

PEPTIDHORMONE – SUBSTRATE PROLINSPEZIFISCHER PROTEASEN

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Kerstin Kühn-Wache

aus Bamako

Halle/Saale (2001)

Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Schomburg
PD Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

08. Mai 2001

I	INHALTSVERZEICHNIS	
II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1	EINLEITUNG	5
1.1	Peptide im Hormonsystem.....	5
1.1.1	Gastrointestinale Peptidhormone.....	6
1.2	Peptide im Nervensystem	12
1.3	Proteolytische Enzyme als Modulatoren der Aktivität biologisch aktiver Peptide.....	13
1.3.1	Die Dipeptidylpeptidase IV	14
1.3.2	Prolyloligopeptidase	20
1.4.	Zielstellung der Arbeit	24
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Großgeräte	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Reinigung der Dipeptidylpeptidase IV aus Schweineniere	27
2.2.2	Reinigung rekombinanter Prolyloligopeptidase aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i> exprimiert in <i>E. coli</i>	29
2.2.3	Proteinbestimmung	29
2.2.4	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	30
2.2.5	Aktivitätsbestimmungen	30
2.2.6	Bestimmung der kinetischen Konstanten	31
2.2.7	Bestimmung der Aktivität humaner rekombinanter POP in U343 Zellen nach Inkubation mit einem Inhibitor.....	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Biologisch aktive Peptide mit Substrateigenschaften	39
3.2	Glukagon und Glukagon - Analoga.....	54
3.2.1	Glukagon.....	54
3.2.2	Glukagon-Analoga	58
3.3	<i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i> (GIP) und GIP-Analoga	61
3.4	Untersuchungen zur Substratspezifität der POP	66

4	DISKUSSION	78
4.1	Erweiterte Substratspezifität der DP IV	79
4.1.1	Substrate mit Serin, Glycin oder Valin in P ₁ -Position	79
4.2	Mechanismus DP IV-katalysierter Hydrolyse von Substraten mit Serin, Valin oder Glycin in P ₁ -Position.....	91
4.2.1	Hydrolyse von Prolinsubstraten	91
4.2.2	Katalyse von Substraten mit Serin, Valin und Glycin in P ₁ -Position	94
4.3	POP-katalysierte Hydrolyse von Substraten mit Serin oder Threonin in P ₁ -Position	99
4.4	Funktion von POP in Signaltransduktionsprozessen.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
6	ABSTRACT	106
7	LITERATURVERZEICHNIS	108

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aa	beliebige Aminosäure
ACTH	adrenocorticotropes Hormon (Corticotropin)
ACN	Acetonitril
AMC	7-Amido-4-Methylcoumarin
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
βA4	Teilsequenz des APP
BIA	biomolekulare Interaktionsanalyse
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary</i> -Zell-Linie
CLIP	<i>Corticotropin-like intermediate lobe peptide</i> (ACTH ₁₈₋₃₉)
CZE	<i>Capillary zone electrophoresis</i>
DAHC	Di-Ammoniumhydrogencitrat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DHAP	2',6'-Dihydroacetophenon
DP I	Dipeptidylpeptidase I (Cathepsin C)
DP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
ΔE	Extinktionsänderung
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (Hydrochlorid)
EDTA	Ethandiamintetraacetat
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ε	Extinktionskoeffizient
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GF-NHO-Bz	Glycylphenylalanylhydroxamsäure-N-Benzoylester
GIP	<i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
GLP-1 bzw. -2	<i>Glucagon-like peptide-1 bzw. -2</i>
GP-4NA	Glycylprolyl-4-Nitroanilid
GPP-4NA	Glycylprolylprolyl-4-Nitroanilid
GRF	<i>Growth hormone-releasing factor</i>
GRP	<i>Gastrin releasing peptide</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HIT	β-Zell-Linie
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>

HS-1	Hymenistatin-1
Ile-Thia	Isoleucyl-Thiazolidin
IP ₃	Inositol(1,4,5)-Trisphosphat
K _A	Assoziationskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
k _{cat}	Wechselzahl
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _{cat} /K _m	Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung enzymkatalysierter Reaktionen
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MDF	<i>Macrophage derived factor</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NP Y	Neuropeptid Y
NTA	Nitriltriäcetylsäure
P YY	<i>Peptide YY</i>
p38-MAP-Kinase	p38 <i>mitogen-activated-protein kinase</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>
PBS	<i>Phosphate buffered salt</i>
PHM	<i>Peptide histidine methionine</i>
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
POP	Prolylloleptidase
PP	<i>Pancreatic polypeptide</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i>
rPOP	rekombinante Prolylloleptidase
SDF	<i>Stromal derived factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Substanz P
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U343	Humane Glioma-Zell-Linie
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
Xaa	variable Aminosäure
Z-	Benzyloxycarbonyl-

