Tween 20 in PBS für 1 Stunde bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Danach wurde die Membran (5 * 8 cm) mit den in PBS-Puffer (5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % v/v Tween 20 in PBS) verdünnten Primär-Antikörpern ÜN bei 8°C inkubiert. Dafür wurde die Membran in einer "feuchten Kammer" (Plastikdose mit wassergetränktem Zellstoff) ausgelegt und mit 2 ml Antikörperlösung überschichtet. Anschließend wurde 3 * 10 Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit 50 ml HRP-konjugiertem (*Horseradish Peroxidase*) sekundärem Antikörper (1:10000) in PBS-Puffer (5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS) erfolgte für 1 Stunde bei RT. Danach wurde die Membran erneut 3-mal mit PBS gewaschen. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mittels Immunodetektions-System „SuperSignal West Pico“ (Fa. Pierce) laut detaillierten Anweisungen des Herstellers. Die Belichtung der Röntgenfilme (Fa. Pierce) in einer Autoradiographiekassette (Fa. Groß) erfolgte zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten. Die Entwicklung und Fixierung der Röntgenfilme wurde in einer Dunkelkammer per Hand durchgeführt. Zwischen dem Entwicklungsschritt und der Fixierung der Filme wurden sie in einem Wasserbad gespült. Abschließend wurden die Filme 15 min in Wasser gewaschen und dann luftgetrocknet.

2.2.14 Isoelektrische Fokussierung der DP IV

Die von Egen und Russel entwickelte Technik der isoelektrischen Fokussierung von Proteinen beruht auf dem Aufbau eines pH-Gradienten in einem Agarosegel durch Ampholyte (Zwitterionen) (Egen und Russell, 1984).

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Hilfe der Multiphor II (Fa. Pharmacia) unter Verwendung eines Power Pac 3000 (Fa. BIO-RAD) durchgeführt. Es wurden 1-25 µg Protein auf ein 62,5 mm * 125 mm Agarosegel aufgetragen und fokussiert.

Laufbedingungen für 3000 Vh (Voltstunden): 2000 V maximal angelegte Spannung; 2 mA maximal Stromstärke; 4 W konstante elektrische Leistung

Für die Ermittlung des isoelektrischen Punktes wurde eine Standardkurve von den isoelektrischen Punkten des verwendeten Proteinstandards gegen den Abstand von der Kathode (in cm) erstellt. Anhand der Standardkurve konnten die isoelektrischen Punkte der DP IV ermittelt werden.

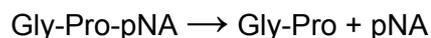
Für die isoelektrische Fokussierung wurden zwei verschiedene Proteinfärbemethoden verwendet. Zum Einen wurde die Proteinfärbung mit „Serva Blue“ und zum Anderen eine Aktivfärbung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.11).

2.2.15 Spektralphotometrische DP IV-Aktivitätsbestimmung

DP IV katalysiert die Abspaltung eines Dipeptides N-terminal von Polypeptiden oder von Chromophoren. Zur Aktivitätsbestimmung wurde ein chromogenes Substrat der allgemeinen Struktur Xaa-Xaa-pNA genutzt.

Beispielreaktion:

DP IV



Die Zunahme der resultierenden Absorptionsänderung bei 390 nm und 30°C wurde an einem UV/Vis Spektrophotometer Lambda 20 der Firma Perkin Elmer gemessen. Die gemessene DP IV-Aktivität wurde in U (*Units*) ausgedrückt, was die Umsatzgeschwindigkeit von 1 µM Gly-Pro-pNA pro Minute darstellt. Messansatz: 500 µl HEPES-Puffer (Zusammensetzung siehe Anhang); 0-500 µl Substrat; 25 µl Enzym; ad 1275 µl H₂O. Die DP IV-Aktivität errechnete sich nach folgender Formel:

$$A = \left(\frac{\Delta E * V_T}{d * \Delta \epsilon * V_S} \right) * \text{Verdünnung} \quad (1)$$

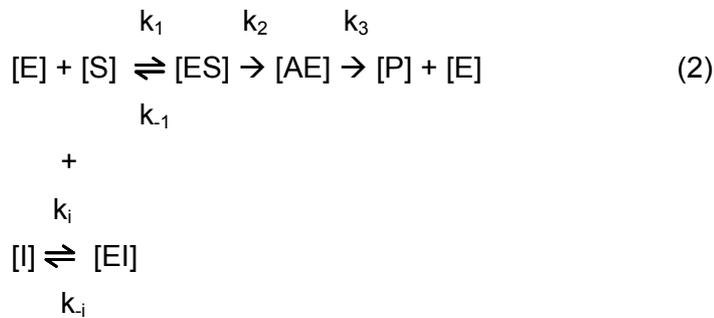
A	=	Aktivität	[mU/ml]
ΔE	=	Änderung der Absorption	[min ⁻¹]
V _T	=	Gesamtvolumen in der Küvette	[ml]
V _S	=	Probenvolumen	[ml]
Δε	=	Differenz der Absorptionskoeffizienten ε _{pNA} – ε _{Gly-Pro-pNA} bei 390 nm	[11,4 · 10 ⁶ cm ² · mol ⁻¹]
d	=	Schichtdicke (Küvette)	[cm]

2.2.16 Fluorimetrische DP IV-Aktivitätsbestimmung

Der Assay beruht auf der DP IV katalysierten Abspaltung von AMC vom eingesetzten Substrat Gly-Pro-AMC, was zum Anstieg der Emission bei 460 nm (Anregungswellenlänge: 380 nm) führte. Die Messungen wurden an einem SFM25 Fluorimeter durchgeführt. Meßansatz: 0,05 mM Gly-Pro-AMC; 0,5-20 µl Probe; ad 2000 µl HEPES-Puffer; Messdauer: 10 Minuten.

2.2.17 Grundlage zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m und K_i

Die ermittelten kinetischen Parameter beschreiben die zeitabhängige Reaktion des Enzyms (E) mit ausgewählten Substraten (S), in deren Folge Reaktionsprodukte (P) entstehen. Weiterhin wird der Einfluss verschiedener Inhibitoren (I) auf die Produktbildung betrachtet, wobei der Inhibitor mit dem Substrat um die Anlagerung am aktiven Zentrum des Enzyms konkurriert (kompetitive Hemmung). Der Reaktionsverlauf folgt dem Schema:



AE	=	Acylenzym
ES	=	Enzym-Substrat-Komplex
E	=	Enzym
S	=	Substrat
P	=	Produkt

Die durch das Enzym katalysierte Umsetzung ist in einen Substratbindungsschritt (charakterisiert durch k_1/k_{-1}) und einen katalytischen Schritt (charakterisiert durch k_2 oder k_3) zerlegt. Schema (2) dokumentiert den Einfluss bei kompetitiver Hemmung eines Enzyms durch Hemmung der Enzym - Substrat Bindung bei $I > 0$.

2.2.18 Bestimmung der kinetischen Parameter K_i , K_m , k_{cat} und IC_{50}

K_m -Wert Bestimmung

Die für die Ermittlung der kinetischen Parameter gewählten Messansätze (siehe Abschnitt 2.2.15 und 2.2.16) entsprechen denen für die Aktivitätsmessung am Fluorimeter bzw. Photometer. Zur Berechnung des K_m -Wertes wurden die Umsatzgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen, die von $1/8 K_m$ bis $4 K_m$ des erwarteten K_m -Wertes variierten, ermittelt. Die dabei erhaltenen Geschwindigkeits-Konzentrations-Wertepaare wurden mit einer Hyperbolengleichung nach Michaelis-Menten ausgewertet und dabei der K_m -Wert ermittelt [Softwareprogramm „GraFit“ (Fa. Erithacus Software Limited)]. Nach Michaelis Menten ergibt sich der K_m -Wert bzw. V_{max} nach:

$$v = \frac{V_{max} * S_0}{S_0 + K_m} \quad (3)$$

S_0	=	Substratkonzentration bei $t = 0$
$V_{(max)}$	=	(maximale) Umsatzgeschwindigkeit
v	=	Geschwindigkeit der Substratkatalyse bei S_0

k_{cat} -Wert Bestimmung

Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung (k_{cat}) erfolgt nach Gleichung 4:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[Enzym]} = \text{Wechselzahl} \quad (4)$$

IC_{50} -Bestimmung

Zur Ermittlung des IC_{50} -Wertes wurde nach Erreichen einer konstanten Anfangsgeschwindigkeit des Substratumsatzes von Gly-Pro-AMC (10 bzw. 20 μM) 0,5-4 μl Inhibitor-Lösung zugegeben. Aus der Anfangsgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit nach Inhibitorgabe wurde die prozentuale Restaktivität ermittelt, welche dann gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen wurde. Die Berechnung des IC_{50} -Wertes erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3“ (Fa. Graphpad) durch nichtlineare Regressionsanalyse.

K_i -Wert Bestimmung

Die Bestimmung der Hemmkonstanten mit den zu testenden Verbindungen wurde mit Hilfe des bereits beschriebenen spektrophotometrischen Tests durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.16). Es wurden je sechs verschiedene Inhibitorkonzentrationen mit vier verschiedenen Substratkonzentrationen kombiniert. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass sie mindestens zwei Größenordnungen unter der kleinsten Inhibitorkonzentration lag und der Substratumsatz 5 % nicht überschritt. Die erhaltenen Initialgeschwindigkeiten wurden mittels nichtlinearer Regression nach einem kompetitiven Mechanismus ausgewertet. Gleichung (5):

$$v = \frac{V_{max} * S_0}{S_0 + K_m \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i} \right)} \quad (5)$$

I_0 = Inhibitorkonzentration

Zur Überprüfung der Richtigkeit des angenommenen Hemmtyps wurde eine Sekundärauftragung des Anstiegs der Geraden aus dem DIXON-Plot gegen die reziproke Substratkonzentration durchgeführt.

Ermittlung von K_m -Werten mittels Plattenmessgerät (TECAN)

Die Ermittlung der Umsatzgeschwindigkeit erfolgte am Plattenfluorimeter der Firma TECAN durch Messung der DP IV vermittelte Freisetzung von pNA- bzw. AMC-Molekülen. Die Freisetzung des C-terminalen Chromophors bzw. Fluorophors wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten verfolgt. Die Produktbildung in Form von AMC-Molekülen wurde anhand der Änderung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) bei 380/460 nm (Extinktion/Emmission) ermittelt. Die Umsatzgeschwindigkeit konnte dann in RFU/min angegeben werden.

Die DP IV-katalysierte Produktbildung der Substrate, die C-terminal ein pNA-Molekül enthalten, wurde photometrisch bei 405 nm verfolgt. Hier ergab sich die Umsatzgeschwindigkeit als Absorptionsänderung von OD_{405}/min . Die Enzymkonzentrationen wurden so gewählt, dass während der gesamten Messung eine lineare Produktentstehung zu beobachten war. Der Ansatz zur K_m -Bestimmung am TECAN setzte sich wie folgt zusammen: 100 μl H_2O ; 100 μl HEPES [+ 0,025 % (v/v)] Brij, bei Fluoreszenzmessung); 20 μl Enzym.

Ermittlung von K_m -Werten mittels HPLC-MS/MS

Zur Ermittlung der K_m -Werte von Peptidsubstraten wurde DP IV mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen in 10 mM Tris-Puffer bei 30°C inkubiert. Zu festgesetzten Zeitpunkten erfolgte die Entnahme einer Probe mit gleichzeitigem Abstoppen der Katalysereaktion mit 9 Volumen 0,1 % Ameisensäure. Mittels HPLC-MS/MS konnte das gebildete Produkt in den entnommenen Proben quantitativ erfasst werden. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass eine lineare initiale Produktbildung bei allen untersuchten Substratkonzentrationen zu beobachten war. Durch Auftragung der Produktbildung gegen die Zeit konnte dann die Umsatzgeschwindigkeit ermittelt werden.

Ermittlung von k_{cat} -Werten für Peptidsubstrate

Der k_{cat} -Wert beschreibt die Geschwindigkeit des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes. Die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit ist erreicht, wenn das gesamte Enzym für die Produktbildung zur Verfügung steht, d.h. nur [ES] oder [AE] vorliegt. Der k_{cat} -Wert kann dann somit aus Gleichung (6) ermittelt werden.

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E]_0 \quad (6)$$

[E]₀ = Gesamt-Enzymkonzentration im Ansatz.

Aus der Hyperbolengleichung nach Michaelis-Menten zur Ermittlung des K_m -Wertes, lässt sich die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) eines Enzyms an seinem Substrat ermitteln. Nach Division durch die dem Ansatz zugegebene Enzymkonzentration, erhält man den k_{cat} -Wert.

2.2.19 Kapillaronenelektrophorese

Die K_m -Werte für DP IV von NP Y-Derivaten wurde mit Hilfe der Kapillaronenelektrophorese bestimmt. Die Kapillaronenelektrophorese vereint die Trennprinzipien der klassischen Elektrophorese auf Platten mit den instrumentellen Methoden der Chromatographie bezüglich der direkten Detektion der getrennten Proben in der Kapillare. Daher ist eine Differenzierung zwischen Produkt und Substrat möglich. Bei der Kapillaronenelektrophorese beruht die Trennung auf den Mobilitätsdifferenzen der Proben, die zu Beginn des Experimentes als definierte Zone im Gemisch am Anfang der Kapillare aufgegeben werden. Die Zonen wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das

Trennsystem und können als voneinander getrennte Zonen durch den Detektor nachgewiesen werden (Engelhardt *et al.*, 1994).

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Folgende Standardbedingungen wurden gewählt:

Kapillare: 50 μM * 30 cm, effektive Länge 20 cm; Laufpuffer: 0,1 M NaPhosphat, pH 2,5; Injektion: Druck 0,5 psi; 5 s; Detektion: UV 200 nm.

2.2.20 MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Molekulargewichtsbestimmung und zur qualitativen Bestimmung der Hydrolyse potentieller Peptidsubstrate

Schnelle Aussagen über Substrateigenschaften ausgewählter Peptide ermöglicht die MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Diese Methode ist dadurch charakterisiert, dass die Analytmoleküle und eine das Laserlicht stark absorbierende Matrix co-kristallisiert werden. Ein Laserimpuls ionisiert und löst die zu untersuchende Verbindung aus dem Matrix-Biomolekülkomplex. Der Analyt bleibt dabei ohne Fragmentierungen erhalten und wird so beschleunigt, dass in einem Flugrohr durch die Bestimmung der Flugzeit dessen Molekülmasse ermittelt werden kann.

Für die Ermittlung der Hydrolysegeschwindigkeit von Peptidsubstraten gegenüber dem proteolytischen Abbau durch DP IV bzw. PEP (30°C) wurde ein Ansatz aus Substrat und Enzym bei 37°C inkubiert. Bei Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeiten des DP IV-katalysierten Abbaus der Substrate durch ssDP IV, rhDP IV und Varianten der rhDP IV wurden die Enzyme so verdünnt, dass die eingesetzte Aktivität (U/ml) denen in humanen Serum entsprach [Hydrolyse von Gly-Pro-pNA (40 mU/ml)]. In definierten Zeitabständen wurden aus dem Ansatz Proben entnommen. Durch Zugabe der Matrix wurde die Enzymreaktion gestoppt. Als Matrix wurde ein Gemisch aus DHAP/DAHC (30 mg DHAP, 44 mg DAHC in 1 ml ACN / 0,1 % TFA im Verhältnis 1:1) eingesetzt. 5 μl des Inkubationsansatzes wurden mit 5 μl Matrixlösung gemischt. Davon wurde 1 μl auf einen Probenteller aufgetragen, getrocknet und im Anschluss massenspektrometrisch analysiert. Die Probennahme und Aufreinigung erfolgte mittels „C₁₈-Zip-Tips“ nach dem Protokoll der Firma Millipore. Zur Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit wurde eine in der Abteilung Massenspektrometrie der Firma probiodrug AG etablierte Methode angewendet (Pauly *et al.*, 1996). Aus dem Inkubationsansatz mit Peptid und Enzym wurden zu festgelegten Zeitpunkten Proben entnommen und die relativen Verhältnisse von Substrat und Produkt mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt. Daraus konnte dann das Verhältnis von intaktem zu prozessiertem Peptid ermittelt und anschließend durch nicht linearer Regressionsanalyse die Halbwertszeit $t_{1/2}$ für die einzelnen Substrate bestimmt werden.

Der Standardinkubationsansatz (mit DP IV) setzte sich wie folgt zusammen: 40 μl Tris/HCl (40 mM im Ansatz, pH 7,6); 40 μl Peptid (25 μM im Ansatz); 20 μl Enzym (entsprechend der gewünschten Volumenaktivität in H₂O verdünnt).

Mit der oben beschriebenen Methode konnte auch das Molekulargewicht von Proteinen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt werden. Vorab wurden die Proteinlösungen gegen 10 mM NaHPO₄ Puffer, pH 7,6 dialysiert.

2.2.21 Biomolekulare Interaktionsanalyse mittels Plasmoresonanzmessung

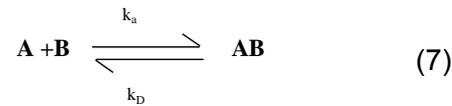
Mittels Oberflächenplasmonresonanzmessungen lassen sich die Wechselwirkungen zwischen einem Molekül und einem, auf einer Sensorchip-Oberfläche immobilisierten, Liganden in Echtzeit untersuchen. Dadurch können Aussagen über die Bindung und Dissoziation eines Liganden-Rezeptor-Komplexes getroffen werden. Wird die Sensorchip-Oberfläche mit monochromatischem Licht bestrahlt, so ergibt sich, in Abhängigkeit von der Massenlagerung, auf der Sensor-Oberfläche ein bestimmter Brechungsindex. Durch Bindung eines Analyten an den auf der Sensorchip-Oberfläche gebundenen Liganden ändert sich der Brechungsindex. Das gemessene Signal wird mit dem Signal einer Referenzzelle verglichen, auf der kein Ligand gebunden ist.

Die Messungen wurden an einem Biacore 3000-Gerät (Fa. Biacore) durchgeführt. Die Immobilisierung der DP IV aus verschiedenen Präparationen erfolgte mittels Aminokopplung nach Angaben des Herstellers (Fa. Biacore).

Die Plasmoresonanzmessung wurde so durchgeführt, dass der Bindungspartner (Rinder ADA Typ VIII bezogen von Sigma) in unterschiedlichen Konzentrationen (gelöst in HBS-N-Puffer) nacheinander über den Chip gegeben wurde (bei 25°C). Dabei wurden 2 * 200 µl mit einer Flussrate von 10 µl/min für 20 Minuten in jeweils steigender Konzentration hintereinander injiziert. Der Punkt in der Assoziationskurve mit den höchsten *Response Units* (RU) wurde für die K_D-Wert Bestimmung verwendet. Diese maximale Resonanz reflektiert den maximalen Bindungspunkt des Liganden zur Chip-Oberfläche (Protein) bei gegebener Konzentration an Liganden. Eluiert wurde der Bindungspartner nach den Messungen mit HBS-N-Puffer.

Die Assoziation von GLP-1 mit Chip-gebundener DP IV wurde so durchgeführt, dass jeweils nach Injektion der unterschiedlichen Konzentrationen des Bindungspartners dieser wieder durch HBS-N-Puffer von der Matrix gewaschen wurde. Die weiteren Versuchsbedingungen entsprachen denen für die Analyse der ADA als Bindungspartner der DP IV.

Die Berechnung des K_D -Wertes erfolgte mittels folgender Gleichungen.



Dissoziation:

$$-\frac{d[AB]}{dt} = K_D * [AB] \quad (8)$$

Im Gleichgewicht gilt:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] * [B]}{[AB]} \quad (9)$$

k_a	=	Assoziationskonstante
k_d	=	Dissoziationskonstante
A / B	=	Bindungspartner
t	=	Zeit

2.2.22 Messung der Aktivität der Prolylendopeptidase

Die Proteaseaktivität der PEP wurde mit Hilfe des fluorogenen Substrates Z-Gly-Pro-AMC (Fa. Bachem) bestimmt. Die kontinuierliche Messung des Substratumsatzes bei 380/460 nm erfolgte mit Hilfe des Spektralfluorometers SFM 25 (Fa. Kontron Instruments) unter Verwendung des EDV Programmes "Flucol-4" (Machleidt *et al.*, 1995). Die gemessene PEP-Aktivität wurde in U (*Units*) ausgedrückt, was die Umsatzgeschwindigkeit von 1 μ M Z-Gly-Pro-AMC pro Minute darstellt. Dabei wurde folgender Reaktionsansatz mittels Thermostat (Fa. Julabo) bei 37°C temperiert:

PEP-Meßpuffer: 50 mM HEPES, pH 7,6; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 mM DTT (Dithiothreitol); 0,0015 %; (v/v) Brij 30; 10 bzw. 20 μ M Substrat Z-Gly-Pro-AMC; 0,5–100 μ l zu untersuchende Probe (Gesamtvolumen 2 ml)

Die Auswertung der erhaltenen Datensätze erfolgte mit Hilfe des EDV-Programmes "Flukin" (Machleidt *et al.*, 1995).

2.2.23 Analyse der hydrolytischen Aktivität von PEP gegenüber Humanin

Der Test zur Hydrolyse von Humanin (HN) (800 μ g/ml in 1 % DMSO/PEP-Puffer) durch PEP (0,02 U) wurde bei 37°C und pH 7,6 durchgeführt. Für die Analyse der Hydrolyse von HN mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden in definierten Zeitabständen dem Inkubationsansatz Proben entnommen. Es wurden „C₁₈-Zip-Tips“ der Firma Millipore verwendet, um störende Bestandteile, wie z.B. die nicht flüchtigen Salze Na⁺, K⁺ oder Phosphat, zu entfernen. Die Probenaufbereitung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Millipore. Zur Bestimmung der Hydrolyse von HN wurde eine in der Abteilung Massenspektrometrie der Firma probiodrug AG etablierte Methode angewendet (siehe Abschnitt 2.2.20) (Pauly *et al.*, 1996).

2.2.24 Präparation von U343-Zellextrakt

Vor dem Aufschluss von U343-Zellen wurde das Wachstumsmedium entfernt und 300 µl PEP-Puffer (1 mM DTT) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden je drei mal gefroren (-80°C) und aufgetaut (RT) und anschließend aus der Inkubationsflasche entfernt. Membran und Organellen wurden mittels eines Zentrifugationsschritts bei 4°C und 3000 *g für 15 Minuten pelletiert. Der lösliche Überstand hatte eine spezifische PEP-Aktivität von 1 U/mg (0,1 U/ml). Die Hydrolyse von HN wurde mit löslichem Zellextrakt durchgeführt, der eine PEP-Aktivität von 0,01 U aufwies.

2.2.25 Kristallisation der rhDP IV

Für Kristallisationsexperimente wurde rhDP IV mittels Metallchelataffinitätschromatographie wie in Abschnitt 2.2.6 und 2.2.7 beschrieben isoliert. Die Proteinlösung wurde auf 0,8 ml konzentriert und nach Zugabe von 1/10 Volumen Deglykosylierungspuffer und 100 U/µg Protein EndoH_f bei 30°C ÜN deglykosyliert. Anschließend wurde dieser Ansatz über Größenausschlusschromatographie (Puffer 10 mM Tris, pH 7,8, 200 mM MgCl₂) aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.7). Die Fraktionen mit DP IV-Aktivität wurden vereinigt und auf 5-7 mg/ml konzentriert. Der Kristallisationsansatz wurde mit Hilfe der „*hanging drop*“ Methode in Limbroplatten (Fa. Limbro) durchgeführt. Dazu wurde 2 µl Proteinlösung mit 2 µl Kristallisationspuffer auf einem Deckgläschen gemischt und anschließend umgedreht mit hängendem Tropfen über das Kristallisationspufferreservoir gebracht und luftdicht verschlossen. Für Co-Kristallisationsversuche wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:1000 (bezogen auf die Molarität) mit den jeweiligen Substraten oder Inhibitoren gemischt und anschließend für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Als Kristallisations- und Kryopuffer diente 200 mM Tris-Puffer, pH 8,0 mit 200 mM MgCl₂, 20% PEG 3350 und 12 % Glycerol. Der Datensatz zur Bestimmung eines DP IV-Kristalls wurde an der *Wiggler Beamline* BW6 am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, Hamburg) von Prof. Dr. Milton Stubbs von der Universität Halle-Wittenberg (Institut für Biochemie/Biotechnologie) aufgenommen und ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der humanen DP IV

DP IV wird nativ als Typ II Transmembranprotein exprimiert, existiert aber auch als lösliche Form ohne Transmembrananker (Ogata *et al.*, 1989; Yaron und Naider, 1993; Vanhoof *et al.*, 1992). Ausgangspunkt für die Expression humaner DP IV war der zur Verfügung gestellte Vektor pAW3, welcher die für die humane DP IV codierende Sequenz enthielt. Die Expression einer löslichen Form des Enzyms wurde dadurch ermöglicht, dass der N-Terminus und die Transmembranregion des Enzyms durch 6 Histidin-Aminosäuren ersetzt wurden. Die Expression der DP IV sollte in *P. pastoris* etabliert werden, da die Hefeexpression post-translationale Modifikationen, die Sekretion des rekombinanten Enzyms in das Medium (ermöglicht die Anwendung einer vereinfachten Isolierungsprozedur), hohe Expressionsraten als auch eine Hoch-Zell-Dichte-Fermentation erlaubt (Sreekrishna *et al.*, 1997; Trimble *et al.*, 1991). Dieser Ansatz stellt damit eine Alternative zu dem bisher bekannten Expressionssystem in Säugerzellen dar (Tanaka *et al.*, 1992).

Ausgehend von dem Vektor pAW3 (pcDNA-3.1-Vektor (Fa. Invitrogen) mit Insertion der $\Delta 1-36$ humanen DP IV mit N-terminalem His-Tag) wurde das DP IV-Konstrukt in den Hefevektor pPICZ α C kloniert (siehe Abb. 2 im Anhang). Das aus der Ligation des *P. pastoris*-Expressionsvektors pPICZ α C (enthält als Sekretionssignal den α -Faktor aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*) mit dem DP IV-Gen resultierende Plasmid pJB-2 wurde in *E. coli* XL-1-Blue Zellen transformiert. Die durch pPICZ α C vermittelte Zeocinresistenz wurde für die Transformationsselektion genutzt. Nach Extraktion des Plasmids aus *E. coli* und dessen Sequenzierung wurde pJB-2 durch Restriktionsverdau mit *SacI* linearisiert. Anschließend wurde pJB-2 zur Transformation des *P. pastoris* Hefestamms X-33 verwendet. Die Integration von pJB-2 in das Hefegenom wurden mittels analytischer PCR bestätigt (Primer 5'AOX1 und 3'AOX1) (siehe Abschnitt 2.1.3).

3.2 Optimierung der Expression und Isolierung der rhDP IV

3.2.1 Charakterisierung von His-Tag Varianten der rhDP IV

In dieser Arbeit sollte die Ausbeute und Isolierungsstrategie für rhDP IV optimiert und erleichtert werden. Dazu wurden die His₆-fusionierten rhDP IV-Varianten $\Delta 1-36$ rhDP IV mit C-terminalen His-Tag, $\Delta 1-36$ rhDP IV mit C- und N-terminalem His-Tag und $\Delta 1-36$ rhDP IV ohne Tag hergestellt. Alle Varianten konnten erfolgreich exprimiert werden. Die His₆-fusionierten rhDP IV-Varianten konnten mittels Metallchelatchromatographie und Größenausschlusschromatographie aus dem Fermentationsmedium isoliert werden (siehe Abschnitt 2.2.7). Die isolierten Enzymmengen der His₆-fusionierten Varianten waren vergleichbar. $\Delta 1-36$ rhDP IV ohne Tag konnte mittels hydrophober Interaktionschromatographie, Ionenaustauscherchromatographie (Anionentauscher) und Größenausschlusschromatographie isoliert werden (siehe Abschnitt 2.2.5). Die Isolierung war deutlich aufwendiger und die Enzymmengen wesentlich geringer (0,1 mg pro Liter Fermentationsmedium) gegenüber den rhDP IV-Varianten mit His-Tag (0,8-3,0 mg pro Liter

Fermentationsmedium). Die kinetischen Konstanten (K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m) der Substrathydrolyse durch die untersuchten Varianten waren vergleichbar (Tab. 3.1) (Bär *et al.*, 2003b).

Tab. 3.1: Kinetische Konstanten K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m (Substrat: Gly-Pro-AMC) und die spezifische Aktivität (Substrat = $4 \cdot 10^{-4}$ M Gly-Pro-pNA), ermittelt für unterschiedliche His₆-fusionierte Varianten der rhDP IV. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES, pH 7,6; 250 mM NaCl.

DP IV Konstrukt	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat} / K_m [μM ⁻¹ s ⁻¹]	spez. Aktivität [U/mg]
N-terminaler His-Tag	$(4,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$32,0 \pm 0,3$	$0,75 \pm 0,02$	18,0
C-terminaler His-Tag	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$32,1 \pm 0,3$	$0,80 \pm 0,04$	19,5
C- und N-terminaler His-Tag	$(4,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$33,8 \pm 0,5$	$0,82 \pm 0,04$	20,1
ohne His-Tag	$(4,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$28,5 \pm 0,6$	$0,66 \pm 0,02$	14,8

3.2.2 Expression und Fermentation der rhDP IV

Nach der Transformation der X-33 Hefezellen mit dem Plasmid pJB-2 wurden 120 Klone im 3 ml-Schüttelkolbenmaßstab auf proteolytische Aktivität der DP IV gegenüber Gly-Pro-AMC getestet. Wenn erforderlich, wurde bei ausgewählten Klonen mit Western-Blot-Analyse (Detektion: anti-penta-His-Tag Antikörper) die Expression der rhDP IV nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.2.13).

Für eine hier exemplarisch beschriebene Fermentation wurde eine Vorkultur mit einem ausgewählten Klon gestartet, bei dem die höchste DP IV-Aktivität im Schüttelröhrchentest (Volumen von 3 ml) gemessen wurde (siehe Abschnitt 2.2.1). Am Ende der Fermentation wurde eine $OD_{600} = 484$ für die Zelldichte der Fermentationssuspension und eine Biotrockenmasse von 73,47 g/l bestimmt (Bär *et al.*, 2003a).

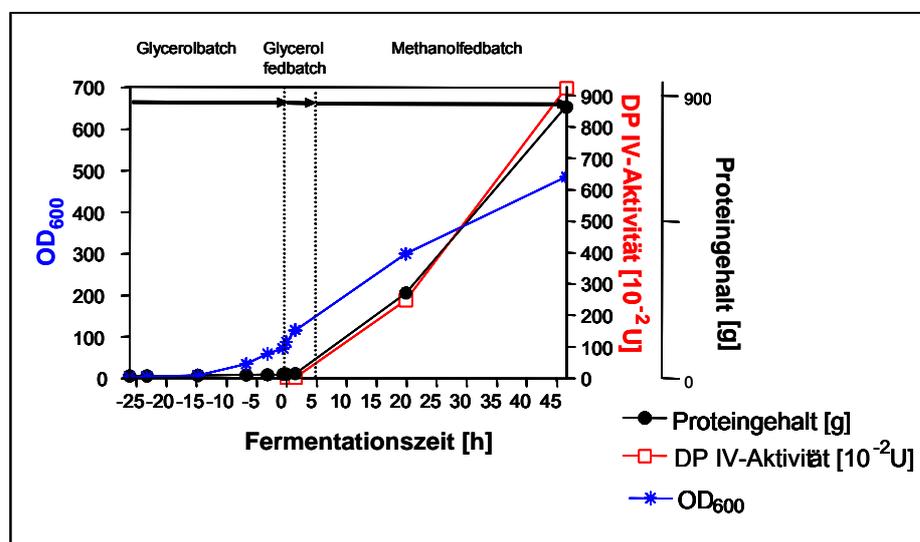


Abb. 3.1: Verlaufdiagramm (Zeitangaben bezogen auf den Start der Substratzugabe) ermittelt für den Proteingehalt, die DP IV-Aktivität und der Zelldichte (OD_{600}) in Abhängigkeit von der Fermentationszeit (-26,17-0 Stunden Glycerol-batch-, 0-5,41 Stunden Glycerol-fed-batch-, 5,41-45,77 Stunden Methanol-fed-batch-Phase) für eine exemplarische Fermentation eines rhDP IV exprimierenden *P. pastoris* Klons (Bär *et al.*, 2003a).

Die Fermentation gliederte sich in drei Abschnitte: Glycerol-batch- (-26,17 – 0 Stunden); Glycerol-fed-batch- (0 - 5,41 Stunden) und Methanol-fed-batch-Phase (5,41 - 45,77 Stunden) (Zeitangaben bezogen auf den Start der Substratzufuhr). Der Verlauf von Substratzugabe und

Zunahme der optischen Dichte durch das Zellwachstum sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Methanolzufuhr wurde nach Programmierung eines Zugabeprofils gesteuert (siehe Abschnitt 2.2.3).

Während der Fermentation zeigte sich, dass der Anstieg des Proteingehalts im Medium mit der Induktion der rhDP IV-Expression durch Methanol-Zugabe korrelierte (Abb. 3.1). Die überwiegende Menge des im Medium akkumulierenden Proteins konnte somit rhDP IV zugeordnet werden.

3.2.3 Isolierung der rhDP IV

Die Isolierung der rhDP IV aus dem Fermentationsüberstand erfolgte nach Abtrennung von Hefezellen und Zellbestandteilen mittels Zentrifugation (20 min bei 30000*g) und Filtration (> 0,8 µM). Der Fermentationsüberstand wurde anschließend direkt über eine NiNTA-Säule gegeben (Flussrate: 5 ml/min). Die Elution des gebundenen Enzyms erfolgte mit einem Gradienten von 5 bis 200 mM Imidazol. Als letzter Isolierungsschritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie mittels einer Superdex 200 Säule von Pharmacia (siehe Abschnitt 2.2.7). Es konnten 32 % der DP IV-Aktivität (1,7 mg rhDP IV pro Liter Fermentationsüberstand, spezifische Aktivität = 18 U/mg) mit einem Reinigungsfaktor von 598 isoliert werden. Die vereinten Fraktionen wurden zur Analyse auf ein SDS-PAGE aufgetragen und anschließend silber gefärbt (siehe Abschnitt 2.2.11). Neben einer breiten Proteinbande bei 100 kDa konnten keine weiteren Banden detektiert werden (Abb. 3.2). Die Identität der rhDP IV konnte über Aktivitätsfärbung mit Gly-Pro-4-Methoxy-β-Naphtylamid, Western-Blot-Analyse (mittels anti-penta-His-Tag Antikörper) und N-terminaler Aminosäuresequenzierung (die ermittelte Sequenz: Ser-Thr-His-His-His war 100 % identisch mit dem N-Terminus der rhDP IV) nachgewiesen werden.

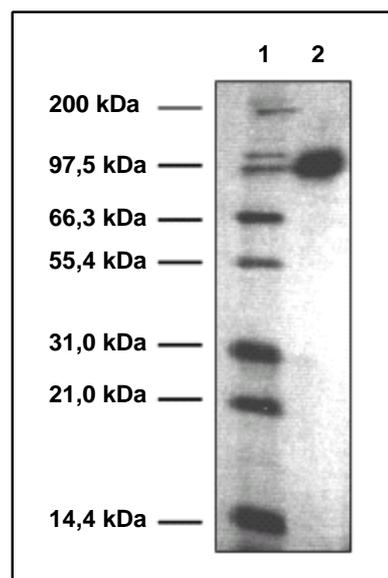


Abb. 3.2: SDS-Gelelektropherogramm (12 % SDS-Gel) nach Silberfärbung der mit Hilfe von Metallchelataffinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie isolierten rhDP IV (5 µg aufgetragen). 1: Proteinmarker; 2: rhDP IV.

Fermentationsüberstände mit einem Volumen von mehr als 3 Litern wurden wie oben beschrieben zentrifugiert und anschließend (im Gegensatz zu Volumina < 3 l) ohne Filtrationsschritt auf eine mit NiNTA-Agarosegel beladene Wirbelschichtbett-Chromatographiesäule gegeben (siehe Abschnitt 2.2.5). Im Gegensatz zu den gepackten NiNTA-Säulen war es durch Anwendung dieser Technik möglich, im ersten Isolierungsschritt deutlich höhere Flussraten zu erzielen (10 ml/min gegenüber 5 ml/min). Darüber hinaus konnten zeitaufwendige Filtrationsschritte eingespart werden. Aufgrund des Totvolumens von bis zu 300 ml musste jedoch mindestens ein Fermentationsüberstand mit Volumina > 2 l vorliegen, um eine Wirbelschichtbettchromatographiesäule effektiv einsetzen zu können.

3.2.4 Optimierung der Fermentationsstrategie

Versuche zur Verbesserung der Fermentationsbedingungen für die Expression der rhDP IV wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lübbert von der Universität Halle-Wittenberg (Abteilung Bioverfahrenstechnik) durchgeführt (Jenzsch *et al.*, 2004).

Bei hohen Biomassekonzentrationen X kann die spezifische Wachstumsrate und somit die spezifische Produktbildung π nicht maximal eingestellt werden, da es zu Limitierungen bei dem Sauerstofftransfer zu den Mikroorganismen im Medium kommt. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass bei der Kultivierung von *P. pastoris* mit Methanol als Kohlenstoffquelle zusätzlich Sauerstoff zur Belüftung in den Reaktor eingetragen wird. Dadurch können hohe spezifische Wachstums- und Produktionsraten (hier DP IV) erzielt werden (Wachstumsrate $\mu > 0,03$ l/h), da die Produktbildung während der Fermentation vom Wachstum der Hefezellen linear abhängig ist.

In der Regel sind Fermenter standardmäßig mit drei „Rushton“ Turbinen (6-Blatt Scheibenrührern) ausgestattet. Durch den Austausch dieser Rührer gegen Rührer mit niedrigeren Energiezahlen war es möglich ohne zusätzlichen Sauerstoffeintrag und somit geringerem technischem Aufwand die Fermentation durchzuführen. Dazu wurden zwei 6-flügelige Hohlblattrührer („Scabarührer“) und darüber ein 4-flügeliger Propellerrührer mit abwärts gerichtetem axialem Strömungsprofil im Fermenter angebracht. Die Produktmengen und die erzielten Biomassen der Fermentationen mit oder ohne zusätzlichen Sauerstoff waren vergleichbar (Abb. 3.3).

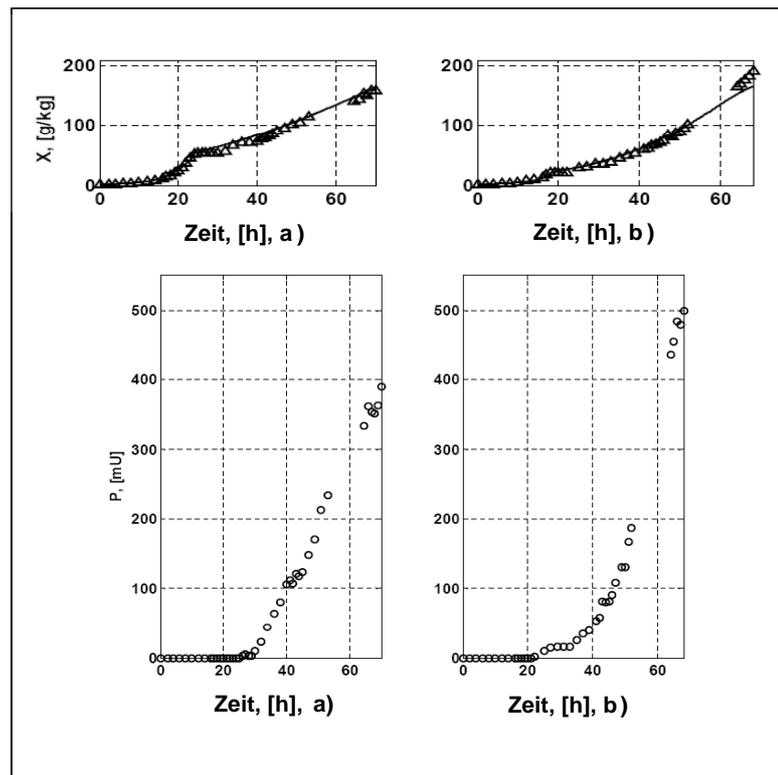


Abb. 3.3: Verlaufsdiagramm für die Entwicklung der Biomasse (X) (oben) und die Produktentstehung (P = rhDP IV) (unten) über die Zeit im Vergleich der Fermentationen mit a) drei 6-Blatt Scheibenrührern, oder b) zwei 6-flügeligen Hohlblattrührern mit niedrigerer Energieeintragskennzahl und einem Propellerrührer (Jenzsch *et al.*, 2004).

Bei Verwendung von „Scaba“- und Propellerrührern wurden während der Fermentation erhöhte Proteinkonzentrationen im Überstand gemessen. Der Grund dafür könnte eine stärkere Scherung der Hefezellen und die Freisetzung von intrazellulären Proteinen sein. Die nachfolgende Isolierung des Proteins wurde durch die zusätzlich im Überstand befindlichen Zellbestandteile erheblich erschwert (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Reinigungstabelle für die Isolierung der rhDP IV aus dem Fermentationsüberstand bei Einsatz von a) zwei 6-flügeligen Hohlblattrührern mit niedrigerer Energieeintragskennzahl und einem Propellerrührer oder b) drei 6-Blatt Scheibenrührern. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Isolierungsschritt	Volumen [ml]		Gesamtprotein [mg]		Aktivität [U]		spezifische Aktivität [U/mg]		Ausbeute [%]		Reinigungsfaktor	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Rührertyp												
Fermentationsüberstand	4100	4100	2076	1230	54,1	60,1	0,03	0,05	-	-	1,0	1,0
1. Metallchelatchromatographie	144	120	56	15,5	33,3	42,6	0,59	2,74	61,4	70,8	22,7	56,2
Größenausschlusschromatographie	3,5	4	10,2	1,6	30,5	32,6	3,00	20,22	56,4	54,2	115	414
2. Metallchelatchromatographie	42	-	1,1	-	21,4	-	18,80	-	39,6	-	721,2	-
nach Proteinkonzentrierung	1	1	1,1	1,6	21,2	31,7	18,90	20,30	39,1	52,7	725,1	415,6

Bei der Fermentation mit „Scaba“- und Propellerrührern musste im Gegensatz zu der Fermentation mit drei 6-blättrigen Scheibenrührern nach einer ersten Metallchelataffinitätschromatographie und einer Größenausschlusschromatographie eine weitere Metallchelataffinitätschromatographie durchgeführt werden, um vollständig homogene DP IV im Coomassigefärbten SDS-Gel zu erhalten (Abb. 3.4).

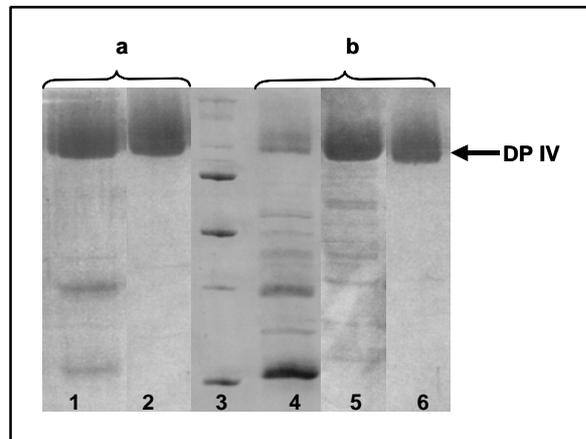


Abb. 3.4: Elektropherogramm eines Coomassie gefärbten SDS-Gels von Proben der Isolierungsschritte nach Einsatz von a) drei 6-Blatt Scheibenrührern oder b) zwei 6-flügeligen Hohlblattrührern mit niedrigerer Energieeintragskennzahl und einem Propellerrührer. 1) Ergebnis der Isolierung nach Metallchelatchromatographie mittels NiNTA-„streamline chelating gel“ in einer Wirbelschichtchromatographiesäule; 2) Ergebnis der Isolierung nach Größenaufschlusschromatographie; 3) Proteinstandard; 4) Ergebnis der Isolierung nach Metallchelatchromatographie mittels NiNTA-„streamline chelating gel“ in einer Wirbelschichtchromatographiesäule; 5) Ergebnis der Isolierung nach Größenaufschlusschromatographie; 6) Ergebnis der Isolierung über Metallchelatchromatographie mittels gepackter NiNTA-Agarose-Säule.

3.3 Charakterisierung der rhDP IV

Die Charakterisierung der homogenen rhDP IV erfolgte anhand der Ermittlung des Molekulargewichts, durch Bestimmung von kinetischen Daten (K_m -, k_{cat} -, k_{cat}/K_m - und K_i -Werte) und des isoelektrischen Punktes sowie Interaktionsstudien mit ADA und GLP-1. Für alle Untersuchungen wurde stets DP IV, isoliert aus Schweineniere (ssDP IV), zum Vergleich mitgeführt.

3.3.1 Sequenzierung und Analyse der DP IV vom Schwein

In der Firma probiodrug AG wurden DP IV-Effektoren bisher mit der nativen, aus Schweineniere isolierten DP IV charakterisiert. Für die Interpretation und den Vergleich der Charakterisierungsergebnisse der Schweine- und rhDP IV wurde die unbekannte Gensequenz der Schweine-DP IV (ssDP IV) ermittelt. Dazu wurde mRNA aus Schweineleber isoliert und der für DP IV kodierende ORF mittels RT-PCR amplifiziert. Auf der Grundlage einer bereits bekannten Teilsequenz am 5' Ende des Gens konnte ein spezifischer Primer entwickelt werden (Qvist *et al.*, 1998). Ein weiterer Primer wurde anhand einer internen Sequenz im Bereich der katalytischen Region unter der Annahme einer Sequenzidentität mit dem humanen Enzym erstellt. Somit konnte fast der komplette ORF amplifiziert und sequenziert werden. Der fehlende Bereich am 3' Ende der cDNA konnte über einen 3'RACE anhand der bereits ermittelten Sequenzinformation analysiert werden (siehe Abschnitt 2.1.1 und Tab. 2 im Anhang). Im Ergebnis wurde ein ORF bestehend aus 2298 bp, kodierend für 766 Aminosäuren gefunden (*GenBank accession number* für die Sequenz der ssDP IV: AY198323; siehe Abb. 1 im Anhang).

Im Vergleich mit humaner-DP IV konnte eine Sequenzidentität von 88,4 % und eine Sequenzhomologie von 92,6 % festgestellt werden. Sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen (Sequenzmotiv Asn-Xaa-Ser/Thr) waren zwischen beiden Enzymen konserviert. Es wurde eine Sequenzverschiebung für eine potentielle N-Glykosylierungsstelle von N279 (ssDP IV) zu N281 (humaner DP IV) festgestellt. Die Aminosäure N520 der humanen Sequenz ist eine mögliche N-Glykosylierungsstelle, welche in der Sequenz vom Schwein nicht vorkommt. Die Positionen N179 und N393 stellen bei ssDP IV weitere N-Glykosylierungsstellen dar (Abb. 3.5) (Bär *et al.*, 2003b).

Human	MKTPWKVLLGLLGAAALVTIIITVPVLLNKGTTDDATADSRKTYTLTDYLNKNTYRLKLYSL	60
Schwein	I V A R S F V F T	60
Maus	V I S -- E A R S A S F V S	58
Ratte	V -- E A AR F V S	58
Human	RWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFHGHSINDYSISPDGQFILLEINY	120
Schwein	Q L I L Y T V R KF	120
Maus	W V F LL H I ES ----YH V R V	114
Ratte	V S L H I EI D S V RL V	118
Human	VKQWRHSYASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNL	180
Schwein	N V K I E K V H	180
Maus	N V K I E K V H	174
Ratte	S I QE K H	178
Human	PSYRITWTGKEDIINYNGITDWVYEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSF	240
Schwein	S Q NV V	240
Maus	H S E NV G N G	234
Ratte	H S NV F N I G G	238
Human	YSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVNTDSLSSVTNATS IQITAPASMLIGDHYL	300
Schwein	I E D RT PNASV Y VP	300
Maus	WI I I SSS A P VAR	294
Ratte	WI I T TTIPM VTT	298
Human	CDVTWATQERISLQWLRRIQNY SVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTTGWVGRFRPS	360
Schwein	G V E I A II T ISS I A	360
Maus	V E A KINLT PSEQ V A	354
Ratte	A VSED A KTTLV PTTQE T A C A	358
Human	EPHFTLDGNSFYKIIISNEEGYRHICYFQIDKKD---CTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYY	417
Schwein	S K H T SN---	417
Maus	S S DKD K H PK --- A S	411
Ratte	S S V DKD K Q K R PEQV A S	418
Human	ISNEYKMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSGPGGL	477
Schwein	H R A NK F	477
Maus	Q E T H N K D A G W	471
Ratte	E T H NKK D L G R	478
Human	PLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPKSKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKS	537
Schwein	SS E D V HG	537
Maus	R TDH E R D V R	531
Ratte	R T Q E D V R	538
Human	KKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYLASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRR	597
Schwein	IEDNSAL V S A	597
Maus	AS	591
Ratte	I AA K	598
Human	LGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVS	657
Schwein	T D A	657
Maus	L V S V	651
Ratte	L L S V	658
Human	RWEYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQOSA	717
Schwein	K	716
Maus	I H	711
Ratte	I H	718
Human	QISKALVDVGVDQAMWYTDEDHGIASSTAHQHIYTHMSHFQCFSLP	766
Schwein	L A T NM L	765
Maus	A LQ H	760
Ratte	A S LQ R	767

Abb. 3.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen von humaner-, Schweine-, Maus-, und Ratten-DP IV. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums (S630, D708 und H740) sind hervorgehoben und unterstrichen dargestellt. Unterstrichene Aminosäuren stellen die Konsensussequenz für potentielle N-Glykosylierungsstellen dar. Die in die Bindung von ADA involvierten Aminosäuren sind hervorgehoben (Bär *et al.*, 2003b).

3.3.2 Bestimmung des Molekulargewichts der rhDP IV

Das exakte Molekulargewicht der rhDP IV wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Für die Messung wurde das Enzym in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Das erhaltene Molekulargewicht von 103,58 kDa des zweiten Peaks (der einfach geladenen Form $m/z = [M + H]^+$) entspricht der monomeren Form der rhDP IV (Abb. 3.6). Alle detektierten Peaks ließen sich auf das Homodimer (Molekulargewicht etwa 210 kDa) zurückführen (Abb. 3.6). Die post-translationalen Modifikationen des Enzyms tragen zu 18,6 % zum Molekulargewicht des Enzyms bei [bezogen auf das theoretische Molekulargewicht von 84,46 kDa, ausgehend von der Primärsequenz der rhDP IV ($\Delta 1-36$ mit His-Tag)]. Für DP IV aus verschiedenen Geweben (Plazenta, Niere, Darm) sind in der Literatur Gewichtsangaben zwischen 100 kDa und 130 kDa für die monomere Form des humanen Enzyms beschrieben (Brandsch *et al.*, 1995; Kähne *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1978). Der Anteil der post-translationalen Modifikationen, hauptsächlich Glykosylierungen, liegt zwischen 10 % und 30 % des Molekulargewichts (Fan *et al.*, 1997; Fukasawa *et al.*, 1981).

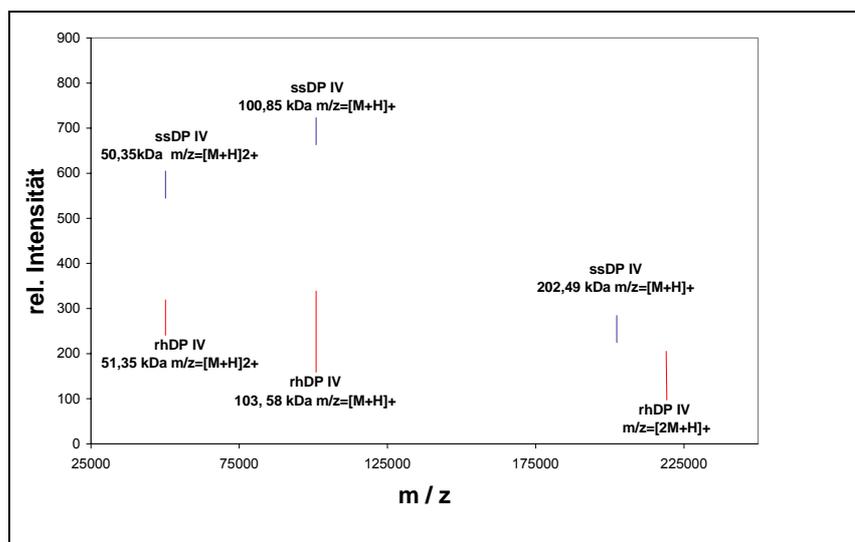


Abb. 3.6: MALDI-TOF-Massenspektrum zur Bestimmung des Molekulargewichts der rhDP IV (rot) und ssDP IV (blau). rhDP IV: 51,14 kDa $\rightarrow m/z = [M + 2 H]^{2+}$, 103,58 kDa $\rightarrow m/z = [M + H]^+$; ssDP IV: 50,35 kDa $\rightarrow m/z = [M + 2 H]^{2+}$, 100,85 kDa $\rightarrow m/z = [M + H]^+$, 202,49 kDa $\rightarrow m/z = [2M + H]^+$.

Für die monomere Form der ssDP IV wurde ein Molekulargewicht von 100,85 kDa bestimmt, davon sind 16,3 % des Molekulargewichts durch post-translationalen Modifikationen des Proteins bedingt [bezogen auf das theoretische Molekulargewicht von 84,46 kDa, ausgehend von der Primärsequenz der löslichen ssDP IV (38-766)]. Der Anteil der post-translationalen Modifikationen am Molekulargewicht ist damit geringer gegenüber rhDP IV (18,6 %). Außerdem konnte eine geringere Molekulargewichtsverteilung und somit auch eine geringere Peakbreite für ssDP IV im Vergleich zu rhDP IV festgestellt werden (Abb. 3.6). Die bereits beschriebenen Unterschiede in den post-translationalen Modifikationen und in der Aminosäuresequenz können die Abweichungen im Molekulargewicht erklären.

Weiterhin wurde das native Molekulargewicht der rhDP IV durch eine analytische Größenausschlusschromatographie bestimmt (Abb. 3.7). Im Vergleich zu einem Molekulargewichtsstandard konnte mittels linearer Regression ein apparentes natives Molekulargewicht von 187,09 kDa ermittelt werden ($R^2 = 0,95$). Da das Molekulargewicht für die monomere Form der rhDP IV mit ca. 100 kDa zuvor bestimmt wurde (Abb. 3.6) konnte angenommen werden, dass rhDP IV nativ als Dimer vorlag.

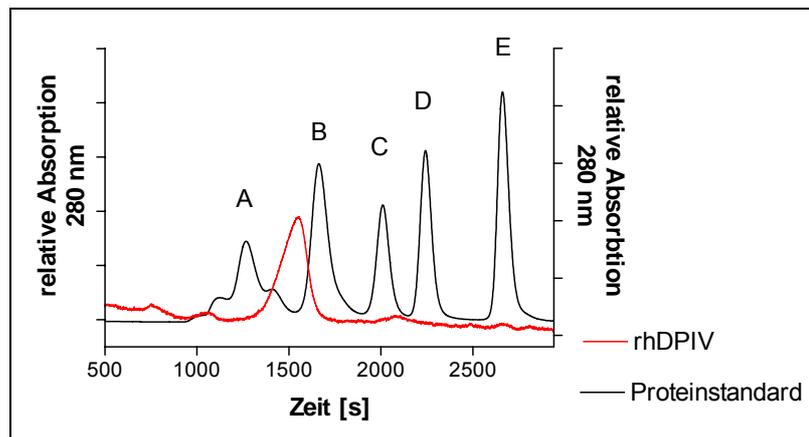


Abb. 3.7: Elutionsprofil einer analytischen Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts der rhDP IV (rot) durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard (schwarz) (Proteinpeaks A-E). Bedingungen: Säule Superdex 200, Raumtemperatur, Flussrate: 0,5 ml/min, 25 μ l rhDP IV (0,24 mg/ml). (Molekulargewichtsstandard bestehend aus A: Thyreoglobulin 670 kDa; B: Gamma Globulin 158 kDa; C: Ovalbumin 44 kDa; D: Myoglobin 17 kDa; E: Vitamin B-12 1,35 kDa) (Bär *et al.*, 2003b).

3.3.3 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung eines Enzyms gibt Informationen über unterschiedliche Ladungszustände und damit über verschiedene post-translationale Modifikationen eines Proteins. Für DP IV werden bis zu 12 verschiedene Isoformen zwischen pH 3,0 und 6,4 in Abhängigkeit von Herkunft und Isolierungsmethoden beschrieben (Reutter *et al.*, 1995). Diese Varianz wird vor allem auf Unterschiede im Grad der Glykosylierung zurückgeführt (Fukasawa *et al.*, 1981; Kähne *et al.*, 1996; Mentlein, 1999; Puschel *et al.*, 1982). Mittels isoelektrischer Fokussierung in einem Agarosegel zwischen pH 3,0 und 6,0 (Abb. 3.8) wurden die isoelektrischen Punkte der Isoformen der rhDP IV und ssDP IV ermittelt. Dabei wurden 17 Isoformen für ssDP IV (Isoelektrischer Punkt (pI): 5,50 - 5,18) gegenüber 30 Isoformen für rhDP IV (pI: 5,50 - 3,49) gefunden, die außerdem eine breitere Verteilung im anionischen Bereich aufwiesen.

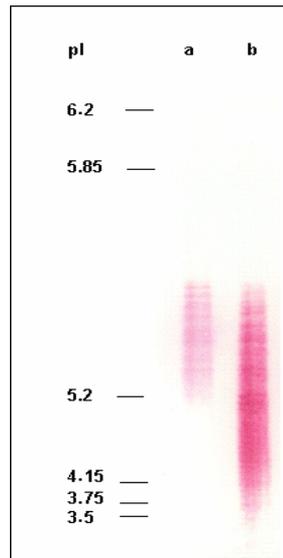


Abb. 3.8: Elektropherogramm einer analytischen IEF in einem Agarosegel, pH 3-6, zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes über Aktivitätsfärbung (Substrat: Gly-Pro-4-methoxy- β -naphthylamid) der rhDP IV im Vergleich mit ssDP IV (jeweils 0,1 μ g Protein aufgetragen). a) DP IV isoliert aus Schweineiere; b) rhDP IV.

3.3.4 Enzymkinetische Charakterisierung mittels Dipeptidderivaten

Für die kinetische Charakterisierung der rhDP IV im Vergleich mit ssDP IV wurden die kinetischen Konstanten von verschiedenen Dipeptidderivaten mit Prolin oder Alanin in P₁-Position ermittelt. Es konnte sowohl für die kinetischen Konstanten K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m , als auch für die Inhibierung mit P32/98 (Isoleucyl-Thiazolidin, siehe Tab. 1 im Anhang) und P59/99 (Isoleucyl-(2)-Cyanopyrrolidin, siehe Tab. 1 im Anhang) eine hohe Übereinstimmung in den für beide Enzyme ermittelten Parametern gefunden werden (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Kinetische Konstanten ermittelt für die Hydrolyse von Dipeptidderivaten und der Hemmung durch verschiedene Inhibitoren durch rh- und ssDP IV. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6; 250 mM NaCl.

Substrat	rhDP IV			ssDP IV		
	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [μ M ⁻¹ s ⁻¹]	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [μ M ⁻¹ s ⁻¹]
Gly-Pro-AMC	$(4,2 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	$32 \pm 0,3$	$0,75 \pm 0,02$	$(6,1 \pm 0,17) \cdot 10^{-5}$	$23,2 \pm 0,5$	$0,38 \pm 0,01$
Ala-Pro-AMC	$(1,9 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	$32 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,13$	$(2,9 \pm 0,21) \cdot 10^{-5}$	$35 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,09$
Ala-Pro-pNA	$(9,0 \pm 1,60) \cdot 10^{-6}$	$35 \pm 1,2$	$3,9 \pm 0,71$	$(1,1 \pm 1,65) \cdot 10^{-5}$	$32 \pm 1,1$	$2,9 \pm 4,35$
Lys-Ala-AMC	$(3,2 \pm 0,06) \cdot 10^{-4}$	$7,5 \pm 0,06$	$0,024 \pm 0,001$	$(2,8 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$4,0 \pm 0,1$	$0,015 \pm 0,0006$
Inhibitor	rhDP IV			ssDP IV		
	K_i [M]			K_i [M]		
P32/98	$(9,3 \pm 0,57) \cdot 10^{-8}$			$(8,5 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$		
P59/99	$(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-9}$			$(3,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$		

3.3.5 Interaktionsstudien mittels Plasmoresonanzmessung

ADA ist ein Bindungspartner der DP IV dessen Affinität zu DP IV mit Hilfe molekularer Interaktionsstudien (Biacore) ermittelt werden sollte (Lambeir *et al.*, 2003). Die Dissoziationskonstante K_D (siehe Abschnitt 2.2.21, berechnet nach Gleichung 9) des rhDP IV-ADA Komplexes (Rinder ADA Typ VIII) betrug für rhDP IV $2,15 \pm 0,18$ nM und für ssDP IV $7,38 \pm 0,54$ nM. Die Bindungsaffinität der rhDP IV ist demnach 3,5-mal größer als die der ssDP IV (Abb. 3.9).

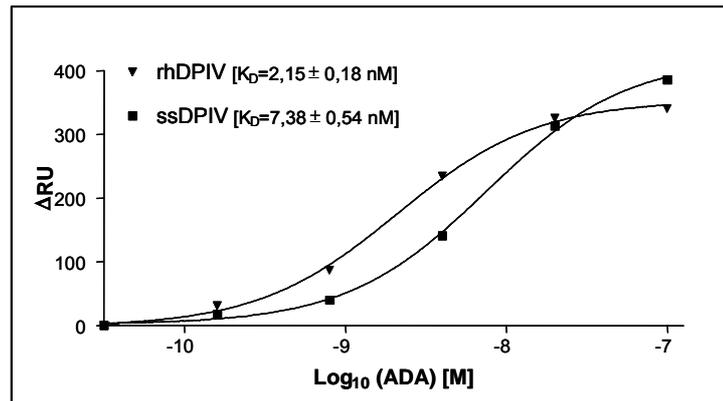


Abb. 3.9: Halblogarithmische Darstellung der konzentrationsabhängigen Bindung von ADA (Rinder ADA Typ VIII) an rhDP IV im Vergleich zu der Bindung mit ssDP IV. Bedingungen: $T = 25^\circ\text{C}$; HBS-N-Puffer, pH 8,0; Enzym über Aminokopplung an den Sensor Chip CM5 gekoppelt (Bär *et al.*, 2003b).

Zur weiteren Charakterisierung der rhDP IV wurde mit der gleichen Methode die Bindungseigenschaft des Enzyms an das Peptidhormonsubstrat GLP-1 (bestehend aus 30 Aminosäuren) untersucht. Der K_D -Wert der Wechselwirkung des Inkretins GLP-1 und rhDP IV betrug $153 \pm 17 \mu\text{M}$, für ssDP IV ergab sich ein K_D -Wert von $33,4 \pm 2,2 \mu\text{M}$. Das Ergebnis weist auf eine höhere Bindungsaffinität der ssDP IV zu GLP-1 hin.

3.4 Prozessierung des Pancreatic Polypeptids und Exendin-3 durch DP IV *in vitro*

Pancreatic Polypeptid (PP) stellt aufgrund seiner Peptidsequenz (PP(1-10): APLEPVYPGD) ein potentielles Substrat der DP IV dar. Das Peptidhormon wird in den „Langerhansschen Inselzellen“ exprimiert und wirkt als Regulator für pankreatische und gastrointestinale Funktionen. Nach Inkubation des Peptids mit rhDP IV [40 mU/ml (entspricht der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma)] konnte im MALDI-TOF-Massenspektrogramm ein produkt-spezifischer Massepeak für PP(3-36) detektiert werden. Die für das Peptidhormon bestimmten Hydrolysegeschwindigkeiten erwiesen sich sowohl bei Hydrolyse durch rh-, als auch ssDP IV vergleichbar. Da der Umsatz des Substrates unter Bedingungen erfolgte für die $[S] < K_m$ gilt, entspricht die Zeit-Umsatz-Kurve einem Reaktionsverlauf nach pseudo-erster Ordnung. Daher kann man aus den Daten direkt „ k_{obs} “ (eine Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung) bzw. die Halbwertszeit für diesen Prozess $t_{1/2}$ ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{obs}$) als Vergleichsparameter bestimmen. Die Hydrolysegeschwindigkeit von PP durch rhDP IV und ssDP IV betragen $0,0155 \pm 0,0005 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,0159 \pm 0,0005 \text{ min}^{-1}$ (Abb. 3.10).

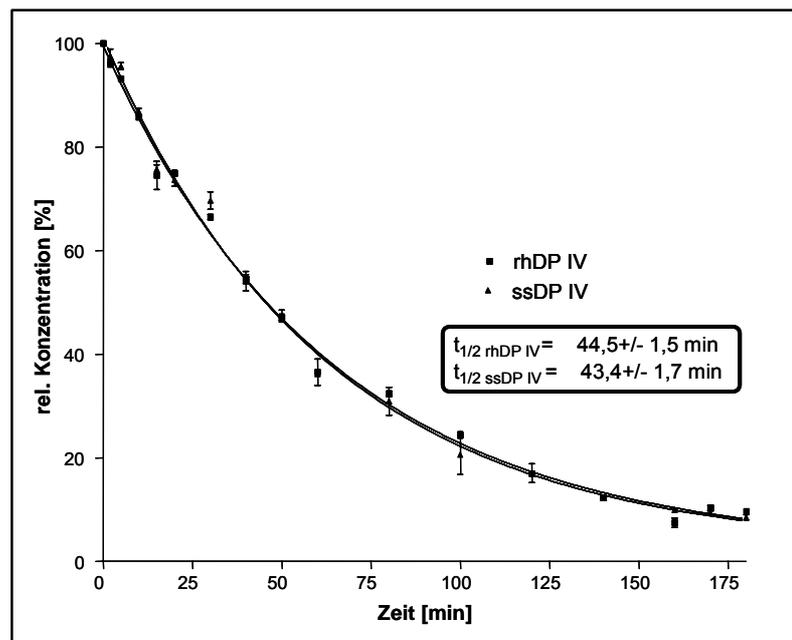


Abb. 3.10: Progressionskurve für die Hydrolyse des Pancreatic Polypeptids während der Inkubation mit je 40 mU/ml (entspricht der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma) rhDP IV oder ssDP IV. Aus dem Inkubationsansatz mit Peptid und Enzym wurden zu festgelegten Zeitpunkten Proben entnommen und die relativen Verhältnisse von Substrat [PP(1-36)] und Produkt [PP(3-36)] über MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Messbedingungen: $T = 37^\circ\text{C}$; Substratkonzentration $25 \mu\text{M}$; 100 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7,6$) bestimmt. Daraus konnte dann das Verhältnis von intaktem zu prozessiertem Peptid ermittelt und mittels nicht linearer Regressionsanalyse die Halbwertszeit für den Umsatz von PP bestimmt werden.

Exendin-3 ist ein Mitglied der GRF/Glukagon-Peptidfamilie und weist hohe Sequenzhomologien zu den anderen Mitgliedern (u.a. GIP, PACAP38) dieser Familie auf (Aminosäuresequenz Exendin-3(1-10): HSDGTFSDL). Das mit einer Länge von 39 Aminosäuren vorkommende Peptid interagiert in geringen Konzentrationen mit einem bisher unbekanntem potentiellen Exendin-Rezeptor, wodurch es zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt. In hohen Konzentrationen bindet Exendin an den VIP-(*Vasoactive Intestinal Peptide*) Rezeptor, was zur Freisetzung von Amylase führt und gleichzeitig weiterhin die intrazelluläre Ausschüttung von cAMP stimuliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die DP IV katalysierte Freisetzung des Dipeptids N-Histidin-Serin vom N-terminus von Exendin-3 nur äußerst langsam (Abb. 3.11) und bei hohen Enzymkonzentrationen erfolgte [400 mU/ml (entspricht dem Zehnfachen der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma)].

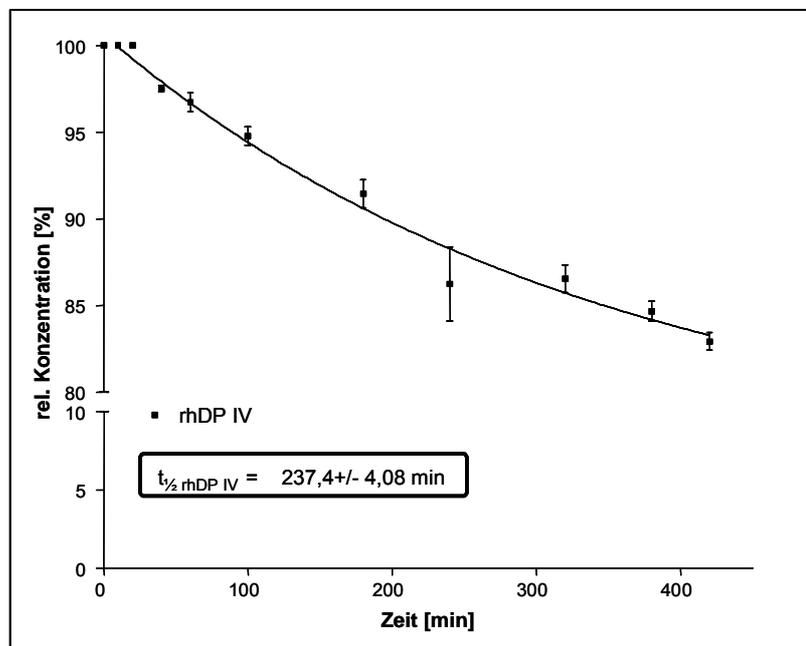


Abb. 3.11: Progressionskurve für die Hydrolyse von Exendin-3 während der Inkubation mit 400 mU/ml rhDP IV (entspricht dem zehnfachen der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma). Aus dem Inkubationsansatz mit Peptid und Enzym wurden zu festgelegten Zeitpunkten Proben entnommen (Messbedingungen: T = 37°C; Substratkonzentration 25 µM; 100 mM Tris-HCl, pH 7,6.) und die relativen Verhältnisse von Substrat [Exendin-3(1-39)] und Produkt [Exendin-3(3-39)] über MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Daraus konnte dann das Verhältnis von intaktem zu prozessiertem Peptid ermittelt und mittels nicht linearer Regressionsanalyse die Halbwertszeit für den Umsatz von Exendin-3 bestimmt werden.

3.5 „Sekundäre“ Wechselwirkungen zwischen DP IV und Peptidhormonen

Durch die kinetische Untersuchung der Hydrolyse von Dipeptidderivatsubstraten durch DP IV wurde deutlich, dass die katalytische Effizienz entscheidend durch die Aminosäure in P₁-Position beeinflusst wird (siehe Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Kinetische Parameter ermittelt mit rhDP IV für die Substrathydrolyse von Dipeptidderivaten mit variierender Aminosäure in P₁-Position. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K _m [M]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [μM ⁻¹ s ⁻¹]
His-Pro-AMC	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	9,5 ± 0,24	0,5 ± 0,05
His-Ala-AMC	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	2,4 ± 0,03	$(1,8 \pm 0,03) \cdot 10^{-2}$
His-Ser-AMC	$(9,2 \pm 2,4) \cdot 10^{-4}$	0,1 ± 0,004	$(1,1 \pm 0,03) \cdot 10^{-4}$
His-Gly-AMC	$(4,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-3}$	1,5 ± 0,81	$(3,6 \pm 2,1) \cdot 10^{-4}$
His-Thr-AMC	keine Hydrolyse bei Substratkonzentrationen < 8 mM		
His-Val-AMC	keine Hydrolyse bei Substratkonzentrationen < 8 mM		

Die ermittelten k_{cat}/K_m-Werte unterschieden sich jeweils um ein bis zwei Größenordnungen in Abhängigkeit davon, ob sich in P₁-Position des Substrates Prolin, Alanin oder Serin befindet (Tab. 3.4 und siehe Abb. 1.2). Es wurde weiterhin untersucht, ob die spezifische Aktivität gegenüber physiologischen Substraten der DP IV ebenfalls entscheidend durch Variation der Aminosäure in der P₁-Position beeinflusst ist. NP Y wird sehr effizient durch DP IV umgesetzt und weist Prolin in P₁-Position auf. Nach Austausch von Prolin (in P₁-Position) gegen Alanin oder Serin in dieser Position waren die ermittelten spezifischen Aktivitäten (k_{cat}/K_m) für Y1H/P2S-NP Y(1-29), Y1H/P2A-NP Y(1-29) und Y1H-NP Y(1-29) vergleichbar [Tab. 3.5 (ermittelt über Kapillarzonenoelektrophorese, siehe Abschnitt 2.2.19)]. Aus diesen Werten ist ersichtlich, dass der Einfluss der Aminosäure in P₁-Position bei NP Y-Derivaten deutlich geringer ist als bei niedermolekularen Substraten (Dipeptidderivatsubstraten).

Tab. 3.5: Kinetische Parameter K_m, k_{cat} und k_{cat}/K_m der rhDP IV katalysierten Substrathydrolyse von NP Y-Derivaten mit Prolin, Alanin oder Serin in P₁-Position. Die Messung erfolgte mittels Kapillarzonenoelektrophorese. Messbedingungen: T = 25°C; Laufpuffer: 0,1 M NaPhosphat, pH 2,5.

Substrat	K _m [M]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [μM ⁻¹ s ⁻¹]
Y1H-NP Y(1-29)	$(4,8 \pm 0,71) \cdot 10^{-5}$	18 ± 1,6	0,38 ± 0,011
Y1H/P2A-NP Y(1-29)	$(3,7 \pm 1,54) \cdot 10^{-5}$	35 ± 5,2	0,95 ± 0,029
Y1H/P2S-NP Y(1-29)	$(6,2 \pm 0,22) \cdot 10^{-5}$	13 ± 0,2	0,21 ± 0,006

Die in Tabelle 3.4 und 3.5 dargestellten Ergebnisse weisen auf einen Einfluss der Substratlänge bei der Erkennung und Katalyse der DP IV hin, welcher im Folgenden untersucht werden sollte. Dazu wurde anhand der Aminosäuresequenz von Glukagon (Serin in P₁-Position) eine Anzahl von Peptiden mit zunehmender Länge, beginnend mit den ersten vier Aminosäuren des Peptid-N-Terminus, synthetisiert. In einem Kompetitionsassay (Substrat: Gly-Pro-pNA) wurden die IC₅₀-Werte für die Peptide mit unterschiedlicher Kettenlänge ermittelt (Tab. 3.6, siehe Abschnitt 2.2.18)

Tab. 3.6: IC₅₀-Werte der Inhibierung der DP IV durch Peptide mit zunehmender Kettenlänge (die Aminosäuresequenz entspricht dem N-Terminus von Glukagon) in einem Wettbewerbsassay (Substrat: Gly-Pro-pNA, Konzentration für IC₅₀-Bestimmung = 4 · 10⁻⁴ M). Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Inhibitor	IC ₅₀ [M]
Glukagon(1-4)	> (1) · 10 ⁻³
Glukagon(1-6)	> (1) · 10 ⁻³
Glukagon(1-8)	> (1) · 10 ⁻³
Glukagon(1-10)	(4,3 ± 1,5) · 10 ⁻⁴
Glukagon(1-14)	(2,2 ± 0,4) · 10 ⁻⁴
Glukagon(1-20)	(1,4 ± 0,4) · 10 ⁻⁴
Glukagon(1-29)	(5,5 ± 0,5) · 10 ⁻⁵

Für die Peptide, die weniger als acht Aminosäuren enthielten, konnte bei einer Konzentration von > 1 mM der eingesetzten Glukagonanaloge keine Hemmung der Substrathydrolyse von Gly-Pro-pNA gemessen werden. Das Peptidhormonanalogon mit der Aminosäuresequenz 1-10 von Glukagon führte erstmals zu einer deutlichen Reduzierung der Enzymaktivität (IC₅₀ = 0,43 mM). Mit zunehmender Kettenlänge (> 10 Aminosäuren) verringerten sich die IC₅₀-Werte (Tab. 3.6) womit der Einfluss der Länge von Peptidketten bei der Bindung dieser Peptide im aktiven Zentrum der DP IV deutlich wurde.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von Peptiden der GRF/Glukagon-Familie zeigt einen hoch konservierten Bereich am Peptid-N-Terminus. Die aus diesem Bereich entnommene Sequenz TFTSDY [Glukagon(5-10)] wurde verwendet, um potentielle „sekundäre“ Interaktionen (außerhalb des katalytischen Zentrums) zwischen Enzym und Substraten der GRF/Glukagon-Peptidfamilie zu inhibieren, ohne die Hydrolyse im katalytischen Zentrum zu beeinträchtigen. Mit Hilfe dieses Hexapeptids sollte eine Unterscheidung zwischen der GRF/Glukagon-Peptidfamilie und Substraten ermöglicht werden, die eine abweichende Aminosäuresequenz in dem Sequenzbereich (5-10) aufweisen, woraus sich andere spezifische „sekundäre“ Wechselwirkungen mit der DP IV ergeben sollten (Abb. 3.12).

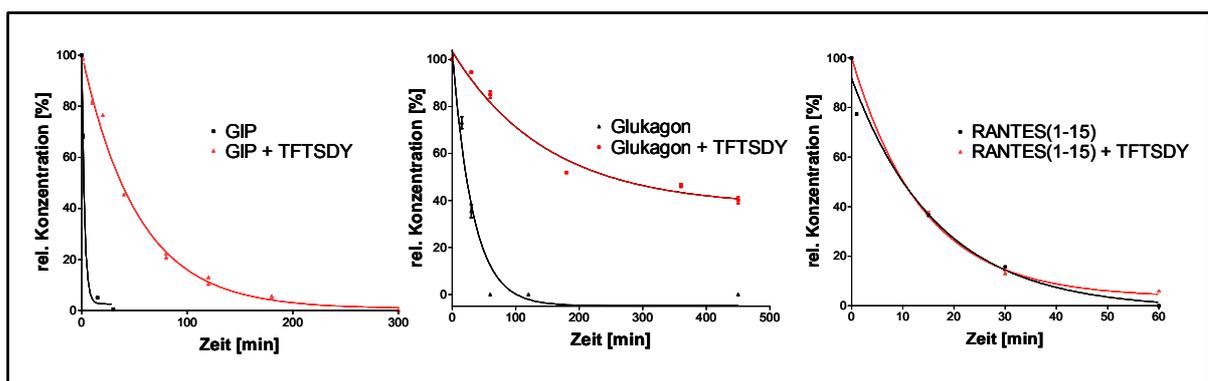


Abb. 3.12: Progressionskurven der Hydrolyse von Glukagon, GIP und Rantes(1-15) bei Inkubation mit je 40 mU/ml rhDP IV (entspricht der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma) jeweils in Ab- und Anwesenheit des Peptids HP1 [TFTSDY (entspricht Glukagon 5-10)]. Aus dem Inkubationsansatz (Messbedingungen: T = 37°C; Substratkonzentration 25 µM; 100 mM Tris-HCl, pH 7,6) mit Peptid und Enzym wurden zu festgelegten Zeitpunkten Proben entnommen und die relativen Verhältnisse von Substrat und Produkt mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt. Daraus konnte dann das Verhältnis von intaktem zu prozessiertem Peptid ermittelt und anschließend durch nicht linearer Regressionsanalyse die Halbwertszeit für den Umsatz der einzelnen Substrate bestimmt werden.

In einem Wettbewerbsassay zeigte sich, dass das Hexapeptid 1, [TFTSDY (Glukagon 5-10)], die Hydrolyse des ausschließlich im aktiven Zentrum bindenden Substrates Gly-Pro-AMC kaum inhibiert ($IC_{50} > 1 \text{ mM}$). Die Umsatzgeschwindigkeit der Peptidsubstrate Glukagon, GIP und RANTES(1-15) durch rhDP IV wurde jeweils mit bzw. ohne Hexapeptid 1 (HP1) mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Das Chemokin RANTES(1-15), enthält Prolin in P₁-Position und unterscheidet sich in der Sequenz im Bereich der Aminosäure 5-10 von den Peptiden der GRF/Glukagon-Familie. Für die Inkubation des Chemokins mit rhDP IV konnte unter An- oder Abwesenheit von HP1 kein Unterschied für die Hydrolysegeschwindigkeit gefunden werden. Im Gegensatz dazu setzte die Zugabe von HP1 die Hydrolysegeschwindigkeit ($k_{\text{obs}} = \ln 2 / t_{1/2}$) der GRF/Glukagon-Peptidfamilie zugehörigen DP IV-Substrate GIP um den Faktor 20 und für Glukagon um den Faktor 13 herab (Abb. 3.12 und siehe Abschnitt 3.4).

Die Aminosäuren der DP IV, die außerhalb des aktiven Zentrums die postulierten „sekundären“ Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym vermitteln, sollten durch Mutagenesestudien charakterisiert werden (siehe Abschnitt 2.1.3). Zur Identifizierung dieser Aminosäuren wurde eine Moleküldynamiksimulation des Peptidsubstrates GIP mit DP IV in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Wolfgang Brandt vom Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) und Frau Dr. Susanne Aust (probiobdrug AG) durchgeführt. Anhand des erstellten Modells konnten „sekundäre“ Wechselwirkungen zwischen der neunten Aminosäure (S7') von GIP und der Aminosäure R560 der DP IV vermutet werden (Abb. 3.13).

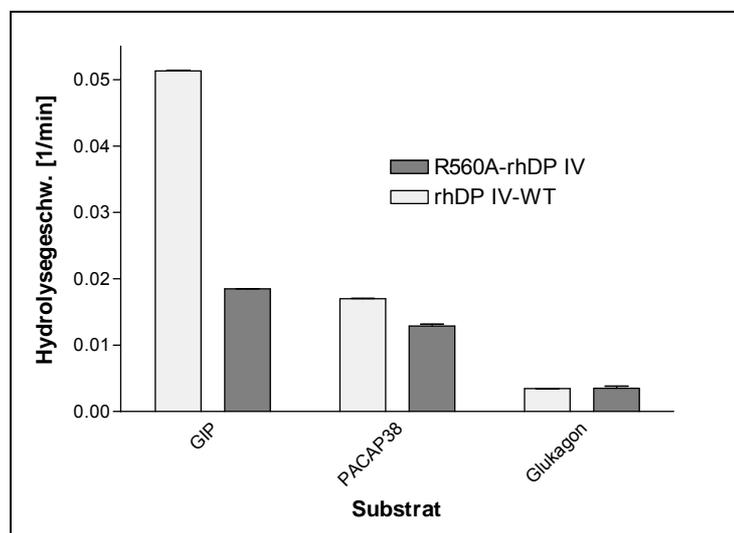


Abb. 3.13: Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten (ermittelt aus $k_{\text{obs}} = \ln 2 / t_{1/2}$) (ermittelt durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie) für die Substrate GIP, PACAP38, Glukagon nach der Inkubation mit R560A-rhDP IV und rhDP IV [eingesetzte DP IV-Aktivität betrug je 40 mU/ml (entspricht der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma)]. Messbedingungen: T = 37°C; Substratkonzentration 25 μM ; 100 mM Tris-HCl, pH 7,6.

Die Halbwertszeiten von GIP, PACAP38 und Glukagon durch rhDP IV-Wildtypenzym (rhDP IV-WT) oder R560A-rhDP IV wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Es zeigte sich, dass die Hydrolysegeschwindigkeit für GIP bei Inkubation mit

R560A-rhDP IV ($k_{\text{obs}} = 0,018 \pm 0,0004 \text{ min}^{-1}$) im Verhältnis zu rhDP IV-WT ($k_{\text{obs}} = 0,051 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$) um den Faktor 2,8 geringer war. Die Hydrolysegeschwindigkeit von PACAP38 mit der rhDP IV-Variante R560A ($k_{\text{obs}} = 0,013 \pm 0,0003 \text{ min}^{-1}$) war um den Faktor 1,3 langsamer im Vergleich mit rhDP IV-WT ($k_{\text{obs}} = 0,017 \pm 0,0003 \text{ min}^{-1}$). Im Gegensatz dazu wurde der Umsatz von Glukagon durch den Aminosäureaustausch im Enzym nicht beeinflusst (Abb. 3.13).

Wie bereits erwähnt, waren die kinetischen Parameter für die Hydrolyse von Dipeptidderivaten zwischen ss- und rhDP IV vergleichbar (siehe Abschnitt 3.3.4 und Tab. 3.3). Jedoch konnten Unterschiede bei der Bindung von GLP-1 und DP IV innerhalb verschiedener Spezies beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.3.5) (Bär *et al.*, 2003b). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Differenzen in der Hydrolysegeschwindigkeit bei Inkubation von Peptidsubstraten der GRF/Glukagon-Familie (VIP und PACAP27) mit ss- oder rhDP IV auftraten. Beide Peptidhormone wurden im Vergleich zu rhDP IV wesentlich schneller durch das aus dem Schwein isolierten Enzym hydrolysiert (z.B. VIP: (ssDP IV) $k_{\text{obs}} = 0,0045 \pm 0,00013 \text{ min}^{-1}$ und (rhDP IV) $k_{\text{obs}} = 0,0026 \pm 0,00008 \text{ min}^{-1}$) (Abb. 3.14). Der Vergleich der kürzlich publizierten Kristallstrukturen von beiden Spezies macht deutlich, dass zwei Aminosäuren (K463 und E464 bei humaner DP IV und S463 sowie L464 bei ssDP IV), welche am Eingang zum „ β -Propellertunnel“ auf der Proteinoberfläche lokalisiert sind, sich aufgrund ihrer Ladungen unterscheiden (Rasmussen *et al.*, 2003; Engel *et al.*, 2003). Der Einfluss der beiden Aminosäuren wurde anhand der rhDP IV-Variante K463S/E464K untersucht, wobei K463 von humaner DP IV durch das in dieser Position in ssDP IV vorkommende Serin ersetzt wurde, wie auch E464 durch Lysin. Daraus resultiert eine Änderung der Oberflächenladung in dieser Position, die möglicherweise die Erkennung und Bindung von Peptidhormonsubstraten beeinflusst.

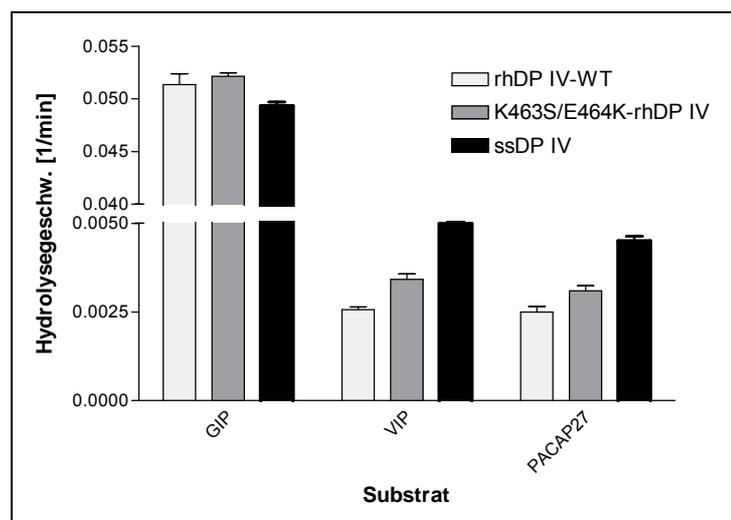


Abb. 3.14: Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten (ermittelt aus $k_{\text{obs}} = \ln 2 / t_{1/2}$) (ermittelt durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie) für die Substrate VIP, PACAP27 und GIP nach der Inkubation mit R560A-rhDP IV und rhDP IV [eingesetzte DP IV-Aktivität betrug je 40 mU/ml (entspricht der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma)]. Messbedingungen: T = 37°C; Substratkonzentration 25 μM ; 100 mM Tris-HCl, pH 7,6.