1 Einleitung

Zur Aufrechterhaltung physiologischer Gleichgewichte (Homöostase) müssen Organismen über ein sensitives und flexibel agierendes Informationssystem verfügen. In komplexen tierischen Organismen existieren hierfür zwei hochspezialisierte Koordinierungs- und Kommunikationssysteme: das Hormon- und das Nervensystem. Das Zusammenwirken beider Systeme wird u.a. durch chemische Botenstoffe, im Nervensystem durch Neurotransmitter und im endokrinen System durch Hormone, gewährleistet, die Signale von Zelle zu Zelle übertragen. Diese Supersysteme arbeiten jedoch nicht unabhängig sondern interagieren miteinander. So können biologisch aktive Peptide sowohl als Neurotransmitter als auch als Peptidhormone fungieren. In Abhängigkeit vom jeweils exponierten Rezeptortyp auf der Zielzelle kann ein und dasselbe Signalmolekül verschiedene physiologische Reaktionen hervorrufen. Die Modulation der Aktivität dieser Signalmoleküle erfolgt unter anderem durch limitierte Proteolyse, d.h. durch Enzyme, die hochspezifisch Peptidbindungen spalten. Nachfolgend soll die Funktion von Peptidhormonen im Nerven- und Hormonsystem erläutert werden. Im Anschluß daran wird auf die Rolle der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5) und der Prolyloligopeptidase (POP; EC 3.4.21.26), zweier prolinspezifischer Proteasen, als Mediatoren im Kommunikationsprozeß beider Systeme eingegangen.

1.1 Peptide im Hormonsystem

1905 prägten Bayliss und Starling den Begriff „Hormon“, um die Wirkung von Secretin zu beschreiben. Secretin ist ein Hormon des Gastrointestinaltraktes. Es stimuliert die Ausschüttung des Pankreassaftes. Aus ihren Arbeiten leiteten sich folgende Vorstellungen über Eigenschaften von Hormonen ab.

Hormone sind chemische Botenstoffe, die durch spezielle Gewebe (Hormondrüsen) produziert, in Körperflüssigkeiten ausgeschüttet werden und so an ihre Zielzellen gelangen. Die Synthese erfolgt jedoch nicht nur in den klassischen endokrinen Organen. Manche Hormone, wie z.B. Angiotensin werden aus Vorstufen im Blut durch die Aktivität proteolytischer Enzyme freigesetzt. Andere, wie das Dihydrotestosteron männlicher Säuger, zirkulieren als Vorstufen und werden erst in den Zielorganen in ihre aktive Form überführt.

Durch Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen kommt es in effizienter Weise zu Änderungen in den Aktivitäten der Zielorgane bzw. Zielzellen. Die chemische Natur von Hormonen ist ver-

schieden. Man unterteilt in vier Hormonklassen: Aminosäurederivate, Polypeptide oder Proteine, Steroide und Eicosanoide.

Different wie ihre chemische Natur sind auch die Wirkprinzipien von Hormonen. Hierbei können vier allgemeine Mechanismen unterschieden werden:

- Die Bindung an einen in der Plasmamembran lokalisierten Rezeptor bewirkt eine Aktivierung der Adenylatzyklase-Kaskade und führt so zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und zur Aktivierung von Proteinkinasen (Adrenalin, Glukagon, *Thyrotropin-releasing hormone* (TRH)).
- In der Phosphoinositid-Kaskade erzeugt die Hydrolyse eines Membranphospholipids zwei intrazelluläre Botenstoffe - Inositoltrisphosphat (öffnet Kalziumkanäle) und Diacylglycerin (aktiviert Proteinkinase C, die Ser- und Thr-Reste in ihren Zielproteinen phosphoryliert).
- Ein drittes Prinzip ist die Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität der Rezeptoren durch die Bindung des Hormons (Insulin, Wachstumsfaktoren).
- Steroid- und Schilddrüsenhormone dringen in ihre Zielzellen ein und binden an Rezeptoren, die zum Kern transportiert werden. Dort binden sie an spezifische DNA-Segmente und agieren als Transkriptionsverstärker.

Bis auf Steroidhormone, deren Rezeptoren intrazellulär lokalisiert sind und die auch aufgrund ihrer Lipophilie die Zellmembran gut passieren können, befinden sich die Rezeptoren der anderen Hormonklassen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran. Bei vielen Hormonen initiiert die Ausbildung des Rezeptor-Hormon-Komplexes die Synthese von sekundären Botenstoffen (*second messenger*), die eine kaskadenartige Aktivierung von Proteinkinasen bewirken und so zu einer enormen Verstärkung des Signals führen. Ein Hormon kann an mehrere verschiedenartige Rezeptoren binden und in Abhängigkeit vom Rezeptortyp unterschiedliche Wirkungen in verschiedenen Organen und Geweben auslösen. Limitierte Proteolyse eines Hormons kann seine Rezeptorspezifität beeinflussen, wie es zum Beispiel für Neuropeptid Y bekannt ist (Medeiros and Turner, 1996).

1.1.1 Gastrointestinale Peptidhormone

In einfachen einzelligen Lebewesen sezerniert der Organismus hydrolytische Enzyme in das äußere Milieu oder in Vakuolen und nimmt die Hydrolyseprodukte durch die Zellmembran wieder auf. In höheren Organismen erfolgt der Aufschluß der Nahrung im Verdauungssys-

tem. Um diesen komplexen Prozeß zu steuern, bedarf es einer Vielzahl regulatorischer Peptide. Die beiden zuerst beschriebenen Hormone, Secretin (1902 durch Bayliss & Starling) und Gastrin (1905 durch Edkins), sind Hormone des gastrointestinalen Traktes. Aufgrund der Menge seiner endokrinen Zellen und der Vielfalt der hier synthetisierten Hormone ist der Darm das größte Hormon-produzierende Organ des Körpers. Viele Gene gastrointestinaler Hormone werden auch außerhalb des gastrointestinalen Traktes exprimiert. Sie können sowohl als metabolische Hormone als auch als Neurotransmitter, lokale Wachstumsfaktoren und Fertilitätsfaktoren wirken.