Die Hydrolyse von niedermolekularen Substraten, wie Gly-Pro-AMC, wurde durch die Variation der Aminosäuren K463S/E464K der rhDP IV nicht beeinträchtigt, jedoch die Hydrolysegeschwindigkeiten der Peptidsubstrate VIP und PACAP27. Durch den Austausch der Aminosäuren K463 und E464 des humanen Enzyms gegen die in der Schweinesequenz vorkommenden S463 und K464 wurde die Substrate durch diese Variante gegenüber der rhDP IV-WT schneller hydrolysiert. Die Hydrolysegeschwindigkeit erwies sich hingegen im Vergleich zu ssDP IV als immer noch langsamer (Abb. 3.14). So betrug k_{obs} bei Inkubation von VIP mit rhDP IV $0,0026 \pm 0,00008 \text{ min}^{-1}$, für die Variante K463S/E464K-rhDP IV $0,0034 \pm 0,00016 \text{ min}^{-1}$ und mit ssDP IV $0,0049 \pm 0,00013 \text{ min}^{-1}$. Die Hydrolysegeschwindigkeit von PACAP27 wurde mit $0,0025 \pm 0,00015 \text{ min}^{-1}$ für rhDP IV, $0,0031 \pm 0,00014 \text{ min}^{-1}$ und für die Variante K463S/E464K-rhDP IV und $0,0045 \pm 0,00013 \text{ min}^{-1}$ mit ssDP IV bestimmt. Anhand dieser Daten wird deutlich, dass die Unterschiede in der Aminosäuresequenz (Aminosäuren 463 und 464) der ssDP IV und rhDP IV einen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit haben, wobei neben dem untersuchten Bereich noch weitere Interaktionen eine Rolle spielen dürften. Im Gegensatz dazu wurde kein Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit von GIP durch ssDP IV, rhDP IV-WT und K463S/E464K-rhDP IV gemessen.

3.6 Enzym-Substrat-Wechselwirkungen im katalytischen Zentrum der DP IV

Der Einfluss einzelner Aminosäureseitengruppen in der Nähe der katalytischen Triade der DP IV auf die Inhibitorbindung und Substrathydrolyse von Dipetid-, Tripeptid- und Polypeptidderivaten, sollte im Folgenden untersucht werden. Hierzu wurden zehn rhDP IV-Varianten mittels Mutagenese-PCR und anschließender Fermentation für kinetische Untersuchungen hergestellt (siehe Abschnitt 2.1.3). Die spezifischen Aktivitäten der isolierten rhDP IV-Varianten sind in Tabelle 3.7 gezeigt.

Tab. 3.7: Spezifische Aktivität der rhDP IV-Varianten nach Fermentation und Isolierung mittels Metallchelataffinitätschromatographie. Messbedingungen: T = 30°C; Substrat = $4 \cdot 10^{-4}$ M Gly-Pro-pNA; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

rhDP IV-Variante	Spezifische Aktivität [U/mg]
WT	20,5
R125A	17,5
R125K	13,7
N710A	0,07
N710Q	0,01
N710D	0,31
Y631F	5,32
W629A	20,1
Y547A	keine Aktivität
E206L	0,08
E205A	1,24

3.6.1 Kinetische Charakterisierung der rhDP IV-Varianten

Die Charakterisierung der beschriebenen rhDP IV-Varianten erfolgte durch Ermittlung der kinetischen Parameter K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m für verschiedene Substrate sowie IC_{50} - und K_i -Werte für unterschiedliche Inhibitoren. Zudem wurden die Hydrolysegeschwindigkeiten der natürlichen DP IV-Substrate NP Y, GIP und PACAP38 während der Inkubation mit den DP IV-Varianten bestimmt.

Kinetische Charakterisierung mit Dipeptidderivaten

Die kinetische Charakterisierung der DP IV wird üblicherweise mit Dipeptidderivaten durchgeführt. Als Dipeptidsubstrat mit Prolin in P_1 -Position wurde Ala-Pro-AMC verwendet. Bei diesem Substrat ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Deacylierung, welche durch die Konstante k_3 beschrieben wird (siehe Abschnitt 1.1.3 und Gleichung (2) in 2.2.17).

Als Substrat mit Alanin in P_1 -Position wurde Lys-Ala-AMC verwendet. Die Spezifität der DP IV für Xaa-Pro-Substrate ist im Vergleich zu Xaa-Ala-Substraten zwischen ein bis zwei Zehnerpotenzen höher (Demuth und Heins, 1995). Bei der Spaltung von Alanin-Substraten ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Acylierung, beschrieben durch die Konstante k_2 in Gleichung (2) in Abschnitt 2.2.17 (siehe Abschnitt 1.1.3) (Rahfeld *et al.*, 1991a).

Kinetische Charakterisierung mit Inhibitoren

Zur Charakterisierung der rhDP IV-Varianten wurde die Bindung von Inhibitoren im aktiven Zentrum untersucht. Die Beschreibung der Interaktionen erfolgte durch Ermittlung des IC_{50} -Wertes sowie in einigen Fällen durch die Inhibierungskonstante K_i .

P32/98 (Isoleucyl-Thiazolidin, siehe Tab. 1 im Anhang) ist ein kompetitiver Inhibitor, welcher von der probiodrug AG zur therapeutischen Anwendung bei Typ 2 Diabetes Patienten entwickelt wurde. Diese Substanz ist ein Dipeptidanalogen, welches in der P₁-Position einen dem Prolin ähnlichen Thiazolidin-Ring aufweist. Es ist davon auszugehen, dass der Inhibitor wie ein Substrat erkannt und gebunden wird. Die Bindungsverhältnissen sollten dabei denen des Übergangszustandes ähneln.

Zur Identifizierung der Aminosäuren des aktiven Zentrums, die mit der P₁-Aminosäure des Substrates interagieren, erfolgte die Charakterisierung mit den Tripeptiden Diprotin A (Ile-Pro-Ile), Diprotin B (Val-Pro-Leu), t-Butyl-Gly-Pro-Ile und t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂ (siehe Tab. 1 im Anhang). Diese Tripeptide sind Substrate der DP IV, die allerdings inhibitorische Wirkung aufweisen, da sie mit anderen DP IV-Substraten um die Bindung am aktiven Zentrum konkurrieren und langsam hydrolysiert werden (Rahfeld *et al.*, 1991b). Durch die Ermittlung der IC₅₀-Werte wurden die Interaktionen der rhDP IV-Varianten mit den Tripeptiden analysiert.

Zur Charakterisierung der Interaktion der DP IV mit Diprotin B wurden außerdem die Parameter K_i, K_m, k_{cat} und k_{cat}/K_m ermittelt. Bei der Inkubation von Substraten, wie Diprotin B, mit Gly-Pro-AMC und Enzym, konkurrieren beide Substrate um die Bindung an das aktive Zentrum der DP IV. Dabei wird die Hydrolyse von Gly-Pro-AMC in Anwesenheit des konkurrierenden Substrates am Fluorimeter verfolgt und eine scheinbare kompetitive Hemmung der Gly-Pro-AMC-Spaltung durch das zugegebene Substrat beobachtet. Aus dieser Interaktion lässt sich nach Gleichung (5) in 2.2.18 eine Inhibierungskonstante für das Substrat ermitteln. Der erhaltene K_i-Wert beschreibt die Wechselwirkung zwischen den rhDP IV-Varianten und dem Substrat (Diprotin B) und ist mit den K_m-Werten des Substrates am jeweiligen Enzym vergleichbar.

t-Butyl-Gly-Pro-Ile gehört zu einer neuen Inhibitorklasse, die von der probiodrug AG für die klinische Anwendung entwickelt wurde. Zur Identifizierung der Aminosäuren im aktiven Zentrum der DP IV, die mit der C-terminalen Carboxylgruppe von Tripeptiden wechselwirken, wurde zudem die Bindung des Inhibitors t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂ untersucht.

3.6.2 Kinetische Daten ermittelt mit rhDP IV-Varianten von verschiedenen DP IV-Substraten und -Inhibitoren

Kinetische Parameter, ermittelt mit rhDP IV-Wildtypenzym

Zunächst wurden alle verwendeten Verbindungen als Substrate und Inhibitoren der rhDP IV-WT charakterisiert, um die Vergleichbarkeit der Enzymvarianten mit einem gemeinsamen Standard zu gewährleisten (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Kinetische Parameter des rhDP IV-WT für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und -Inhibitoren. Messbedingungen: $T = 30^\circ\text{C}$; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Ala-Pro-AMC	$(1,9 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	$32 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,13$
Lys-Ala-AMC	$(3,2 \pm 0,06) \cdot 10^{-4}$	$7,5 \pm 0,06$	$0,024 \pm 0,001$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(9,3 \pm 0,57) \cdot 10^{-8}$	$(1,6 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$	
Diprotin B	$(3,7 \pm 0,13) \cdot 10^{-5}$	$(3,7 \pm 0,13) \cdot 10^{-5}$	
Diprotin A	n.b.	$(2,2 \pm 0,13) \cdot 10^{-6}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(3,6 \pm 0,16) \cdot 10^{-6}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(6,7 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$	

Die Ergebnisse (Tab. 3.8) bestätigen die bisher bekannten Daten mit Substraten der Prolin- und Alanin-Reihe (Demuth und Heins, 1995). Wie erwartet ist Lys-Ala-AMC ein schlechteres Substrat der DP IV als Ala-Pro-AMC.

Unter den analysierten Substanzen erwies sich P32/98 als der effektivste Inhibitor mit einer Inhibierungskonstante von 93 nM. Die IC_{50} -Werte der Tripeptide t-Bu-Gly-Pro-Ile, t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH₂ und Diprotin A lagen in einem Bereich zwischen 2-7 μM . Diprotin A wird effektiver gebunden als Diprotin B, die IC_{50} -Werte unterscheiden sich um eine Größenordnung.

Kinetische Parameter der R125A-rhDP IV

Die Aminosäure R125 im aktiven Zentrum der DP IV interagiert mit einem Carbonylsauerstoff im Peptidrückgrat der DP IV-Substrate (siehe Abschnitt 1.1.3). Der Austausch von R125 gegen Alanin bedeutet den Verlust der positiven Ladung und der langen Seitenkette des Arginins (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante R125A für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und -Inhibitoren. Messbedingungen: $T = 30^\circ\text{C}$; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Ala-Pro-AMC	$(3,7 \pm 0,18) \cdot 10^{-5}$	48 ± 1	$1,3 \pm 0,07$
Lys-Ala-AMC	$(3,0 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$3,4 \pm 0,04$	$0,01 \pm 0,001$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(2,0 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$	$(3,1 \pm 0,41) \cdot 10^{-7}$	
Diprotin B	$(2,3 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$(2,0 \pm 0,28) \cdot 10^{-4}$	
Diprotin A	n.b.	$(4,0 \pm 0,53) \cdot 10^{-4}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(4,0 \pm 2,00) \cdot 10^{-4}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(8,0 \pm 1,10) \cdot 10^{-5}$	

Kinetische Parameter der R125K-rhDP IV

Die Aminosäure Lysin ist wie Arginin ebenfalls eine basische Aminosäure, trägt allerdings eine kürzere Seitenkette und enthält statt der Guanidino-Gruppe eine ϵ -Amino-Gruppe.

Der Vergleich des DP IV-WT mit den R125A- und R125K-rhDP IV-Varianten gab Auskunft über die Relevanz der Seitenkettenlänge und der Basizität der Aminosäure bei den Interaktionen von R125 mit dem Peptidrückgrat der Substrate und Inhibitoren (Tab. 3.10).

Tab. 3.10: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante R125K für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und –Inhibitoren. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\mu M^{-1}s^{-1}$]
Ala-Pro-AMC	$(3,8 \pm 0,11) \cdot 10^{-5}$	$37 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,03$
Lys-Ala-AMC	$(1,1 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$3,6 \pm 0,04$	$(3,2 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(1,6 \pm 0,04) \cdot 10^{-7}$	$(3,0 \pm 0,16) \cdot 10^{-7}$	
Diprotin B	$(1,0 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	
Diprotin A	n.b.	$(6,5 \pm 0,32) \cdot 10^{-5}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(2,0 \pm 0,21) \cdot 10^{-4}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(5,3 \pm 0,29) \cdot 10^{-5}$	

Der Austausch der Aminosäure R125 zeigte im Vergleich zum WT nur einen geringen Einfluss auf die Bindung und Hydrolyse von Dipeptidsubstraten durch DP IV (siehe Tab. 3.8).

Die Bindung des Dipeptidanalogs P32/98 war offensichtlich bei allen R125-rhDP IV-Varianten im Vergleich zum WT nur gering oder gar nicht beeinflusst. Allerdings veränderte sich die Interaktion mit den vier getesteten Tripeptid-Derivaten für alle R125-rhDP IV-Varianten dramatisch. Es wurden besonders starke Effekte bei der Bindung der Tripeptide mit intakter Carboxylgruppe am C-Terminus ermittelt. Die Bindung von t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂ war ebenfalls beeinträchtigt, allerdings geringer im Vergleich zu dem Inhibitor mit unmodifiziertem C-Terminus t-Butyl-Gly-Pro-Ile (siehe Tab. 3.8).

Kinetische Parameter der N710A-rhDP IV

Die Aminosäure N710 interagiert wie R125 mit einem Carbonylsauerstoff im Peptidrückgrat von DP IV-Substraten (siehe Abschnitt 1.1.3). Zur Charakterisierung der Interaktionen von N710 mit den verwendeten Substraten und Inhibitoren wurde diese mit Alanin ausgetauscht (Tab. 3.11). Diese Variation bedingt den Verlust eines potentiellen Protonendonors und die Verkürzung der Aminosäureseitenkette.

Tab. 3.11: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante N710A für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und –Inhibitoren. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [μM ⁻¹ s ⁻¹]
Ala-Pro-AMC	$(1,7 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$	$0,74 \pm 0,03$	$(4,4 \pm 0,46) \cdot 10^{-4}$
Lys-Ala-AMC	$(1,2 \pm 3,34) \cdot 10^{-1}$	$0,11 \pm 0,28$	$(9,1 \pm 25,9) \cdot 10^{-7}$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(4,5 \pm 1,2) \cdot 10^{-4}$	$(4,0 \pm 1,00) \cdot 10^{-4}$	
Diprotin B	Nicht messbar bei einer Diprotin B-Konzentration < 10 mM	$(1,6 \pm 1,45) \cdot 10^{-1}$	
Diprotin A	n.b.	$(3,2 \pm 1,70) \cdot 10^{-2}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(3,6 \pm 1,70) \cdot 10^{-2}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(1,4 \pm 0,53) \cdot 10^{-4}$	

Kinetische Parameter der N710Q-rhDP IV

Durch den Austausch von N710 gegen Glutamin wurde die Aminosäureseitenkette um eine CH₂-Gruppe verlängert, wobei die polaren Restgruppen unverändert blieben. Die Charakterisierung dieser Enzymvariante sollte Aufschluss über sterische Interaktionen zwischen der Aminosäure N710 und den DP IV-Substraten und Inhibitoren geben (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante N710Q für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und –Inhibitoren. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [μM ⁻¹ s ⁻¹]
Ala-Pro-AMC	$(1,2 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$	$0,23 \pm 0,01$	$(2,0 \pm 0,21) \cdot 10^{-4}$
Lys-Ala-AMC	Keine Hydrolyse bei Substratkonzentration < 10 mM		
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	Nicht messbar bei einer Inhibitorkonzentration < 10 mM	$(2,0 \pm 0,50) \cdot 10^{-3}$	
Diprotin B	keine Bindung	keine Bindung	
Diprotin A	n.b.	$(5,1 \pm 2,70) \cdot 10^{-3}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(2,9 \pm 1,90) \cdot 10^{-2}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(1,3 \pm 0,80) \cdot 10^{-2}$	

Kinetische Parameter der N710D-rhDP IV

Durch den Austausch von N710 gegen Asparaginsäure blieb die Länge der Seitenkette unverändert, allerdings weist Asparaginsäure einen sauren Rest in Form einer Carboxylgruppe auf.

Tab. 3.13: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante N710D für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und –Inhibitoren. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Ala-Pro-AMC	$(1,2 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	$19 \pm 0,6$	$(1,6 \pm 0,14) \cdot 10^{-2}$
Lys-Ala-AMC	$(8,2 \pm 2,00) \cdot 10^{-4}$	$17 \pm 0,1$	$(1,6 \pm 0,43) \cdot 10^{-5}$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(1,0 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$(3,0 \pm 0,15) \cdot 10^{-5}$	
Diprotin B	$(1,2 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	$(2,8 \pm 3,10) \cdot 10^{-3}$	
Diprotin A	n.b.	$(1,1 \pm 0,40) \cdot 10^{-3}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(6,0 \pm 0,46) \cdot 10^{-4}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(4,0 \pm 0,58) \cdot 10^{-4}$	

Die Bindung und Hydrolyse von Dipeptidderivaten durch DP IV-Varianten von N710 wurde stark beeinträchtigt (siehe Tab. 3.11-3.13). Die Hydrolyse und Inhibierung der Varianten N710A-rhDP IV und N710Q-rhDP IV war stärker beeinträchtigt als N710D-rhDP IV. Die drei untersuchten rhDP IV-Varianten konnten Substrate mit Prolin in P₁-Position spalten. Allerdings konnte durch den Austausch des Asparagin-Restes zu Glutamin (N710Q) das Substrat Lys-Ala-AMC nicht mehr prozessiert werden. Im Gegensatz dazu, wurde, wie oben gezeigt, das Substrat durch die Varianten N710A-rhDP IV und N710D-rhDP IV hydrolysiert.

Bei der Interaktion mit Inhibitoren konnten ebenfalls starke Einschränkungen beobachtet werden. Hier zeigten sich bei allen verwendeten Effektoren die deutlichsten Inhibierungseffekte bei der Variante N710Q-rhDP IV. Ab einer Konzentration < 10 mM wurde diese Variante durch Diprotin B nicht mehr inhibiert. Die Variation von N710 zu Alanin bewirkte ebenfalls eine starke Beeinflussung der Inhibitorbindung. Die geringsten Abweichungen zum WT waren bei der Variante N710D-rhDP IV zu beobachten (siehe Tab. 3.8).

Kinetische Parameter der Y631F-rhDP IV

Zur Untersuchung des Einflusses der Hydroxylgruppe von Y631 bei der Bildung des Oxyanion-Loches wurde das Tyrosin gegen Phenylalanin ausgetauscht und die resultierende DP IV-Variante mit den oben beschriebenen Substraten und Inhibitoren analysiert (Tab. 3.14 und siehe Abschnitt 1.1.3).

Tab. 3.14: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante Y631F für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und -Inhibitoren. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\mu M^{-1}s^{-1}$]
Ala-Pro-AMC	$(1,7 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$	$9,2 \pm 0,09$	$0,56 \pm 0,02$
Lys-Ala-AMC	$(4,6 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$	$3,2 \pm 0,05$	$0,007 \pm 0,0003$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(1,8 \pm 0,05) \cdot 10^{-7}$	$(3,5 \pm 0,10) \cdot 10^{-7}$	
Diprotin B	$(1,7 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$	$(6,7 \pm 0,44) \cdot 10^{-5}$	
Diprotin A	n.b.	$(5,0 \pm 0,53) \cdot 10^{-6}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(6,0 \pm 0,46) \cdot 10^{-6}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(7,8 \pm 0,84) \cdot 10^{-6}$	

Die fehlende Hydroxylgruppe des Y631 zeigte im Vergleich mit dem WT weder einen Einfluss auf die Bindung und Spaltung der Dipeptidderivate, noch auf die Inhibitorbindung (siehe Tab. 3.8).

Untersuchung der rhDP IV-Variante Y547A

Die Hydroxylgruppe von Y547 soll als Protonendonator bei der Bildung des Oxyanion-Übergangszustands eine wichtige Rolle spielen (Aertgeerts *et al.*, 2004b; Engel *et al.*, 2003; Hiramatsu *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003; Thoma *et al.*, 2003). Diese Annahme konnte in dieser Arbeit durch die Variation von Y547 zu Alanin unterstützt werden. Y547A-rhDP IV konnte exprimiert, isoliert und über Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 3.15 und siehe Abschnitt 2.1.13), zeigte aber keinerlei Proteolyse von Substraten wie Ala-Pro-AMC, Lys-Ala-AMC oder GIP (Alanin in P₁-Position) und NP Y (Prolin in P₁-Position).

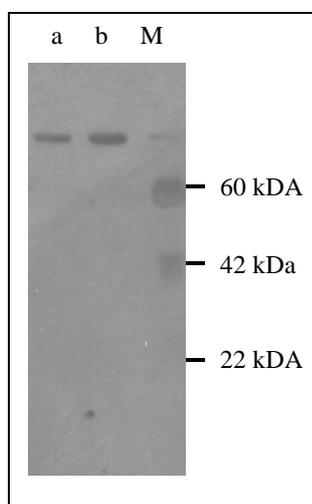


Abb. 3.15: SDS-Gelelektropherogramm (12 %) der Western-Blot-Analyse von a) rhDP IV-WT und b) der proteolytisch inaktiven Variante Y547A-rhDP IV nach Isolierung mittels Metallchelataffinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „SuperSignal West“ (Fa. Pierce) gemäß den Anweisungen des Herstellers. In der Spalte „M“ ist der Proteinmarker „MultiMark Multi-Colored Standard“ von Invitrogen aufgetragen.

Kinetische Parameter der W629A-rhDP IV

W629 soll mit der Aminosäure in P₂-Position von NP Y(1-10) interagieren (Aertgeerts *et al.*, 2004b). Durch den Austausch von W629 gegen Alanin konnte die Rolle dieser Aminosäure bei der Substrat- oder Inhibitorbindung untersucht werden.

Tab. 3.15: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante W629A für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und –Inhibitoren. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Ala-Pro-AMC	$(2,6 \pm 0,25) \cdot 10^{-6}$	$67 \pm 1,9$	$25 \pm 2,5$
Lys-Ala-AMC	$(3,3 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$12 \pm 0,1$	$0,036 \pm 0,001$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(2,1 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$	$(2,0 \pm 0,10) \cdot 10^{-7}$	
Diprotin B	$(3,0 \pm 0,10) \cdot 10^{-5}$	$(2,1 \pm 0,28) \cdot 10^{-5}$	
Diprotin A	n.b.	$(2,6 \pm 0,19) \cdot 10^{-6}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(1,3 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(2,3 \pm 0,50) \cdot 10^{-6}$	

Durch den Austausch von W629 gegen Alanin wurden nur geringe Veränderungen der K_m - und k_{cat} -Werte gegenüber den getesteten Substraten deutlich (Tab. 3.15). In vielen Fällen erfolgte sowohl eine effektivere Substratbindung, als auch eine erhöhte Hydrolysegeschwindigkeit der Dipeptidderivate im Vergleich zum WT (siehe Tab. 3.8).

Die Inhibierungskonstanten der untersuchten Effektoren waren jeweils mit denen für das Wildtypenzym ermittelten vergleichbar (siehe Ta. 3.8).

Kinetische Parameter der E205A- und E206L-rhDP IV

E205 und E206 fixieren mit den negativ geladenen Carboxylgruppen den positiv geladenen N-Terminus der Substrate (siehe Abschnitt 1.1.3). Zur Untersuchung der Relevanz dieser Interaktion wurden mit den Variationen E205A und E206L die negativen Ladungen entfernt.

Tab. 3.16: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante E205A für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und –Inhibitoren. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Ala-Pro-AMC	$(2,4 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$17 \pm 0,2$	$(7,2 \pm 0,27) \cdot 10^{-2}$
Lys-Ala-AMC	$(3,5 \pm 0,29) \cdot 10^{-3}$	$0,2 \pm 0,01$	$(5,6 \pm 0,53) \cdot 10^{-5}$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(2,1 \pm 0,07) \cdot 10^{-5}$	$(2,2 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$	
Diprotin B	$(1,2 \pm 0,04) \cdot 10^{-3}$	$(4,1 \pm 2,10) \cdot 10^{-3}$	
Diprotin A	n.b.	$(1,4 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(1,7 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(1,3 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$	

Tab. 3.17: Kinetische Parameter der rhDP IV-Variante E206L für die Substrathydrolyse bzw. Inhibierung (Substrat: Gly-Pro-AMC, Substratkonzentration für IC_{50} -Bestimmung = K_m) ermittelt mit verschiedenen DP IV-Substraten und –Inhibitoren. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Ala-Pro-AMC	$(8,7 \pm 0,70) \cdot 10^{-4}$	$1,76 \pm 0,05$	$(2,0 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$
Lys-Ala-AMC	$(3,4 \pm 3,00) \cdot 10^{-2}$	$(1,1 \pm 0,79) \cdot 10^{-2}$	$(3,2 \pm 3,66) \cdot 10^{-7}$
Inhibitor	K_i [M]	IC_{50} [M]	
P32/98	$(5,2 \pm 0,86) \cdot 10^{-4}$	$(4,0 \pm 1,00) \cdot 10^{-4}$	
Diprotin B	$(2,6 \pm 0,26) \cdot 10^{-2}$	$(5,1 \pm 3,80) \cdot 10^{-3}$	
Diprotin A	n.b.	$(1,4 \pm 0,48) \cdot 10^{-2}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile	n.b.	$(4,5 \pm 4,80) \cdot 10^{-2}$	
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	n.b.	$(2,5 \pm 1,20) \cdot 10^{-2}$	

Die rhDP IV-Varianten der Aminosäuren E205 und E206 wiesen deutliche Effekte auf den Umsatz der Dipeptidderivate auf (Tab. 3.16 und Tab. 3.17). Der Verlust der negativen

Ladung bewirkte bei beiden Varianten eine Erhöhung der K_m -Werte, allerdings konnten bei der E206L-rhDP IV-Variante stärkere Effekte beobachtet werden (die K_m -Werte waren ca. um den Faktor 10 erhöht). Zudem hatte diese Enzymvariante Auswirkungen auf die Hydrolysegeschwindigkeit. Die k_{cat} -Werte der E205A-rhDP IV für den Umsatz von Ala-Pro-AMC waren mit dem WT vergleichbar, lediglich die Hydrolysegeschwindigkeit von Lys-Ala-AMC wurde beeinträchtigt (siehe Tab. 3.8).

Die Inhibitorbindung war bei beiden rhDP IV-Varianten ebenfalls herabgesetzt. Im Vergleich mit E205A-rhDP IV wies die Variante E206L-rhDP IV eine stärkere Beeinträchtigung der Bindung mit den untersuchten Inhibitoren auf.

3.6.3 Hydrolyse von Diprotin B (Val-Pro-Leu) durch rhDP IV-Varianten

Die untersuchten rhDP IV-Varianten wiesen zum Teil deutliche Unterschiede bei den IC_{50} - und K_i -Werten für Diprotin B als kompetitiver Inhibitor bei der Hydrolyse von Gly-Pro-AMC durch DP IV auf (siehe Tab. 3.8-3.17). Daher kann die Ermittlung der K_m -, k_{cat} - und k_{cat}/K_m -Werte für die rhDP IV-Varianten (siehe Abschnitt 2.2.18) Hinweise ergeben, ob die Bindung und / oder die Hydrolyse beeinflusst wird. Die in Tabelle 3.18 dargestellten k_{cat} -Werte wurden aus den maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten in Anlehnung an die Erklärung in Abschnitt 2.2.18 berechnet.

Tab. 3.18: Kinetische Parameter K_m -, k_{cat} -, k_{cat}/K_m -, IC_{50} - und K_i - für Diprotin B ermittelt mit verschiedenen rhDP IV-Varianten. Messbedingungen: T = 30°C; 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5.

rhDP IV-Variante	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [μM ⁻¹ s ⁻¹]	K_i [M]
WT	$(7,2 \pm 0,10) \cdot 10^{-6}$	$7,0 \pm 0,13$	$0,972 \pm 0,029$	$(9,8 \pm 0,26) \cdot 10^{-6}$
R125A	$(3,7 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$	$7,7 \pm 0,13$	$0,021 \pm 0,0015$	$(2,3 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$
R125K	$(8,5 \pm 1,30) \cdot 10^{-5}$	$8,9 \pm 0,33$	$0,1 \pm 0,016$	$(7,5 \pm 0,20) \cdot 10^{-5}$
N710D	$(1,0 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$	$19,5 \pm 0,52$	$0,02 \pm 0,0016$	$(1,2 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$

Das Substrat Diprotin B wurde ab einer Konzentration < 1 mM nicht mehr von den Varianten N710A-, N710Q- und E206L-rhDP IV hydrolysiert (Tab. 3.18). Die Variation N710Q beeinträchtigte die Bindung des Tripeptides wesentlich stärker als bei den Aminosäurevarianten von R125. Dabei wirkte sich der Austausch zu Alanin stärker aus als der zu Lysin.

3.6.4 Untersuchung der Hydrolyse von Peptidhormonen durch rhDP IV-Varianten

Durch die Charakterisierung der rhDP IV-Varianten mit kurzen Substraten und Inhibitoren wurde der Einfluss der untersuchten Aminosäuren der DP IV auf die Bindung und Hydrolyse dieser artifiziellen Substrate deutlich (siehe Tab. 3.8-3.18). Natürliche Substrate der DP IV weisen dagegen eine Peptidkettenlänge von ca. 10-100 Aminosäuren auf.

Zur Charakterisierung der Enzymvarianten wurden die drei im Folgenden beschriebenen physiologischen Substrate mit unterschiedlichen Aminosäuren in P₁-Position ausgewählt.

NP Y: NP Y (siehe Abschnitt 1.1.4) besteht aus den 36 Aminosäuren YPSKPDNPGE DAPAEDMARY YSALRHYINL ITRQRY und besitzt Prolin in P₁-Position.

GIP: Das Inkretin-Hormon GIP (siehe Abschnitt 1.1.4) besitzt Alanin in P₁-Position und besteht aus folgenden 42 Aminosäuren: Y AEGTFISDY SIAMDKIHQQ DFVNWLLAQK GKKNDWKHNI TQ.

PACAP38: Das im peripheren und zentralen Nervensystem weit verbreitete PACAP38 (siehe Abschnitt 1.1.4) besitzt Serin in P₁-Position und die Aminosäuresequenz HSDGIFTDSY SRYRKQMAVK KYLA AVLGKR YKQ RVKNK.

Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeiten von Peptidhormonen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der Aminosäuren des Enzyms, die bei der Bindung oder Hydrolyse der natürlichen DP IV-Substrate eine Rolle spielen, wurde zunächst überprüft, ob das jeweilige Peptidsubstrat durch die DP IV-Varianten umgesetzt wurde (Tab. 3.19). Konnten die Varianten die Hydrolyse des jeweiligen Substrates katalysieren, wurden nachfolgend K_m-, k_{cat}- und k_{cat}/K_m-Werte bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.18).

Tab. 3.19: Relative Hydrolysegeschwindigkeit der Peptidhormone NP Y, GIP und PACAP38 durch rhDP IV-Varianten im Vergleich zum Wildtypenzym. Messbedingungen: T = 37°C; Substratkonzentration 25 µM; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.

+++ Substrathydrolysegeschwindigkeit mit der des Wildtypenzyms vergleichbar
- keine Hydrolyse

rhDP IV-Variante	Hydrolyse von NP Y (Tyr-Pro-Ser...)	Hydrolyse von GIP (Tyr-Ala-Glu...)	Hydrolyse von PACAP38 (His-Ser-Asp...)
WT	+++	+++	+++
R125A	++	+	-
R125K	+++	++	-
N710A	+	-	-
N710Q	+	-	-
N710D	++	-	-
Y631F	+++	+++	+++
W629A	+++	+++	+++
E206L	-	-	-
E205A	+	-	-

Die ermittelten Hydrolysegeschwindigkeiten von NP Y nach Inkubation mit den Varianten Y631F-rhDP IV und W629A-rhDP IV waren mit dem rhDP IV-WT vergleichbar. Die rhDP IV-Varianten von R125 zeigten eine geringe Beeinflussung der Hydrolyse von NP Y. Deutliche Effekte konnten bei den Variationen von N710 nachgewiesen werden. Hier zeigte die Variante N710D-rhDP IV die höchste Umsatzgeschwindigkeit, die allerdings gegenüber dem WT herabgesetzt war. Die Umsatzgeschwindigkeit von NP Y war bei den Varianten N710A- und N710Q-rhDP IV gegenüber N710D-rhDP IV noch geringer. N710Q-rhDP IV wies die geringste Hydrolysegeschwindigkeit gegenüber NP Y auf (Tab. 3.19).

Aus der Analyse der Hydrolyse von GIP nach Inkubation mit den rhDP IV-Varianten wurde ersichtlich, dass die Varianten Y631F-rhDP IV und W629A-rhDP IV keine deutlichen Unterschiede zum WT aufwiesen. Es konnte kein Umsatz von GIP durch die Varianten N710A-, N710Q-, N710D-, E206L- und E205A rhDP IV unter den gegebenen Bedingungen

gemessen werden. R125A-rhDP IV und R125K-rhDP IV zeigten deutliche Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit von GIP (Tab. 3.19).

Bei der Hydrolyse von PACAP38 unterschieden sich die Geschwindigkeiten der Varianten Y631F und W629A nicht von der rhDP IV-WT. Dagegen konnte PACAP38 durch keine weitere rhDP IV-Variante prozessiert werden (Tab. 3.19).

Bestimmung der K_i -Werte für Peptidhormone mit rhDP IV-Varianten

Die ermittelten scheinbaren Inhibierungskonstanten für Substrate wie NP Y, GIP oder PACAP38, sollten einen Rückschluss auf den K_m -Wert dieser Substrate ermöglichen (Tab. 3.20) (siehe Abschnitt 3.6.1).

Tab. 3.20: Scheinbare K_i -Werte der Peptidhormone GIP, NP Y und PACAP38 für deren Hemmung der Gly-Pro-AMC-Spaltung durch die rhDP IV-Varianten R125A und R125K im Vergleich zum rhDP IV-WT. Messbedingungen: T = 30°C; 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,6.

Substrat (bzw. Inhibitor)	rhDP IV-Variante	K_i [M]
NP Y	WT	$(2,5 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$
	R125A	$(2,7 \pm 0,23) \cdot 10^{-4}$
	R125K	$(8,0 \pm 1,30) \cdot 10^{-4}$
GIP	WT	$(8,8 \pm 0,79) \cdot 10^{-5}$
	R125A	$(2,8 \pm 2,30) \cdot 10^{-4}$
	R125K	$(2,3 \pm 0,24) \cdot 10^{-4}$
PACAP38	WT	$(4,5 \pm 0,28) \cdot 10^{-5}$
	R125A	$(3,0 \pm 0,20) \cdot 10^{-4}$
	R125K	$(2,4 \pm 0,24) \cdot 10^{-4}$

Bestimmung der K_m -, k_{cat} - und k_{cat}/K_m -Werte für die Hydrolyse von Peptidhormonen durch rhDP IV-Varianten

Durch die Punktmutationen in den rhDP IV-Varianten R125A und R125K wurde die Hydrolyse der Peptidhormone zum Teil deutlich beeinflusst (siehe Tab. 3.19 und Tab. 3.20). Durch die Ermittlung der K_m -, k_{cat} - und k_{cat}/K_m -Werte für die Hydrolyse der Peptidhormone durch die rhDP IV-Varianten (siehe Abschnitt 2.2.18) wurde überprüft, ob die Bindung der Substrate oder deren Hydrolyse durch die rhDP IV-Varianten beeinflusst werden.

NP Y:

Tab. 3.21: Kinetische Parameter K_m -, k_{cat} - und k_{cat}/K_m für die Hydrolyse von NP Y durch rhDP IV-Wildtypenzym und die rhDP IV-Varianten R125A, R125K, N710A, N710Q, N710D und E205A. Messbedingungen: T = 30°C; 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5.

rhDP IV-Variante	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]
WT ^a	$1,2 \cdot 10^{-5}$	40	0,76
R125A	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$23 \pm 0,9$	$0,15 \pm 0,02$
R125K	$(5,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$32 \pm 0,5$	$0,61 \pm 0,03$
N710A	$(8,3 \pm 1,7) \cdot 10^{-5}$	$1,8 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,005$
N710Q	$(5,1 \pm 1,6) \cdot 10^{-4}$	$2,0 \pm 0,32$	$(3,9 \pm 1,6) \cdot 10^{-3}$
N710D	$(1,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$12 \pm 0,9$	$0,06 \pm 0,01$
E205A	$(1,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$10 \pm 1,0$	$0,06 \pm 0,02$

^aDaten aus Lambeir *et al.*, für ein Molekulargewicht der DP IV = 85 kDa (Lambeir *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Variation von R125 der K_m -Wert für die Bindung von NP Y beeinflusst wird (Tab. 3.21). Es zeigte sich, dass die DP IV-katalysierte Hydrolyse von NP Y durch die Mutationen R125A und R125K kaum beeinträchtigt ist. Ein wesentlicher Effekt auf den K_m -Wert tritt zudem nur bei der Variante R125A-rhDP IV auf, welche keine Ladung an Position 125 aufweist. Diese Effekte sind bei dem Substrat der Alanin-Reihe (GIP) stärker ausgeprägt, während PACAP38 durch R125A-rhDP IV und R125K-rhDP IV nicht mehr umgesetzt wird.

Durch Variation von N710 werden sowohl die k_{cat} , als auch die K_m -Werte beeinträchtigt. Analog zur Hydrolyse von Dipeptidderivaten war bei den Varianten N710A-rhDP IV und N710Q-rhDP IV die Substratbindung stärker herabgesetzt als bei N710D-rhDP IV.

Der Austausch von E205 gegen Alanin beeinträchtigt den K_m -Wert im Vergleich zum WT (Faktor 14). Im Vergleich zu Dipeptidderivaten ist allerdings auch der k_{cat} -Wert beeinträchtigt, welcher um den Faktor 4 erniedrigt ist (Tab. 3.21).

GIP:

Tab. 3.22: Kinetische Parameter K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m für die Hydrolyse von GIP durch rhDP IV-WT und die rhDP IV-Varianten R125A und R125K. Messbedingungen: T = 30°C; 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5.

rhDP IV-Variante	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [μM ⁻¹ s ⁻¹]
DP IV-WT	$(8,4 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$	$3,9 \pm 0,2$	$(4,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-2}$
R125A	$(1,2 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$	$0,16 \pm 0,08$	$(1,4 \pm 1,0) \cdot 10^{-4}$
R125K	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$0,88 \pm 0,08$	$(5,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$

Die im Vergleich zum rhDP IV-WT abweichenden K_m - und k_{cat} -Werte zeigen, dass sowohl die Bindung, als auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hydrolyse von GIP durch Variation von R125 beeinflusst werden (Tab. 3.22). Dabei zeigt die Variante R125A-rhDP IV stärkere Effekte als R125K-rhDP IV. Offensichtlich spielt R125 bei der GIP-Hydrolyse eine wesentliche Rolle, sowohl bei der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes, als auch bei der Bildung des Acylenzyms.

PACAP38:

PACAP38 wurde durch keine der rhDP IV-Varianten R125A, R125K, N710A, N710Q, N710D, E205A und E206L prozessiert (siehe Tab. 3.19) Dadurch waren keine kinetischen Parameter bestimmbar.

3.7 Kristallisation der rhDP IV

Anhand der Kristallstruktur der DP IV ist es möglich die Lage und Interaktionen von Substraten (z.B. Peptidhormone) und Inhibitoren im Enzym zu untersuchen. Innerhalb der probiodrug AG sollte durch die Kristallisation der rhDP IV ein Beitrag zum Design von Inhibitoren anhand der Proteinstruktur erbracht werden. Es konnten sowohl mit deglykosylierter (Endo H_F -behandelt), als auch mit glykosylierter rhDP IV-WT sowie mit der deglykosylierten Enzymvariante N710Q-rhDP IV (Endo H_F -behandelt) Proteinkristalle erhalten werden (Kristallisationsbedingungen: 200 mM Tris-Puffer pH 8,0 mit 200 mM $MgCl_2$, 20 % PEG 3350 und 12 % Glycerol) (Abb. 3.16 und siehe Abschnitt 2.2.25).

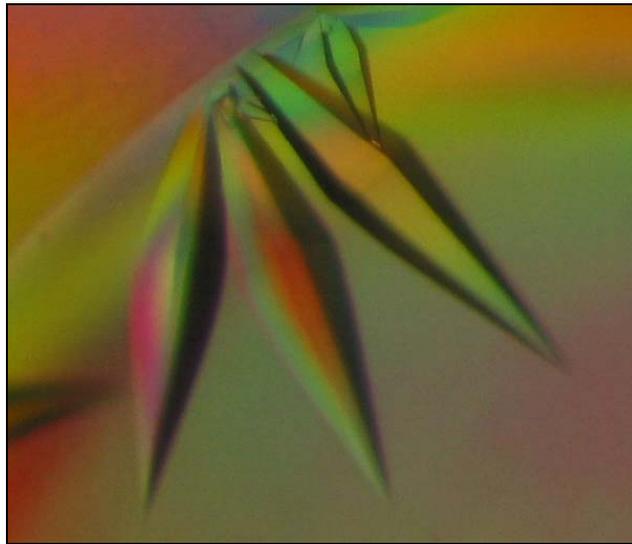


Abb. 3.16: Proteinkristall der deglykosylierter rhDP IV (Endo H_F -behandelt). Zur Kristallisation wurden 2 μ l Proteinlösung (7 mg/ml) mit 2 μ l 200 mM Tris-Puffer, pH 8,0; 200 mM $MgCl_2$; 20% PEG 3350; 12 % Glycerol versetzt. Die orthorombischen Kristalle entstanden nach zwei Tagen „sitting drop“-Dampfdiffusion.

Die Röntgenkristallanalyse mit deglykosylierter Δ 1-36 rhDP IV (Endo H_f-behandelt), co-kristallisiert mit GIP wurde an der *Wiggler Beamline* BW6 am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, Hamburg) von Prof. Dr. Milton Stubbs von der Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich für Biochemie/Biotechnologie durchgeführt. Es konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,08 Å aufgenommen werden (Tab. 3.23). Die Kristalle gehörten der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁ mit Zellkonstanten von a = 65,68 Å, b = 68,13 Å und c = 420,08 Å an. Die Struktur der DP IV wurde durch „molekulares replacement“ anhand einer bereits publizierten DP IV-Struktur („PBD“-Datenbankeintrag: 1N1M) als Suchmodell gelöst. Eine Elektronendichte, die auf das Vorhandensein von GIP innerhalb des Enzyms schließen lässt, konnte nicht gefunden werden.

Tab. 3.23: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für rhDP IV, aufgenommen an der *Wiggler Beamline* BW6 am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, Hamburg).

Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Auflösung	100-2,08 Å
Zellkonstanten	
a (Å)	65,68
b (Å)	68,13
c (Å)	420,08
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Gemessene / Einzelne Reflexe	193707 / 86584
^a R _{sym} (%)	5,4 (100 - 2,08 Å) 58,2 (bei 2,13 Å)
R _{fac} (%)	25,6 bis 2,4 Å
R _{free} (%)	30,0 bis 2,4 Å
Mittlerer B-Faktor	24,1452
R.m.s. Abweichung Bindungslänge (Å)	0,007109
R.m.s. Abweichung Winkel (°)	1,43369

$${}^a R_{sym} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$$

I: stellt die Intensität der Einzelmessung dar ($\langle I \rangle$ = Mittelwert der gefundenen Intensitäten)

R_{free}: berechnet mit 5 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden

3.8 Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der PEP anhand eines potentiellen physiologischen Substrates

3.8.1 Expression und Isolierung der rekombinanten humanen PEP

Die Prolylendopeptidase (PEP, EC 3.4.21.26) ist als namensgebendes Enzym der S9 Subfamilie ein unmittelbar mit DP IV verwandtes Enzym. In Analogie zu intensiven Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften nativer Substrate der DP IV sollte die Substratspezifität der PEP in dieser Arbeit näher untersucht und neue potentielle Substrate des Enzyms identifiziert werden (siehe Abschnitt 1.2).

Rekombinante humane PEP, kloniert in den Vektor pQE-31 (Fa. Qiagen), wurde in M15-*E. coli* Zellen transformiert und für vier Stunden im Schüttelkolben bei 37°C nach IPTG-Induktion exprimiert. Die *E. coli* Zellen wurden mit Hilfe einer FRENCH-Pressen aufgeschlossen und der Suspensionsüberstand zentrifugiert und filtriert. Die PEP konnte über mehrere Schritte isoliert werden. Dabei wurden nacheinander eine Metallchelataffinitätschromatographie-Säule, ein DEAE-Sephacel Anionenaustauscher, eine Butyl-Sepharose-Säule und eine MonoQ-Säule eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.8). Es konnten insgesamt 7,2 mg rekombinante humane PEP (rhPEP) aus einer 10 l Schüttelkultur mit einer spezifischen Aktivität von 3,7 U/mg isoliert werden (Abb. 3.17). Weitere Proteaseaktivitäten gegenüber Ala-pNA (Aminopeptidasesubstrat) oder Gly-Pro-pNA (DP IV-Substrat) konnten nicht festgestellt werden.