Ein Polypeptid muß folgenden Kriterien genügen, um als gastrointestinales Hormon klassifiziert werden zu können:

1. Das Peptid muß in Reaktion auf Nahrungsaufnahme oder einen anderen physiologischen Stimulus durch einen Teil des Verdauungstraktes freigesetzt werden.
2. Die Substanz muß nach dem Stimulus im Blut nachweisbar sein.
3. Die exogene Gabe der Substanz muß die Reaktion im gastrointestinalen Trakt auslösen, die normalerweise auf den endogenen Stimulus erfolgt (Rehfeld, 1998).

Seit den späten siebziger Jahren wurden eine Vielzahl regulatorischer Peptide (Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren) des Darms beschrieben. Individuelle Gene für regulatorische Peptide des Darms kodieren für verschiedene Peptide, die in gewebs- und zellspezifischer Art unterschiedliche bioaktive Peptide freisetzen. Durch Strukturaufklärung konnten Homologien zwischen Gruppen der Peptidhormone nachgewiesen werden, so daß eine Unterteilung in Familien erfolgte (vgl. Tabelle 1, S. 8).

Die Art der Homologie variiert bei den einzelnen Familien. So ist den Mitgliedern der „*Pancreatic polypeptide*“-Familie (PP-Familie) eine generelle Ähnlichkeit in der Primärstruktur (zwischen 45 und 70%) eigen, die eine identische und stabile Tertiärstruktur (PP-Faltungsmotiv) zur Folge hat. Die Gastrin-Familie zeichnet sich durch eine Konservierung der Aminosäuren des C-Terminus aus. Veränderungen an den vier C-terminalen Aminosäuren führen zu einem drastischen Verlust der biologischen Aktivität (Rehfeld, 1998).

Der Aufschluß der Nahrung im Magen-Darm-Trakt führt zu einer Freisetzung gastroenteropankreatischer Hormone in das Blut, die bei der Koordinierung der Verdauungsprozesse eine wesentliche Rolle spielen. Dies führte zu der These, daß ein Teil der Peptide auch in die Kontrolle des Sättigungsgefühls und damit in die Steuerung der aufgenommenen Nahrungsmenge involviert sein könnte (Schols *et al.*, 1999).

Tabelle 1: gastroenteropankreatische Peptidfamilien nach Rehfeld (Rehfeld, 1998)

Familie	Peptide
Secretin-Familie oder auch	- Secretin
GRF-Familie	- Glukagon und <i>Glucagon-like Peptides</i> (GLP) - <i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i> (GIP) - <i>Vasoactive intestinal polypeptide</i> (VIP) und <i>Peptide histidine methionine</i> (PHM) - <i>Growth hormone releasing factor</i> (GRF) - <i>Pituitary adenylate cyclase-activating peptide</i> (PACAP)
Insulin Familie	- Insulin - <i>Insulin-like growth factor I und II</i> (IGF I und IGF II) - Relaxin
EGF Familie	- <i>Epidermal growth factor</i> (EGF) - <i>Transforming growth factor-α</i> (TGF- α) - Amphiregulin
Gastrin Familie	- Gastrin - Cholecystokinin21 (CCK21)
PP-gefaltete Familie	- <i>Pancreatic polypeptide</i> (PP) - Peptid YY (P YY) - Neuropeptid Y (NP Y)
Tachykinin Familie	- Substanz P (SP) - Neurokinin A - Neurokinin B
Somatostatin Familie	- Somatostatin - Corticostatin

1.1.1.1 Glukagon

Die Regulation der Konzentration des Blutzuckers ist ein homöostatisches System. Eine konstante Blutglukosekonzentration ist essentielle Voraussetzung für den Ablauf so elementarer Lebensprozesse wie der Zellatmung. Glukose ist eine der Haupttransportformen von Kohlenhydraten und die Hauptenergiequelle der Zellen höherer Organismen. Länger anhaltende Störungen dieses Systems führen zu pathologischen Veränderungen, die sich z.B. in

Diabetes mellitus äußern können. Wichtigste Regulatoren der Blutglukosekonzentration sind die antagonistischen Hormone Insulin und Glukagon, die in den Langerhans'schen Zellen des Pankreas produziert werden. Glukagon ist ein aus 29 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Es wird als Propeptid in den α -Zellen (auch A-Zellen) der Bauchspeicheldrüse und in endokrinen Zellen der intestinalen Mukosa synthetisiert. In Abhängigkeit vom Syntheseort wird Proglukagon unterschiedlich prozessiert. Als Hauptprodukte entstehen im Pankreas Glukagon und im Dünndarm *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) sowie *Glucagon-like peptide-2* (GLP-2) (vgl.

Abbildung 1).

Trotz der hohen Sequenzhomologie zwischen Glukagon und GLP-1 wirken beide Peptide über spezifische Rezeptoren (Holst, 1996).

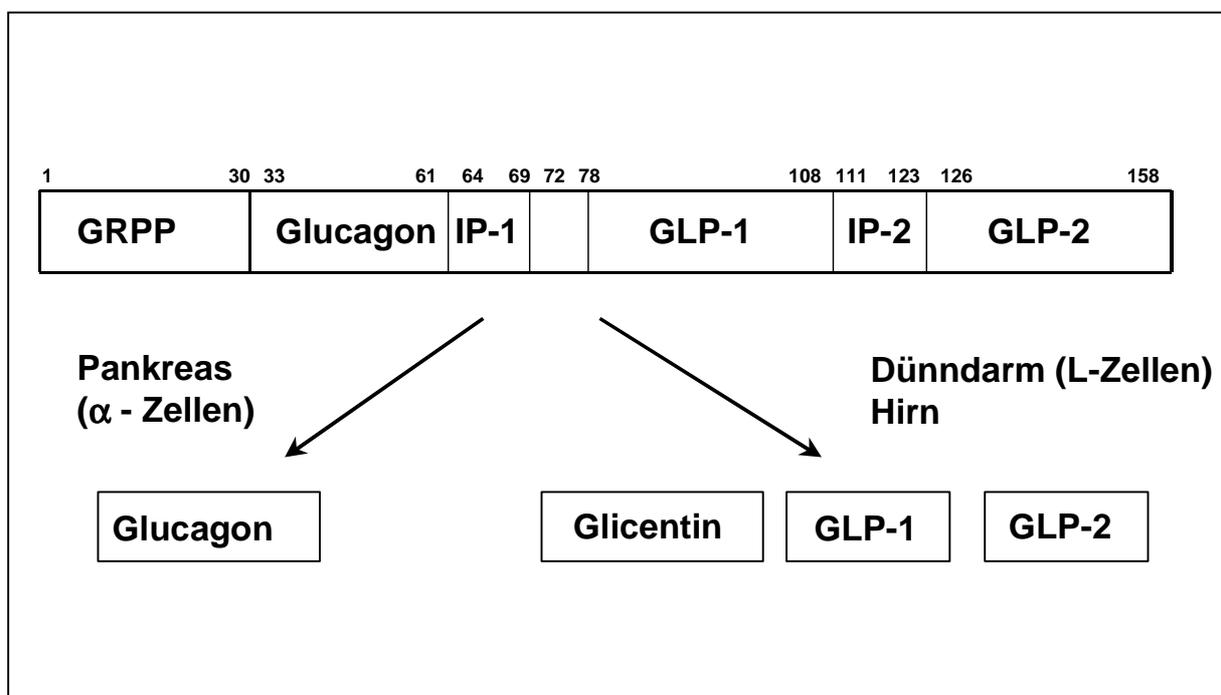


Abbildung 1: Schematische Darstellung der aus der Sequenz des Proglukagons durch limitierte Proteolyse freisetzbaren Peptidhormone

Bindet Glukagon an seinen Rezeptor, so wird G-Protein-vermittelt eine Adenylatzyklase aktiviert, die die intrazelluläre Menge an cAMP erhöht. Die erhöhte cAMP-Konzentration stimuliert das Proteinkinase-System in Leberzellen. Eine Aktivitätssteigerung der Glykogenphosphorylase und die Induktion der Glykogenolyse sind die Folge. Gleichzeitig wird die Aktivität der Glykogensynthase gehemmt. Zu einer gesteigerten Glukagon-Produktion kommt es immer dann, wenn sich der Organismus im Hungerzustand befindet oder nach einer kohlenhydratarmen Mahlzeit, um die Versorgung des Organismus mit Glukose aufrechtzuerhalten.

1.1.1.2 ***Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)***

Ausgangs des 19. Jahrhunderts beschrieben Ewals und Boas, daß mit Olivenöl vermengte Nahrung sowohl die Entleerung des Magens als auch die Magensäuresekretion hemmte (Ewald and Boas, 1880). Bei der Entdeckung des Secretins 1902 postulierten Bayliss und Starling, daß nach Nahrungsaufnahme vom Darm freigesetzte Signale eine endokrine Reaktion des Pankreas hervorrufen können (Bayliss and Starling, 1902). 1929 verfolgten Zuns und La Barré diese Idee weiter und konnten einen Secretin-freien intestinalen Extrakt isolieren, der Hypoglykämie in Hunden induzierte (Zunz and La Barré, 1929). Daraufhin wurde von La Barré der Begriff „Incretin“ eingeführt, um die humorale Aktivität des Darms zu beschreiben, die die Sekretion der endokrinen Zellen des Pankreas verstärkte (La Barre and Still, 1930). 40 Jahre später prägten Unger und Eisentraut (Unger and Eisentraut, 1969) den Begriff der „enteroinsularen Achse“. Die enteroinsulare Achse beschreibt die Signaleffekte zwischen Darm, Pankreas und Zielgewebe, die die schnelle und effiziente Aufnahme der Nahrung ermöglichen. Creutzfeldt (Creutzfeldt, 1979) definierte Kriterien, die ein Incretin oder Hormon erfüllen muß, um Teil der enteroinsularen Achse zu sein:

- Es muß durch Nährstoffaufnahme, insbesondere Kohlenhydrate, freigesetzt werden.
- Es muß in physiologischen Konzentrationen bei erhöhten Blutglukosekonzentrationen die Insulinsekretion verstärken.