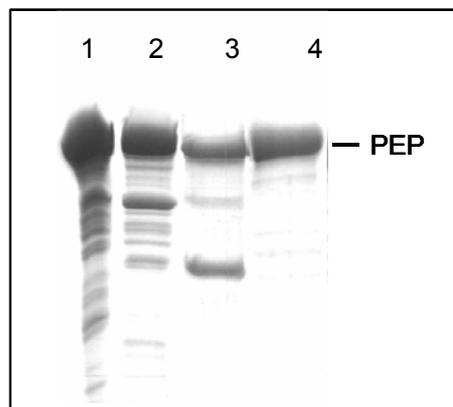


Abb. 3.17: SDS-Gelelektropherogramm (12% SDS-Gel nach Coomassie-Färbung) von Proben der einzelnen Isolierungsschritte von rhPEP aus M15-*E. coli*-Zellen. 1: Ergebnis der Isolierung nach Durchführung einer Metallchelataffinitätschromatographie (Elution mit 80 mM Imdiazol, pH 7,6); 2: Ergebnis der Isolierung nach Einsatz eines DEAE-Sephacel Anionenaustauschers (pH 6,8); 3: Ergebnis der Isolierung nach Einsatz einer Butyl-Sepharose Säule für Hydrophobe Interaktionschromatographie (1,2 M Ammoniumsulfat und pH 6,8); 4: Ergebnis der Isolierung nach Einsatz einer MonoQ-Säule bei pH 6,8.

3.8.2 Untersuchung der Substrathydrolyse von Humanin durch PEP

In dieser Arbeit wurde das aus 24 Aminosäuren bestehende Peptid Humanin (HN) als potentielles physiologisches Substrat der PEP untersucht. HN weist in der Aminosäuresequenz zwei Prolinreste auf, die mögliche Hydrolysestellen für die Prolin spezifische Serinprotease PEP darstellen (Abb. 3.18, siehe Abschnitt 1.2.2).

Innerhalb der letzten drei Jahre wurde HN als „Rettungsfaktor“ bei Bax (Bcl-2-assoziiertes X protein) oder IGFBP-3 (*Insulin Growth Factor Binding Protein-3*) induziertem Zelltod

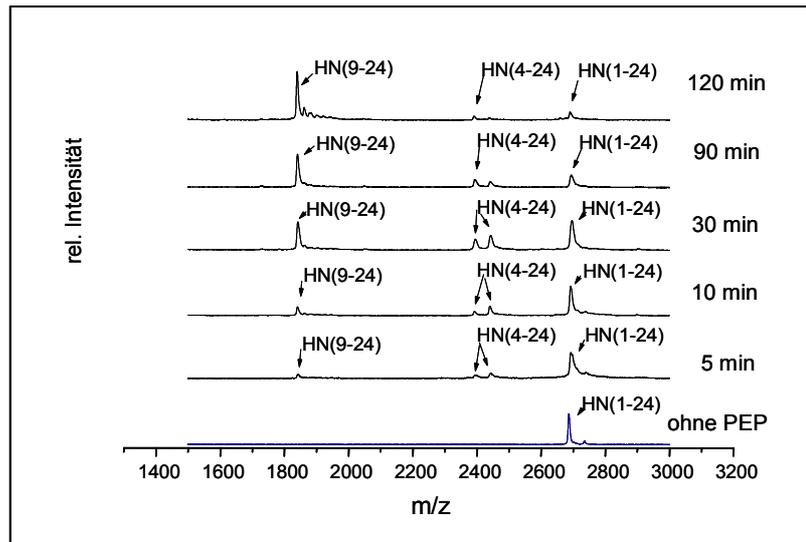


Abb. 3.19: MALDI-TOF-Massenspektrum von HN(1-24) nach Inkubation mit rhPEP bei 37°C und pH 7,6 (spezifische Aktivität gegenüber $4 \cdot 10^{-4}$ M Gly-Pro-pNA = 0,02 U). In der untersten Zeile ist das Ergebnis ohne Enzym nach 120 Minuten Inkubation zu sehen. Die Peakverteilung der Proben, entnommen nach 5, 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten, ist darüber dargestellt. Die Masse $m/z = [M + H]^+ = 2686$ Da entspricht HN(1-24), Masse $m/z = [M + H]^+ = 2387$ Da entspricht HN(4-24) und Masse $m/z = [M + H]^+ = 1837$ Da entspricht HN(9-24). Masse $m/z = [M + H]^+ = 2435$ Da entspricht einem Oxidationspeak von Cystein mit +48 Da zu $m/z = [M + H]^+ = 2387$ Da.

Der Substratpeak mit der Masse $m/z = [M + H]^+ = 2686$ Da blieb ohne PEP im Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 120 Minuten intakt (Abb. 3.19). Mit Enzym ergab sich ein zeitabhängiger Abbau von HN(1-24). Über die Zeit konnte eine deutliche Verringerung der Peakhöhe des Substrates festgestellt werden, wobei zeitgleich ein Abbauprodukt mit der Masse $m/z = [M + H]^+ = 2387$ Da entstand. Diese Masse entsprach der Aminosäuresequenz HN(4-24), die durch eine post-Prolin(3) Freisetzung von drei Aminosäuren am N-Terminus von HN entstand. Der Massepeak von 2387 Da nahm nach ca. 30 Minuten ab und nur ein Produkt von $m/z = [M + H]^+ = 1837$ Da konnte am Ende der Messungen nachgewiesen werden. Diese Masse entsprach HN(9-24) und stellte das Hydrolyseprodukt der Peptidbindung nach Cystein in Position acht dar. Das Produkt einer PEP-spezifischen post-Prolin(19) Peptidhydrolyse konnte nicht nachgewiesen werden.

In den Abbildungen 3.19-3.21 ist ein gleichzeitig mit HN(4-24) auftretender Massepeak von +48 Da mit $m/z = [M + H]^+ = 2435$ Da zu erkennen. Ein zweiter Peak mit der Masse von +48 Da wurde auch für das Substrat HN(1-24) gemessen ($m/z = [M + H]^+ = 2734$ Da). Die Peaks mit einer Masse von +48 Da wurden in Abhängigkeit von Cystein in der Peptidkette gefunden. Dieses Phänomen wurde von Sedo *et al.* mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie am Beispiel von HN untersucht (Sedo *et al.*, 2004). In Abhängigkeit von Cystein im Peptid wurde nach Oxidation von Cystein zu Sulfonsäure eine zusätzliche Masse von +48 Da für HN ermittelt.

Die post-Cystein spezifische Hydrolyse von HN durch PEP konnte auch unabhängig von der Spaltung nach Prolin(3) gezeigt werden. Dazu wurde HN(4-24) als Substrat eingesetzt. In Abhängigkeit von der Zeit entstand ein Massepeak von $m/z = [M + H]^+ = 1837$ Da, der mit dem Spaltprodukt HN(9-24) übereinstimmt. Die Umsetzung von HN(4-24) durch PEP konnte durch

Enzym-spezifische Inhibitoren gehemmt werden. Eine post-Cystein Hydrolyse durch PEP ist bis heute nicht beschrieben und sollte im Folgenden näher charakterisiert werden.

Serin554 der katalytischen Triade von PEP wurde gegen Alanin mittels Mutagenese-PCR variiert (siehe Abschnitt 2.1.3). Mit Hilfe der Enzymvariante wurde untersucht, ob die post-Cystein Hydrolyse durch die katalytische Triade (S554, H680, D641) der PEP vermittelt wird. Humane-S554A-PEP war inaktiv gegenüber dem PEP-Substrat Gly-Pro-Pro-AMC. Nach 90 Minuten Inkubation der humanen-S554A-PEP mit HN konnten keine Katalyseprodukte im Massenspektrum detektiert werden (Abb. 3.20). Es war außerdem möglich, die Hydrolyse von HN durch Wildtyp-PEP mit verschiedenen Enzym spezifischen Peptidinhibitoren vollständig zu hemmen (Abb. 3.20). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Prozessierung von HN durch die katalytische Triade der PEP vermittelt wird.

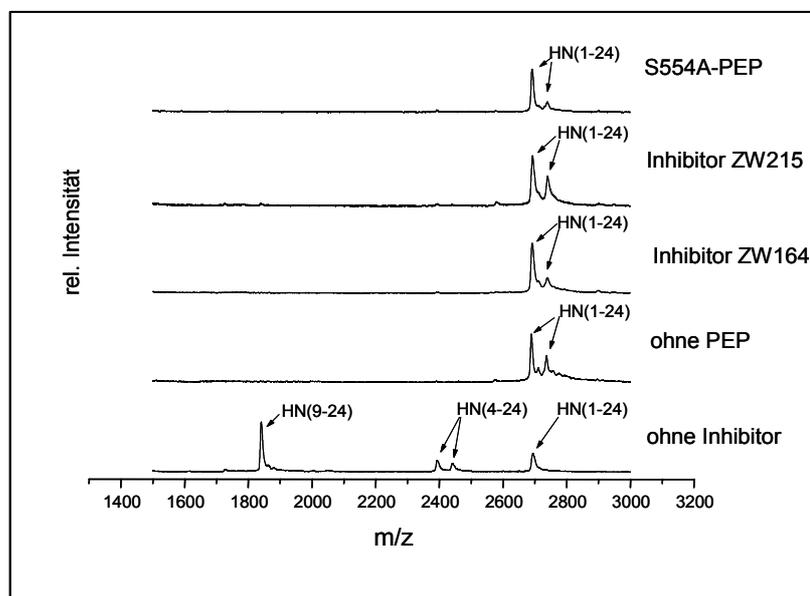


Abb. 3.20: MALDI-TOF-Massenspektrum nach 90 Minuten Inkubation von HN(1-24) mit humaner S554A-PEP und humaner PEP-Wildtyp (spezifische Aktivität gegenüber $4 \cdot 10^{-4}$ M Gly-Pro-pNA = 0,02 U) ohne und mit Inhibitor ZW215 (unveröffentlichter Vertreter einer Klasse von PEP-Inhibitoren) oder ZW164 (Fmoc-Ala-Pyrr-CN). HN(1-24) und PEP wurden bei 37°C und pH 7,6 inkubiert. Als Kontrolle wurde HN(1-24) ohne PEP parallel über 90 Minuten inkubiert und vermessen.

Der Aminosäureaustausch im Peptide HN von Cystein in Position acht gegen Prolin, Alanin oder Glycin führte zu dem gleichen in Abbildung 3.19 gezeigten Spaltungsmuster durch PEP [Spaltungsprodukte HN(4-24) und HN(9-24)]. HN mit Phenylalanin an Position acht (C8F-HN) wurde hingegen nicht durch PEP in dieser Position gespalten. P3V-HN wurde nach gleichem Muster wie P3V/C8A-HN zu HN(9-24) prozessiert. P3V/C8F-HN blieb nach 90 Minuten Inkubation mit PEP intakt (Tab. 3.24). Damit konnte gezeigt werden, dass PEP beide Hydrolysestellen unabhängig von einander erkennt und HN spezifisch nach der C-terminalen Peptidbindung von Cystein, Prolin, Alain und Glycin hydrolysiert. Hingegen wurde nach den Aminosäuren Phenylalanin und Valin an Position drei bzw. acht von HN keine PEP vermittelte Hydrolyse gefunden.

Die Kettenlänge von HN wurde im Folgenden verkürzt, um ein mögliches Erkennungsmotiv für die Spaltung nach Cystein zu finden. Eine Cystein-spezifische Hydrolyse des HN-Peptids konnte nur für HN(4-19) gefunden werden, HN(4-13) und HN(4-9) wurden nicht gespalten. Damit ergab sich die für die Interaktion mit Bax essentielle Kernregion von HN als Motiv zur Substraterkennung des Peptids durch PEP (Tab. 3.24).

Tab. 3.24: Darstellung der Lage und Anzahl der detektierten Spaltstellen bei Inkubation von HN-Varianten mit humaner-PEP (spezifische Aktivität gegenüber $4 \cdot 10^{-4}$ M Gly-Pro-pNA = 0,02 U) bei 37°C und pH 7,6. Pfeile kennzeichnen Hydrolysestellen. Hervorgehobene Aminosäuren wurden gegenüber dem Wildtyp-HN [HN(1-24)] variiert.

Variante	Sequenz	Spaltung
HN(1-24)	MAP↓RGFSC↓LLLLLTSEIDL PVKRRRA	++
HN(4-24)	RGFSC↓LLLLLTSEIDL PVKRRRA	+
HN(9-24)	LLLLLTSEIDL PVKRRRA	-
C8P-HN	MAP↓RGFSP↓LLLLLTSEIDL PVKRRRA	++
C8A-HN	MAP↓RGFSA↓LLLLLTSEIDL PVKRRRA	++
C8GHN	MAP↓RGFSG↓LLLLLTSEIDL PVKRRRA	++
C8F-HN	MAP↓RGFSF LLLLLTSEIDL PVKRRRA	+
P3V-HN	MAV RGFSC↓LLLLLTSEIDL PVKRRRA	+
P3V/C8A-HN	MAV RGFSA↓LLLLLTSEIDL PVKRRRA	+
P3V/C8F-HN	MAV RGFSE LLLLLTSEIDL PVKRRRA	-
HN(4-19)	RGFSC↓LLLLLTSEIDL P	+
HN(4-13)	RGFSC LLLLLT	-
HN(4-9)	RGFSC L	-

Außer dem humanen Enzym ist auch bakterielle-PEP in der Lage, HN als Substrat umzusetzen. HN wurde durch PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* nach Prolin(3) und Cystein(8) hydrolysiert. Die Hydrolyse von HN konnte durch PEP-spezifische Inhibitoren (ZW164 und ZW215, siehe Tab. 1 im Anhang) gehemmt werden.

Neben den *in vitro* Versuchen konnte die Inaktivierung von HN auch mittels löslichem Zellextrakt, welcher von der humanen Gliazelllinie U343 gewonnen wurde (siehe Abschnitt 2.2.24) nachgewiesen werden (spezifische Aktivität gegenüber $4 \cdot 10^{-4}$ M Gly-Pro-pNA = 0,01 U) (Abb. 3.21 und siehe Abschnitt 2.2.23). Nach 60 Minuten Inkubation von HN mit Zellextrakt zeigte sich im MALDI-TOF-Massenspektrum das gleiche Produktmuster im Vergleich mit den vorher gezeigten Untersuchungen (Abb. 3.19 und Abb. 3.21). AEBSF, ein Serinprotease-, und ZW164, ein spezifischer PEP-Inhibitor, konnten die Prozessierung von HN hemmen. Im Gegensatz dazu konnten Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor), E64 (Cysteinprotease-inhibitor), EDTA (Metalloproteaseinhibitor) oder Leupeptin (Trypsin- und allgemeiner Cysteinproteaseinhibitor) die Hydrolyse des Peptids nicht verhindern.

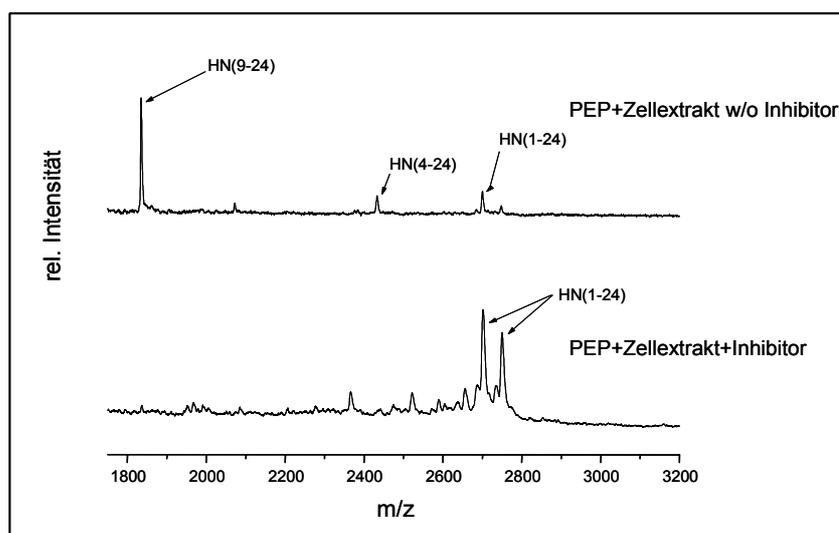


Abb. 3.21: MALDI-TOF-Massenspektrum von HN(1-24) nach 60 Minuten Inkubation mit Zellextrakt von humanen Gliazelllinie U343 (spezifische Aktivität gegenüber $4 \cdot 10^{-4}$ M Gly-Pro-pNA = 0,01 U) mit und ohne PEP-spezifischen Inhibitor (ZW164). HN(1-24) wurde bei 37°C inkubiert.

3.8.3 Post-Cystein spezifische Prozessierung durch DP IV

Die räumliche Anordnung des katalytischen Zentrums, insbesondere der hydrophoben P₁-Bindungstasche, ist für PEP und DP IV vergleichbar. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass DP IV, wie auch PEP in der Lage ist, am Carboxy-Terminus von Cystein Peptide zu hydrolysieren. Dazu ist es im Gegensatz zu der Endopeptidase PEP notwendig, dass sich Cystein in zweiter Position am N-Terminus des Peptids befindet, um von der Exopeptidase DP IV erkannt zu werden. Nach Austausch von Alanin gegen Cystein in zweiter Position des Substrates GIP konnte eine DP IV spezifische Hydrolyse von A2C-GIP gezeigt werden (Abb. 3.22). A2C-GIP wurde ($k_{\text{obs}} = 0,019 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$) im Vergleich mit GIP mit Alanin in zweiter Position ($k_{\text{obs}} = 0,01 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$) durch rhDP IV schneller umgesetzt. Die Hydrolyse von A2C-GIP und Wildtyp-GIP konnte mit dem DP IV spezifischen Inhibitor P32/98 gehemmt werden.

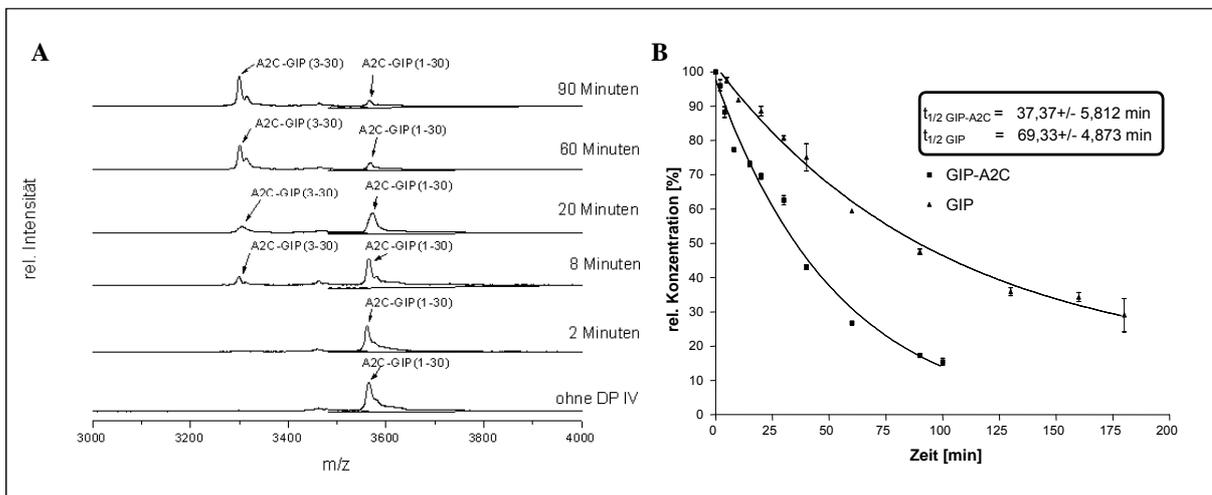


Abb. 3.22: A) MALDI-TOF-Massenspektrum aufgenommen von Proben die nach verschiedenen Zeitpunkten aus dem Inkubationsansatz von A2C-GIP mit rhDP IV entnommen wurden (Inkubationsansatz: T = 37°C; Substratkonzentration 25 μM ; 100 mM Tris-HCl, pH 7,6). Als Kontrolle wurde A2C-GIP über 90 Minuten bei gleichen Bedingungen aber ohne Enzym inkubiert. B) Progressionskurve für die Hydrolyse von GIP(1-30) und A2C-GIP(1-30) bei Inkubation mit je 40 mU/ml (entspricht der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma) rhDP IV. Aus dem Inkubationsansatz mit Peptid und Enzym wurden nach festgelegten Zeitpunkten Proben entnommen und die relativen Verhältnisse von Substrat [GIP(1-30) oder A2C-GIP(1-30)] und Produkt [GIP(3-30) oder A2C-GIP(3-30)] über MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt. Daraus konnte dann das Verhältnis von intaktem zu prozessiertem Peptid bestimmt und mittels nicht linearer Regressionsanalyse die Halbwertszeiten für den Umsatz des Peptids ermittelt werden.

4 Diskussion

4.1 Expression, Isolierung und Charakterisierung der rhDP IV

Die Serinprotease Dipeptidylpeptidase IV (EC 3.4.14.5) ist in viele physiologische Prozesse involviert, z.B. der Zellaktivierung, im Immunsystem oder im Stoffwechsel dort insbesondere in die Regulierung des Blutzuckerspiegels. Durch ihre enzymatische Wirkung beeinflusst die DP IV die physiologische Funktion vieler Chemokine, Neuropeptide und Peptidhormone (Boonacker und Van Noorden, 2003; Lambeir *et al.*, 2003). Die Firma probiodrug AG entwickelt Effektoren zur spezifischen Kontrolle der proteolytischen Aktivität der DP IV, um damit in pathophysiologische Prozesse eingreifen zu können. Die in dieser Arbeit etablierte Expression und Isolierung der humanen DP IV ist eine Voraussetzung zur Charakterisierung von Effektoren und zur Untersuchung von Struktur- und Funktionsbeziehungen des Enzyms. DP IV wird bisher aus Geweben, Organen und aus dem Serum über zahlreiche Reinigungsschritte isoliert (Fukasawa *et al.*, 1981). Bis zum Beginn dieser Arbeit, wurde die Expression der rekombinanten DP IV nur im analytischen Maßstab in Säugerzelllinien beschrieben (Darmoul *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 1997).

4.1.1 Expression der löslichen Δ 1-36 rhDP IV mit His-Tag

Für die Expression der humanen DP IV wurden, in vorangehenden Experimenten zu dieser Arbeit, zwei verschiedene Expressionskonstrukte (intrazelluläre und sekretorische Expression) in COS-7 Säugerzellen untersucht. Die Expression der DP IV konnte in beiden Fällen über Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden, das Enzym war aber nur bei sekretorischer Expression proteolytisch aktiv (Bär *et al.*, 2003b). Dies lässt darauf schließen, dass post-translationale Modifikationen des Enzyms (wie Glykosylierungen) für die Aktivität, die Faltung und die Stabilität des Enzyms notwendig sind.

Aufgrund der geringen exprimierten Proteinmengen in humanen Zelllinien wurde in dieser Arbeit zur Expression der humanen DP IV die Hefe *P. pastoris* gewählt (siehe Abschnitt 3.2). Dieses eukaryontische Expressionssystem erlaubt die Produktion großer Mengen rekombinanten Proteins im Labormaßstab. Zudem ermöglicht dieses System einfache genetische Manipulation und post-translationale Modifikationen wie Glykosylierung, die Nutzung eines starken induzierbaren Promotors, die Möglichkeit zur Fermentation und die kostengünstige Expression von Selenomethionin-Proteinen zur Phasenbestimmung bei Röntgenkristalluntersuchungen (Cregg *et al.*, 1993; Dobers *et al.*, 2002; Larsson *et al.*, 2002; Romanos *et al.*, 1992).

In *Mammalia* wird DP IV als Typ II Transmembranprotein exprimiert. Neben dieser membranständigen Form existiert im Serum eine lösliche Form mit verkürztem N-Terminus (Δ 1-36). Der intrazellulärer Anteil und die Transmembranregion des Enzyms sind bei der löslichen Form nicht vorhanden (Ogata *et al.*, 1989; Yaron und Naider, 1993; Vanhoof *et al.*, 1992). Beide Formen der DP IV sind vergleichbar in Bezug auf ihre enzymologischen

Eigenschaften und der Bindung von Interaktionspartnern (De Meester *et al.*, 1999; Dobers *et al.*, 2002; Ogata *et al.*, 1989; Yaron und Naider, 1993).

Zur Etablierung einer effizienten Expression der DP IV wurde die lösliche Form (Δ 1-36 rhDP IV) in einen sekretorischen *P. pastoris*-Vektor (pPICZ α C) kloniert (siehe Abb. 2 im Anhang). Ein His-Tag, bestehend aus 6 Histidinresten, wurde an den N-Terminus der Δ 1-36 rhDP IV fusioniert, um eine effektive Isolierung und Detektion mittels Western-Blot zu ermöglichen (siehe Abschnitte 3.1 und 2.2.13). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *P. pastoris* rhDP IV aktiv und in löslicher Form sekretiert (siehe Abschnitt 3.2.2). Dies macht deutlich, dass sowohl der intrazelluläre Teil, wie auch der Transmembranteil der DP IV nicht essentiell für eine korrekte Faltung des Enzyms in *P. pastoris* sind. Im Gegensatz zu Dobers *et al.*, die eine ungekürzte aktive DP IV exprimierten, konnte bei der Isolierung der löslichen N-terminal His₆-fusionierten Form kein Aktivitätsverlust während der Isolierung des Enzyms mittels Metallchelatchromatographie festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.2.3) (Dobers *et al.*, 2002). Verschiedene Konstrukte der rhDP IV mit C-terminalem, C- und N-terminalem oder ohne His-Tag, konnten während dieser Arbeit in löslicher, stabiler und aktiver Form exprimiert werden (siehe Abschnitt 3.2.1). Alle DP IV-Varianten, abgesehen von der DP IV ohne Tag konnten über Metallchelatchromatographie isoliert werden und wiesen keine Unterschiede bezüglich der spezifischen Aktivität auf (siehe Tab. 3.1). Somit sind möglicherweise die von Dobers *et al.* gefundenen Aktivitätsverluste auf Interaktionen des hydrophoben Transmembranankers mit der Säule oder anderen Oberflächen zurückzuführen (Dobers *et al.*, 2002).

Der His-Tag am N-Terminus der rhDP IV sollte beim Vergleich mit ssDP IV (durch proteolytischen Zellaufschluss N-terminal verkürzt ssDP IV = 38-766) keinen Einfluss auf die Bindungs- und Katalysefunktion des Enzyms haben. Anhand der Kristallstrukturen der rh- und ssDP IV wird deutlich, dass sich der N-Terminus und damit der His-Tag des rekombinanten Enzyms nicht in räumlicher Nähe vom katalytischen Zentrum, den möglichen Substrateintrittsstellen („Seitenöffnung“/Propellerpore), der ADA Bindungsstelle und der Dimerisierungsregion der DP IV befindet (siehe Abschnitt 1.1.2 und Abb. 3.5) (Engel *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2004; Rasmusen *et al.*, 2003; Weihofen *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit konnte die Fermentation mit *P. pastoris* optimiert werden (siehe Abschnitt 3.2.4). Bioreaktoren werden standardmäßig mit drei Rushton Turbinen (6-Blatt Scheibenrührern) ausgestattet. Optimale Wachstumsraten der Hefen werden erst durch die zusätzliche Zufuhr von Sauerstoff erzielt. Durch den Austausch dieser Rührer gegen Rührer mit niedrigeren Energiezahlen war es möglich, ohne zusätzlichen Sauerstoffeintrag und somit mit geringerem technischen Aufwand die Fermentation durchzuführen (Jenzsch *et al.*, 2004).

Das Enzym konnte nach der Fermentation im 2 oder 5-10 Liter Maßstab in zwei Chromatographieschritten isoliert werden (siehe Abschnitt 3.2.3 und 3.2.4). Dabei wurden 0,8-3 mg homologes Enzym pro Liter Fermentationsmedium aus der Expression mit *P. pastoris* isoliert (Bär *et al.*, 2003a). Das Ergebnis für die Expression im

Fermentationsmaßstab war vergleichbar mit den von Dobers *et al.* beschriebenen Mengen, die bei Expression in Insektenzellen erzielt wurden (2 mg/l) (Dobers *et al.*, 2002).

4.1.2 Biochemische Charakterisierung der rhDP IV

DP IV aus verschiedenen Spezies weisen Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf und stellen damit natürliche Varianten des Enzyms dar (siehe Abb. 3.5). Der Vergleich dieser Varianten kann hilfreich sein, um die Rolle von bestimmten Aminosäuren zu charakterisieren. Rekombinante humane DP IV wurde mit dem nativen aus Schweineniere isolierten Enzym in den biochemischen, physikalischen und kinetischen Eigenschaften untersucht und verglichen (siehe Abschnitt 3.3). Für die bessere Interpretation der Ergebnisse wurde das bisher unbekannte Gen für DP IV aus Schwein sequenziert. Die Aminosäuresequenzen des humanen- und ss-Proteins wiesen 91,9 % Homologie und 87,5 % Identität auf (siehe Abschnitt 3.3.1).

Neun bzw. zehn potentielle N-Glykosylierungsstellen ergaben sich aus der Aminosäuresequenz für humane- und ssDP IV (siehe Abb. 3.5). Das Molekulargewicht für ein rhDP IV Monomer (Δ 1-36 mit His-Tag) wurde aus der Primärsequenz mit 84,5 kDa berechnet, über MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden 103,6 kDa experimentell ermittelt (siehe Abb. 3.6). Dieser Unterschied ist, entsprechend Literaturangaben, vor allem auf post-translationalen Modifikationen, hauptsächlich Glykosylierung, zurückzuführen (Fan *et al.*, 1997; Fukasawa *et al.*, 1981; Kähne *et al.*, 1996). Ein höheres Molekulargewicht und eine breitere Verteilung der Isomere, analysiert mittels isoelektrischer Fokussierung, deuten auf eine stärkere und heterogenere Glykosylierung des rekombinanten Enzyms im Vergleich zu dem nativen Protein (Schwein) hin (siehe Abschnitt 3.3.3 und Abb. 3.8).

Beim Vergleich der kürzlich erschienenen Röntgenkristallstruktur nativer DP IV (Schwein) mit in Insekten- oder Hefezellen exprimierter humaner DP IV zeigten sich größere Heterogenitäten im Glykosylierungsmuster bei dem humanen Enzym (Engel *et al.*, 2003; Hiramatsu *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass nur einige der potentiellen N-Glykosylierungsstellen modifiziert waren, hierbei konnte für ssDP IV fünf von zehn und bei der rhDP IV zwischen zwei und sieben nachgewiesen werden.

Es bestehen Unterschiede im Glykosylierungsmuster sowie im Aufbau und der Zusammensetzung der Oligosaccharidketten in Abhängigkeit vom Organismus in dem DP IV exprimiert wurde (Cregg *et al.*, 1993). Dies könnte auch die in dieser Arbeit beschriebenen Abweichungen bezüglich der Anzahl und Breite der Isoformen nach isoelektrischer Fokussierung erklären (siehe Abb. 3.8).

Anhand des Aminosäuresequenzvergleiches der DP IV aus verschiedenen Organismen wie Mensch, Ratte, Schwein und Maus zeigte sich, dass die Glykosylierungsstellen N85, N92, N150, N219, N229, N321 und N685 hoch konserviert sind (Nummerierung anhand der humanen Sequenz) (siehe Abb. 3.5). Die hohe Konservierung der Glykosylierungsstellen gibt einen Hinweis auf deren mögliche Bedeutung für die Faltung, Transport oder Stabilisierung des Enzyms. Im Unterschied zu der Glykosylierungsstelle N281 des humanen Enzyms

befindet sich die potentielle Sialisierungsstelle für ssDP IV an Aminosäureposition N279. Bei den Aminosäuresequenzen der DP IV in Nagetiere konnte keine potentielle Glykosylierungsstelle gefunden werden. Engel *et al.*, beschrieben, dass die Glykosylierung von N279 für die Tetramerisierung der ssDP IV notwendig ist (Engel *et al.*, 2003). Lambeir *et al.* zeigten, dass native DP IV-Aggregate mit hohem Molekulargewicht bei der Isolierung mittels Größenausschlusschromatographie bildet (Lambeir *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit kein Hinweis auf solche Aggregationen von rhDP IV unter den gewählten Bedingungen für die Größenausschlusschromatographie gefunden werden (siehe Abb. 3.7).

4.1.3 Kinetische Charakterisierung der rhDP IV

Die Firma probiodrug AG entwickelt pharmakologische Wirkstoffe (wie Inhibitoren) zur therapeutischen Behandlung von z.B. Typ 2 Diabetes-Patienten. Bisher wurden Inhibitoren anhand der nativen DP IV isoliert aus Schwein, charakterisiert. Zukünftig sollen kinetische Untersuchungen mit humanem Enzym durchgeführt werden.

Für die ermittelten K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m und K_i -Werte mit niedermolekularen Substraten bzw. Inhibitoren zeigte sich, dass die kinetischen Konstanten für ss- und rhDP IV vergleichbar sind (siehe Tab. 3.3). Weiterhin bestätigten die in dieser Arbeit ermittelten Konstanten Literaturergebnisse für native DP IV, isoliert aus humanem Plasma. So wurde von Jiang *et al.* für die kompetitive Inhibierung mit P32/98 ein K_i von 120 nM (93 nM in dieser Arbeit) und für die Inhibierung des Enzyms mit P59/99 ein K_i von 1,1-22,0 nM beschrieben (3,8 nM in dieser Arbeit) (siehe Tab. 3.3) (Jiang *et al.*, 1997). Neben der hohen Übereinstimmung der kinetischen Ergebnisse der ss- und rhDP IV ermittelt mit Effektoren und Substraten mit geringem Molekulargewicht zeigte sich, dass die Aminosäuren im katalytischen Zentrum hoch konserviert sind (Aminosäureidentität von 97 % für beide DP IV-Enzyme) (Abb. 4.1) (Bär *et al.*, 2003b).

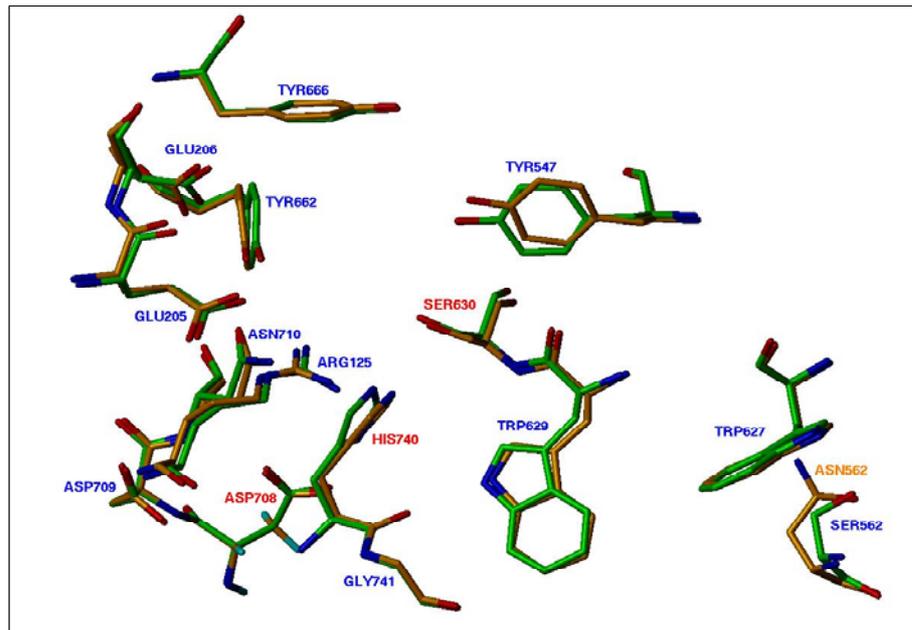


Abb. 4.1: Vergleich der Lage von Aminosäuren im aktiven Zentrum von humaner- [orange („PBD“-Datenbankeintrag: 1N1M) (Rasmussen *et al.*, 2003)] und ssDP IV [grün („PBD“-Datenbankeintrag: 1ORV) (Engel *et al.*, 2003)]. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind im Vergleich zueinander in ihrer räumlichen Anordnung dargestellt. Für die Kalkulation des RMS-(quadratischer Mittelwert) Wertes wurden die Aminosäuren der humanen DP IV als Zielmolekül genutzt. Nacheinander wurden die Aminosäuren (mit Wasserstoffbrücken) des nativen Enzyms (Schwein) auf das zugehörige Atom des Zielmoleküls übertragen. Dabei wurde eine Übereinstimmung in Form eines RMS-Wertes von 0,34 Å gefunden. Dieser Wert liegt im Bereich der Standardabweichung bei Bestimmung von Kristallstrukturen. Die katalytische Triade ist in rot beschriftet (Bär *et al.*, 2003b).

Im Gegensatz zu den kurzen Substraten und Inhibitoren konnten für natürliche Substrate (bestehend aus 20-100 Aminosäuren) wie GLP-1, Unterschiede in der Kinetik zwischen dem humanen- und dem aus Schwein isolierten Enzym festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.3.5). GLP-1 vom Schwein oder Mensch unterscheidet sich nicht in der Peptidsequenz. Die Propellerdomäne, durch die Substrate möglicherweise das katalytische Zentrum erreichen können (Engel *et al.*, 2003; Hiramatsu *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003), weist hingegen eine geringere Übereinstimmung zwischen dem Enzym aus Schwein und Mensch auf (85 %) (siehe Abb. 1.1 und Abb. 3.5). Die Ursache für die unterschiedliche Substratbindung könnten weitere „sekundäre“ Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat an Orten außerhalb des katalytischen Zentrums sein.

Die Interaktion zwischen ADA und DP IV wurde intensiv untersucht und mittels Röntgenkristallstrukturanalyse durch Co-Kristallisation von ADA und humaner DP IV beschrieben (Weihofen *et al.*, 2004). Hierbei sind Unterschiede für die Bindung von ADA und DP IV bei den verschiedenen Spezies nachgewiesen worden. Die Interaktion zwischen DP IV und ADA konnte in mehreren Organismen wie Mensch, Hase und Rind nicht aber für Ratte und Maus gezeigt werden (Dong *et al.*, 1997; De Meester *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde eine stärkere Bindung der humanen DP IV zu ADA gegenüber der Interaktion der ssDP IV zu ADA gemessen (siehe Abschnitt 3.3.5). In der Literatur ist die Protein-Protein Kopplung von ADA mit dem vierten und fünften Propellerblatt der DP IV (Aminosäuren 282-295 und 322-350) vorrangig an den hydrophoben Aminosäuren L294 und V341 beschrieben (siehe Abschnitt

1.1.4) (Ludwig *et al.*, 2004). Die Sequenz des Enzyms vom Schwein weist gegenüber humaner DP IV einen Aminosäureaustausch in den Positionen 338-340 auf (siehe Abb. 3.5). Diese Region überlappt mit der ADA-Bindungsregion und führt zu einer Änderung in der Hydrophobizität in diesem Bereich (Abb. 4.2). Der Austausch von C339 human zu S339 Schwein (siehe Abb. 3.5) führt dazu, dass nur bei dem humanen Enzym eine Cysteinbrücke ausgebildet wird, die wahrscheinlich nicht für die Stabilität des Enzyms wichtig ist, aber zur Stabilisierung der ADA-Bindungsregion beitragen könnte.

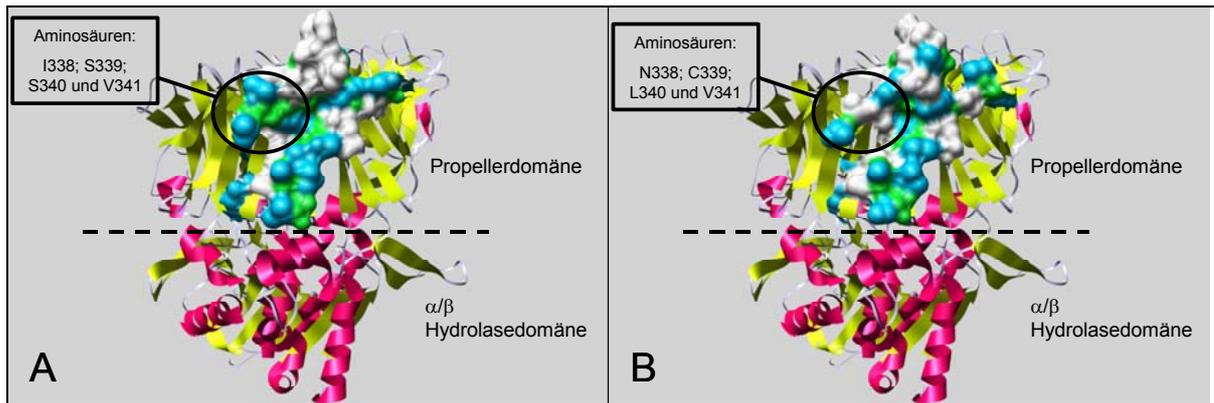


Abb. 4.2: Schematische Darstellung und Vergleich der Oberflächenregionen (Aminosäuren 282-295 und 322-350) von humaner- (A) und Schweine-DP IV (B) die nach Ludwig *et al.* mit ADA interagieren (Zeichnung erstellt anhand der Kristallstrukturen aus der „PBD“-Datenbank: 1N1M bzw. 1ORF) (Ludwig *et al.*, 2004). Blaue Oberflächen bezeichnen hydrophobe Aminosäureseitenketten und grüne hydrophobe Bereiche des Peptidrückgrats, die zu der über hydrophobe Bindungen vermittelten Interaktion beitragen. Hervorgehoben sind Aminosäuren die durch die Variation in beiden Spezies einen besonderen Einfluss auf die Bindung zwischen beiden Proteinen haben könnten.

4.1.4 Prozessierung des Pancreatic Polypeptids und Exendin-3 durch DP IV *in vitro*

Das Pancreatic Polypeptid ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes sekretorisches Peptid, welches hauptsächlich in der Pankreas produziert wird (Henderson und Rinker, 1999). Die genaue physiologische Funktion von PP ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt (Henderson und Rinker, 1999; Pasioka und Hershfield, 1999). PP scheint aber eine ähnliche Rolle im Metabolismus zu spielen wie die anderen Peptide der Pancreatic Polypeptid Familie. Es konnte gezeigt werden, dass das Peptid die Sekretion von Enzymen aus der Pankreas und die Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten beeinflusst (Henderson und Rinker, 1999). Die Konzentration von PP im Serum steigt bei Nahrungsaufnahme an und beschleunigt die Darmentleerung (Henderson und Rinker, 1999; Pasioka und Hershfield, 1999). Ebenso konnten nach längerem Fasten oder körperlicher Betätigung erhöhte PP-Konzentrationen festgestellt werden (Pasioka und Hershfield, 1999). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie mit den DP IV-Substraten der Pancreatic Polypeptid Familie und der Anwesenheit von Prolin in P₁-Position von PP kann eine Spaltung durch DP IV angenommen werden (siehe Abschnitt 3.4 und Abb. 4.3). Aufgrund von früheren Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass PP resistent gegen den proteolytischen Abbau durch DP IV ist (Mentlein *et al.*, 1993). Dies konnte in dieser Arbeit widerlegt werden. Die ermittelten Hydrolysegeschwindigkeiten von PP ($0,016 \pm 0,0005 \text{ min}^{-1}$) sind mit denen für den von

PACAP38 ($0,017 \pm 0,0003 \text{ min}^{-1}$) vergleichbar (gemessen mit einer im Blutplasma vergleichbaren DP IV-Aktivität = 40 mU/ml) (siehe Abb. 3.13).

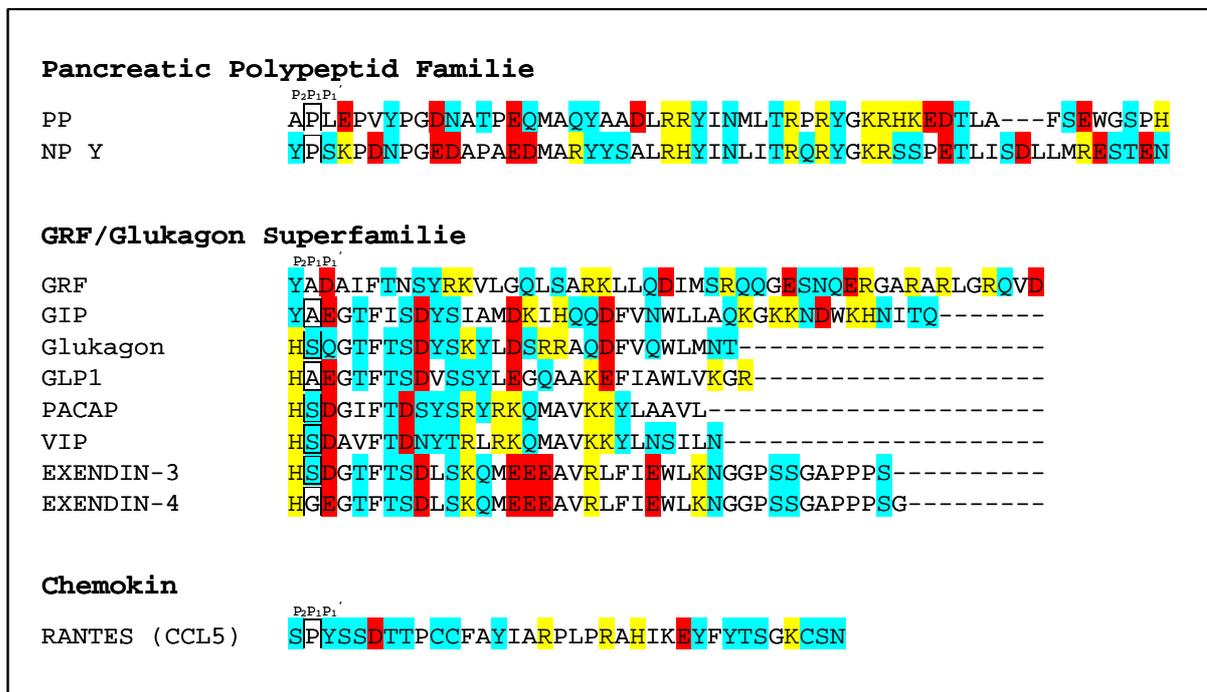


Abb. 4.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von DP IV-Peptidsubstraten anhand der Eigenschaften der Aminosäureseitenketten. Gezeigt sind Peptidsubstrate, die in dieser Arbeit in Bezug auf die Hydrolyse von DP IV charakterisiert wurden. Mit einem Kasten ist jeweils die in P₁-Position befindliche Aminosäure dargestellt. Farblich gekennzeichnet sind:

S, T, N, Q, Y, C: Aminosäuren mit ungeladener polarer Seitenkette
 H, R, K: Aminosäuren mit basischer, polarer Seitenkette
 E, D: Aminosäuren mit saurer, polarer Seitenkette
 G, A, V, L, I, M, P, F, W: Aminosäuren mit unpolare Seitenkette

Exendin-3 ist ein Mitglied der GRF/Glukagon-Peptidfamilie (Abb. 4.3) und wurde zuerst aus dem Gift der Skorpionskrustenechse *Heloderma horridum* isoliert. In geringen Konzentrationen bindet Exendin-3 an einen potentiellen, bisher nicht identifizierten Exendin-Rezeptor, wodurch es zu einem Anstieg der cAMP-Konzentrationen in den Acinuszellen des Pankreas kommt. Bei höheren Exendin-3 Konzentrationen bindet das Peptid an den VIP-Rezeptor und stimuliert einen weiteren zellulären Anstieg von cAMP und gleichzeitig die Freisetzung des Verdauungsenzyms Amylase (Raufman *et al.*, 1991).

Exendin-3 weist hohe Homologie mit den anderen Peptiden der GRF/Glukagon-Familie auf (Glukagon = 48 %, GLP-1 = 50 % homolog) und enthält Serin als zweite N-terminale Aminosäure, wodurch es zu einem potentiellen Substrat der DP IV wird (Abb. 4.3, siehe Tab. 1.1). In dieser Arbeit konnte erst bei hohen Enzymkonzentrationen eine sehr langsame Hydrolyse von Exendin-3 durch DP IV nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11).

Das zu Exendin-3 hoch homologe Exendin-4 (Abb. 4.3) und gegenüber DP IV-Hydrolyse resistente Peptidanaloga von GIP und GLP-1 wird zur Zeit in einer Reihe von klinischen Studien als potentielle Kandidaten zur Behandlung von Typ 2 Diabetes-Patienten untersucht, da diese Peptide an der Regulation der Insulinausschüttung und damit des Blutzuckerspiegels im Körper beteiligt sind (siehe Abschnitt 1.1.4) (Burcelin *et al.*, 1999; Drucker *et al.*, 1997;

Drucker *et al.*, 1999; Drucker, 2001; Drucker, 2002; Hinke *et al.*, 2004). Die Eigenschaften, welche die hohe Abbaustabilität von Exendin-3 gegenüber DP IV bedingen, sollen in weiteren Studien untersucht werden. Möglicherweise können so identifizierte Aminosäuresequenzen oder Tertiärstrukturelemente als Grundlage für DP IV-resistente Analoga der GRF/Glukagon-Peptidfamilie dienen.

4.2 „Sekundäre“ Wechselwirkungen zwischen DP IV und Peptidhormonen

DP IV ist an der Prozessierung und damit der Aktivierung oder Deaktivierung einer Vielfalt von Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Neuropeptiden und Zytokinen beteiligt. Bisher wird durch die Hemmung der Enzymfunktion (bei therapeutischen Ansätzen) mit niedermolekularen, im aktiven Zentrum bindenden Inhibitoren in alle durch DP IV-Katalyse vermittelten Prozesse eingegriffen. Ziel einer gerichteten und nebenwirkungsarmen Therapie ist es, durch selektive Inhibierung, nur einzelne Prozesse zu beeinflussen.

Der Vergleich der katalytischen Parameter nieder- und höhermolekulare Verbindungen als Substrate der DP IV macht sichtbar, dass die Kettenlänge von Substraten eine Bedeutung für die katalytische Effizienz des Enzyms hat (siehe Tab. 3.4 und Tab. 3.5). Wenn, wie bei Dipeptidderivatsubstraten, allein die ersten beiden Aminosäuren des Substrates mit dem katalytischen Zentrum interagieren, beträgt der Unterschied in der spezifischen Aktivität k_{cat}/K_m für Prolin gegenüber Alanin und wiederum gegenüber Serin in P₁-Position jeweils eine Größenordnung (siehe Tab. 3.4) (Demuth und Heins, 1995). Demgegenüber konnten durch den Austausch der Aminosäure in vorletzter N-terminaler Position von NP Y(1-29) vergleichbare spezifische Aktivitäten für die drei genannten Aminosäuren ermittelt werden (siehe Tab. 3.5). Somit dürften weitere Wechselwirkungen an der Stabilisierung und / oder der Ausrichtung der Peptidsubstrate für eine effektive Hydrolyse beteiligt sein. Darauf weisen auch die kinetischen Daten für das Peptidhormon PACAP hin, welches als PACAP27 und PACAP38 vorkommt, hin (siehe Abb. 4.3). Beide Peptide weisen in den Aminosäuren 1-27 eine identische Sequenz auf, werden aber mit unterschiedlicher Effektivität prozessiert (k_{cat}/K_m -Wert für PACAP27 = $0,0042 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, für PACAP38 = $0,024 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) (siehe Tab. 1.1) (Lambeir *et al.*, 2003). Die spezifische Aktivität für den Umsatz des Dipeptidderivats His-Ser-AMC durch DP IV wurde mit $(1,1 \pm 0,03) \cdot 10^{-4} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ermittelt (siehe Tab. 3.4), hingegen wurde für Glukagon mit den gleichen N-terminalen Aminosäuren (Histidin-Serin-) ein k_{cat}/K_m -Wert von $0,19 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ bestimmt (Lambeir *et al.*, 2003). Dieser deutliche Unterschied für die katalytische Effizienz der DP IV gegenüber Substraten mit verschiedenen Kettenlängen und die oben beschriebenen Beispiele lassen die Existenz von „sekundären“ Wechselwirkungen zwischen Peptidsubstraten und dem Enzym vermuten.

In vorliegender Arbeit konnten Wechselwirkungen, die über die Bindung an das katalytische Zentrum hinausgehend anhand von Glukagonderivaten von unterschiedlicher Länge gezeigt werden. Nach Verlängerung der Aminosäurenkette von Glukagon auf 10 Aminosäuren wurde in einem Kompetitionsansatz gegen Gly-Pro-pNA ein IC₅₀-Wert von 0,43 mM ermittelt

(siehe Tab. 3.6). Mit zunehmender Kettenlänge und dadurch wahrscheinlich vermehrt auftretenden „sekundären“ Interaktionen zwischen Substrat und Enzym, trat eine verstärkte kompetitive Hemmung durch die Glukagonderivate auf. Damit scheinen Regionen innerhalb des Enzyms, die vermutlich Wechselwirkungen im Bereich um die zehnte Aminosäure von Peptidsubstraten eingehen können, einen Einfluss auf die Ausrichtung und / oder Bindung des Substrates und dessen Hydrolyse zu haben.

Einige Peptidhormone, die Substrate der DP IV darstellen, lassen sich in verschiedene Peptidfamilien einordnen (siehe Abschnitt 1.1.4 und Tab. 1.1). Der Sequenzvergleich der Peptide zeigt, dass es stark homologe Bereiche innerhalb einer Substratfamilie gibt, die wiederum ein Unterscheidungsmerkmal zu anderen Peptidfamilien darstellen (siehe Abb. 4.3).

In Analogie zur Sequenz Glukagon(5-10) wurde ein Hexapeptid (TFTSDY) abgeleitet, das kompetitiv den Umsatz von bestimmten Peptidsubstraten (GIP und Glukagon), nicht aber den von niedermolekularen Substraten hemmt. Die Hemmung durch TFTSDY war spezifisch gegenüber der Hydrolyse von Substraten der GRF/Glukagon-Peptidfamilie (siehe Abb. 3.12), während der Umsatz des Chemokins RANTES(1-15) nicht beeinträchtigt wurde. Zukünftig wäre der Einsatz von Inhibitoren, gerichtet gegen „sekundäre“ Interaktionen zwischen einzelnen Substraten oder Substratklassen und der DP IV als Ansatz für eine nebenwirkungsarme Therapieform denkbar. Insbesondere die selektive Inhibierung des Umsatzes der Inkretine GIP und GLP-1, die zur GRF/Glukagon-Peptidfamilie gehören, wäre interessant für eine therapeutische Anwendung bei Typ 2 Diabetes Erkrankungen (siehe Abschnitt 1.1.4).

Mit Hilfe von Mutationsstudien sollten Aminosäuren der DP IV identifiziert werden, die an den oben beschriebenen „sekundären“ Wechselwirkungen beteiligt sind. In der Literatur werden zwei mögliche Substratzugänge („ β -Propellertunnel“ und „Seitenöffnung“) zu dem in einem Hohlraum im Inneren der DP IV befindlichen katalytischen Zentrum diskutiert (siehe Abschnitt 1.1.2 und Abb. 4.4) (Aertgeerts *et al.*, 2004b; Engel *et al.*, 2003). Damit kommen auch zwei Regionen innerhalb des Enzyms in Frage, die auf dem Weg des Substrates zum katalytischen Zentrum an „sekundären“ Wechselwirkungen beteiligt sein könnten (Abb. 4.4). Den Substratzugang durch den „ β -Propellertunnel“ können aufgrund des Porendurchmessers nur linearisierte Substrate passieren, die aber auch einen „*Hairpin Loop*“ aufweisen können. Peptidketten die eine α -Helix Struktur beinhalten sind dazu nicht in der Lage (Rasmussen *et al.*, 2003). Eine Entfaltung von strukturierten Substraten wäre notwendig, um über diesen Weg zum katalytischen Zentrum zu gelangen. Der N- und C-Terminus des β -Propellers partizipieren nicht im gleichen β -Faltblatt, dadurch kann die β -Propellerpore nicht durch eine Art „Reisverschluss“ geschlossen werden, wie es in einigen Proteinen mit β -Propellermotiven der Fall ist (u.a. bei der G-Protein β -Untereinheit oder der Glukose Dehydrogenase) (siehe Abschnitt 1.1.2 und 1.1.3) (Fülöp und Jones, 1999). Der B-Wert (gibt an, wie starr die Ordnung innerhalb eines Kristalls ist), ermittelt für das erste

β -Faltblatt der Kristallstruktur 1N1M, ist höher als im Rest des β -Propellers, was auf eine erhöhte Flexibilität hinweist (Rasmussen *et al.*, 2003). Es wäre denkbar, dass durch die Bewegung des ersten β -Faltblatts ein sich Schließen oder Öffnen des Substratzuganges möglich wird und damit eine Selektivität gegenüber Substraten entsteht. Den zweiten und kürzeren Weg des Substrateintritts stellt die ovale, so genannte „Seitenöffnung“ zwischen β -Propeller und α/β -Hydrolasedomäne mit einem Durchmesser von 15 - 22 Å dar. Der Zugang von Substraten mit α -Helix Strukturen wäre hier denkbar (Abb. 4.4) (Rasmussen *et al.*, 2003).

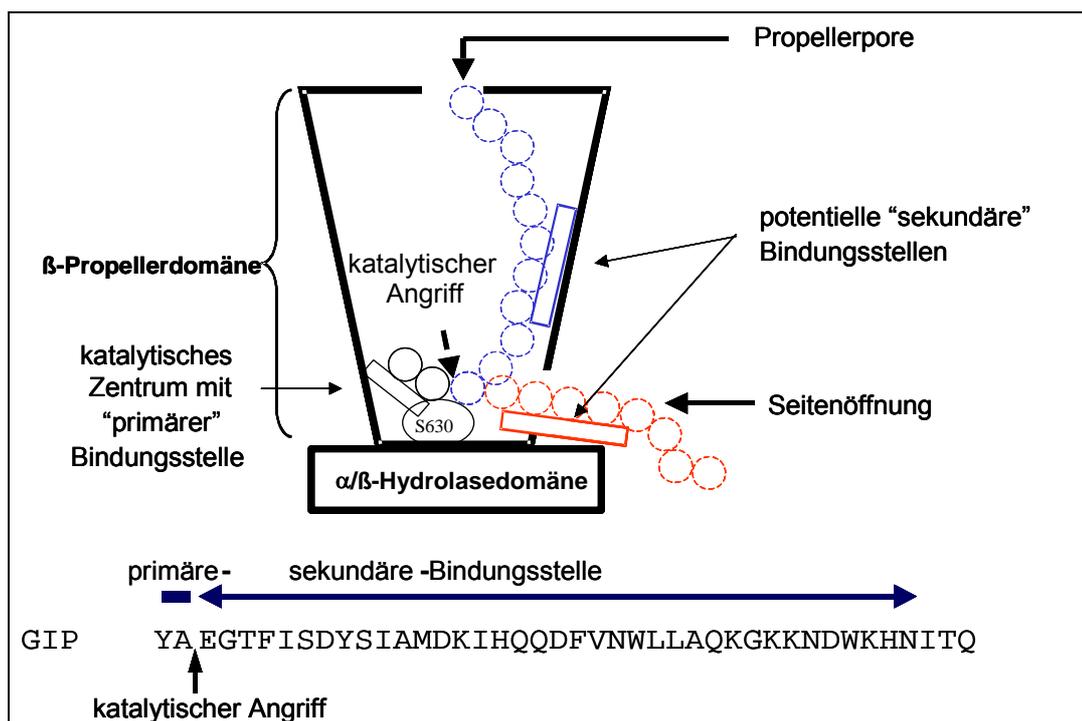


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der DP IV und der beiden potentiellen Substratein- bzw. -ausgänge zum katalytischen Zentrum, sowie der vermuteten Position von potentiellen „sekundären“ Bindungsstellen innerhalb des Enzyms und des physiologischen Substrates GIP. In schwarzen, roten oder blauen Kugeln sind Aminosäuren eines Peptidsubstrates schematisch dargestellt (das Modell, die Anzahl und Größe der Kugeln entspricht nicht den realen Größenverhältnissen).

Aertgeerts *et al.* konnten bei Co-Kristallisation von NP Y(1-10) und DP IV eine Elektronendichte bis zur sechsten Aminosäure des Peptids bestimmen (Aertgeerts *et al.*, 2004b). Anhand dessen wurde vermutet, dass sich NP Y(1-10) in den großräumigen Seitenausgang orientiert, da das dort befindliche Lösungsmittel eine klare Auflösung der Peptidstruktur [insbesondere der Aminosäuren 7-10 von NP Y(1-10)] behindert. Wie oben diskutiert deuten die Ergebnisse dieser Arbeit aber darauf hin, dass NP Y(1-10) nicht die ausreichende Länge besitzt, um innerhalb der DP IV (möglicherweise der Propellerpore) stabil fixiert zu werden. Daraus resultierte vermutlich die hohe Flexibilität im C-Terminus von NP Y(1-10) und somit die schlechte Auflösung in der Kristallstruktur. Bessere Aussagen über den Substrateingang bzw. -ausgang des Enzyms („ β -Propellerpore“ oder „Seiteneingang“) und Aminosäuren die an potentiellen „sekundären“ Wechselwirkungen beteiligt sind, könnten

durch die Co-Kristallisation von längeren Peptiden mit DP IV getroffen werden (siehe Abschnitt 3.7).

Aufgrund der bekannten Beispiele von PEP und der Tricorn-Protease, die eine ähnliche β -Propellerdomäne aufweisen wie DP IV und deren Pore als Substrateingang dient, wurde das Modell des Substrateintritts durch den β -Propeller favorisiert (Brandstetter *et al.*, 2002; Fülöp *et al.*, 2000). Anhand einer Moleküldynamiksimulation, in der GIP in DP IV gedockt wurde, konnte die Aminosäure R560 als potentieller Mediator von „sekundären“ Wechselwirkungen identifiziert werden (interagiert mit der neunten Aminosäure von GIP) (Abb. 4.5).

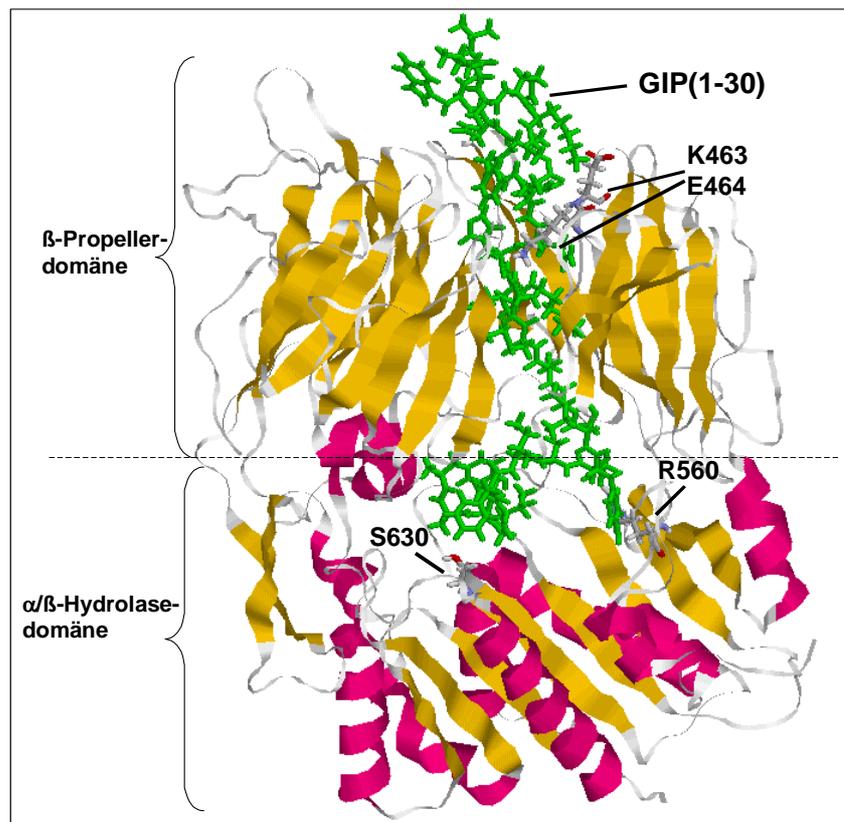


Abb. 4.5: Darstellung eines Monomers der humanen DP IV (dargestellt mit sekundären Faltungsmotiven) „gedockt“ mit GIP(1-30) (grün und „stick“-Modus) und Aminosäuren des Enzyms die an „sekundären“ Interaktionen beteiligt sein könnten. In „stick“-Modus und „CPK“ hervorgehoben sind S630 des aktiven Zentrums und die für Untersuchungen von „sekundären“ Interaktionen ausgetauschten Aminosäuren R560 (wurde gegen A560 ausgetauscht), K463 und E464 (wurden gegen die in der ssDP IV-Sequenz vorkommenden Aminosäuren S463 bzw. K464 ausgetauscht).

Die durch Mutagenese-PCR generierte Variante R560A-rhDP IV wies im Vergleich zu rhDP IV-WT eine langsamere Hydrolysegeschwindigkeit von GIP und PACAP38 auf. Dies spricht für eine Beteiligung dieser Aminosäure bei der Bindung oder Ausrichtung der bezeichneten Substrate (siehe Abb. 3.13). Außerdem bestätigen die modelltheoretischen Arbeiten und die kinetischen Ergebnisse eine Funktion der Variante R560A-rhDP IV bei „sekundären“ Wechselwirkungen innerhalb des Bereichs der 9 oder 10 Aminosäure von Peptidsubstraten. Dies entspricht der Region in der das oben beschriebene Hexapeptid (TFTSDY) „sekundäre“ Wechselwirkungen blockieren sollte.

Ein Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten und Bindungskonstanten mit Peptidsubstraten zwischen ss- und rhDP IV zeigte zum Teil deutliche Abweichungen bei der Katalysegeschwindigkeit und dem Bindungsverhalten auf. Wie bereits diskutiert weisen beide Enzyme kaum Unterschiede in der räumlichen Anordnung der zu 97 % identischen Aminosäuren im katalytischen Zentrum auf (siehe Abb. 4.1). Im Gegensatz dazu sind die Aminosäuren in der β -Propellerdomäne nur zu 85 % identisch. Die zwei auf der Proteinoberfläche am Zugang zur Propellerpore lokalisierten Aminosäuren K463 und E464 der humanen DP IV sind in ssDP IV durch S463 und K464 ersetzt. Nach dem Austausch der Aminosäuren des humanen Enzyms gegen die in der ssDP IV vorkommenden Aminosäuren erhöhte sich die Umsatzgeschwindigkeit durch die Variante S463S/E464K-rhDP IV im Vergleich zu rhDP IV-WT für die Substrate VIP und PACAP27, nicht aber für GIP (Abb. 3.14). Dies lässt vermuten, dass die zwischen ss- und rhDP IV unterschiedlichen Aminosäuren einen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeiten haben. Anhand der Ergebnisse lassen sich weitere „sekundäre“ Interaktionen zwischen Peptidsubstraten und Aminosäuren auf der Oberfläche des Enzyms vermuten.

4.3 Enzym-Substrat-Wechselwirkungen im katalytischen Zentrum der DP IV

Durch die bereits publizierten Kristallstrukturen der DP IV war es möglich, Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substraten und Inhibitoren und Aminosäureresten in der Nähe des katalytischen Zentrums der DP IV zu identifizieren (Aertgeerts *et al.*, 2004b; Engel *et al.*, 2003; Oefner *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003; Thoma *et al.*, 2003). Die Bedeutung dieser Wechselwirkungen, insbesondere bei der Erkennung und Hydrolyse von natürlichen Substraten, sollte in der vorliegenden Arbeit durch Analyse des Einflusses von Aminosäuren in S_2 -, S_1 -, S_1' - und S_2' -Position der DP IV und der P_2 -, P_1 -, P_1' - und P_2' -Position von Substraten untersucht werden. Dazu wurden Aminosäurereste der DP IV in den Positionen R125, N710, Y631, W629, Y547, E205 und E206 variiert und die resultierenden Varianten mit verschiedenen Substraten und Inhibitoren charakterisiert.

Eine erste kinetische Charakterisierung der rhDP IV-Varianten erfolgte mit den Dipeptidderivaten Ala-Pro-AMC und Lys-Ala-AMC und dem dipeptidanalogen Inhibitor P32/98 (Strukturformel siehe Tab. 1 im Anhang und Abb. 4.7).

Die Tripeptide Diprotin A und Diprotin B sind Substrate der DP IV, die sehr langsam hydrolysiert werden (Rahfeld *et al.*, 1991b) [k_{cat} -Wert für NP Y = 40 s^{-1} (Lambeir *et al.*, 2003), k_{cat} -Wert für Diprotin B = $8,8 \text{ s}^{-1}$ (Abb. 4.7 und siehe Tab. 3.18)]. Kürzlich konnten Thoma *et al.* eine Kristallstruktur mit dem gebundenen Tripeptid Diprotin A (Ile-Pro-Ile) veröffentlichen und damit Wechselwirkungen der C-terminalen freien Carboxylgruppe mit R125 im aktiven Zentrum des Enzyms zeigen, die bei der Bindung längerer Peptidketten nicht vorkommen (Thoma *et al.*, 2003). Die probiodrug AG untersucht Tripeptide, wie t-Butyl-Gly-Pro-Ile und t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂, für die therapeutische Anwendung bei Typ 2 Diabetes-Patienten. In dieser Arbeit wurde die Charakterisierung der rhDP IV-Varianten mit Tripeptiden durchgeführt,

um die Rolle der an der Bindung und Hydrolyse von Tripeptiden beteiligten Aminosäuren besser zu verstehen (Abb. 4.7).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Hydrolyse der physiologischen Substrate NP Y, GIP und PACAP38 (Aminosäuresequenzen siehe Abb. 4.3) nach Austausch von einzelnen Aminosäuren von rhDP IV untersucht und mit dem WT verglichen. Die Auswirkungen von verschiedenen Aminosäuren in der P₁-Position auf die Hydrolyse eines Peptidhormons wurden mit NP Y (Prolin in P₁-Position), GIP (Alanin in P₁-Position) und PACAP38 (Serin in P₁-Position) untersucht. Zunächst wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie geprüft, ob die Substrate durch die Enzym-Varianten umgesetzt wurden (siehe Tab. 3.19). Aussagen über k_{cat} - und K_m -Werte konnten aber erst nach Etablierung der kinetischen Analyse mittels HPLC-MS/MS getroffen werden (siehe Abschnitt 2.2.18 und Tab. 3.21-3.22).

Die DP IV-vermittelte Katalyse wird allgemein durch kinetische Studien mit Dipeptidderivaten charakterisiert. Der Einfluss der Aminosäure in P₁-Position scheint allerdings auch von der Substratlänge abzuhängen (siehe Abschnitt 4.2). In Abbildung 4.6 sind zusammenfassend die k_{cat}/K_m -Werte für die Hydrolyse von Dipeptidderivaten und Peptidhormonen gezeigt.

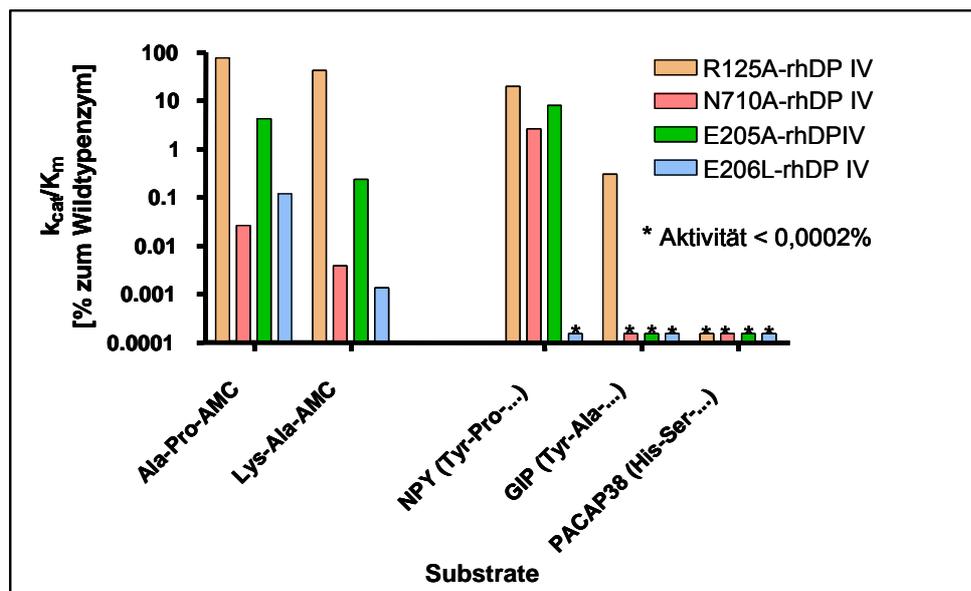


Abb. 4.6: Zusammenfassende Darstellung der k_{cat}/K_m -Werte verschiedener DP IV-Varianten mit in P₁-Position variierenden Substraten. Die Daten sind in Prozent im Vergleich zu rhDP IV-WT gezeigt. Links: k_{cat}/K_m -Werte der Hydrolyse von Dipeptidderivaten durch DP IV-Varianten prozentual zum Wildtypenzym. Rechts: k_{cat}/K_m -Werte der Hydrolyse von Peptidhormonen durch DP IV-Varianten prozentual zum Wildtypenzym.

Durch den Austausch bestimmter Aminosäuren im aktiven Zentrum der DP IV zeigt sich der Einfluss auf die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Aminosäure in P₁-Position des Substrates. Damit wird deutlich, dass weitere Strukturbereiche im Enzym existieren, die außerhalb des aktiven Zentrums zur Substratbindung beitragen (siehe Abschnitt 4.2).

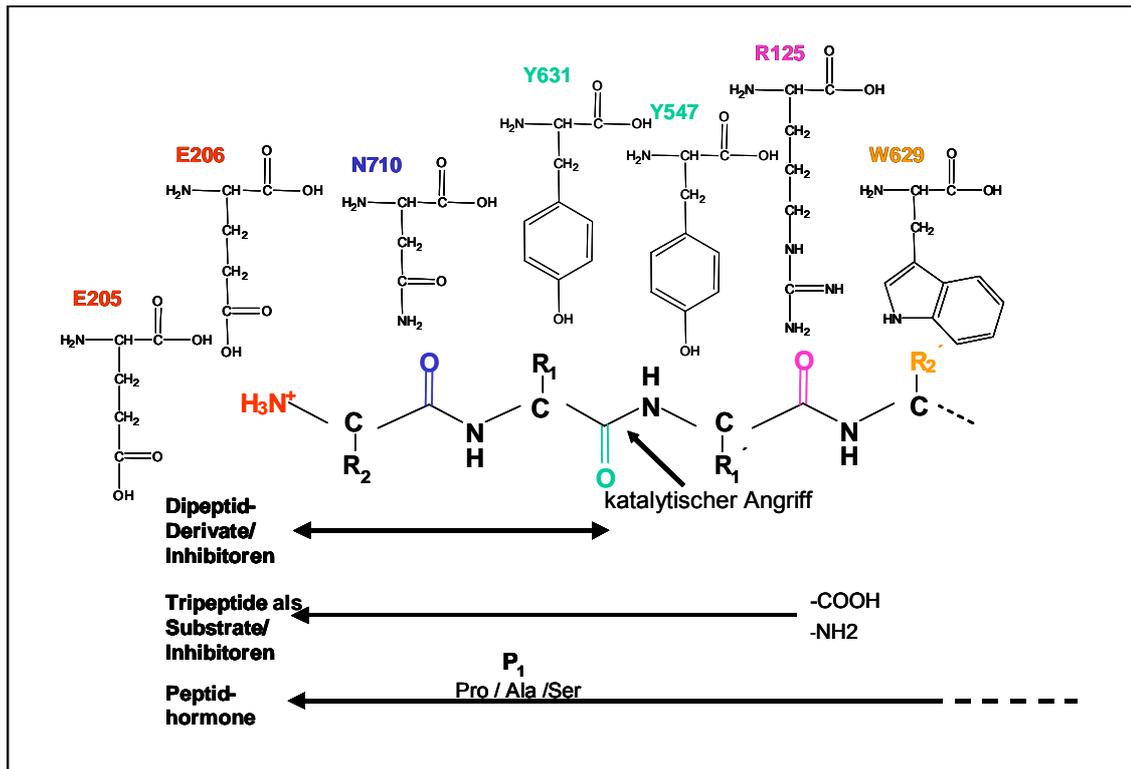


Abb. 4.7: Schematische Darstellung der anhand der Ergebnisse dieser Arbeit postulierten Lage und Interaktionspunkte (farblich gekennzeichnet) zwischen Substraten bzw. Inhibitoren und den untersuchten Aminosäuren E205, E206, N710, Y631, Y547, R125 und W629 im katalytischen Zentrum der DP IV. Mit Hilfe von verschiedenen Substraten bzw. Inhibitoren mit variierenden Kettenlängen war es möglich den positionellen Einfluss der Aminosäuren der DP IV auf die Substrat- bzw. Inhibitorbindung zu bestimmen. Danach interagieren E205 und E206 mit dem protonierten N-Terminus von Substraten bzw. Inhibitoren, N710 bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure in P₂-Position aus, die Amidgruppe von Y631 und die Hydroxylgruppe von Y547 sind bei der Bildung des Oxyanion-Übergangszustands beteiligt, R125 interagiert mit dem Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure in P₁'-Position (bzw. mit der Carboxylgruppe in P₁'-Position von Tripeptiden) und W629 scheint keine essentiellen Wechselwirkungen zu der Seitengruppe der P₂'-Aminosäure einzugehen.

4.3.1 Vergleich von K_m- und scheinbaren K_i-Werten der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse von Peptidsubstraten

Die Ermittlung des K_i-Wertes für die Konkurrenz von Tripeptiden oder Peptidhormonen mit Gly-Pro-AMC kann fluorimetrisch erfolgen und der ermittelte K_i-Wert sollte auf den K_m-Wert schließen lassen (siehe Abschnitt 3.6.1).

Anhand der K_m- und K_i-Werte von Diprotin B zeigte sich, dass diese Daten für die jeweilige rhDP IV-Variante vergleichbar sind und gut übereinstimmen (siehe Tab. 3.18). Dagegen weichen die ermittelten K_m- und K_i-Werte der Peptidhormone voneinander ab (siehe Tab. 3.20-3.22). Eine mögliche Erklärung dafür könnten die Wechselwirkungen der längeren Substrate außerhalb der P₂- und P₁-Position sein.

4.3.2 Charakterisierung der rhDP IV-Varianten R125, N710, Y631, W629, Y547, E205 und E206

Einfluss der Variation von R125 auf die Substrathydrolyse durch DP IV

Anhand der Kristallstrukturen der DP IV mit dipeptidanalogen Inhibitoren wurde gezeigt, dass R125 zusammen mit N710 das P₂-Carbonylsauerstoffatom der Peptidbindung koordiniert (Aertgeerts *et al.*, 2004b; Engel *et al.*, 2003; Oefner *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003; Thoma *et al.*, 2003). Thoma *et al.* zeigten durch Co-Kristallisation der DP IV mit dem gebundenem Tripeptid Diprotin A, dass R125 mit der nur bei Tripeptiden vorkommenden freien C-terminalen Carboxylgruppe interagiert (siehe Abschnitt 3.6.1) (Thoma *et al.*, 2003). Thoma *et al.* vermuteten, dass durch diese Wechselwirkung das tetrahedrale Intermediat stabilisiert wird, da R125 die Dissoziation der abgespaltenen Aminosäure verlangsamt (Thoma *et al.*, 2003). Aertgeerts *et al.*, konnten anhand der Kristallstruktur der DP IV mit NP Y(1-10) die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen R125 und dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure in P₁'-Position zeigen (Aertgeerts *et al.*, 2004b).

Die Varianten R125A-rhDP IV und R125K-rhDP IV zeigten nur geringe Abweichungen bei der Bindung und Hydrolyse von Dipeptidderivaten, wie auch bei der Inhibierung mit P32/98 im Vergleich zu rhDP IV-WT (siehe Tab. 3.8-3.10). Somit spielt bei Dipeptidderivaten die Interaktion von R125 mit dem P₂-Carbonylsauerstoff keine oder nur eine untergeordnete Rolle. Die IC₅₀- und K_i-Werte für die Tripeptidhydrolyse durch die rhDP IV-Varianten R125A und R125K sind im Vergleich zum rhDP IV-WT beeinträchtigt (ca. Faktor 10). Dies weist auf eine Interaktion von R125 mit der Aminosäure in P₁'-Position der Substrate hin.

Die K_m-, k_{cat}- und k_{cat}/K_m-Werte für R125A-rhDP IV und R125K-rhDP IV mit Diprotin B zeigen, dass der K_m-Wert für Diprotin B durch die Variation von R125 beeinflusst ist (12 µM für DP IV-WT, 920 µM für R125A und 85 µM für R125K) (siehe Tab. 3.18). Dagegen sind die k_{cat}-Werte mit dem rhDP IV-WT vergleichbar, wobei für die Variante R125A-rhDP IV eine schwache Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit ermittelt werden konnte. Somit scheint R125 durch Interaktion mit der Carboxylgruppe in P₁'-Position an der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes zwischen Diprotin B und rhDP IV beteiligt zu sein (siehe Abb. 4.7). Weiterhin könnte eine optimale Substrat-Konformation zur Ausbildung eines tetrahedralen Intermediates durch ionische Interaktion von R125 mit der Carboxylgruppe in P₁'-Position behindert werden.

Der Einfluss der C-terminalen Carboxylgruppe von Tripeptiden auf deren Bindung wurde anhand der Tripeptide t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂ und t-Butyl-Gly-Pro-Ile untersucht.

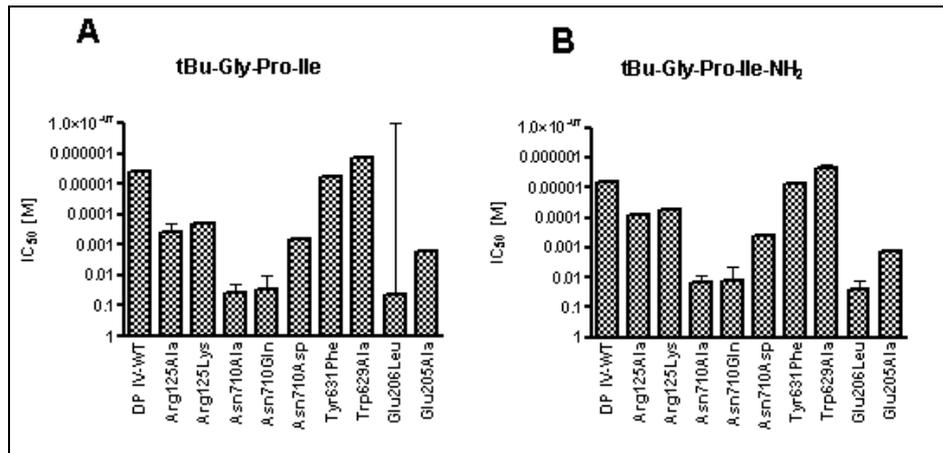


Abb. 4.8: Graphische Darstellung der IC₅₀-Werte von t-Butyl-Gly-Pro-Ile (A) im Vergleich zu den IC₅₀-Werten von t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂ (B) ermittelt für die untersuchten rhDP IV-Varianten. Messbedingungen: T = 30°C; HEPES-Puffer, pH 7,6; Substrat: Gly-Pro-AMC.

Anhand der Abbildung 4.8 wird deutlich, dass die Auswirkungen der einzelnen Aminosäurevariationen auf die Bindung der beiden Inhibitoren vergleichbar sind. Allerdings zeigt die Variation von R125 im aktiven Zentrum der DP IV einen geringeren Effekt auf die Bindung von t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂ (IC₅₀-Wert im Vergleich zum WT um Faktor 10 erhöht), als auf die Bindung des Tripeptides mit intakter Carboxylgruppe (IC₅₀-Wert um Faktor 100 erhöht) (siehe Tab. 3.8-3.10). Dies weist darauf hin, dass R125 sowohl mit dem Carbonylsauerstoff einer Peptidbindung der Aminosäure in P₁'-Position interagiert (bei Bindung von t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂), als auch mit der freien Carboxylgruppe von Tripeptiden. Aufgrund der räumlichen Nähe und der Interaktion einer basischen Aminosäure mit einer sauren Restgruppe ist anzunehmen, dass R125 eine Salzbrücke zu der freien Carboxylgruppe in P₁'-Position ausbildet (siehe Abb. 4.7). Dagegen besteht die Wechselwirkung zwischen R125 und dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure in P₁'-Position aus einer Wasserstoffbrückenbindung (Aertgeerts *et al.*, 2004b). Eine Salzbrücke stellt im Vergleich zu einer Wasserstoffbrückenbindung eine Interaktion mit höherer Bindungsenergie dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bildung einer Salzbrücke zwischen R125 und der Carboxylgruppe in P₁'-Position wahrscheinlich ist.

Die Untersuchungen der Hydrolyse von Peptidhormonen durch DP IV-Varianten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ergaben, dass die Variation der Aminosäure R125 starken Einfluss auf die Hydrolyse von GIP (Alanin in P₁-Position) hatte (siehe Tab. 3.19 und 3.22). GIP wurde kaum durch R125A-rhDP IV und deutlich langsamer (ca. Faktor 13) durch R125K-rhDP IV im Vergleich zum WT hydrolysiert (Abb. 4.9).

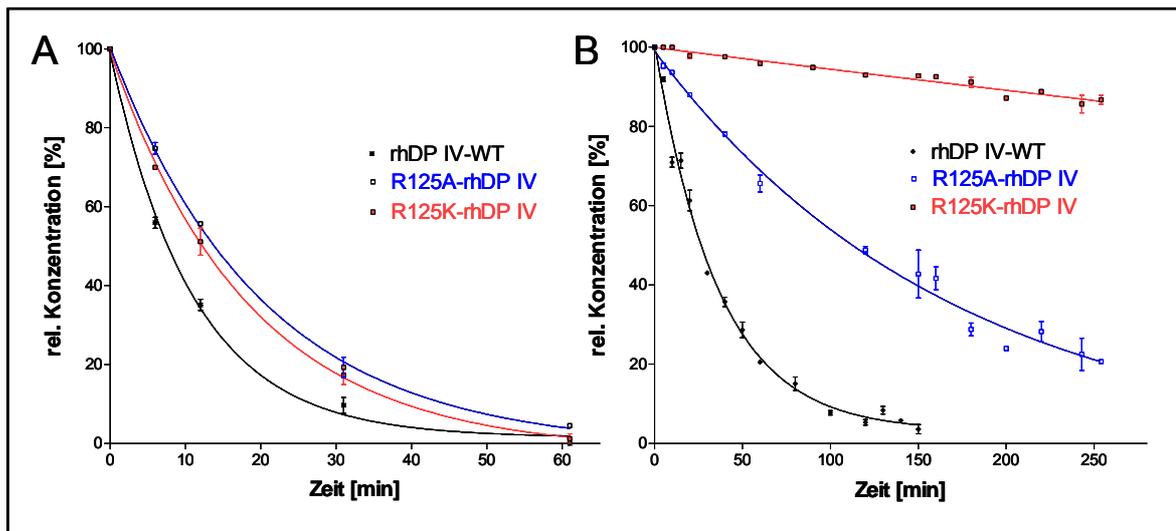


Abb. 4.9: Progressionskurven für die Hydrolyse von NP Y (A) und GIP (B) für die Enzymvarianten R125A-rhDP IV und R125K-rhDP IV im Vergleich mit dem rhDP IV-Wildtypenzym. Messbedingungen: $T = 37^{\circ}\text{C}$; NP Y- und GIP-Konzentration $25\ \mu\text{M}$; $10\ \text{mM}$ Tris-HCl-Puffer, $\text{pH}\ 7,5$. Die Enzymkonzentration entsprach einer Aktivität von $40\ \text{mU/ml}$ bezogen auf die Hydrolyse von $4 \cdot 10^{-4}\ \text{M}$ Gly-Pro-pNA bei 30°C (entspricht der DP IV-Aktivität im humanen Blutplasma).