Das *Glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP) erfüllt diese Kriterien. Es wurde 1970 von Brown und Pederson (Brown and Pederson, 1970) aufgrund seiner inhibitorischen Effekte auf die Magensäure- und Pepsin-Sekretion isoliert und zuerst als „*Gastric inhibiting peptide*“ bezeichnet. GIP wurde in den K-Zellen des Duodenum und Jejunum nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe um Dupré stellte 1973 fest, daß die intravenöse Infusion von gereinigtem GIP_{Schwein} im Menschen gemeinsam mit Glukose eine signifikant größere Insulinfreisetzung bewirkte als die separate Verabreichung der gleichen Glukosedosis (Dupré *et al.*, 1973). Die erhöhte Insulinsekretion trat nur während der GIP-Infusion auf und wurde nicht im euglykämischen Status beobachtet. Die glukoseabhängige insulintrope Aktivität des GIP wurde später auch *in vivo* an Hunden und an perfundierten Rattenpankreatata gezeigt. Neben der Stimulierung der GIP-Sekretion durch Kohlenhydrate verstärkt die Aufnahme von Fetten ebenfalls die Ausschüttung des Hormons. Glukose-unabhängige Erhöhung der Konzentration des GIP hat keinen Effekt auf den Plasmainsulinspiegel. Die Glukoseabhängigkeit des insulintropen Effektes des GIP scheint ein Sicherheitsmechanismus gegen eine unproportionale Stimulierung des Insulinspiegels bei einer fettreichen und kohlenhydratarmen Ernährung zu sein. Das Resultat einer unproportional hohen Insulinausschüttung wäre ein hypoglykämischer Zustand. Da der durch GIP vermittelte Incretin-Effekt von größerer physiolo-

gischer Relevanz als die Hemmung der Magensäuresekretion ist, wurde das Peptidhormon in „*Glucose-dependent insulinotropic polypeptide*“ umbenannt. GIP entfaltet seine Wirkung über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Dieser Rezeptor wurde 1993 erstmals aus der Ratte kloniert (Usdin *et al.*, 1993). Der GIP-Rezeptor ist ein Glykoprotein, das zur Familie der Secretin/VIP-Rezeptoren gehört. Für die Auslösung der cAMP vermittelten Signalkaskade ist die erste aminoternale Transmembranregion erforderlich (Gelling *et al.*, 1997). GIP und sein Rezeptor sind den Neuropeptiden *Vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) und *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide* (PACAP) sowie deren Rezeptoren verwandt. Es konnte gezeigt werden, daß VIP und PACAP die intrazellulären cAMP- und Ca^{2+} -Spiegel maximal 29 Minuten nach Stimulierung ihrer Rezeptoren erhöhen, die Freisetzung von Insulin aus HIT-Zellen jedoch für mehr als 50 Minuten anhält, wenn cAMP und Ca^{2+} -Konzentrationen wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückgekehrt sind (Filipsson *et al.*, 1998). Worauf dieser Effekt beruht, konnte noch nicht geklärt werden. Mit Hilfe von Wortmannin, einem spezifischen Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) konnte nachgewiesen werden, daß GIP auch einen Wortmannin-sensitiven Mechanismus der Signaltransduktion nutzt (McIntosh *et al.*, 1999); (Kubota *et al.*, 1997; Straub and Sharp, 1996). mRNA des GIP-Rezeptors wurde außer im Pankreas ebenfalls im Magen, Darm, adrenalen Cortex, Herz, Lunge und Hirn sowie auf den endothelialen Zellen der Hauptblutgefäße und auf Fettzellen nachgewiesen (Morgan, 1996). Ob es weitere Liganden für den GIP-Rezeptor gibt oder ob GIP andere, bislang noch unbekannte physiologische Effekte hat, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Aufgrund der insulinotropen Eigenschaft und seiner Funktion im Fettstoffwechsel ist GIP ein Ansatzpunkt für die Therapie von Diabetes mellitus Typ II oder Adipositas. Mentlein *et al.* wiesen *in vitro* nach, daß gereinigte humane DP IV das N-terminale Dipeptid Tyr-Ala von GIP abspaltet (Mentlein *et al.*, 1993). Während der Inkubation von humanem Serum mit GIP konnten die gleichen Abbaufragmente nachgewiesen werden. Diprotein A und Lys-Pyrrolidid, zwei spezifische DP IV-Inhibitoren, hemmten den Abbau zu GIP_{3-42} vollständig. Untersuchungen in Wistar-Ratten, denen markiertes, synthetisches GIP bzw. GLP-1 appliziert wurde, ergaben, daß die Halbwertszeit beider Incretine *in vivo* ca. 2 min beträgt (Kieffer *et al.*, 1995). Eine Stabilisierung des N-Terminus von GIP gegen proteolytischen Angriff durch DP IV könnte *in vivo* zu einer verlängerten Stimulation des GLP-1 und zu einer verstärkten Insulinsekretion in Reaktion auf einen erhöhten Blutglukosespiegel führen. Systematische Studien zum Einfluß von N-terminalen Modifikationen am GIP sind bisher noch nicht publiziert worden. Eine N-terminale Glykosylierung des GIP verstärkte den Insulin-stimulierenden Effekt des Hormons auf β -Zellen. Die Verbindung, Tyr¹-Glucitol GIP, ist resistent gegen aminopeptidatischen Angriff und verfügt auch über bessere glukosesenkende Eigenschaften als das native GIP (O'Harte *et al.*, 2000; O'Harte *et al.*, 1999).