Die kinetischen Parameter, ermittelt mit den Varianten von R125, zeigten eine Beeinträchtigung sowohl der K_m -, als auch k_{cat} -Werte auf (siehe Tab. 3.8-3.10). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass K125, ebenso wie R125 mit dem Peptidrückgrat des Substrates interagiert. Die Guanidino-Gruppe des Arginins besitzt zwei Zentren zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff des Substratrückgrates (siehe Abb. 1.4). Die ϵ -Amino-Gruppe des Lysins weist dagegen nur ein Zentrum zur Ausbildung dieser Wasserstoffbrückenbindung auf. Somit könnte der Einfluss auf die Hydrolyse von GIP durch R125K-rhDP IV auf eine schwächere Interaktion des Carbonylsauerstoffs mit der ϵ -Amino-Gruppe des Lysins zurückzuführen sein.

Wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben bildet R125 sowohl eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure des Substrates in P_1 -Position, als auch eine Salzbrücke mit E205 aus. Bleibt die Eigenschaft der Seitenkette als Protonendonator erhalten, so sind Bindung und Hydrolyse von GIP möglich, wobei die Interaktion mit E205 gestört sein könnte. Außerdem kann sich keine Salzbrücke mehr zwischen R125 und E205 ausbilden was ebenfalls Auswirkungen auf die Hydrolyse von GIP haben kann. Nach Austausch von R125 zu Alanin (kürzere Seitenkette, Verlust der basischen Eigenschaft) wurde eine stärkere Beeinflussung der Hydrolyse von GIP festgestellt (siehe Tab. 3.19). Auch die K_m - und k_{cat} -Werte für R125A-rhDP IV zeigten größere Abweichungen zum WT als R125K-rhDP IV (siehe Tab. 3.22).

Die Hydrolyse von NP Y (Prolin in P_1 -Position) war dagegen nicht so stark beeinträchtigt (ohne Auswirkungen auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt) (Abb. 4.9 und siehe Tab. 3.19 und Tab. 3.21). Wie erwartet wurde PACAP38 (Serin in P_1 -Position) nach Variation von R125 nicht mehr prozessiert (siehe Tab. 3.19).

Die Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz des Aminosäurerestes in P_1 -Position der Substrate. Befinden sich Aminosäuren mit kürzeren Seitenketten als Prolin (Alanin oder Serin)

in der P_1 -Position des Substrates, so ist eine zusätzliche Stabilisierung oder auch Fixierung des Substratrückgrates durch R125 erforderlich. Es ist anzunehmen, dass NP Y, mit Prolin in P_1 -Position, über die hydrophobe S_1 -Tasche an das aktive Zentrum der DP IV gebunden wird, ohne eine weitere Bindung des Substratrückgrates durch R125 zu benötigen.

Die Daten in den Tabellen 3.21 und 3.22 belegen, dass die Variation von R125 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Deacylierung) bei der Hydrolyse von Substraten der Prolin-Reihe (NP Y und Diprotin B) nicht beeinflusst, dagegen sind die k_{cat} -Werte für die Hydrolyse von GIP (mit Alanin in P_1) erhöht. Es wurde außerdem gezeigt, dass R125 mit dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure in P_1' -Position interagiert. Ist die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend, so beeinflusst R125 diesen Schritt nicht, da das C-terminale Spaltprodukt (inkl. P_1' -Aminosäure) vor diesem Katalyseschritt schon freigesetzt wurde. Ist dagegen die Acylierungsreaktion geschwindigkeitsbestimmend, trägt R125 durch Interaktion mit dem Carbonylsauerstoff in P_1' -Position des Peptidrückgrates zur optimalen Ausrichtung der zu spaltenden Bindung bei. Die Tatsache, dass die Variation von R125 den k_{cat} -Wert für GIP (Alanin-Reihe) beeinflusst, jedoch nicht für Substrate der Prolin-Reihe (hier untersucht NP Y und Diprotin B), bedeutet, dass bei der Hydrolyse von Peptidhormonen wie auch bei Dipeptidderivaten die Deacylierung bei Prolin-Substraten und die Acylierungsreaktion bei Alanin-Substraten geschwindigkeitsbestimmend ist (siehe Tab. 3.8-3.10, Tab. 3.19 und Tab. 3.21-3.22) (Rahfeld *et al.*, 1991a).

Einfluss der Aminosäure N710 auf die Substrathydrolyse durch DP IV

In der Literatur ist anhand der Kristallisationsstudien der DP IV beschrieben, dass N710 mit dem Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure in P_2 -Position des Substrates durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung interagiert (Aertgeerts *et al.*, 2004b; Engel *et al.*, 2003; Oefner *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003; Thoma *et al.*, 2003).

Die Varianten N710A-, N710Q- und N710D-rhDP IV zeigten eine deutliche Beeinträchtigung der Bindung und Hydrolyse von Dipeptidderivaten (siehe Tab. 3.8 und Tab. 3.11-3.13). Die Auswirkungen auf die Bindung von Tripeptiden durch die Varianten von N710 waren mit denen von Dipeptidderivaten vergleichbar. Daraus wird ersichtlich, dass die Koordination des P_2 -Carbonylsauerstoffs durch N710 für die Bindung von Tripeptiden ebenso relevant ist, wie für die Bindung der Dipeptidderivate (siehe Abb. 4.7).

Der Austausch von Asparagin zu Alanin bewirkt die Verkürzung der Aminosäureseitenkette und den Verlust der Amidgruppe, welche als Protonendonator zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung dient. Bei der Substrathydrolyse erfolgt keine Fixierung des Substratrückgrates durch N710 über eine Wasserstoffbrückenbindung, was sich daher in den veränderten k_{cat} - und K_m -Werten widerspiegelt (k_{cat}/K_m -Werte weichen ca. um Faktor 1000 vom WT ab) (siehe Tab. 3.8 und Tab. 3.11).

Die Variante N710Q-rhDP IV ist bei der Substratbindung und Hydrolyse stärker beeinträchtigt, als N710A-rhDP IV (k_{cat}/K_m -Werte ca. um Faktor 10000 im Vergleich zum WT erniedrigt). Bei der Variante N710Q-rhDP IV (Verlängerung der Aminosäureseitenkette) besteht noch die

Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung zum Substratrückgrat, allerdings kann diese durch die Veränderungen der sterischen Verhältnisse oder der Orientierung der Seitenkette offensichtlich nicht mehr genutzt werden (siehe Tab. 3.12).

Durch die Variation von Asparagin zu Asparaginsäure wurde bei unveränderter Seitenkettenlänge ein saurer Rest in Form einer Carboxylgruppe eingeführt. Es ist anzunehmen, dass die Carboxylgruppe der Asparaginsäure als Protonendonator zur Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff des Substratrückgrates dient. Asparaginsäure besitzt andere Protonendonoreigenschaften, als Asparagin, was an den Abweichungen bei den K_m -, k_{cat} - und k_{cat}/K_m -Werten gegenüber dem WT sichtbar wurde (k_{cat}/K_m -Werte weichen ca. um Faktor 100 vom WT ab) (siehe Tab. 3.13).

Bei den Varianten von N710 waren sowohl für Ala-Pro-AMC, als auch Lys-Ala-AMC die K_m - und k_{cat} -Werte im Vergleich zum WT beeinträchtigt (siehe Tab. 3.8 und Tab. 3.11-3.13). Daraus lässt sich ableiten, dass die Fixierung des Carbonylsauerstoffs der P₂-Aminosäure des Substrates durch N710 sowohl für die Substratbindung, als auch für den Katalysemechanismus essentiell ist. Dabei war der Einfluss bei dem Prolin-Substrat wiederum am geringsten (siehe Abb. 4.7).

Der Vergleich der kinetischen Konstanten für die Hydrolyse von Diprotin B durch DP IV und den Enzymvarianten verdeutlicht den Effekt der Variation von N710 auf die Katalyse (siehe Abb. 4.7). Die Varianten N710A- und N710Q-rhDP IV prozessieren Diprotin B ab einer Konzentration < 1 mM nicht mehr. Die Variante N710D-rhDP IV zeigt im Vergleich zum rhDP IV-WT sowohl eine Erhöhung des K_m - als auch des k_{cat} -Wertes. Im Gegensatz zu langkettigen Peptidsubstraten der DP IV ist der k_{cat} -Wert der DP IV-katalysierten Spaltung von Diprotin B herabgesetzt (siehe Tab. 3.8 und Tab. 3.13). Wie zuvor erwähnt, vermuteten Thoma *et al.*, dass der erniedrigte k_{cat} -Wert in der Interaktion zwischen R125 und der C-terminalen Carboxylgruppe des Tripeptides begründet ist, welche die Bildung eines im Sinne der Hydrolyse „produktiven“ tetrahedralen Intermediates, was dann zum Acylenzym zerfällt, behindert (Thoma *et al.*, 2003). Auf einen derartigen Mechanismus deuten auch die kinetischen Parameter hin, die in dieser Arbeit mit den Varianten von N710 ermittelt wurden. Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen R125 und N710 (siehe Abb. 1.4) ist im aktiven Zentrum der Variante N710D-rhDP IV eine Interaktion zwischen der basischen Seitenkette von R125 und der nunmehr sauren Seitenkette von Asparagin an Position 710 zu vermuten. Diese Wechselwirkung verhindert möglicherweise die Interaktion zwischen R125 und der Carboxylgruppe des Tripeptides, wodurch die Fixierung des C-Terminus der P₁'-Aminosäure nicht mehr stattfinden kann. Dies könnte die beobachtete deutliche Erhöhung des k_{cat} -Wertes der N710D-rhDP IV-katalysierten Spaltung von Diprotin B erklären (siehe Tab. 3.8 und Tab. 3.13). Interessanterweise wird damit wieder die Geschwindigkeit der Val-Pro-Abspaltung erreicht, wie sie von der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Val-Pro-pNA bekannt ist, welche mit geschwindigkeitsbestimmender Deacylierung verläuft (Heins *et al.*, 1988). In weiteren Untersuchungen sollten die kinetischen Parameter für die Hydrolyse von t-Butyl-Gly-Pro-Ile im Vergleich zu t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH₂ durch die Variante N710A- und N710D-rhDP IV, bzw.

dem rhDP IV-WT ermittelt werden, um den Einfluss von Asparaginsäure in Position 710 zu analysieren. Weiterhin sollte Asparagin als Protonendonator für eine Wasserstoffbrückenbindung im aktiven Zentrum des Enzyms einen anderen Einfluss haben als Asparaginsäure. Ob hier unter Umständen ein erleichterter Protonenübergang Einfluss auf die Katalyse bei der Enzymvariante N710D-rhDP IV im aktiven Zentrum der DP IV hat, kann nur durch weitere Experimente wie z.B. der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Substrathydrolyse durch die Enzymvarianten bestimmt werden.

Die untersuchten rhDP IV-Varianten von N710 prozessierten die Peptidhormone GIP und PACAP38 nicht, dagegen wurde NP Y hydrolysiert (siehe Tab. 3.19). Die kinetischen Daten für die Hydrolyse von NP Y zeigen, dass durch Variation von N710 sowohl die K_m -, als auch die k_{cat} -Werte beeinträchtigt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen weiterhin die Bedeutung des Aminosäurerestes in P_1 -Position der Substrate (siehe Abb. 4.7, Tab. 3.21 und Diskussion über den Einfluss der Aminosäure R125). Befindet sich Prolin in der P_1 -Position, kann das Substrat auch nach Variation der Aminosäure N710 prozessiert werden, da die Interaktion mit der hydrophoben S_1 -Tasche genügt, um Bindung und Hydrolyse zu ermöglichen. Befinden sich allerdings Serin oder Alanin in P_1 -Position der Substrate, so ist die Prozessierung ohne zusätzliche Fixierung des Substratrückgrates durch N710 nicht mehr möglich.

Einfluss der Aminosäure Y631 auf die Substrathydrolyse durch DP IV

In der Literatur wird diskutiert, dass die Amidgruppe von Y631 an der Bildung des Oxyanion-Lochs gemeinsam mit der Hydroxylgruppe von Y547 beteiligt ist (Aertgeerts *et al.*, 2004b; Engel *et al.*, 2003; Oefner *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003; Thoma *et al.*, 2003). Die Untersuchungen im Laufe der vorliegenden Arbeit sollten zeigen, ob auch der Hydroxylgruppe von Y631 eine solche Funktion zukommt. Für die Variante Y631F-rhDP IV konnten keine Abweichungen zum WT gemessen werden (siehe Tab. 3.14). Daraus kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass die Hydroxylgruppe von Y631 keine Funktion bei der Bindung oder Hydrolyse von Dipeptidderivaten, Tripeptiden oder Peptidhormonen ausübt (siehe Abb. 4.7).

Einfluss der Aminosäure Y547 auf die Substrathydrolyse durch DP IV

Die Variante Y547A-rhDP IV wurde nur in inaktiver Form exprimiert, wodurch kein Abbau von Dipeptidderivatsubstraten oder von GIP und NP Y nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.15). Dies bestätigt die entscheidende Bedeutung der Hydroxylgruppe von Tyrosin bei der Bildung des Oxyanion-Lochs, diese Art der Stabilisierung ist wiederum typisch für die Serinproteasenfamilie S9 (siehe Abb. 4.7) (Bjelke *et al.*, 2004; Kiss *et al.*, 2004).

Einfluss der Aminosäure W629 auf die Substrathydrolyse durch DP IV

Aus verschiedenen Kristallstrukturen der DP IV mit und ohne Inhibitoren war ersichtlich, dass die Seitenkette der Aminosäure W629 beim Substrateintritt eine Konformationsänderung vollzieht. Die Kristallstruktur der DP IV ohne gebundenes Substrat oder Inhibitor zeigt, dass der Indolring des W629 das aktive Zentrum abschirmt. Hingegen verdeutlichen Kristallstrukturen mit gebundenem Substrat oder Inhibitor, dass nach der Bindung eine Konformationsänderung dieser Seitenkette vollzogen wurde, da S630 der katalytischen Triade zugänglich wird (Kristallstrukturen aus der „PBD“-Datenbank: 1N1M und 1PFQ).

Durch den Verlust der voluminösen Seitenkette (W629A-rhDP IV) waren teilweise die K_m -Werte erniedrigt und die k_{cat} -Werte gegenüber dem rhDP IV-WT erhöht (siehe Tab. 3.15). Eine Ursache für die erniedrigten K_m -Werte könnte sein, dass das aktive Zentrum im ungebundenen Enzym nicht mehr abgeschirmt wird. Das Substrat könnte somit das katalytische Zentrum ungehindert erreichen, ohne das Energie für die Konformationsänderung des W629 aufgebracht werden muss. Die erhöhten k_{cat} -Werte könnten dadurch begründet sein, dass bei der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Substraten mit Prolin in P_1 -Position die geschwindigkeitsbestimmende (siehe Abschnitt 1.1.3) Deacylierung bei Anlagerung von Wasser stattfindet (siehe Abb. 1.3).

Die kinetischen Studien mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie belegten, dass weder die Bindung, noch die Hydrolyse der untersuchten Peptidhormone NP Y, GIP und PACAP38 bei der Variante W629A beeinträchtigt waren (siehe Tab. 3.19). Aertgeerts *et al.* beschrieben eine Interaktion zwischen W629 und dem Lysin in P_2 -Position des NP Y(1-10) (Aertgeerts *et al.*, 2004b). PACAP38 und GIP enthalten Glycin in P_2 -Position und auch hier wurden keine Abweichungen der Hydrolysegeschwindigkeiten im Vergleich zum WT festgestellt. Sollte eine Interaktion mit den Aminosäuren in P_2 -Position der Substrate stattfinden, so ist diese für die Bindung und Hydrolyse der untersuchten Substrate nicht relevant (siehe Abb. 4.7).

Einfluss der Aminosäuren E205 und E206 auf die Substrathydrolyse durch DP IV

Für die proteolytische Funktion der Exopeptidase DP IV ist zum einen die Bindung der P_1 -Aminosäure in der hydrophoben Bindungstasche entscheidend, zum anderen die Fixierung des geladenen N-Terminus in P_2 -Position. Die bisher veröffentlichten Kristallstrukturen der DP IV zeigen, dass die negativ geladenen Aminosäuren E205 und E206 mit dem positiv geladenen N-Terminus des Substrates interagieren. Zudem bildet E205 eine Salzbrücke zu R125 aus (Aertgeerts *et al.*, 2004b; Engel *et al.*, 2003; Oefner *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2003; Thoma *et al.*, 2003). Abbott *et al.* zeigten im Jahr 1999, dass durch Variation der Aminosäuren E205 und E206 die katalytische Aktivität bei der Hydrolyse von Dipeptidderivatsubstraten (Gly-Pro-pNA) stark beeinflusst wird (Abbott *et al.*, 1999). Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten vor allem die Rolle dieser Aminosäuren bei der Bindung von Peptidhormonen beschreiben.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der negativen Ladung durch Variation von E205 und E206 die Substratbindung wesentlich beeinträchtigt (siehe Abb. 4.7, Tab. 3.8 und

Tab. 3.16-3.17). Allerdings zeigten sich stärkere Auswirkungen bei der Variante E206L-rhDP IV, hier waren neben den K_m -Werten auch die k_{cat} -Werte beeinflusst. Bei der Hydrolyse von Lys-Ala-AMC durch E205A-rhDP IV war ebenfalls der k_{cat} -Wert verringert.

Für die Spaltung von Xaa-Pro-Substraten ist die Deacylierungsreaktion geschwindigkeitsbestimmend (siehe Abschnitt 1.1.3) (Rahfeld *et al.* 1991a). Folglich könnte die Fixierung des N-Terminus durch E205 bei der Bildung des Acylenzyms eine Rolle spielen. Zudem ist möglich, dass die Fixierung des N-Terminus durch E205 für die Bildung des Acylenzyms nur dann notwendig ist, wenn sich kein Prolin in P_1 -Position befindet. Dagegen ist die Interaktion zwischen E206 und dem Substrat-N-Terminus sowohl während der Substratbindung, als auch für die Acylierungs- und Deacylierungsreaktion essentiell.

Die Fixierung des Substrat-N-Terminus scheint für die Bindung von Tripeptiden ebenso relevant zu sein, wie für die Bindung der Dipeptidderivate. Der ermittelte K_i -Wert für Diprotin B war mit 26 mM sehr hoch, ebenso kann der K_m -Wert in diesem Bereich angenommen werden (siehe Abschnitt 4.3.1). Die Ermittlung der kinetischen Parameter k_{cat} und K_m und somit die Differenzierung zwischen Beeinträchtigung der Substratbindung oder Hydrolyse sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.

Die Varianten E206L-rhDP IV und E205A-rhDP IV waren weder zur Hydrolyse von GIP noch von PACAP38 fähig (siehe Tab. 3.19). NP Y konnte nicht durch E206L-, aber durch E205A-rhDP IV prozessiert werden. Die kinetischen Daten für die Hydrolyse von NP Y durch E205A-rhDP IV zeigten, dass eine deutliche Beeinflussung des K_m -Wertes vorliegt (Faktor 14) (siehe Tab. 3.21). Im Gegensatz zu den Dipeptidderivaten ist hier der k_{cat} -Wert um den Faktor 4 verringert. Die Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit der Fixierung des N-Terminus durch die Aminosäuren E205 und vor allem E206 bei der Substratbindung. Während die Fixierung des N-Terminus durch E206 für die Substratbindung und Hydrolyse essentiell ist, ist die Aminosäure in P_1 -Position des Substrates für die Hydrolyse von E205A-rhDP IV entscheidend. Daraus lässt sich ableiten, dass E205 ebenfalls zur optimalen Ausrichtung des Substrates beiträgt, vor allem wenn sich kein Prolin in P_1 -Position des Substrates befindet.

4.4 Kristallisation der rhDP IV

In dieser Arbeit konnte in *P. pastoris* exprimierte rhDP IV erfolgreich kristallisiert werden (siehe Abb. 3.16). Dabei entstanden Proteinkristalle aus glykosylierter- und deglykosylierter- Δ 1-36 rhDP IV mit N-terminalem His-Tag. Ebenso wurden Proteinkristalle der deglykosylierten rhDP IV-Variante N710Q hergestellt (siehe Abschnitt 4.3.2). Es gelang durch Röntgenanalyse einen Datensatz eines Kristalls der deglykosylierten Δ 1-36 rhDP IV mit einer Auflösung von 2,08 Å aufzunehmen (siehe Tab. 3.23). Die Co-Kristallisation mit einem Peptidhormon war bisher nicht erfolgreich. Mit der Etablierung der Kristallisationsbedingungen für rhDP IV besteht für die Firma probiodrug AG zukünftig die Möglichkeit, mit Hilfe von Co-Kristallisation oder *Soaking*-Experimenten Auskunft über die Orientierung und Wechselwirkungen von Effektoren zu erhalten. Geplant sind außerdem Studien mit einer Auswahl von Peptidhormonsubstraten, wodurch der Weg des Substrates in das Enzym und eventuelle „sekundäre“ Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat und Möglichkeiten zu deren Inhibierung analysiert werden sollen (siehe Abschnitt 4.2). Des Weiteren können anhand von DP IV-Varianten zukünftig Struktur- und Funktionsbeziehungen bei der Hydrolyse oder Interaktion von Bindungspartnern, Substraten und Inhibitoren aufgeklärt werden.

4.5 Inaktivierung von Humanin durch PEP

Parallel zu den detaillierten Untersuchungen zur DP IV-Substratkatalyse von Peptiden wurde in diesem Teil der Arbeit die Substratspezifität der mit DP IV verwandten Endopeptidase PEP (EC 3.4.21.26) gegenüber natürlichen Substraten analysiert. Die Charakterisierung von potentiellen PEP-Substraten gibt Hinweise zur weitgehend unbekanntem zellulären Funktion des Enzyms und die therapeutische Relevanz für den Einsatz von PEP-spezifischen Inhibitoren.

Hierfür wurde die Expression der humanen PEP nach Transformation eines zur Verfügung gestellten Expressionsplasmids (PEP kloniert in pQE-31) in M15 *E. coli*-Zellen etabliert. Das Enzym konnte mittels Metallchelatchromatographie, anschließender Anionentauschchromatographie (DEAE-Sephacel und MonoQ Säule) und hydrophobe Interaktionschromatographie (Buthyl-Sepharose) isoliert werden (siehe Abschnitt 2.2.8 und Abb. 3.17).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Humanin (HN, bestehend aus 24 Aminosäuren) ein potentielles Substrat der PEP darstellt, welches durch die katalytische Aktivität des Enzyms in seiner Funktion als „Rettungsfaktor“ gegen neuronalen Zelltod inaktiviert werden kann (siehe Abschnitt 3.8). HN wird von einem 75 bp Gen auf der mitochondrialen 16S Ribosomen RNA codiert (Guo *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2001b). Der Beweis für die intrazelluläre Expression von HN konnte mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers über Western-Blot-Analyse erbracht werden (Tajima *et al.*, 2002).

In anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass neuronaler Zelltod, ausgelöst durch Mutationen in FAD-(Familiäre Alzheimer Erkrankung) Genen, A β , Serumsentzug oder die

Applikation von Staurosporin (Kinaseinhibitor) durch HN verhindert werden konnten (Hashimoto *et al.*, 2001b; Kariya *et al.*, 2003; Sponne *et al.*, 2004). Die Arbeitsgruppe von Guo *et al.* konnte mit Hilfe eines „Yeast Two Hybrid Screens“ HN als selektiven intrazellulären Bindungspartner von Bax nachweisen (Guo *et al.*, 2003). Die Assoziation mit Bax blockiert die Wanderung von Bax in die Mitochondrien und somit die Freisetzung von Cytochrom C, welches zu einer Caspase-3 und-9 vermittelten Apoptose führt.

Bei der Alzheimer Erkrankung wird als ein hauptsächliches pathophysiologisches Ereignis das Absterben von neuronalen Zellen beobachtet. Der Schutz dieser Zellen ist ein wichtiger therapeutischer Ansatz zur Behandlung dieser Krankheiten. Unter der Annahme, dass HN als „Rettungsfaktor“ gegen neuronalen Zelltod in der Zelle durch PEP proteolytisch inaktiviert werden kann, würde die Inhibierung des Enzyms einen Schutz für HN darstellen und somit die Bax induzierte Apoptose verhindern (Abb. 4.10).

Die Bindung von HN an Bax ist abhängig von einer intakten „Kernregion“ des Peptids (Aminosäuren Prolin 3 bis Prolin 19) (siehe Abb. 3.18) (Hashimoto *et al.*, 2001a; Yamagishi *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PEP durch Hydrolyse innerhalb dieser Region HN inaktiviert (siehe Abb. 3.19). Dieser Mechanismus könnte einen Kontrollpunkt für Apoptose und / oder die intrazelluläre Homöostase des Peptids darstellen. Nach 90 Minuten Inkubation von HN mit PEP unter physiologischen Bedingungen wurde das Peptid fast vollständig abgebaut. Neben der *in vitro* gezeigten Inaktivierung von HN wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie auch nach Inkubation des Peptids mit Zellextrakt von humanen U343-Zellen ausschließlich die gleichen Abbauprodukte detektiert (siehe Abb. 3.21). Bei den *in vitro* wie auch den Experimenten mit Zellextrakten war es möglich die Hydrolyse von HN durch die Serinprotease PEP nur durch Enzym-spezifische oder allgemeine Serinprotease-Inhibitoren zu verhindern.

Interessant ist, dass in unabhängigen Experimenten gezeigt wurde, dass die Inhibierung der PEP in neuronalen Zellen zu ähnlichen physiologischen Effekten führt, wie die Applikation oder Expression von HN (siehe Abschnitt 1.2.3).

Während der Applikation von PEP-spezifischen Inhibitoren an einem Ischämie-Rattenmodell, bzw. bei primären Neuronen in Zellkulturversuchen konnte die Protektion vor neuronalem Zelltod und ein effektiver Aufschub bei altersbedingter Apoptose festgestellt werden (Katsube *et al.*, 1999; Shishido *et al.*, 1999). Durch Expression von HN in der Zelllinie CSM14.1 konnte gleichfalls die Induktion von Apoptose durch u.a. den Kinase-Inhibitor Staurosporin, durch Serumsentzug (Kariya *et al.*, 2002), durch ein lösliches Prion-Fragment (Aminosäuren 118-135) oder durch Behandlung mit UV-Licht verhindert werden. Im Gegensatz dazu konnte der Bax-unabhängige Zelltod, wie z.B. durch Stimulation mit dem Tumor Nekrose Faktor, durch HN nicht verhindert werden (Guo *et al.*, 2003). Die Neurotoxizität von Glutamat oder den fibrillären Teil des Prionenfragments (Aminosäuren 106-126) gegenüber primären Neuronen und F11 Hybridomazellen wurde durch HN ebenfalls nicht beeinflusst (Hashimoto *et al.*, 2001a; Sponne *et al.*, 2004).

Die Effekte von PEP-Inhibierung und HN-Applikation waren bei Gedächtnisstörungen ebenfalls vergleichbar. Gedächtnisstörungen, die durch Elektroschocks oder Scopolamin induziert wurden, konnten durch die Inhibierung der PEP behoben werden (Nanri und Kaneto, 1987; Yoshimoto *et al.*, 1987). Es wurden bereits klinische Phase I Studien mit PEP-Inhibitoren als „kognitive Verstärker“ für Lern- und Gedächtnisstörungen durchgeführt (Morain *et al.*, 2000; Umemura *et al.*, 1997; Umemura *et al.*, 1999). Die Applikation von HN bei Mäusen führte ebenfalls zur Verhinderung der durch Scopolamin ausgelösten Kurzzeitgedächtnisstörungen (Mamiya und Ukai, 2001).

Die Organspezifische und subzelluläre Lokalisation der PEP und HN sind vergleichbar. So ist bekannt, dass die höchsten PEP-Aktivitäten im Gehirn zu finden sind (Gallegos *et al.*, 1999; Irazusta *et al.*, 2002; Mentlein *et al.*, 1990). Für HN wurde ein ähnliches Verteilungsmuster im Körper beschrieben (Tajima *et al.*, 2002). Es konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass PEP intrazellulär lokalisiert ist (mündliche Mitteilung von Dr. Ingo Schulz, probiodrug AG) (Dresdner *et al.*, 1982; Hasebe *et al.*, 2001). Die Bindung von HN und Bax findet ebenfalls intrazellulär statt und verhindert, dass das diffus im Zytosol vorliegende Bax in die Mitochondrien wandert und dort Apoptose auslöst (Abb. 4.10) (Wolter *et al.*, 1997).

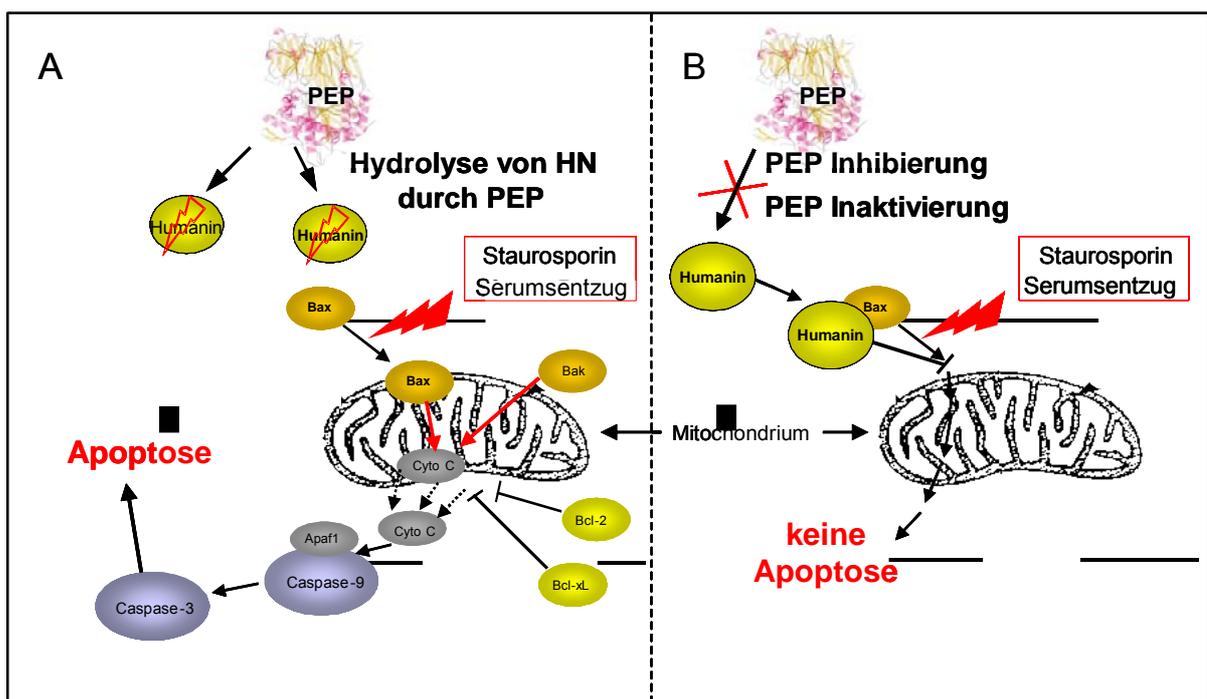


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der möglichen Rolle der PEP (A) und dessen Inhibierung (B) bei Bax-vermittelter Apoptose. Möglicherweise könnte die Inhibierung der PEP die Inaktivierung von HN verhindern. Dadurch wäre HN bei Apoptoseinduktion (z.B. durch Seumsentzug oder Staurosporin) in der Lage, Bax zu binden. Damit wird Bax an der Freisetzung von Cytochrom C (Cyto C) und der Induktion des Caspase-9 und -3 vermittelten Zelltods gehindert. Bcl-xL und Bcl-2 sind wie Bak und Bax Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, wobei erstere den Austritt von Cytochrom C verhindern, letztere begünstigen.

Als weitere Interaktionspartner von HN wurde neben Bax auch das Protein TRIM11 (Tripartit Motif11) beschrieben. Es wird diskutiert, ob TRIM11 eine Rolle bei der Regulation des HN-Spiegels in der Zelle spielt, indem TRIM11 den Abbau des Peptids über Ubiquitin

vermittelt (Niikura *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu dem zuvor diskutierten ubiquitären HN-Abbau lässt sich die proteolytische Funktion der intrazellulären PEP schnell und effizient durch pH- oder Redoxpotentialänderung regulieren (Szeltner *et al.*, 2000; Szeltner *et al.*, 2003). Somit ist es denkbar, dass PEP ein Kontrollenzym für die Homöostase von HN ist. Die Inhibierung der PEP *in vitro* und im Zellextrakt führte dazu, dass die für den Schutz vor Apoptose funktionelle „Kernregion“ intakt blieb (Abb. 4.10 und siehe Abb. 3.18-3.21).

Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten nach Inkubation mit PEP zwei Spaltstellen innerhalb der Kernregion von HN identifiziert werden. Neben der zu erwartenden post-Prolin-Spaltung (nach Prolin in Position drei) kam es zu einer Prozessierung des Peptids am Cystein an Position acht (siehe Abb. 3.19). Eine vergleichbare post-Cystein-Hydrolyse durch PEP wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Hydrolyse im aktiven Zentrum der PEP erfolgte, da die post-Prolin und post-Cystein spezifische Hydrolyse von HN durch PEP nur mit Hilfe der PEP spezifischen Inhibitoren (ZW215 und ZW164) oder den Serinproteaseinhibitor AEBSF verhindert werden konnte (siehe Abb. 3.20).

Der Abbau von HN ist ebenfalls an das Vorhandensein des Serinrestes (S544) im aktiven Zentrum der PEP gebunden. So war die PEP-Variante S554A nicht in der Lage, HN zu hydrolysieren (siehe Abb. 3.20).

PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* weist eine ähnliche Substratspezifität wie das humane Enzym auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass HN von beiden Enzymen unter Erhalt von identischen Abbauprodukten umgesetzt und durch Enzym-spezifische Effektoren inhibiert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass HN allgemein durch PEP mittels einer post-Cysteinspaltung hydrolysiert werden kann.

In der S₁-Bindungsstelle akzeptiert PEP vor allem Aminosäuren mit kurzen Seitenketten (Fülöp *et al.*, 1998). Der Austausch von Cystein gegen Alanin [HN(C9A)] oder Glycin [HN(C9G)] in HN führte gleichfalls zu einer PEP abhängigen Hydrolyse in derselben Position. Beide Aminosäuren weisen eine relativ kleine Seitengruppe auf und könnten somit aufgrund ihrer Größe in der S₁-Bindungstasche durch das Enzym akzeptiert werden. Die voluminöse, hydrophobe Aminosäure Phenylalanin wurde von PEP in P₁-Position nicht akzeptiert und HN(C9F) nicht durch das Enzym prozessiert (siehe Tab. 3.24). Die beobachtete Spezifität der PEP gegenüber den Aminosäuren in P₁-Position entspricht somit der von DP IV bekannten Substratspezifität (siehe Abschnitt 1.1.3). Die Tatsache, dass Cysteine nur selten in Peptidsequenzen vorkommen oder wie bei einer Reihe von Chemokinen [z.B. RANTES, MIG (Monokin induziert durch INF- γ), Eotaxin, IP-10 (INF- γ -induzierbares Protein 10), SDF-1 α (*Stromal derived factor-1 α*) und MDC (*Macrophage-derived chemokine*)] über Cysteinbrücken verbunden sind könnte eine Begründung dafür sein, warum eine post-Cysteinspaltung bisher nicht beobachtet wurde.

Die Aminosäuresequenz von HN weist ein zweites Prolin an Position 19 auf. Eine Hydrolyse durch PEP nach diesem Prolin, auch nach Verkürzung der Peptidkette, konnte nicht nachgewiesen werden. Die relativ große Distanz zum N-Terminus des Peptids oder die

Peptidsequenz im Bereich von Prolin(19) könnte dafür verantwortlich sein, dass das Peptid in dieser Position nicht hydrolysiert wurde (siehe Tab. 3.24).

Das auch die prolin-spezifische DP IV in der Lage ist, Cystein als Aminosäure in P₁-Position von Substraten zu erkennen, konnte in dieser Arbeit erstmals anhand eines modifizierten GIP-Substrates (GIP-A2C) für das Enzym gezeigt werden. Dabei wurde durch DP IV vom Substrat-N-Terminus das Dipeptid Tyr-Cys- freigesetzt (siehe Abb. 3.22). Zwischen PEP und DP IV sind die Interaktionen mit der Aminosäure in P₁-Position und die Bindung des Peptidrückgrats vergleichbar, was die ähnliche Spezifität von beiden Enzymen für Cystein in P₁-Position erklärt. GIP-A2C wurde sogar deutlich schneller durch rhDP IV umgesetzt, als Wildtyp-GIP mit Alanin in P₁-Position. Ob sich die höhere Spezifität der DP IV gegenüber Cystein im Vergleich zu Alanin in P₁-Position auch mit Dipeptidsubstratderivaten bestätigt, bleibt weiteren Studien vorbehalten.

Die Eigenschaft zweier unterschiedlicher Vertreter der Strukturklasse der Prolyl Oligopeptidasen, Substrate nach der Aminosäure Cystein zu hydrolysieren war bisher unbekannt. Mit dem PEP-Substrat HN wird deutlich, dass dies eine wesentliche, bisher unentdeckte Regulationsmöglichkeit durch diese Enzymklasse ist. Abschließend sei hervorzuheben, dass bisher keine Enzyme bei Säugetieren gefunden wurden die nach Cystein mit hoher Effizienz spalten können. Bekannt sind auto-katalytische Prozesse durch Virus- (NS3 Polyprotein Peptidase des *Hepatitis C Viruses* und die Npro Endopeptidase des *Pestiviruses*) oder bakterielle- (UmuD Protein aus *E. coli* und Fragilysin aus *Bacteroides fragilis*) Proteasen (McDonald *et al.*, 1998; Rumenapf *et al.*, 1998; Urbani *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu PEP und DP IV weist keines dieser Enzyme eine post-Prolin-Spezifität auf.

5 Zusammenfassung

Die multifunktionelle Serinprotease Dipeptidylpeptidase IV/CD26 (DP IV) ist in der Lage Dipeptide vom N-Terminus von Peptiden abzuspalten und diese damit in ihrer Funktion zu aktivieren oder zu deaktivieren. Aufgrund dessen ist das Prolin-spezifische Enzym in eine Vielzahl von physiologischen Prozessen wie z.B. der Blutzuckerhomöostase involviert.

Inhalt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen von Struktur- und Funktionsbeziehungen mit humaner DP IV bezüglich der Hydrolyse von höher- und niedermolekularen Substraten bzw. Inhibitoren nach Etablierung und Optimierung einer Expressions- und Isolierungsstrategie zur Herstellung des rekombinanten Enzyms.

DP IV existiert sowohl als Typ II Transmembranprotein auf der Oberfläche von Endothel- und Epithelzellen, als auch in löslicher Form in Körperflüssigkeiten. Der Transmembranteil der humaner DP IV wurde durch sechs Histidine ersetzt, wodurch es erstmals gelang das Enzym in löslicher Form in *P. pastoris* im 2-10 l Fermentationsmaßstab zu exprimieren. Dabei konnten 0,8-3 mg Enzym pro Liter Fermentationsmedium über zwei Chromatographieschritte bis zur Homogenität isoliert werden.

Durch den Einbau von zwei 6-flügeligen Hohlblattrührern mit niedriger Energieeintragskennzahl wurde die Fermentation von *P. pastoris* optimiert. Dadurch ist es möglich die Fermentation ohne zusätzliche Sauerstoffzufuhr durchzuführen. Die so erhaltene Biomasse und die erzielten Produktmengen (rhDP IV) waren mit den Ergebnissen herkömmlicher Methoden vergleichbar.

Zukünftig erlaubt die optimierte Expression und Isolierung der rekombinanten humanen DP IV (rhDP IV) Inhibitoren und Substrate innerhalb der Firma probiodrug AG anhand des humanen Enzyms zu charakterisieren.

Bisher wurde dafür bei der probiodrug AG native DP IV, isoliert aus Schweineiere (ssDP IV) verwendet. Die biochemischen und kinetischen Eigenschaften der rhDP IV wurden mit denen der ssDP IV verglichen. Für die Interpretation der Ergebnisse wurde die bisher unbekannt Gensequenz der ssDP IV mittels RT-PCR ermittelt (88 % Identität der Aminosäuresequenzen von humaner- und ssDP IV) (*GenBank accession number* für die Sequenz der ssDP IV: AY198323). Die ermittelten kinetischen Parameter gegenüber niedermolekularen Substraten und Inhibitoren waren für beide Enzyme vergleichbar. Hingegen zeigten sich Unterschiede bei der Interaktion mit dem DP IV-Bindungspartner Adenosindeaminase (ADA) (ADA-rhDP IV: $K_d = 2,15 \pm 0,18$ nM beziehungsweise ADA-ssDP IV: $K_d = 7,38 \pm 0,54$ nM) und der Hydrolyse von höhermolekularen Substraten wie GLP-1, VIP und PACAP27.

Die kinetische Charakterisierung der DP IV wird üblicherweise mit synthetischen, niedermolekularen Substraten oder Inhibitoren durchgeführt. Die kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen der DP IV zeigen aber auch mögliche Wechselwirkungen zu Inhibitoren oder Peptidsubstraten in der Nähe des katalytischen Zentrums. Der Einfluss der Aminosäuren R125, E205, E206, Y547, W629, Y631 und N710 auf diese Wechselwirkungen wurde mit Hilfe von Mutationsstudien untersucht. Zur Ermittlung der kinetischen Parameter K_m und k_{cat} für die

Hydrolyse der physiologischen DP IV-Substrate NP Y (Prolin in P₁-Position), GIP (Alanin in P₁-Position) und PACAP38 (Serin in P₁-Position) gelang es eine Methode zur Quantifizierung des Reaktionsproduktes mittels HPLC-MS/MS-Analytik zu etablieren. Im Ergebnis der Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass mit dipeptidanalogen Substraten bzw. Inhibitoren gemessenen Daten nicht direkt auf die Hydrolyse von physiologischen Substraten übertragbar sind. Durch den Aminosäureaustausch von N710 und R125 wurde deutlich, dass N710 essentiell für die Bindung dipeptidanaloger Strukturen ist, während R125 hier keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Beide Aminosäuren sind insbesondere zur Hydrolyse von längeren Peptidsubstraten notwendig, wenn sich Alanin oder Serin in P₁-Position befinden. Damit wurde erstmalig gezeigt, dass bei der Bindung und Hydrolyse von Peptiden, die kein Prolin in P₁-Position aufweisen, die Interaktion der Aminosäuren R125 und N710 mit dem Peptidrückgrat des Substrates eine entscheidende Rolle spielen.

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Fixierung des protonierten Substrat-N-Terminus von den zwei Glutaminsäuren E205 und E206 abhängig ist. Allerdings ist die Prozessierung von Substraten mit Prolin in P₁-Position ohne Beteiligung von E205 möglich. Anhand der in dieser Arbeit dargestellten Resultate kann auch angenommen werden, dass die Amidgruppe von Y631 und die Hydroxylgruppe von Y547 bei der Bildung des Oxyanion-Übergangszustands beteiligt sind.

Weitere Ergebnisse zeigen, dass der P₁-Position eine unterschiedliche Bedeutung bei der Hydrolyse von höher- und niedermolekularen Substraten zukommt. Die spezifische Aktivität, ermittelt für Dipeptidderivatsubstrate mit Prolin, Alanin oder Serin in P₁-Position wies einen Unterschied um bis zu zwei Größenordnungen auf. Substrate bestehend aus 29 Aminosäuren mit identischer Aminosäuresequenz die nur in P₁-Position variieren (Prolin, Alanin, Serin) wiesen eine vergleichbare katalytische Effizienz auf. Somit scheint für die Substraterkennung von physiologischen Peptidsubstraten die Länge und damit weitere „sekundäre“ Wechselwirkungen, außerhalb des katalytischen Zentrums eine Rolle zu spielen. Dies konnte durch die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen von Glukagon abgeleiteten unterschiedlich langen Peptiden bestätigt werden. Erst bei Peptiden mit mehr als acht Aminosäuren konnte eine deutliche Inhibierung gegenüber der Spaltung von Gly-Pro-pNA ermittelt werden. Mit zunehmender Kettenlänge wurde die Inhibierung weiter verstärkt.

Auf Grundlage der ermittelten Substratlänge für die Stabilisierung von Peptidsubstraten wurde eine mögliche Inhibierung von „sekundären“ Wechselwirkungen untersucht. Im Ergebnis gelang es mit dem Hexapeptid TFTSDY, abgeleitet von dem innerhalb der GRF/Glukagon-Peptidfamilie hoch homologen Bereich der Aminosäuren 5-10, erstmals substratspezifisch die Hydrolyse von Glukagon und GIP (Peptide der GRF/Glukagon-Familie) um den Faktor 13 (für Glukagon) bzw. 20 (für GIP) zu verlangsamen. Im Gegensatz dazu war die Umsatzgeschwindigkeit des Chemokins RANTES(1-15) durch das Peptid TFTSDY nicht beeinträchtigt. Die im katalytischen Zentrum stattfindende Hydrolyse von Dipeptidderivat-substraten wurde durch das Hexapeptid nicht behindert. Mit diesem neuen potentiellen

Inhibitor ist es somit zum ersten Mal möglich, gezielt zwischen einzelnen Peptidsubstraten zu unterscheiden.

Der Bereich, der anhand der Ergebnisse für „sekundäre“ Wechselwirkungen postuliert wurde, konnte durch den Aminosäureaustausch R560A in rhDP IV und die daraus resultierende Verlangsamung der Umsatzgeschwindigkeit für die Peptide GIP und PACAP38 weiter bestätigt werden.

Im Verlauf der Charakterisierungsstudien wurde die DP IV katalysierte Hydrolyse eines bis dahin in der Literatur als resistent gegenüber DP IV beschriebenen Substrates, Pancreatic Polypeptid (36 Aminosäuren lang, Prolin in P₁-Position, gehört zur Pancreatic Polypeptid-Peptidfamilie) gezeigt.

Mit der in dieser Arbeit exprimierten rhDP IV war es möglich erfolgreich Proteinkristalle zu erzeugen und ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,08 Å aufzunehmen. Damit gelang es ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Inhibitor- und Substratbindungseigenschaften (u.a. „sekundäre“ Interaktionen) innerhalb der Firma probiodrug AG zu etablieren. Es wurden bereits Versuche für die Co-Kristallisation mit einer Reihe von niedermolekularen Inhibitoren und Peptidsubstraten durchgeführt. Die Kristalle sollen demnächst am Synchrotron in Hamburg untersucht werden.

Die Prolylendopeptidase (PEP) stammt aus derselben Proteasefamilie S9 wie die Exopeptidase DP IV. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Hydrolyse von natürlichen Substraten und die Bedeutung der Aminosäure in P₁-Position für die Katalyse durch die Endopeptidase PEP untersucht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass das aus 24 Aminosäuren bestehende Peptid Humanin (HN) ein Substrat der intrazellulär vorkommenden PEP darstellt. HN gilt als Rettungsfaktor gegen Bax induzierte Apoptose in neuronalen Zellen. Diese Funktion geht durch Prozessierung innerhalb eines „Kernbereichs“ (Aminosäuren 3-19) des Peptids verloren. Es konnte *in vitro* und in Zellextrakt von humanen U343-Gliazellen gezeigt werden, dass HN durch PEP innerhalb dieser Region gespalten und damit inaktiviert wird. Neben einer post-Prolin(3) Prozessierung wurde auch erstmals eine Hydrolyse am C-Terminus von Cystein(8) nachgewiesen. Weiterhin wird HN ebenfalls durch PEP hydrolysiert, wenn das in Position acht befindliche Cystein gegen Glycin oder Alanin ausgetauscht wurde.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse scheint es möglich, dass die Inaktivierung von HN durch PEP einen Kontrollpunkt bei der Apoptose von neuronalen Zellen darstellt und / oder die intrazelluläre Homöostase von HN durch das Enzym PEP kontrolliert wird. Ein neuer Therapieansatz bei Alzheimer Erkrankung könnte somit der Einsatz von zellgängigen PEP-Inhibitoren darstellen.

Die bisher unbekannte Substratspezifität gegenüber Cystein in P₁-Position konnte auch erstmals für DP IV, nach dem Austausch von Alanin gegen Cystein an vorletzter Position von GIP (A2C-GIP), nachgewiesen werden.

6 Summary

Dipeptidyl peptidase IV/CD26 (DP IV) is a multifunctional serine protease hydrolyzing the release of dipeptides from the N-terminus of oligopeptides and small polypeptides. The proline specific enzyme can either inactivate or activate by its catalytic action, a variety of peptides. Therefore DP IV is involved in a number of physiological processes, for example, blood glucose homeostasis.

This work deals with structural and functional relation studies of DP IV regarding its hydrolytic action on substrates (physiological substrates and dipeptide derivatives) and inhibitor binding after previously establishing and optimizing the expression and purification of human recombinant DP IV.

The enzyme is expressed on the surface of epithelial and endothelial cells as a type II transmembrane protein. However, soluble DP IV is also present in bodily fluids. After replacing the membrane anchor with a His-Tag, the large-scale expression of the soluble human recombinant enzyme using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, yielded 0.8-3 mg DP IV protein per liter fermentation supernatant. The enzyme could be purified to homogeneity in two chromatography steps.

It is demonstrated that bioreactor construction is of practical importance to some recombinant protein production processes. This work focused on the oxygen mass transfer of the bioreactor while fermenting yeast cultures which depicts a limitation to productivity that must be overcome artificially by the supplement of molecular oxygen in the aeration stream. However, when, the standard Rushton turbines in the bioreactor are replaced by a set of lower-power number impellers, it is possible to operate the reactor without additional oxygen while obtaining comparable growth rates and productivities. In the future, the optimized expression and purification procedure will allow kinetic characterization studies of inhibitors and substrates to be performed with human recombinant DP IV.

The characterization of human recombinant DP IV confirmed proper folding and glycosylation similar to DP IV purified from porcine kidney. The kinetic comparison of both proteins, using short synthetic substrates and inhibitors, revealed similar characteristics. In contrast, the enzyme adenosine deaminase (ADA) binds stronger to human than to porcine DP IV ($K_D = 2.15 \pm 0.18$ nM and $K_D = 7.38 \pm 0.54$ nM, respectively). Even though, the sequence of porcine DP IV generated by RT-PCR (gene bank accession number of the sequence from porcine DP IV: AY198323) revealed an 88 % identity between both enzymes, the species variations between the two enzymes are likely to be responsible for the differences in ADA-binding and in the kinetics measured with natural peptide substrates such as GLP-1, VIP and PACAP27.

DP IV is often characterized by its ability to release chromophores (pNA) or fluorophores (AMC) from dipeptide substrates. Recent publications of the crystal structure of DP IV revealed further interactions between substrates or inhibitors near the catalytic triad that might support enzyme catalysis and determine substrate specificity. In order to elucidate the function and the contribution of single amino acids, such as R125, E205, E206, Y547, W629, Y631 and N710, which surround the catalytic triad of DP IV, their specific role was investigated by carrying out mutagenesis studies. A HPLC-MS/MS method was established to allow, for the first time, the measurement and determination of the kinetic constants, K_m and k_{cat} , for the peptide substrates NP Y (proline in P_{1-} position) GIP (alanine in P_{1-} position) and PACAP38 (serine in P_{1-} position). It was shown, that the kinetics found with synthetic dipeptide derivatives was not the same as that observed with physiological substrates. The amino acid exchange of N710 and R125 showed that N710 is essential for binding of dipeptide derivatives while R125 is not. However, both amino acids play an essential role in the binding and hydrolysis of long natural substrates with alanine (GIP) or serine (PACAP38) in the P_{1-} position while substrates with proline in this position are not dependent on the amino acids R125 and N710. As a result, it was shown that the amino acids R125 and N710 play an essential role by interacting with the peptide backbone of substrates.

Furthermore, it was confirmed that the fixation of the protonated substrate N-terminus is dependent on the amino acids E205 and E206. However, substrates displaying proline in P_{1-} position are still processed without the participation of E205. The results of this work also support the fact that the hydroxyl group of Y547 and the amide group of Y631 participate in the formation of the oxyanion transition state.

This work verifies the fact that the P_{1-} position contributes differently in the catalysis of low molecular weight substrates or physiological substrates. The K_m/k_{cat} -values for dipeptide substrates with proline, alanine or serine in the P_{1-} position varied by two orders of magnitude while the specific activity determined for substrates consisting of 29 residues with the same amino acids in the same position were comparable. Due to these results the question was addressed whether a certain chain length and possible "secondary" interactions are necessary for substrate recognition. A set of successive prolonged peptides beginning with the N-terminal four amino acids of the glucagon sequence were analyzed in a competitive inhibition assay with Gly-Pro-pNA. The first significant inhibition was found with glucagon sequences longer than 8 residues. Ascending chain length further enhanced the inhibition effect.

Based on the findings that a certain chain length is necessary to stabilize peptide binding, possible inhibition of these "secondary" interactions was investigated. It was found that the hexapeptide TFTSDY, deduced from a conserved region localized at the N-terminal region of the GRF/glucagon family, inhibited the hydrolysis of GIP (20 times longer half live time) and

glucagon (13 times longer half live time) which are members of this peptide family. In contrast, no inhibition was found when incubating with the chemokine RANTES(1-15) (not a homologue to TFTSDY in the peptide's N-terminus) or dipeptide substrate derivatives that only bind to the catalytic site of DP IV. Consequently, this new class of inhibitor directed against "secondary" interactions between enzyme and substrate allows for the first time to distinguish between substrate families avoiding putative severe side effects in therapy, based on the inhibition of DP IV catalysis.

During the characterization studies, it was demonstrated, that the pancreatic polypeptide (36 amino acids of length, proline in the P₁-position), a member of the pancreatic polypeptide family, is a substrate of DP IV.

A dataset with a resolution of 2.08 Å was obtained from protein crystal analysis by X-Ray Diffraction experiments with human recombinant DP IV. This technique was established to allow the characterization of inhibitor- or substrate-binding ("secondary" interactions) by soaking or co-crystallization experiments. Co-crystallization of human recombinant DP IV with different low molecular weight inhibitors and physiological substrates were previously carried out and will soon be analyzed on the synchrotron in Hamburg.

Prolyl endopeptidase (PEP; also called prolyl oligopeptidase) belongs to the same protease family (S9) as the exopeptidase, DP IV. The specificity for amino acids in the P₁-position and the catalysis of natural substrates by intracellular located PEP was investigated in this work.

It could be demonstrated, that Humanin (HN) (consists of 24 amino acids), a recently described intracellular located peptide with a protective effect against Bax induced cell death, is processed by PEP. This protective effect is lost when the peptide is cleaved within a core region (amino acid 3-19) which interacts with Bax and thereby inhibits the delocalization of Bax into the mitochondria where it mediates cytochrome c release and cell death. It was shown that PEP has the potential to specifically cleave [after proline(3)] and inactivate HN within this core region. In addition, unexpected post-cysteine(8) specific hydrolysis of HN was observed. The specificity of the enzyme for both cleavage sites was demonstrated by inhibition of PEP and amino acid exchanges at the specific cleavage sites. These findings allow speculation regarding the role of PEP in controlling the active levels of HN by determining its action in neuronal cell protection. Consequently, a new therapeutic approach for the treatment of the Alzheimer disease could be an application of PEP inhibitors. The previously undiscovered specificity for a post-cysteine cleavage was also demonstrated with DP IV, by processing the GIP variant A2C-GIP after the cysteine residue.

7 Literaturverzeichnis

- Abbott, C.A., McCaughan, G. W., und Gorrell, M. D. (1999). Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted beta propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity. *FEBS Lett.* 458, 278-284.
- Aertgeerts, K., Ye, S., Shi, L., Prasad, S. G., Witmer, D., Chi, E., Sang, B. C., Wijnands, R. A., Webb, D. R., und Swanson, R. V. (2004a). N-linked glycosylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26): effects on enzyme activity, homodimer formation, and adenosine deaminase binding. *Protein Sci.* 13, 145-154.
- Aertgeerts, K., Ye, S., Tennant, M. G., Kraus, M. L., Rogers, J., Sang, B. C., Skene, R. J., Webb, D. R., und Prasad, G. S. (2004b). Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci.* 13, 412-421.
- Ahmad, S., Wang, L., und Ward, P. E. (1992). Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 1257-1261.
- Akrawi, A.F. und Bailey, G. S. (1976). Purification and specificity of prolyl dipeptidase from bovine kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 422, 170-178.
- Aoyagi, T. und Muraoka, Y. (1993). [Prolyl endopeptidase inhibitors]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 38, 1971-1986.
- Aoyagi, T., Nagai, M., Ogawa, K., Kojima, F., Okada, M., Ikeda, T., Hamada, M., und Takeuchi, T. (1991). Poststatin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase, produced by *Streptomyces viridochromogenes* MH534-30F3. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)* 44, 949-955.
- Atack, J.R., Suman-Chauhan, N., Dawson, G., und Kulagowski, J. J. (1991). In vitro and in vivo inhibition of prolyl endopeptidase. *Eur. J. Pharmacol.* 205, 157-163.
- Bal, G., Van, d., V, Antonov, D., Lambeir, A. M., Grellier, P., Croft, S. L., Augustyns, K., und Haemers, A. (2003). Prolylisoxazoles: potent inhibitors of prolyloligopeptidase with antitrypanosomal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2875-2878.
- Bär, J.W., Gerhartz, B., Hoffmann, T., Rosche, F., und Demuth, H.-U. (2003a). Characterisation of human DP IV produced by a *Pichia pastoris* expression system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 524, 103-108.
- Bär, J., Weber, A., Hoffmann, T., Stork, J., Wermann, M., Wagner, L., Aust, S., Gerhartz, B., und Demuth, H.-U. (2003b). Characterisation of human dipeptidyl peptidase IV expressed in *Pichia pastoris*. A structural and mechanistic comparison between the recombinant human and the purified porcine enzyme. *Biol. Chem.* 384, 1553-1563.
- Barelli, H., Petit, A., Hirsch, E., Wilk, S., De Nanteuil, G., Morain, P., und Checler, F. (1999). S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 657-661.
- Barrett, A.J. und Rawlings, N. D. (1992). Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373, 353-360.
- Bird, A.P., Faltinek, J. R., und Shojaei, A. H. (2001). Transbuccal peptide delivery: stability and in vitro permeation studies on endomorphin-1. *J. Control Release* 73, 31-36.
- Bjelke, J.R., Christensen, J., Branner, S., Wagtmann, N., Olsen, C., Kanstrup, A. B., und Rasmussen, H. B. (2004). Tyrosine 547 constitutes an essential part of the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* 279, 34691-34697.

- Blomqvist, A.G. und Herzog, H. (1997). Y-receptor subtypes--how many more? *Trends Neurosci.* 20, 294-298.
- Bongers, J., Lambros, T., Ahmad, M., und Heimer, E. P. (1992). Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1122, 147-153.
- Boonacker, E. und Van Noorden, C. J. (2003). The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur. J. Cell Biol.* 82, 53-73.
- Bordallo, C., Schwencke, J., und Suarez, R. M. (1984). Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 173, 199-203.
- Bordusa, F. und Jakubke, H. D. (1998). The specificity of prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningoseptum*: mapping the S' subsites by positional scanning via acyl transfer. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1775-1780.
- Bouras, M., Huneau, J. F., Luengo, C., Erlanson-Albertsson, C., und Tome, D. (1995). Metabolism of enterostatin in rat intestine, brain membranes, and serum: differential involvement of proline-specific peptidases. *Peptides* 16, 399-405.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brandsch, M., Brandsch, C., Prasad, P. D., Ganapathy, V., Hopfer, U., und Leibach, F. H. (1995). Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter. *FASEB J.* 9, 1489-1496.
- Brandstetter, H., Kim, J. S., Groll, M., Gottig, P., und Huber, R. (2002). Structural basis for the processive protein degradation by tricorn protease. *Biol. Chem.* 383, 1157-1165.
- Brenner, S. (1988). The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334, 528-530.
- Broder, C.C., Nussbaum, O., Gutheil, W. G., Bachovchin, W. W., und Berger, E. A. (1994). CD26 antigen and HIV fusion? *Science* 264, 1156-1159.
- Brzezinska-Slebodzinska, E. und Adamczyk, J. (1979). Partial purification and characterization of the oxytocin-inactivating enzymes from chicken liver. *Acta Biochim. Pol.* 26, 407-416.
- Bühling, F., Kunz, D., Reinhold, D., Ulmer, A. J., Ernst, M., Flad, H. D., und Ansorge, S. (1994). Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells. *Nat. Immun.* 13, 270-279.
- Burcelin, R., Dolci, W., und Thorens, B. (1999). Long-lasting antidiabetic effect of a dipeptidyl peptidase IV-resistant analog of glucagon-like peptide-1. *Metabolism* 48, 252-258.
- Callebaut, C., Krust, B., Jacotot, E., und Hovanessian, A. G. (1993). T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4⁺ cells. *Science* 262, 2045-2050.
- Camargo, A.C., Almeida, M. L., und Emson, P. C. (1984). Involvement of endo-oligopeptidases A and B in the degradation of neurotensin by rabbit brain. *J. Neurochem.* 42, 1758-1761.
- Cheng, H.C., Abdel-Ghany, M., Elble, R. C., und Pauli, B. U. (1998). Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J. Biol. Chem.* 273, 24207-24215.
- Cregg, J.M., Vedvick, T. S., und Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N. Y.)* 11, 905-910.

- Cunningham, D.F. und O'Connor, B. (1997). Identification and initial characterisation of a N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal (Z-Pro-prolinal)-insensitive 7-(N-benzyloxycarbonyl-glycyl-prolyl-amido)-4-methylcoumarin (Z-Gly-Pro-NH-Mec)-hydrolysing peptidase in bovine serum. *Eur. J. Biochem.* 244, 900-903.
- Darmoul, D., Lacasa, M., Baricault, L., Marguet, D., Sapin, C., Trotot, P., Barbat, A., und Trugnan, G. (1992). Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 267, 4824-4833.
- David, F., Bernard, A. M., Pierres, M., und Marguet, D. (1993). Identification of serine 624, aspartic acid 702, and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl-peptidase IV (CD26). A member of a novel family of nonclassical serine hydrolases. *J. Biol. Chem.* 268, 17247-17252.
- De Meester, I., Kestens, L. L., Vanham, G. L., Vanhoof, G. C., Vingerhoets, J. H., Gigase, P. L., und Scharpe, S. L. (1995). Costimulation of CD4+ and CD8+ T cells through CD26: the ADA-binding epitope is not essential for complete signaling. *J. Leukoc. Biol.* 58, 325-330.
- De Meester, I., Korom, S., Van Damme, J., und Scharpé, S. (1999). CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today* 20, 367-375.
- De Meester, I., Vanhoof, G., Lambeir, A. M., und Scharpe, S. (1996). Use of immobilized adenosine deaminase (EC 3.5.4.4) for the rapid purification of native human CD26/dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5). *J. Immunol. Methods* 189, 99-105.
- Deacon, C.F., Hughes, T. E., und Holst, J. J. (1998). Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes* 47, 764-769.
- Demuth, H.-U. und Heins, J. (1995). Catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. In *Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in Metabolism and the Immune Response*. B.Fleischer, editor. Springer Verlag Heidelberg, 1-26.
- Demuth, H.-U., Kapitza, C., und Heise, T. (2004) Typ 2-Diabetes-Therapie mittels DPP-IV-Inhibitoren, Aus: GLP-1-Therapiepotential bei Diabetes mellitus, Baptist Gallwitz, *Uni-Med Verlag AG*, Bremen-London-Boston, 76-89.
- Demuth, H.-U., Schlenzig, D., Schierhorn, A., Grosche, G., Chapot-Chartier, M. P., und Gripon, J. C. (1993). Design of (omega-N-(O-acyl)hydroxy amid) aminodicarboxylic acid pyrrolidides as potent inhibitors of proline-specific peptidases. *FEBS Lett.* 320, 23-27.
- Dendorfer, A., Wolfrum, S., Wellhoner, P., Korsman, K., und Dominiak, P. (1997). Intravascular and interstitial degradation of bradykinin in isolated perfused rat heart. *Br. J. Pharmacol.* 122, 1179-1187.
- Diefenthal, T., Dargatz, H., Witte, V., Reipen, G., und Svendsen, I. (1993). Cloning of proline-specific endopeptidase gene from *Flavobacterium meningosepticum*: expression in *Escherichia coli* and purification of the heterologous protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 90-97.
- Dobers, J., Zimmermann-Kordmann, M., Leddermann, M., Schewe, T., Reutter, W., und Fan, H. (2002). Expression, purification, and characterization of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in Sf9 insect cells. *Protein Expr. Purif.* 25, 527.
- Dong, R.P., Tachibana, K., Hegen, M., Munakata, Y., Cho, D., Schlossman, S. F., und Morimoto, C. (1997). Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J. Immunol.* 159, 6070-6076.
- Dresdner, K., Barker, L. A., Orlowski, M., und Wilk, S. (1982). Subcellular distribution of prolyl endopeptidase and cation-sensitive neutral endopeptidase in rabbit brain. *J. Neurochem.* 38, 1151-1154.

- Drucker, D.J. (2001). Development of glucagon-like peptide-1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes. *Curr. Pharm. Des* 7, 1399-1412.
- Drucker, D.J. (2002). Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology* 122, 531-544.
- Drucker, D.J., Boushey, R. P., Wang, F., Hill, M. E., Brubaker, P. L., und Yusta, B. (1999). Biologic properties and therapeutic potential of glucagon-like peptide- 2. *JPEN. J. Parenter. Enteral. Nutr.* 23, S98-100.
- Drucker, D.J., DeForest, L., und Brubaker, P. L. (1997). Intestinal response to growth factors administered alone or in combination with human [Gly2]glucagon-like peptide 2. *Am. J. Physiol* 273, G1252-G1262.
- Egen, N.B. und Russell, F. E. (1984). Effects of preparatory procedures on the venom from a rattlesnake (*Crotalus molossus molossus*), as determined by isoelectric focusing. *Toxicon* 22, 653-657.
- Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H.-U., und Brandstetter, H. (2003). The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 5063-5068.
- Engelhardt, H., Beck, W., und Schmitt, T. (1994). Kapillarelektrophorese (Braunschweig, Wiesbaden: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH).
- Fan, H., Meng, W., Kilian, C., Grams, S., und Reutter, W. (1997). Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *Eur. J. Biochem.* 246, 243-251.
- Feller, A.C. und Parwaresch, M. R. (1980). [Selective staining of T-lymphoblastic leukemia cells by glycyl-prolyl-4-methoxy-beta-naphthylamiden-peptidase (DAP IV)]. *Klin. Padiatr.* 192, 150-153.
- Ferrario, C.M. und Iyer, S. N. (1998). Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul. Pept.* 78, 13-18.
- Fleischer, B. (1994). CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol. Today* 15, 180-183.
- Frohman, L.A., Downs, T. R., Heimer, E. P., und Felix, A. M. (1989). Dipeptidylpeptidase IV and trypsin-like enzymatic degradation of human growth hormone-releasing hormone in plasma. *J. Clin. Invest* 83, 1533-1540.
- Fukasawa, K.M., Fukasawa, K., Hiraoka, B. Y., und Harada, M. (1981). Comparison of dipeptidyl peptidase IV prepared from pig liver and kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 657, 179-189.
- Fukasawa, K.M., Fukasawa, K., Hiraoka, B. Y., und Harada, M. (1983). Characterization of a soluble form of dipeptidyl peptidase IV from pig liver. *Experientia* 39, 1005-1007.
- Fülöp, V. und Jones, D. T. (1999). Beta propellers: structural rigidity and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 715-721.
- Fülöp, V., Bocskei, Z., und Polgar, L. (1998). Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* 94, 161-170.
- Fülöp, V., Szeltner, Z., und Polgar, L. (2000). Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism. *EMBO Rep.* 1, 277-281.
- Gallegos, M.E., Zannatha, M. M., Osornio, E. G., Sanchez, A. S., und Posadas del rio, F. A. (1999). The activities of six exo-and endopeptidases in the substantia nigra, neostriatum, and cortex of the rat brain. *Neurochem. Res.* 24, 1557-1561.

- Gehlert, D.R. (1998). Multiple receptors for the pancreatic polypeptide (PP-fold) family: physiological implications. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218, 7-22.
- Girardi, A.C., Knauf, F., Demuth, H.-U., und Aronson, P. S. (2004). Role of dipeptidyl peptidase IV in regulating activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287, C1238-C1245.
- Goettig, P., Groll, M., Kim, J. S., Huber, R., und Brandstetter, H. (2002). Structures of the tricorn-interacting aminopeptidase F1 with different ligands explain its catalytic mechanism. *EMBO J.* 21, 5343-5352.
- Goossens, F., De, M., I, Vanhoof, G., und Scharpe, S. (1992). A sensitive method for the assay of serum prolyl endopeptidase. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30, 235-238.
- Goossens, F., De, M., I, Vanhoof, G., und Scharpe, S. (1996). Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34, 17-22.
- Goossens, F., Vanhoof, G., De, M., I, Augustyns, K., Borloo, M., Tourwe, D., Haemers, A., und Scharpe, S. (1997). Development and evaluation of peptide-based prolyl oligopeptidase inhibitors--introduction of N-benzyloxycarbonyl-prolyl-3-fluoropyrrolidine as a lead in inhibitor design. *Eur. J. Biochem.* 250, 177-183.
- Greene, L.J., Spadaro, A. C., Martins, A. R., Perussi De Jesus, W. D., und Camargo, A. C. (1982). Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension* 4, 178-184.
- Griffiths, E.C., McDermott, J. R., und Smith, A. I. (1982). Inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and (3Me-His) TRH by brain peptidases studied by high-performance liquid chromatography. *Neurosci. Lett.* 28, 61-65.
- Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A. C., und Reed, J. C. (2003). Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 423, 456-461.
- Gutheil, W.G., Subramanyam, M., Flentke, G. R., Sanford, D. G., Munoz, E., Huber, B. T., und Bachovchin, W. W. (1994). Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 6594-6598.
- Hanski, C., Huhle, T., Gossrau, R., und Reutter, W. (1988). Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro. *Exp. Cell Res.* 178, 64-72.
- Hashimoto, Y., Niikura, T., Ito, Y., Sudo, H., Hata, M., Arakawa, E., Abe, Y., Kita, Y., und Nishimoto, I. (2001a). Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J. Neurosci.* 21, 9235-9245.
- Hashimoto, Y., Niikura, T., Tajima, H., Yasukawa, T., Sudo, H., Ito, Y., Kita, Y., Kawasumi, M., Kouyama, K., Doyu, M., Sobue, G., Koide, T., Tsuji, S., Lang, J., Kurokawa, K., und Nishimoto, I. (2001b). A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6336-6341.
- Hasebe, T., Hua, J., Someya, A., Morain, P., Checler, F., und Nagaoka, I. (2001). Involvement of cytosolic prolyl endopeptidase in degradation of p40-phox splice variant protein in myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 69, 963-968.
- Hegen, M., Mittrücker, H. W., Hug, R., Demuth, H.-U., Neubert, K., Barth, A., und Fleischer, B. (1993). Enzymatic activity of CD26 (dipeptidylpeptidase IV) is not required for its signalling function in T cells. *Immunobiology* 189, 483-493.

- Heins, J., Welker, P., Schonlein, C., Born, I., Hartrodt, B., Neubert, K., Tsuru, D., und Barth, A. (1988). Mechanism of proline-specific proteinases: (I) Substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney and proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Biochim. Biophys. Acta* 954, 161-169.
- Henderson, R.A., und Rinker, A.D. (1999). Gastric, Pancreatic and Intestinal Function. Burtis CA and Ashwood ER, eds, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd ed, Philadelphia, PA: WB Saunders, 1271-1327.
- Heymann, E. und Mentlein, R. (1978). Liver dipeptidyl aminopeptidase IV hydrolyzes substance P. *FEBS Lett.* 91, 360-364.
- Hinke, S.A., Manhart, S., Kuhn-Wache, K., Nian, C., Demuth, H.-U., Pederson, R. A., und McIntosh, C. H. (2004). [Ser2]- and [Ser(P)2]Incretin Analogs: Comparison of dipeptidyl peptidase IV resistance and biological activities in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 3998-4006.
- Hiramatsu, H., Kyono, K., Higashiyama, Y., Fukushima, C., Shima, H., Sugiyama, S., Inaka, K., Yamamoto, A., und Shimizu, R. (2003). The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV, possessing a unique eight-bladed beta-propeller fold. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 849-854.
- Hoffmann, T., Reinhold, D., Kahne, T., Faust, J., Neubert, K., Frank, R., und Ansorge, S. (1995). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) by anti-DP IV antibodies and non-substrate X-X-Pro-oligopeptides ascertained by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 716, 355-362.
- Holst, J.J. und Deacon, C. F. (1998). Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47, 1663-1670.
- Hopsu-Havu, V.K. und Glenner, G. G. (1966). A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie*. 7, 197-201.
- Ikonen, M., Liu, B., Hashimoto, Y., Ma, L., Lee, K. W., Niikura, T., Nishimoto, I., und Cohen, P. (2003). Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 13042-13047.
- Irazusta, J., Larrinaga, G., Gonzalez-Maeso, J., Gil, J., Meana, J. J., und Casis, L. (2002). Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem. Int.* 40, 337-345.
- Ishino, T., Ohtsuki, S., Homma, K., und Natori, S. (1998). cDNA cloning of mouse prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by Swiss 3T3 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 123, 540-545.
- Iwaki-Egawa, S., Watanabe, Y., Kikuya, Y., und Fujimoto, Y. (1998). Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J. Biochem. (Tokyo.)* 124, 428-433.
- Iwaki-Egawa, S., Watanabe, Y., und Fujimoto, Y. (1997). CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase- binding protein in rat cells. *Cell Immunol.* 178, 180-186.
- Jenzsch, M., Lange, M., Bär, J., Rahfel, J.-U., Lübbert, A. (2004). Bioreactor retrofitting to avoid aeration with oxygen in *Pichia pastoris* cultivation processes for recombinant protein production. *Chemical Engineering Research and Design.* 82(A9), 1144-1152
- Jiang, J.D., Wilk, S., Li, J., Zhang, H., und Bekesi, J. G. (1997). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection in a T-cell line (CEM) by new dipeptidyl-peptidase IV (CD26) inhibitors. *Res. Virol.* 148, 255-266.
- Kabashima, T., Fujii, M., Meng, Y., Ito, K., und Yoshimoto, T. (1998). Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 358, 141-148.

- Kabashima, T., Ito, K., und Yoshimoto, T. (1996). Dipeptidyl peptidase IV from *Xanthomonas maltophilia*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme. *J. Biochem. (Tokyo.)* 120, 1111-1117.
- Kabashima, T., Yoshida, T., Ito, K., und Yoshimoto, T. (1995). Cloning, sequencing, and expression of the dipeptidyl peptidase IV gene from *Flavobacterium meningosepticum* in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 123-128.
- Kähne, T., Kroning, H., Thiel, U., Ulmer, A. J., Flad, H. D., und Ansorge, S. (1996). Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation. *Cell Immunol.* 170, 63-70.
- Kamei, H., Ueki, T., Obi, Y., Fukagawa, Y., und Oki, T. (1992). Protective effect of eurystatins A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors, on scopolamine-induced amnesia in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 60, 377-380.
- Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F., und Morimoto, C. (1993). Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 261, 466-469.
- Kanatani, A., Yoshimoto, T., Kitazono, A., Kokubo, T., und Tsuru, D. (1993). Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme. *J. Biochem. (Tokyo)* 113, 790-796.
- Kariya, S., Takahashi, N., Hirano, M., und Ueno, S. (2003). Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes. *Mol. Cell Biochem.* 254, 83-89.
- Kariya, S., Takahashi, N., Ooba, N., Kawahara, M., Nakayama, H., und Ueno, S. (2002). Humanin inhibits cell death of serum-deprived PC12h cells. *Neuroreport* 13, 903-907.
- Kato, A., Fukunari, A., Sakai, Y., und Nakajima, T. (1997). Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 328-335.
- Kato, T., Hama, T., Kojima, K., Nagatsu, T., und Sakakibara, S. (1978a). Excretion of X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase in human urine as determined with a new fluorogenic substrate. *Clin. Chem.* 24, 1163-1166.
- Kato, T., Nagatsu, T., Kimura, T., und Sakakibara, S. (1978b). Fluorescence assay of x-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase activity with a new fluorogenic substrate. *Biochem. Med.* 19, 351-359.
- Kato, T., Okada, M., und Nagatsu, T. (1980). Distribution of post-proline cleaving enzyme in human brain and the peripheral tissues. *Mol. Cell Biochem.* 32, 117-121.
- Katsube, N., Sunaga, K., Aishita, H., Chuang, D. M., und Ishitani, R. (1999). ONO-1603, a potential antidementia drug, delays age-induced apoptosis and suppresses overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured central nervous system neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 6-13.
- Katsube, N., Sunaga, K., Chuang, D. M., und Ishitani, R. (1996). ONO-1603, a potential antidementia drug, shows neuroprotective effects and increases m3-muscarinic receptor mRNA levels in differentiating rat cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 214, 151-154.
- Khin, E.E., Kikkawa, F., Ino, K., Kajiyama, H., Suzuki, T., Shibata, K., Tamakoshi, K., Nagasaka, T., und Mizutani, S. (2003). Dipeptidyl peptidase IV expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma and its inverse correlation with tumor grade. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188, 670-676.
- Kiss, A.L., Szeltner, Z., Fulop, V., und Polgar, L. (2004). His507 of acylaminoacyl peptidase stabilizes the active site conformation, not the catalytic intermediate. *FEBS Lett.* 571, 17-20.

- Kiyama, M., Hayakawa, M., Shiroza, T., Nakamura, S., Takeuchi, A., Masamoto, Y., und Abiko, Y. (1998). Sequence analysis of the *Porphyromonas gingivalis* dipeptidyl peptidase IV gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1396, 39-46.
- Kobayashi, H., Hosono, O., Mimori, T., Kawasaki, H., Dang, N. H., Tanaka, H., und Morimoto, C. (2002). Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 29, 1858-1866.
- Koida, M. und Walter, R. (1976). Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 251, 7593-7599.
- Kreil, G., Haiml, L., und Suchanek, G. (1980). Stepwise cleavage of the Pro part of promelittin by dipeptidyl peptidase IV. *Eur J Biochem* 111, 49-58.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambeir, A.M., Diaz, P. J., Chacon, P., Vermeulen, G., Heremans, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., De, M., I, und Scharpe, S. (1997). A prediction of DPP IV/CD26 domain structure from a physico-chemical investigation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1340, 215-226.
- Lambeir, A.M., Durinx, C., Scharpe, S., und De, M., I. (2003). Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 40, 209-294.
- Larsson, A.M., Stahlberg, J., und Jones, T. A. (2002). Preparation and crystallization of selenomethionyl dextranase from *Penicillium minioluteum* expressed in *Pichia pastoris*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58, 346-348.
- Lazaro, I., Nanche, D., Signoret, N., Bernard, A. M., Marguet, D., Klatzmann, D., Dragic, T., Alizon, M., und Sattentau, Q. (1994). Factors involved in entry of the human immunodeficiency virus type 1 into permissive cells: lack of evidence of a role for CD26. *J Virol.* 68, 6535-6546.
- Lee, S.U., Park, Y. H., Davis, W. C., Hamilton, J., Naessens, J., und Bohach, G. A. (2002). Molecular characterization of bovine CD26 upregulated by a staphylococcal superantigen. *Immunogenetics* 54, 216-220.
- Li, M., Chen, C. Q., und Wang, D. B. (2000). [Purification and characterization of recombinant *Aeromonas punctata* prolyl endopeptidase]. *Sheng Wu Gong. Cheng Xue. Bao.* 16, 345-348.
- Lojda, Z. (1977). Studies on glycyl-proline naphthylamidase. I. Lymphocytes. *Histochemistry* 54, 299-309.
- Lojda, Z. (1988). Dipeptidyl peptidases of human lymphocytes. *Czech. Med.* 11, 181-194.
- Ludwig, K., Fan, H., Dobers, J., Berger, M., Reutter, W., und Bottcher, C. (2004). 3D structure of the CD26-ADA complex obtained by cryo-EM and single particle analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 223-229.
- Machleidt, W., Nagler, D. K., Assfalg-Machleidt, I., Stubbs, M. T., Fritz, H., und Auerswald, E. A. (1995). Temporary inhibition of papain by hairpin loop mutants of chicken cystatin. Distorted binding of the loops results in cleavage of the Gly(9)-Ala10 bond. *FEBS Lett.* 361, 185-190.
- Maes, M., Goossens, F., Scharpe, S., Calabrese, J., Desnyder, R., und Meltzer, H. Y. (1995). Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 58, 217-225.

- Mamiya, T. und Ukai, M. (2001). [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1597-1599.
- Mantle, D., Falkous, G., Ishiura, S., Blanchard, P. J., und Perry, E. K. (1996). Comparison of proline endopeptidase activity in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin. Chim. Acta* 249, 129-139.
- Marguet, D., Baggio, L., Kobayashi, T., Bernard, A. M., Pierres, M., Nielsen, P. F., Ribet, U., Watanabe, T., Drucker, D. J., und Wagtmann, N. (2000). Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6874-6879.
- Marguet, D., Bernard, A. M., Vivier, I., Darmoul, D., Naquet, P., und Pierres, M. (1992). cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule. A multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV (CD26) included in a subgroup of serine proteases. *J. Biol. Chem.* 267, 2200-2208.
- McDonald, J. P., Frank, E. G., Levine, A. S., und Woodgate, R. (1998). Intermolecular cleavage by UmuD-like mutagenesis proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 1478-1483.
- Mendez, M., Cruz, C., Joseph-Bravo, P., Wilk, S., und Charli, J. L. (1990). Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides* 17, 55-62.
- Mentlein, R. (1988). Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett.* 234, 251-256.
- Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* 85, 9-24.
- Mentlein, R., Dahms, P., Grandt, D., und Kruger, R. (1993). Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul. Pept.* 49, 133-144.
- Mentlein, R., Rix-Matzen, H., und Heymann, E. (1988). Subcellular localization of non-specific carboxylesterases, acylcarnitine hydrolase, monoacylglycerol lipase and palmitoyl-CoA hydrolase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 964, 319-328.
- Mentlein, R., von Kolszynski, M., Sprang, R., und Lucius, R. (1990). Proline-specific proteases in cultivated neuronal and glial cells. *Brain Res.* 527, 159-162.
- Misumi, Y., Hayashi, Y., Arakawa, F., und Ikehara, Y. (1992). Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* 1131, 333-336.
- Miura, N., Shibata, S., und Watanabe, S. (1995). Increase in the septal vasopressin content by prolyl endopeptidase inhibitors in rats. *Neurosci. Lett.* 196, 128-130.
- Morain, P., Robin, J. L., De Nanteuil, G., Jochemsen, R., Heidet, V., und Guez, D. (2000). Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 50, 350-359.
- Morimoto, C., Lord, C. I., Zhang, C., Duke-Cohan, J. S., Letvin, N. L., und Schlossman, S. F. (1994). Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human immunodeficiency virus type 1 infection and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9960-9964.
- Moriyama, A., Nakanishi, M., Takenaka, O., und Sasaki, M. (1988). Porcine muscle prolyl endopeptidase: limited proteolysis of tryptic peptides from hemoglobin beta-chains at prolyl and alanyl bonds. *Biochim. Biophys. Acta* 956, 151-155.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
- Nakajima, T., Ono, Y., Kato, A., Maeda, J., und Ohe, T. (1992). Y-29794--a non-peptide prolyl endopeptidase inhibitor that can penetrate into the brain. *Neurosci. Lett.* 141, 156-160.
- Nanri, M. und Kaneto, H. (1987). [Anti-amnesic effect of prolyl endopeptidase inhibitors in mice]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 89, 323-329.
- Nardi, M., Chopin, M. C., Chopin, A., Cals, M. M., und Gripon, J. C. (1991). Cloning and DNA sequence analysis of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 45-50.
- Nauck, M. (1996). Therapeutic potential of glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 13, S39-S43.
- Nauck, M.A., Holst, J. J., Willms, B., und Schmiegel, W. (1997). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) as a new therapeutic approach for type 2-diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105, 187-195.
- Nauck, M.A., Weber, I., Bach, I., Richter, S., Orskov, C., Holst, J. J., und Schmiegel, W. (1998). Normalization of fasting glycaemia by intravenous GLP-1 ([7-36 amide] or [7-37]) in type 2 diabetic patients. *Diabet. Med.* 15, 937-945.
- Nesterenko, M.V., Tilley, M., und Upton, S. J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 28, 239-242.
- Niikura, T., Hashimoto, Y., Tajima, H., Ishizaka, M., Yamagishi, Y., Kawasumi, M., Nawa, M., Terashita, K., Aiso, S., und Nishimoto, I. (2003). A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1150-1158.
- Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Sato, E., Mikami, T., und Takahashi, E. (1999). Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding the feline T-cell activation antigen CD26 homologue. *Immunogenetics* 50, 366-368.
- Oefner, C., D'Arcy, A., Mac, S. A., Pierau, S., Gardiner, R., und Dale, G. E. (2003). High-resolution structure of human apo dipeptidyl peptidase IV/CD26 and its complex with 1-[[2-[(5-iodopyridin-2-yl)amino]-ethyl]amino]-acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 1206-1212.
- Ogata, S., Misumi, Y., Tsuji, E., Takami, N., Oda, K., und Ikehara, Y. (1992). Identification of the active site residues in dipeptidyl peptidase IV by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31, 2582-2587.
- Ogata, S., Misumi, Y., und Ikehara, Y. (1989). Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH₂-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *J. Biol. Chem.* 264, 3596-3601.
- Ohmori, T., Nakagami, T., Tanaka, H., und Maruyama, S. (1994). Isolation of prolylendopeptidase-inhibiting peptides from bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 809-815.
- Ohtsuki, S., Homma, K., Kurata, S., und Natori, S. (1997). Molecular cloning of cDNA for *Sarcophaga* prolyl endopeptidase and characterization of the recombinant enzyme produced by an *E. coli* expression system. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 337-343.
- Ohtsuki, T., Tsuda, H., und Morimoto, C. (2000). Good or evil: CD26 and HIV infection. *J Dermatol Sci* 22, 152-160.

- O'Leary, R.M., Gallagher, S. P., und O'Connor, B. (1996). Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 441-449.
- Pasieka, J.L. und Hershfield, N. (1999). Pancreatic polypeptide hyperplasia causing watery diarrhea syndrome: a case report. *Can. J. Surg.* 42, 55-58.
- Pauly, R.P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H., Pederson, R. A., und Demuth, H.-U. (1996). Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach. *J. Biol. Chem.* 271, 23222-23229.
- Pederson, R.A., White, H. A., Schlenzig, D., Pauly, R. P., McIntosh, C. H., und Demuth, H.-U. (1998). Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide. *Diabetes* 47, 1253-1258.
- Piazza, G.A., Callanan, H. M., Mowery, J., und Hixson, D. C. (1989). Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. *Biochem. J.* 262, 327-334.
- Polgar, L. (1991). pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle. *Eur. J. Biochem.* 197, 441-447.
- Polgar, L. (2002). The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 349-362.
- Polgar, L. und Szabo, E. (1992). Prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV are distantly related members of the same family of serine proteases. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373, 361-366.
- Polgar, L., Kollt, E., und Hollosi, M. (1993). Prolyl oligopeptidase catalysis. Reactions with thiono substrates reveal substrate-induced conformational change to be the rate-limiting step. *FEBS Lett.* 322, 227-230.
- Puschel, G., Mentlein, R., und Heymann, E. (1982). Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur. J. Biochem.* 126, 359-365.
- Qvist, H., Sjostrom, H., und Noren, O. (1998). The TATA-less, GC-rich porcine dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) promoter shows bidirectional activity. *Biol. Chem.* 379, 75-81.
- Rahfeld, J., Schierhorn, M., Hartrodt, B., Neubert, K., und Heins, J. (1991b). Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV? *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 314-316.
- Rahfeld, J., Schutkowski, M., Faust, J., Neubert, K., Barth, A., und Heins, J. (1991a). Extended investigation of the substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 372, 313-318.
- Ranger, A.M., Malynn, B. A., und Korsmeyer, S. J. (2001). Mouse models of cell death. *Nat. Genet.* 28, 113-118.
- Rasmussen, H.B., Branner, S., Wiberg, F. C., und Wagtmann, N. (2003). Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nat. Struct. Biol.* 10, 19-25.
- Raufman, J.P., Singh, L., und Eng, J. (1991). Exendin-3, a novel peptide from *Heloderma horridum* venom, interacts with vasoactive intestinal peptide receptors and a newly described receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. Description of exendin-3(9-39) amide, a specific exendin receptor antagonist. *J. Biol. Chem.* 266, 2897-2902.
- Rennex, D., Hemmings, B. A., Hofsteenge, J., und Stone, S. R. (1991). cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry* 30, 2195-2203.