1.2 Peptide im Nervensystem

Nervenzellen sind bei Metazoen die phylogenetisch älteste Bildungsstätte von Wirkstoffen. Erst seit ca. fünfzig Jahren hat sich die Vorstellung etabliert, daß die Kommunikation zwischen den Neuronen des Zentralnervensystems vorrangig durch chemische denn elektrische Signale erfolgt. Der Hypothalamus ist einer der wichtigsten Synthesorte für Hormone und biologisch aktive Peptide des Nervensystems. Viele der Neuropeptide kommen nicht nur in zentralen und peripheren Neuronen vor, sondern werden auch in endokrinen Zellen, z.B. im Darmtrakt, gefunden.

Zu den in den letzten Jahren sehr intensiv erforschten Neuropeptiden gehört das Neuropeptid Y (NP Y), das eine wichtige Funktion in der Steuerung des Energiehaushaltes des Organismus hat. Es wurde 1982 erstmals von Tatemoto *et al.* aus Schweinehirn isoliert und wirkt vasopressiv (Tatemoto, 1982). Es stimuliert die Nahrungsaufnahme, reguliert Hormonsynthese und -freisetzung und ist an der Kontrolle des circadianen Rhythmus beteiligt. Synthetisiert wird NP Y in peripheren sympathischen Neuronen und im Hirn. Im Zusammenhang mit der Ausprägung von Adipositas (Fettsucht) wird NP Y als ein wesentlicher Faktor zur Aufrechterhaltung der Energiebalance diskutiert (Strader *et al.*, 1997; Bannon *et al.*, 2000; Uusitupa *et al.*, 1998). Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch werden kurzfristig von verschiedenen Signalen beeinflusst. Dazu gehören neuronale Signale, die Informationen über den circadianen Rhythmus übermitteln, metabolische Signale über den Energiebedarf des Hirns und gastrointestinale Signale in Form von Peptidfreisetzungen als Reaktion auf Nahrungsaufnahme. So kann der Körper seinen Energiebedarf der gegebenen äußeren Situation kurzfristig anpassen. Über lange Zeiträume hinweg wird jedoch ein homöostatisches Gleichgewicht des Energiehaushaltes aufrechterhalten, das nur unter pathologischen Bedingungen außer Kontrolle gerät und sich u.a. in der Ausprägung von Adipositas äußern kann. Diese regulativen Funktionen werden durch das Zentralnervensystem gesteuert, das Informationen über die Größe der Energiedepots (in Form von gespeichertem Fett) durch die Konzentrationsänderung eines anderen Neuropeptides, des Leptins, erhält (Schwartz *et al.*, 1999).

Eine enge Wechselwirkung besteht auch zwischen Komponenten des Nervensystems und anderen Systemen, z.B. dem Immunsystem der Haut. Neuropeptide werden ebenso von sensorischen Nerven in der Haut freigesetzt und können die Funktion von Keratinozyten, Langerhans'schen Zellen und Mastzellen modulieren. Zu diesen Peptiden gehören die Tachykinine Substanz P und Neurokinin A, das *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP), das *Vasoactive intestinal peptide* (VIP) und Somatostatin (SMS). Sie wirken auf Zellproliferation, Zytokinproduktion und Antigenpräsentation unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Es konnte nachgewiesen werden, daß einige Hauterkrankungen wie Psoriasis

(Schuppenflechte) und atopische Dermatitis eine neurogene Komponente haben (Scholzen *et al.*, 1998).

1.3 Proteolytische Enzyme als Modulatoren der Aktivität biologisch aktiver Peptide

Proteolytische Enzyme haben nicht nur katabole Funktion, sie stellen auch wichtige regulatorische Schaltstellen in einer Reihe physiologischer Signalkaskaden dar. Durch limitierte Proteolyse sind hochspezifische Proteasen an der Aktivierung, Inaktivierung und Wirkungsmodulation von biologisch aktiven Peptiden in den verschiedenen Organsystemen des Körpers beteiligt. So werden z.B. Proteasen, Zytokine, Peptidhormone und neuroaktive Peptide in ihrer Aktivität durch limitierte Proteolyse reguliert. Es ist heute davon auszugehen, daß ubiquitär verbreitete hochspezifische Proteasen wie die Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) zum einen in unterschiedlicher Weise in lokale oder systemspezifische Regulationskaskaden eingreifen und zum anderen entscheidend am Zusammenspiel der verschiedenen Organsysteme (neuronales System, gastrointestinales System, Immunsystem, kardiovaskuläres System) beteiligt sind. Ähnliches gilt, auf einer anderen Ebene, für die intrazellulär lokalisierte Prolyloligopeptidase (POP). Diese ist ebenfalls an der Regulation und Vernetzung wichtiger zellulärer und extrazellulärer Prozesse (Apoptose, Lern- und Gedächtnisleistungen) beteiligt. Aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen stellen solche Proteasen potentielle therapeutische Ziele für eine Reihe von Erkrankungen dar. Im Unterschied zur Inhibierung hochspezifischer Proteasen von Krankheitserregern (HIV-Protease) besteht bei der Hemmung solcher körpereigenen Enzyme jedoch immer die Gefahr, ungewollt in andere Regulationskaskaden einzugreifen und damit unerwünschte Nebenwirkungen zu erzielen. Deshalb ist ein möglichst umfassendes Wissen um die molekularen Eigenschaften und die physiologische Rolle dieser Proteasen Voraussetzung für eine zielgerichtete und nebenwirkungsarme Therapie.