- Reutter, W., Baum, O., Löster, K., Fan, H., Bork, J.P., Bernt, K., Hanski, C., und Tauber, R. (1995). In *Metabolism and the Immune Response*. B.Fleischer, editor. Springer Verlag, Heidelberg.
- Romanos, M.A., Scorer, C. A., und Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8, 423-488.
- Rosenblum, J.S. und Kozarich, J. W. (2003). Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 496-504.
- Rumenapf, T., Stark, R., Heimann, M., und Thiel, H. J. (1998). N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J. Virol.* 72, 2544-2547.
- Sambrook, J., Fritsch, E., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Schechter, I. und Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157-162.
- Schneider, J.S., Giardiniere, M., und Morain, P. (2002). Effects of the prolyl endopeptidase inhibitor S 17092 on cognitive deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Neuropsychopharmacology* 26, 176-182.
- Schulz, I., Gerhartz, B., Neubauer, A., Holloschi, A., Heiser, U., Hafner, M., und Demuth, H.-U. (2002). Modulation of inositol 1,4,5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition. *Eur. J. Biochem.* 269, 5813-5820.
- Sedo, A. und Malik, R. (2001). Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochim. Biophys. Acta* 1550, 107-116.
- Sedo, O., Novotna, K., und Havel, J. (2004). Advantages of derivatization by osmium tetroxide and 2,2'-bipyridine for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay fragment ion analysis of peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 339-344.
- Shinoda, M., Miyazaki, A., und Toide, K. (1999). Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and on cholinergic and peptidergic neurons in rats with ibotenate-induced lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav. Brain Res.* 99, 17-25.
- Shinoda, M., Toide, K., Ohsawa, I., und Kohsaka, S. (1997). Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 641-645.
- Shishido, Y., Furushiro, M., Tanabe, S., Shibata, S., Hashimoto, S., und Yokokura, T. (1999). Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 372, 135-142.
- Siegel, E.G., Gallwitz, B., Scharf, G., Mentlein, R., Morys-Wortmann, C., Folsch, U. R., Schrezenmeir, J., Drescher, K., und Schmidt, W. E. (1999). Biological activity of GLP-1-analogues with N-terminal modifications. *Regul. Pept.* 79, 93-102.
- Smith, R.E., Talhouk, J. W., Brown, E. E., und Edgar, S. E. (1998). The significance of hypersialylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in the inhibition of its activity by Tat and other cationic peptides. CD26: a subverted adhesion molecule for HIV peptide binding. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 851-868.
- Sponne, I., Fifre, A., Koziel, V., Kriem, B., Oster, T., und Pillot, T. (2004). Humanin rescues cortical neurons from prion-peptide-induced apoptosis. *Mol. Cell Neurosci.* 25, 95-102.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A., und Birkenberger, L. A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190, 55-62.

- Stano, J., Kovacs, P., Nemec, P., und Neubert, K. (1994). Dipeptidyl Peptidase from *Lactococcus lactis* spp. *leactis*: Purification and Properties. *Biologia* 49, 905-910.
- Stratton, J., Chiruvolu, V., und Meagher, M. (1998). High cell-density fermentation. *Methods Mol. Biol.* 103, 107-120.
- Stryer, L. (1990). *Biochemie* (Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH).
- Szeltner, Z., Renner, V., und Polgar, L. (2000). Substrate- and pH-dependent contribution of oxyanion binding site to the catalysis of prolyl oligopeptidase, a paradigm of the serine oligopeptidase family. *Protein Sci.* 9, 353-360.
- Szeltner, Z., Rea, D., Renner, V., Juliano, L., Fulop, V., und Polgar, L. (2003). Electrostatic environment at the active site of prolyl oligopeptidase is highly influential during substrate binding. *J. Biol. Chem.* 278, 48786-48793.
- Tajima, H., Niikura, T., Hashimoto, Y., Ito, Y., Kita, Y., Terashita, K., Yamazaki, K., Koto, A., Aiso, S., und Nishimoto, I. (2002). Evidence for in vivo production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. *Neurosci. Lett.* 324, 227-231.
- Tanaka, T., Camerini, D., Seed, B., Torimoto, Y., Dang, N. H., Kameoka, J., Dahlberg, H. N., Schlossman, S. F., und Morimoto, C. (1992). Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J. Immunol.* 149, 481-486.
- Tanaka, T., Kameoka, J., Yaron, A., Schlossman, S. F., und Morimoto, C. (1993). The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4586-4590.
- Tate, S.S. (1981). Purification and properties of a bovine brain thyrotropin-releasing-factor deamidase. A post-proline cleaving enzyme of limited specificity. *Eur. J. Biochem.* 118, 17-23.
- Tezuka, Y., Fan, W., Kasimu, R., und Kadota, S. (1999). Screening of crude drug extracts for prolyl endopeptidase inhibitory activity. *Phytomedicine.* 6, 197-203.
- Thoma, R., Loffler, B., Stihle, M., Huber, W., Ruf, A., und Hennig, M. (2003). Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure. (Camb.)* 11, 947-959.
- Torimoto, Y., Dang, N. H., Vivier, E., Tanaka, T., Schlossman, S. F., und Morimoto, C. (1991). Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 147, 2514-2517.
- Trimble, R.B., Atkinson, P. H., Tschopp, J. F., Townsend, R. R., und Maley, F. (1991). Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* 266, 22807-22817.
- Umemura, K., Kondo, K., Ikeda, Y., Nishimoto, M., Hiraga, Y., Yoshida, Y., und Nakashima, M. (1999). Pharmacokinetics and safety of Z-321, a novel specific orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in healthy male volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 39, 462-470.
- Umemura, K., Kondo, K., Ikeda, Y., Kobayashi, T., Urata, Y., und Nakashima, M. (1997). Pharmacokinetics and safety of JTP-4819, a novel specific orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in healthy male volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 43, 613-618.
- Urbani, A., Bianchi, E., Narjes, F., Tramontano, A., De Francesco, R., Steinkuhler, C., und Pessi, A. (1997). Substrate specificity of the hepatitis C virus serine protease NS3. *J. Biol. Chem.* 272, 9204-9209.
- Vanhoof, G., De, M., I, van Sande, M., Scharpe, S., und Yaron, A. (1992). Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluids. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30, 333-338.

- Vanhoof, G., Goossens, F., De, M., I, Hendriks, D., und Scharpe, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9, 736-744.
- Viscidi, R.P., Mayur, K., Lederman, H. M., und Frankel, A. D. (1989). Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science* 246, 1606-1608.
- Vlasak, R., Vilas, U., Strobl, B., und Kreil, G. (1997). cDNA cloning and expression of secreted *Xenopus laevis* dipeptidyl aminopeptidase IV. *Eur. J. Biochem.* 247, 107-113.
- Voet, D. und Voet, J.G. (1992). Biochemie. 1. Auflage, *VCH Verlagsgesellschaft mbH*, Weinheim.
- Wallen, E.A., Christiaans, J. A., Jarho, E. M., Forsberg, M. M., Venalainen, J. I., Mannisto, P. T., und Gynther, J. (2003). New prolyl oligopeptidase inhibitors developed from dicarboxylic acid bis(l-prolyl-pyrrolidine) amides. *J. Med. Chem.* 46, 4543-4551.
- Walter, R. und Shlank, H. (1971). In vivo inactivation of oxytocin. *Endocrinology* 89, 990-995.
- Weihofen, W.A., Liu, J., Reutter, W., Saenger, W., und Fan, H. (2004). Crystal structure of CD26/DPPIV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J. Biol. Chem.*
- Welches, W.R., Brosnihan, K. B., und Ferrario, C. M. (1993). A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci.* 52, 1461-1480.
- Williams, R.S., Cheng, L., Mudge, A. W., und Harwood, A. J. (2002). A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature* 417, 292-295.
- Williams, R.S., Eames, M., Ryves, W. J., Viggars, J., und Harwood, A. J. (1999). Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. *EMBO J.* 18, 2734-2745.
- Wolf, B., Fischer, G., und Barth, A. (1978). [Kinetics of dipeptidyl-peptidase IV]. *Acta Biol. Med. Ger.* 37, 409-420.
- Wolter, K.G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., und Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139, 1281-1292.
- Wrenger, S., Kähne, T., Bohuon, C., Weglohner, W., Ansorge, S., und Reinhold, D. (2000). Amino-terminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidyl peptidase IV (DP IV). *FEBS Lett.* 466, 155-159.
- Yamagishi, Y., Hashimoto, Y., Niikura, T., und Nishimoto, I. (2003). Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults. *Peptides* 24, 585-595.
- Yaron, A. (1987). The role of proline in the proteolytic regulation of biologically active peptides. *Biopolymers* 26 Suppl, S215-S222.
- Yaron, A. und Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 31-81.
- Yip, R.G. und Wolfe, M. M. (2000). GIP biology and fat metabolism. *Life Sci.* 66, 91-103.
- Yoshimoto, T. und Tsuru, D. (1982). Proline-specific dipeptidyl aminopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biochem. (Tokyo)* 91, 1899-1906.
- Yoshimoto, T., Kado, K., Matsubara, F., Koriyama, N., Kaneto, H., und Tsuru, D. (1987). Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J. Pharmacobiodyn.* 10, 730-735.

- Yoshimoto, T., Miyazaki, K., Haraguchi, N., Kitazono, A., Kabashima, T., und Ito, K. (1997). Cloning and expression of the cDNA encoding prolyl oligopeptidase (prolyl endopeptidase) from bovine brain. *Biol. Pharm. Bull.* 20, 1047-1050.
- Zhu, L., Tamvakopoulos, C., Xie, D., Dragovic, J., Shen, X., Fenyk-Melody, J. E., Schmidt, K., Bagchi, A., Griffin, P. R., Thornberry, N. A., und Sinha, R. R. (2003). The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J. Biol. Chem.* 278, 22418-22423.

III Anhang

Sequenz der DP IV vom Schwein

In Abbildung 1 ist der sequenzierte ORF von Schweine-DP IV bestehend aus 2298 bp (kodierend für 766 Aminosäuren) dargestellt (*GenBank accession number* für die Sequenz der Schweine-DP IV: AY198323).

```

M K T P W K V L L G L L G I A A L V T V I T V P V V L L N K
1 ATGAAGACACCGTGGAAAGTGCTCCTGGGACTGCTGGGGATAGCTGGCGTCGTCACCGTCATCACCGTGCCCGTGGTTCGCTGAACAAA
G T D D A A A D S R R T Y T L T D Y L K S T F R V K F Y T L
91 GGCACAGATGATGCTGCAGCTGATGTCGAGAACCTACACGCTAAGTATTTAAAAAGTACTTTTAGAGTGAAGTCTATACCTTG
Q W I S D H E Y L Y K Q E N N I L L F N A E Y G N S S I F L
181 CAATGGATTCAGATCATGAATATCTCTACAAACAAGAAAATAATATCTTGCTATTCATGCTGAATATGGAACAGCTCCATTTCCTG
E N S T F D E L G Y S T N D Y S V S P D R Q F I L F E Y N Y
271 GAGAACAGTACATTTGATGAAGTGGATATTTACAAATGATTAAGTACTGCTGATCTCCTGATAGACAATTTATCTCTCGAATACAATAT
V K Q W R H S Y T A S Y D I Y D L N K R Q L I T E E R I P N
361 GTAAGCAATGGAGACATTCCTACACAGCTTCATATGACATTTATGACTTAAATAAAGACAGCTAATCACAGAAAGAGAGAATCCAAAC
N T Q W I T W S P V G H K L A Y V W N N D I Y V K N E P N L
451 AACACACAGTGGATCACATGGTCACCGTGGGTCATAAATGGCATAAGTTTGGAAACAATGATATTTATGTGAAAAATGAACCAACTTG
S S Q R I T W T G K E N V I Y N G V T D W V Y E E E V F S A
541 TCCAGTCAGAGGATCACGTGGACTGGGAAAGAAAATGTAATCTACAATGGAGTAACTGACTGGGTTTATGAAGAGGAAGCTTCAGTGCT
Y S A L W W S P N G T F L A Y A Q F N D T E V P L I E Y S F
631 TACTCTGCTCTGTTGGTCTCCAAACGGCACITTTTITAGCATATGCCAATTTAACGACACAGAAGTCCCGCTGATGAACTACTCTC
Y S D E S L Q Y P K T V R I P Y P K A G A E N P T V K F F V
721 TACTCTGATGATGACTGACAGTACCCAAAGACTGTGCGGATTCACACAAAGGACAGGAGCTGAGAAATCCAAAGGTTAAAGTCTTTGTT
V D T R T L S P N A S V T S Y Q I V P P A S V L I G D H Y L
811 GTAGATACCGAGTCTCTAGCCAAACGCGAGTGAATTCCTACCAAAATCGTTCCTCCGGCTCTGTGTTAATAGGGGATCACTACTTG
C G V T W V T E E R I S L Q W I R R A Q N Y S I I D I C D Y
901 TGTGGGTGACATGGTAAACAGAAAGAAAGTTCCTTTGTCAGTGGATCCGGAGGGCTCAGAACTATTTCGATCATGATATCTGACTAT
D E S T G R W I S S V A R Q H I E I S T T G W V G R F R P A
991 GACGAATCCACCGAAGATGGATTTCCCTCAGTGGCCCGGCAACACATGAAATCAGTACCCTGGCTGGGTGGAGATTTAGGCTGCA
E P H F T S D G N S F Y K I I S N E E G Y K H I C H F Q T D
1081 GAACCTCATTTTACCTCTGATGGGAATAGCTTCTACAAGATCATCAGCAATGAAGAGGGCTACAAACACATTTGTGATTTCCAAACAGAC
K S N C T F I T K G A W E V I G I E A L T S D Y L Y Y I S N
1171 AAGAGTAAATGCAATTTATTAACAAAAGGAGCTGGGAGGTCAITGGGATAGAAGCTCTTACCAAGTATACCTGTACTACATTAGTAAAT
E H K G M P G G R N L Y R I Q L N D Y T K V T C L S C E L N
1261 GAACATAAAGGAATGCCAGGAGGAAGAAATCTCTATAGGATCCAGCTTAATGACTACACAAAAGTGAAGTGGCTTAGCTGTGAGCTGAAT
P E R C Q Y Y S A S F S N K A K Y Y Q L R C F G P G L P L Y
1351 CCAGAAAGTGTGACTACTATTTGCAATCATTTAGTAAACAGGCAAAATACTATCAGCTGAGATGTTTGGCCCTGGTTCGCCCTCTAT
T L H S S S S D K E L R V L E D N S A L D K M L Q D V Q M P
1441 ACTCTGCATAGCAGTACAGTGAATAAAGAACTAAGAGTCTTGGAAAGACAATTCAGCTTTGGATAAAATGCTGCAGKATGCCAGATGCC
S K K L D V I N L H G T K F W Y Q M I L P P H F D K S K K Y
1531 TCAAAAAGTGGAGTCAATTAATTTGCAATGGCACAAAATTTTGGTATCAGATGATCTTGCCCTCCATTTTGTGATAAGTCCAAGAAATAT
P L L I E V Y A G P C S Q K V D T V F R L S W A T Y L A S T
1621 CCTCTGCTAATAGAAGTGTATGACGGCCCTTGTAGTCAAAAAGTAGACACTGTCTTCAGACTCAGCTGGCTACTTACCTTGCAAGTACA
E N I I V A S F D G R G S G Y Q G D K I M H A I N R R L G T
1711 GAGAACATTTATAGTACTAGCTAGCTTTGATGGCAGAGGAGTGGTTACCAAGGAGATAAGATCATGCAACGCAATCAACAGAAAGCTGGGAACA
F E V E D Q I E A T R Q F S K M G F V D D K R I A I W G W S
1801 TTTGAAGTTGAAGATCAAATGAAGCAACAGACAATTTTCAAAAATGGGATTTGTGGATGACAAGCGGATTCGAATTTGGCGCTGTCA
Y G G Y V T S M V L G A G S G V F K C G I A V A P V S K W E
1891 TATGGAGGTATGTAACCTCAATGGTCTGGGAGCAGGAGTGGCGTTCAGGTTGGAATAGCCGTGCAACCTGTGCAAAAGTGGGAG
Y Y D S V Y T E R Y M G L P T P E D N L D Y Y R N S T V M S
1981 TACTAGACTCAGTGTACACAGAGCGTTACATGGGTCTTCCAACTCCAGAGCAACCTTGACTATTTACAGGAATTCACAGTCAATGAGC
R A E N F K Q V E Y L L I H G T A D D N V H F Q Q S A Q L S
2071 AGAGCTGAAAATTTTAAACAAGTTGAGTACCTCCTTATTCATGGAACAGCAGATGATAACGTTCAATTTTTCAGCAGTCCGCTCAGCTCTCT
K A L V D A G V D F Q T M W Y T D E D H G I A S N M A H Q H
2161 AAAGCCCTGGTGGATGCTGGATGGATTTCCAGACAATGTGGTATACAGATGAAGACCATGGGATTTGCCAGCAACATGGCACATCAACAT
I Y T H M S H F L K Q C F S L P
2251 ATATATACGCACATGAGCCATTTTCTAAACAATGCTTCTCTACCTTAGCACCTTGAAACAGCATGCCATTTAAAGCTTACGAAAAGC
2341 CACTTTTGTCTCTCATTTATCTCCAACCTGCCTGTCAAGATGATGATCTTAAAAAATAAAC

```

Abb. 1: Aminosäuren (1-766) und Nukleotidsequenz (1-2401) der DP IV aus *Sus scrofa* (Genbank Accession Nummer AY198323). Die potentiellen Glykosylierungsstellen sind mit fettgedruckten Buchstaben markiert (Bär *et al.*, 2003b).

Klonierungsschema für humane DP IV in den Hefevektor pPICZ α C

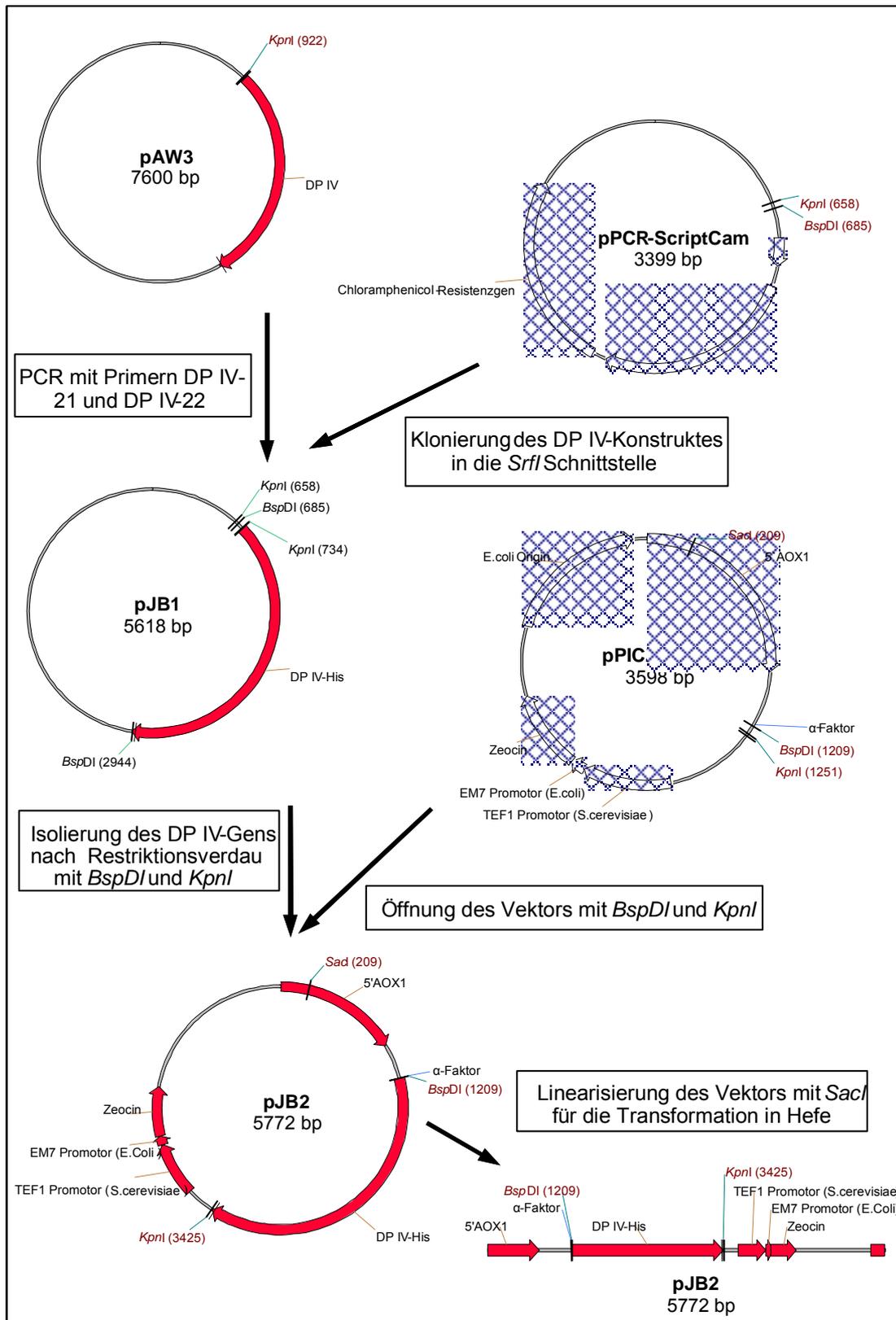


Abb. 2: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für humane DP IV in den Hefevektor pPICZ α C. Humane Δ 1-36 DP IV wurde aus dem zur Verfügung gestellten Vektor pAW3 zunächst mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pPCR-Script Cam kloniert. Unter zu Hilfenahme der Restriktionsenzyme *KpnI* und *BspDI* wurde humane Δ 1-36 DP IV in den *P. pastoris*-Vektor pPICZ α C kloniert und für die anschließende Transformation von *P. pastoris* mittels *SacI* Restriktion linearisiert. Die Bezeichnung der hergestellten Vektoren erfolgte mit fortlaufenden Nummern in chronologischer Reihenfolge. Außerdem wurde generell der Zusatz „pJB“ (*plasmid Joachim Bär*) verwendet.

Geräte

Gerät	Hersteller/Anbieter
Avanti J-20	Beckmann, München
BIAcore 3000	Biacore, Freiburg
Biostat-B Fermenter	B.Braun Biotech International, Melsungen
Blotting-Apparatur TRANS-BLOT 5D	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
DNA-Gelelektrophorese GEB1A-UVT	Hybaid AGS, Heidelberg
Elektroporator	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Fermenter Biostat B oder ED	B. Braun Biotech, Melsungen
FPLC-System	Pharmacia Biotech, Erlangen
FRENCH Presse	Spectronic Instruments, Rochester, USA
Gelelektrophorese-System Mini-Protean II	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
HPLC-MS/MS	HPLC: Perkin Elmer Serie 200, Überlingen MS: API 365, Applied Biosystems, Darmstadt
Inkubationsschrank B6 FUNCTION line	Hereus, Hanau
Kapillarelektrophorese MDQ	Beckmann, München
Kreischüttler GFL 3005	GFL, Burgwedel
LD-TOF-System 2025A	Hewlett Packard, Waldbronn
MicroPulser™ (Elektroporator)	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Multiphor II	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
PCR-Gerät PCR Sprint	Hybaid AGS, Heidelberg
pH-Meter	Multilab, Berlin
Photometer SmartSpec 3000	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Plattenreader SUNRISE	TECAN, Crailsheim
Power PAC3000	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Reinstwasseranlage PURELAB Plus UV	USF SERAL, Ransbach-Baumbach
Schüttelinkubator KS-15/TH-15 und SM-30/TH-30	Bühler, Tübingen
Spektralfluorimeter SFM 25	Kontron, Neufahrn
Spektralphotometer Uvikon 950	Kontron Instruments
Stromversorgungsgerät POWER-PAC 200 und 300	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Hereus, Osterode
UV-System	INTAS, Göttingen

Materialien

Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, in der Reinheitsstufe „z.A.“ von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Zur Herstellung von wässrigen Lösungen wurde Reinstwasser aus der Anlage PURELAB PLUS UV (Fa. PURELAB) verwendet. Die Aufzählung der Substanzen erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Kulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller/Anbieter
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco, Augsburg
Chloramphenicol	Sigma, Deisendorf
Zeocin	Invitrogen, Groningen, NL

Substrate und Inhibitoren

Produkt	Hersteller/Anbieter
Ala-pNA	probiodrug AG, Halle/S
Ala-Pro-AMC	probiodrug AG, Halle/S
Ala-Pro-pNA	probiodrug AG, Halle/S
AMC (7-amino-4-methylcoumarin)	Bachem, Heidelberg
Diprotein-A (Ile-Pro-Ile)	probiodrug AG, Halle/S
Diprotein-B (Leu-Pro-Val)	probiodrug AG, Halle/S
Exendin-3	Bachem, Heidelberg
GIP	probiodrug AG, Halle/S
GLP-1	probiodrug AG, Halle/S
Glukagon	probiodrug AG, Halle/S
Gly-Pro-AMC	probiodrug AG, Halle/S
His-Ala-AMC	probiodrug AG, Halle/S
His-Gly-AMC	probiodrug AG, Halle/S
His-Pro-AMC	probiodrug AG, Halle/S
His-Ser-AMC	probiodrug AG, Halle/S
Lys-Ala-AMC	probiodrug AG, Halle/S
NP Y	probiodrug AG, Halle/S
P32/98	probiodrug AG, Halle/S
P59/99	probiodrug AG, Halle/S
PACAP27	probiodrug AG, Halle/S
PACAP38	probiodrug AG, Halle/S
Pancreatic Polypeptid	Bachem, Heidelberg
Peptid: TFTSDY	probiodrug AG, Halle/S
t-Bu-Gly-Pro-Ile	probiodrug AG, Halle/S
t-Bu-Gly-Pro-Ile-NH ₂	probiodrug AG, Halle/S
Z-Gly-Pro-AMC	Bachem, Heidelberg
Z-Gly-Pro-AMC	probiodrug AG, Halle/S
ZW164	probiodrug AG, Halle/S
ZW215	probiodrug AG, Halle/S

Inhibitoren

Tab. 1: Strukturformeln der für die kinetische Charakterisierung verwendeten kompetitiven Inhibitoren bzw. Substrate. (der PEP-spezifische Inhibitor ZW215 konnte nicht aufgeführt werden, da der Effektor einer neuen Klasse von PEP-Inhibitoren angehört, dessen chemische Struktur aus patentrechtlichen Gründen hier nicht gezeigt werden kann).

Inhibitor	Strukturformel
P32/98 (Isoleucyl-Thiazolidin)	
Diprotin A (Ile-Pro-Ile)	
Diprotin B (Val-Pro-Leu)	
t-Butyl-Gly-Pro-Ile-NH ₂	
t-Butyl-Gly-Pro-Ile	
ZW164 (Fmoc-Ala-Pyrr-CN)	
P59/99 (Isoleucyl-(2)-Cyanopyrrolidin)	

Anhang

Primäre und Sekundäre Antikörper

Produkt	Hersteller/Anbieter
Penta His-Tag monoklonaler Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgG Peroxidase konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg

Enzyme

Produkt	Hersteller/Anbieter
ADA Typ VIII (bovine)	Bachem, Heidelberg
Platinum Taq High Fidelity	Invitrogen, Groningen, NL
EndoH _f	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> PEP	probiodrug AG, Halle/S.
Lyticase (aus <i>Arthrobacter Luteus</i>)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
native Schweine Dipeptidylpeptidase IV	probiodrug AG, Halle/S
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
<i>SacI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>BspDI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>KpnI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
PNGase F	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

Sonstige Chemikalien

Produkt	Hersteller/Anbieter
Agarose Qualex Gold	Hybaid-AGS, Heidelberg
Ammoniumsulfat	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
DNA-Größenstandard Bioladder 1 kb	Hybaid-AGS, Heidelberg
DNA-Größenstandard Bioladder 100	Hybaid-AGS, Heidelberg
DNA-Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
Protein-Molekulargewichtsstandard MultiMark	Invitrogen, Groningen, NL
Röntgenfilm-Entwickler	Tetanal, Norderstedt
Röntgenfilm-Fixierer	Tetanal, Norderstedt

Sonstige Labor-Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller/Anbieter
VIVASPIN 20 ml CONCENTRATOR	Vivascience, Hannover
Linbroplatten	Linbro, McLean, USA
C ₁₈ -Zip-Tips	Millipore, Billerica, USA

Kit's

Produkt	Hersteller/Anbieter
EasySelect <i>Pichia</i> Expression Kit	Invitrogen, Groningen, NL
JETquick DNA Clean-up Spin Kit/50	Genomed, Oeynhausen
JETquick GelExtraktion Spin Kit	Genomed, Oeynhausen
JETquick PCR Purification Kit	Genomed, Oeynhausen
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed, Oeynhausen
PCR-Script Amp bzw. Cam Cloning Kit	Stratagene, Cedar Creek, USA
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen, Groningen, NL
3'RACE	Invitrogen, Groningen, NL

Computerprogramme

Produkt	Hersteller/Anbieter
Biacore X Control	Biacore, Freiburg
BIAEvaluation	Biacore, Freiburg
GraFit 4.03	Erithacus Software Limited
KinLab 2.80.02	Perkin Elmer, Überlingen
SYBYL	Tripos, USA
MFCS/win 1.x.	B. Braun Biotech, Melsungen
Prism 3.02	GraphPad, USA

Escherichia coli- und Pichia pastoris-Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende *E. coli*- und *P. pastoris*-Stämme benutzt:

<i>E. coli</i> M15	(Qiagen, Hilden)
Epicurian Coli XL-1-Blue	(Fa. Stratagene, La Jolla USA, Kat.-Nr. 200315)
<i>Pichia pastoris</i> X-33	(Invitrogen, Groningen, NL)

Plasmid-Vektoren

Folgende Plasmid-Vektoren wurden in dieser Arbeit als Klonierungsvektoren bzw. als Expressionsvektoren eingesetzt:

pPCR-Script Cam SK(+) (Stratagene, Heidelberg)

pPCR-Script Amp SK(+) (Stratagene, Heidelberg)

pPICZ α C (Invitrogen, Groningen, NL): Der Vektor besitzt ein Zeocin-Resistenzgen und beinhaltet zudem ein Signalpeptid (α -Faktor), um einen effizienten Transport des Proteins in das Medium zu gewährleisten. Die 5' AOX1-Sequenz des Plasmids beinhaltet ein 942 bp langes Fragment, das dem AOX1-(Alkoholoxidase 1) Promoter der Hefe *P. pastoris* entspricht und eine Methanol induzierte Genexpression ermöglicht. Der Expressionsvektor hat mit *SacI* eine singuläre Schnittstelle außerhalb der essentiellen Genregionen. Dies ermöglicht eine Linearisierung des Plasmids für die Hefetransformation und die Integration in das Hefegenom.

pQE-31 (Qiagen, Hilden): Dieser Vektor wurde für die Expression von humaner PEP verwendet und wurde für diese Arbeit von Herrn Dr. Schulz freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Vektor besitzt ein Ampecillin-Resistenzgen.

Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) und in einer Konzentration von 100 pmol/µl synthetisiert (Tab. 1). Die Arbeitslösungen (20 pmol/µl) wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit Aqua dest. hergestellt.

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide hergestellt von der Firma Metabion (München)

Verwendung/ Enzymvariante	Oligonukleotid	Nukleotidsequenz
Sequenzierung	3' AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
	5' AOX1	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
R125A-DP IV	DP IV-120	5'-CTACGTGAAGCAATGGGCGCATTCTACACAGCTTC-3'
	DP IV-121	5'-GAAGCTGTGTAGGAATGCGCCATTGCTTCACGTAG-3'
R125K-DP IV	DP IV-118	5'-CTACGTGAAGCAATGGAAGCATTCTACACAGCTTC-3'
	DP IV-119	5'-GAAGCTGTGTAGGAATGCTTCATTGCTTCACGTAG-3'
N710A-DP IV	DP IV-124	5'-GAACAGCAGATGATGCCGTTCACTTTTCAGCAGTCAG-3'
	DP IV-125	5'-CTGACTGCTGAAAGTGAACGGCATCATCTGCTGTTC-3'
N710D-DP IV	DP IV-126	5'-GAACAGCAGATGATGACGTTCACTTTTCAGCAGTCAG-3'
	DP IV-127	5'-CTGACTGCTGAAAGTGAACGTCATCATCTGCTGTTC-3'
N710Q-DP IV	DP IV-122	5'-GAACAGCAGATGATCAGGTTCACTTTTCAGCAGTCAG-3'
	DP IV-123	5'-CTGACTGCTGAAAGTGAACCTGATCATCTGCTGTTC-3'
E205A-DP IV	DP IV-140	5'-GGTTTATGAAGAGGCAGTCTTCAGTGCCTACTCTGC-3'
	DP IV-141	5'-GCAGAGTAGGCACTGAAGACTGCCTCTTCATAAACC-3'
E206L-DP IV	DP IV-68	5'-CTGACTGGGTTTATGAAGAGCTAGTCTTCAGTGCCTAC-3'
	DP IV-69	5'-GTAGGCACTGAAGACTAGCTCTTCATAAACCAGTCAG-3'
W629A-DP IV	DP IV-75	5'-GCAATTTGGGGCTGGTCATAGCGAGGGTACGTAACC-3'
	DP IV-76	5'-GGTTACGTACCCTCGCTATGACCAGCCCCAAATTGC-3'
W547A-DP IV	DP IV-92	5'-CCTCTACTATTAGATGTGGCTGCAGGCCATGTAGTC-3'
	DP IV-93	5'-GACTACATGGGCTGCAGCCACATCTAATAGTAGAGG-3'
Y631F-DP IV	DP IV-80	5'-GCAATTTGGGGCTGGTCATTCCGAGGGTACGTAACC-3'
	DP IV-81	5'-GGTTACGTACCCTCCGAATGACCAGCCCCAAATTGC-3'
Amplifikation der humanen DP IV aus cDNA	D1	5'-CATGAATTCAAAACCTTACACTCTAACTG-3'
	D2	5'-GACTCGAGCTAAGGTAAAGAGAAACATTG-3'
His-6 Tag-Kassetten	C1	5'-GATCCGCCAGCCATGGTACATCATCATCATCATG-3'
	C2	5'-AATTCATGATGATGATGATGATGTACCATGGCTGGCG-3'
	C3	5'-GATCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTC-3'
	C4	5'-AACCAGAGCAGCAGTACCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCATGGTG-3'
	C5	5'-TGGGTTCCAGGTTCCACCGGTGACGGCATCATCATCATG-3'
	C6	5'-AATTCATGATGATGATGATGATGCGCGTCACCGGTGGAACCTGG-3'
<i>P. pastoris</i> Klonierung	D3	5'-TCATCGATGCATCATCATCATCAT-3'
	D4	5'-TAGGTACCGCTAAGGTAAGAGAAAC-3'
Amplifikation der DP IV von Schweineniere- cDNA	E1	5'-GATGAAGACACCGTGGAAAG-3'
	E2	5'-ACGCCACACAAGTAGTGATC-3'
	E3	5'-GCAGTACCCAAAGACTGTGC-3'
	E4	5'-TTATCCAAAGCTGAATGGTC-3'
	E5	5'-GCATCATTTAGTAAACAAGGC-3'
	E6	5'-CTGTAATAGTCAAGTTGTC-3'
	E7	5'-TGGGGCTGGGCATATGGAGG-3'
	E8	5'-GACTCGAGCTAAGGTAAAGAGAAACATTG-3'
AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	

Puffer und Lösungen (in alphabetischer Reihenfolge)

Entfärbelösung (Coomassie-Färbung)	10 % Essigsäure
Färbelösung (Coomassie-Färbung)	50 % Methanol 10 % Essigsäure 0,025 % Serva <i>blue W</i>
HEPES-Puffer	24,53 g/l HEPES 6,72 g/l NaCl (0,05 M) pH 7,6 (KOH)
HEPES-Brij	24,32 g/l HEPES 19,76 g/l KCl 0,025 % Brij pH 7,6 (KOH)
HBS-N-Puffer pH 7,4 (Biacore)	0,01 M HEPES 0,15 M NaCl
PBS	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,45 g/l Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O 0,4 g/l KH ₂ PO ₄
PBS-Tween	PBS + 0,5 % Tween 20
Probenpuffer (Agarosegelelektrophorese)	0,4 % Bromphenolblau 1 mM EDTA 50 % Glycerol
Probenpuffer pH 6,8 (SDS-Page)	200 mM Tris/HCL 10 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 10 % (v/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Puffer A (Metallchelatchromatographie)	300 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O pH 7,6

Anhang

Puffer B (Metallchelatchromatographie) 300 mM NaCl
50 mM NaH₂PO₄·2 H₂O
200 mM Imidazol
pH 7,6

SDS-Puffer 3,61 g/l Glycine
0,76 g/l Tris
0,25 g/l SDS

Stopplösung (für K_m-Bestimmung mittels HPLC MS/MS)
0,1 % Ameisensäure

TBE-Puffer (Agarosegelelektrophorese) 90 mM Tris
90 mM Borsäure
20 mM EDTA

Tris-Puffer 10 mM (für K_m-Bestimmung mittels HPLC MS/MS)
10 mM Tris
pH 7,6 (HCl)

Medien (in alphabetischer Reihenfolge)

BMM Medium (mit Methanol) / BMG Medium (mit Glycerol) (*P. pastoris*):
100 mM Kaliumphosphat, pH 6,0
1,34 % YNB
4 · 10⁻⁵ % Biotin
1 % Glycerol
oder 0,5 % Methanol

Fermentationsmedium (*P. pastoris*) 4,13 g/l KOH
3 g/l NH₄SO₄
0,9 g/l CaSO₄·2 H₂O
18 g/l K₂SO₄
15 g/l MgSO₄·7 H₂O
mit H₃PO₄ auf pH 5,0 einstellen
40 g/l Glycerol
4 ml/l Spurensalzlösung

Glycerol-Fed-batch Lösung (für die Fermentation):
800 g/l Glycerol
12 ml/l Spurensalzlösung

Anhang

LB Medium / LB Agar (*E. coli*)

5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
10 g/l Pepton
+/- 10 g/l Agar

Methanol-Fed-batch Lösung (für die Fermentation)

100 % Methanol
12 ml/l Spurensalzlösung

Spurensalzlösung (*P. pastoris*)

6 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
0,8 g/l NaI
3 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,2 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0,2 g H_3BO_3
0,5 g/l $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
2 g/l ZnCl_2
65 g/l FeSO_4
0,2 g/l Biotin
5 ml/l Konzentrierte Schwefelsäure

YPD Medium / YPD Agar (*P. pastoris*)

1 % Hefeextrakt
2 % Peptone
2 % Dextrose (Glukose)
+/- 2 % Agar
+/- 100 µg/ml Zeocin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Joachim Wolfgang Bär geboren am 19.07.1974 in Kassel, an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Ich habe mich mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben.

Halle (Saale), 14. April 2005

Lebenslauf

Name: Joachim Wolfgang Bär

Geburtsdatum: 19.07.1974

Geburtsort: Kassel

Familienstand: ledig, 1 Kind

08/1980 – 06/1984 Grundschule am Schloth in Melsungen

09/1984 – 06/1991 Gesamtschule Melsungen

10/1991 – 05/1994 Oberstufengymnasium „Geschwister Scholl“, Melsungen

06/1994 – 10/1995 Zivildienst in der Diakonie Kassel

10/1995 – 02/2001 Studium der Biotechnologie an der technischen Universität Braunschweig

08/1998 - 02/1999 Auslandssemester an der Universität Lund, Schweden im Fachbereich „Chemical Engineering“

06/1999 - 09/1999 Anfertigung der Studienarbeit zum Thema „activity and mechanical strength measurements of in aliginate immobilized enzymes“ unter der Anleitung von Prof. Dr. Legge an der University of waterloo, Kanada

03/2000 – 02/2001 Diplomarbeit zum Thema „Etablierung eines Expressionssystems für humane Dipeptidylpeptidase IV“ unter Anleitung von PD. Dr. S. Lang und Prof. Dr. N. Käufer von der technischen Universität Braunschweig, angefertigt in der Firma probiodrug AG Arbeitsgruppe „protein engineering“ in Halle an der Saale

seit 03/2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Firma probiodrug AG in der Arbeitsgruppe „protein engineering“, unter Leitung von Dr. B. Gerhartz und Dr. J.-U. Rahfeld

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlichst bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle danke ich herzlichst Herrn PD Dr. H.-U. Demuth und Herrn PD Dr. K. Glund für die Überlassung des Themas, das mir geschenkte Vertrauen und die Gewährung optimaler Arbeitsbedingungen bei der Anfertigung meiner Promotionsarbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. M. Stubbs für die Betreuung meiner Arbeit an der Lutheruniversität Halle/Wittenberg und die große Unterstützung zusammen mit Dr. S. Cumanevich bei der Durchführung der Kristallisationsstudien.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem direkten Betreuer Dr. J.-U. Rahfeld für die Hilfestellung bei der praktischen Arbeit und seiner ständigen Diskussionsbereitschaft. Seine Hilfestellung trug entscheidend dazu bei, dass die angefertigte Arbeit in der vorliegenden Qualität und Umfang angefertigt werden konnte. Mein Dank gilt auch Dr. B. Gerhartz der in der ersten Zeit meiner Arbeit als direkter Betreuer dazu beigetragen hat diese Arbeit auf den richtigen Weg zu bringen.

Bei Dr. T. Hoffmann bedanke ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft und die Anregungen die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. A. Lübbert und insbesondere bei M. Jenzsch bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Optimierung der Fermentationsbedingungen und Durchführung zahlreicher Fermentationen.

Ein ganz großer Dank gilt K. Gans für ihre außerordentliche Arbeit bei der Untersuchung der Wechselwirkungen im katalytischen Zentrum von DP IV.

Dr. W. Brand, Dr. S. Aust und S. Chambre gilt mein Dank für die Durchführung von Modelltheoretischen Arbeiten mit DP IV, die Grundlage für Teile dieser Arbeit waren

Mein Dank gilt Dr. K. Kühn-Wache für die Unterstützung und die von ihr geschaffenen Grundlagen bei den Untersuchungen der sekundären Bindungseigenschaften der DP IV.

Dr. I. Schulz gilt mein Dank für die Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung zu Fragen über die Prolylendopeptidase und in Zellkulturarbeiten.

Bei M. Werrmann möchte ich mich insbesondere für die Unterstützung bei der Isolierung von DP IV und PEP aus Fermentationsmedium bedanken.

Bei der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie, insbesondere Dr. F. Rosche und Dr. R. Wolf bedanke ich mich für die Bereitstellung des MALDI-TOF MS Gerätes und die hilfreiche Unterstützung bei Messungen mit dem LC/MS-Gerät.

Bei der Arbeitsgruppe Peptidsynthese, speziell Dr. S. Manhart bedanke ich mich für die Bereitstellung von Substraten und Inhibitoren.

Bei L. Wagner bedanke ich mich für die Unterstützung bei Experimenten zur isoelektrischen Fokussierung von DP IV.

Den Studenten K. Pawelke, K. Müller und N. Gensch danke ich für ihre Geduld mit mir und die gute Zusammenarbeit.

Ich möchte mich insbesondere bedanken bei S. Treichel, S. Chambre, R. Wolf, K. Gans, A. Weber und J.-U. Rahfeld für die Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern der (Mobi-)Arbeitsgruppe Molekularbiologie sowie allen anderen Kollegen von Probiodrug AG, Halle (Saale) danke ich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit sowie die immer währende Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Familie, Erik Bär und Stefanie Treichel, für die Liebe Geduld mit mir und meiner Arbeit. Meinen lieben Eltern danke ich für alles, besonders dafür, dass sie mir diesen Werdegang ermöglicht haben. Ebenso danke ich allen Verwandten, Bekannten und Freunden für die immer währende Hilfe und Unterstützung unserer Familie.