1.3.1 Die Dipeptidylpeptidase IV

1.3.1.1 Vorkommen

Die Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5) wurde 1966 von Hopsu-Havu und Glenner in Rattenleberhomogenaten aufgrund ihrer Fähigkeit Naphthylamin aus Gly-Pro-2-Naphthylamid freizusetzen entdeckt (Hopsu-Havu and Glenner, 1966). Seither konnte das Enzym aus einer Reihe verschiedener Organismen, u.a. aus Bakterien, Hefe, Insekten und Pflanzen isoliert werden (Yoshimoto and Tsuru, 1982; Nardi *et al.*, 1991; Bordallo *et al.*, 1984; Kreil *et al.*, 1980; Stano *et al.*, 1994). In Säugern wurde das Enzym in verschiedenen Geweben und Flüssigkeiten gefunden. Dazu zählen Plazenta, Niere, Lymphozyten, Urin und Serum (Puschel *et al.*, 1982; Iwaki-Egawa *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1978b; Akrawi and Bailey, 1976; Feller and Parwaresch, 1980). In der Niere ist DP IV vorrangig in der Nierenrinde, insbesondere in den Mikrovilli der Bürstensaummembran lokalisiert (Kenny *et al.*, 1977). Die Bürstensaummembran der Enterozyten des Dünndarms und die Mikrovilli der plazentalen Throphoblasten sind ebenfalls reiche DP IV-Quellen (Barrett *et al.*, 1998). In der Leber wurde das Enzym hauptsächlich in den Hepatozyten der Plasmamembran gefunden, die die Gallengänge umgibt. Im Immunsystem wurde die DP IV als Leukozytenantigen CD26 identifiziert, dessen Expression streng mit dem Aktivierungs- und Proliferationsstatus der T-Zellen korreliert (Lojda, 1988). CD26 konnte ebenfalls auf aktivierten B- und NK-(*Natural killer*)-Zellen nachgewiesen werden. DP IV ist auf vielen epithelialen und einigen spezialisierten mesodermalen Zellen lokalisiert und wird häufig an physiologischen Barrieren wie beispielsweise der Blut-Hirn-Schranke exponiert (Mentlein, 1999).

1.3.1.2 Molekulare und katalytische Eigenschaften

Die Dipeptidylpeptidase IV ist ein multifunktionelles Protein, das membranverankert auf Zelloberflächen exponiert wird. Das Enzym hat - in Abhängigkeit von der Spezies, dem Gewebe und dem zellulären Differenzierungsstatus - ein Molekulargewicht von ca. 110 000 bis 150 000 Da pro Untereinheit. Diese Heterogenität ist vermutlich durch unterschiedliche Glykosylierungsgrade bedingt (Smith *et al.*, 1998). Die native Peptidase besteht aus zwei katalytisch voneinander unabhängigen, identischen Untereinheiten, die durch nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind.

Auf der Grundlage intensiver physiko-chemischer Untersuchungen wurde von Lambeir *et al.* ein Modell der Domänenstruktur der DP IV vorgeschlagen (Lambeir *et al.*, 1997). Die Primärkonfiguration setzt sich aus fünf distinkten Domänen zusammen. Der Membrananker wird durch eine 22 Aminosäurereste umfassende hydrophobe Peptidsequenz (7-29) gebildet. Daran schließt sich N-terminal eine kurze hydrophile zytosolische Domäne an. Ein flexibles Segment verbindet den Membrananker mit einer großen, glykosylierten Region (48-324), einem cysteinreichen Bereich (325-552) und der C-terminalen katalytischen Domäne (553-766). Die Glykosylierungsregion repräsentiert fünf von acht Glykosylierungsorten (Ratte) (Ogata *et al.*, 1989). 10 bis 27% des DP IV Moleküls bestehen aus Kohlenhydraten. Die Bedeutung domänenspezifischer Glykosylierungen sowohl für die Stabilität und Proteinfaltung als auch für die enzymatische Aktivität und die Targetierung der DP IV in der Zelle konnte 1997 von Fan *et al.* durch gezielte Punktmutation nachgewiesen werden (Fan *et al.*, 1997).

Nach Klonierung und Sequenzierung der für DP IV kodierenden DNA-Bereiche von Ratte (Ogata *et al.*, 1989), Maus (Marguet *et al.*, 1992), Mensch (Darmoul *et al.*, 1992; Misumi *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992a); *Flavobacterium meningosepticum* (Kabashima *et al.*, 1995), *Xanthomonas maltophilia* (Kabashima *et al.*, 1996) und *Xenopus laevis* (Vlasak *et al.*, 1997) konnten zwischen pro- und eukaryotischer DNA Sequenzhomologien von ca. 30% nachgewiesen werden (Kabashima *et al.*, 1996; Kiyama *et al.*, 1998). DNA-Vergleiche zwischen eukaryotischen Spezies zeigten weitaus größere Homologien (ca. 85% Ratte und Mensch (Misumi *et al.*, 1992), ca. 89% Maus und Mensch (Darmoul *et al.*, 1992)).

Trotz intensivster Bemühungen konnte die DP IV bisher noch nicht kristallisiert und daher keine Röntgenkristallstruktur erhalten werden.

DP IV ist eine ubiquitär verbreitete Serinprotease, die durch den klassischen Serinproteaseinhibitor Diisopropylfluorophosphat (DFP) hemmbar ist. Innerhalb stark konservierter Regionen im C-terminalen Bereich wurde durch gezielte Punktmutationen die katalytische Triade (Ser, Asp, His) identifiziert (Ogata *et al.*, 1992; David *et al.*, 1993). Die für Serinproteasen, Esterasen und Lipasen typische Konsensus-Sequenz Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly konnte um den aktiven Serylrest der DP IV nachgewiesen werden (Polgar, 1992; Brenner, 1988). Die Anordnung der Aminosäurereste, die die katalytische Triade bilden, und der Katalysemechanismus unterscheiden die DP IV von den klassischen Serinproteasefamilien der Subtilisine (Familie S8; Asp, His, Ser) und Chymotrypsine (Familie S1; His, Asp, Ser). Daher wurde die Zuordnung der DP IV zu einer neuen Familie der Serinproteasen, der Prolylloligopeptidase-Familie (S9), gemeinsam mit Prolylloligopeptidase (EC 3.4.21.26) und der Acylaminoacylpeptidase (EC 3.4.19.1) vorgeschlagen (Barrett and Rawlings, 1992; Polgar and Szabo, 1992).

Die Iminosäure Prolin hat unter den proteinogenen Aminosäuren einen Sonderstatus inne. Prolylhaltige Peptidbindungen beeinflussen nicht nur die Ausbildung von Sekundär- und Ter-

tiärstrukturen der Moleküle, sie stellen ebenfalls einen Schutz vor dem Angriff unspezifischer Proteasen dar. Nur wenige Proteasen sind in der Lage, die Hydrolyse von Peptidbindungen zu katalysieren, an denen Prolin beteiligt ist. Die DP IV zeichnet sich durch ihre Fähigkeit aus, die Freisetzung N-terminaler Dipeptide von Peptiden und Proteinen zu katalysieren, wenn diese in vorletzter Position der Peptidkette ein Prolin oder Alanin besitzen (Heymann and Mentlein, 1978; Kato *et al.*, 1978a). Neben Prolin und Alanin in P₁-Position¹ akzeptiert die DP IV auch Pipecolinsäure, Hydroxyprolin ($k_{cat}/K_m = 10^3$ bis $10^4 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) und Dehydroprolin (Heins *et al.*, 1988). An Analoga des *Growth hormone releasing factor* (GRF) konnten Bongers *et al.* zeigen, daß humane, plazentale DP IV in der Lage ist, die Hydrolyse auch solcher Peptidbindungen zu katalysieren, die an P₁-Position ein Serin, Valin, Glycin ($k_{cat}/K_m = 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) oder Leucin ($k_{cat}/K_m = 40 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) haben (Bongers *et al.*, 1992). GRF ist ein Polypeptid aus 44 Aminosäureresten mit einer C-terminalen Amidierung, das im Hypothalamus produziert wird und die Freisetzung des Wachstumshormons aus der Hypophyse stimuliert. Die biologische Halbwertszeit im Menschen beträgt 6,8 min. Als hauptinaktivierendes Enzym konnte die DP IV nachgewiesen werden (Frohman *et al.*, 1989). DP IV-resistente Analoga gelten deshalb als aussichtsreiche Kandidaten für eine Therapie bei Wachstumshormondefiziten. Zur Stabilisierung des GRF erfolgte u.a. ein Austausch der Aminosäuren in P₁-Position, um die DP IV-katalysierte Proteolyse zu verhindern. Überraschenderweise wurden [Ser²]-, [Val²]-, [Gly²]- und [Thr²]-GRF-Analoga durch die DP IV als Substrate akzeptiert. Als Reaktionsprodukt wurde das biologisch inaktive GRF₃₋₄₄ nachgewiesen.

Martin *et al.* wiesen nach, daß auch Threonin in P₁-Position toleriert wird (Martin *et al.*, 1993). Am Beispiel von *Macrophage-derived chemokine* (MDC) demonstrierten Proost *et al.*, daß die Substratspezifität der DP IV weniger streng ist, als bis dato angenommen. Der Hydrolyse des Dipetides Gly-Pro folgte die Abspaltung eines zweiten Dipeptides (Tyr-Gly) (Proost *et al.*, 1999). DP IV-katalysierte Hydrolyse von Peptidbindungen kann nicht stattfinden, wenn sich in P₁'-Position eine D-Aminosäure, Prolin oder Hydroxyprolin befinden. Essentiell für die Katalyse ist, daß die zu hydrolysierende Peptidbindung in *trans*-Konformation vorliegt (Demuth and Heins, 1995).

¹ Die Bezeichnung der Aminosäuren um die hydrolysierte Peptidbindung folgt der Schechter&Berger-Nomenklatur (Schechter and Berger, 1967). Demnach werden die Aminosäuren in N-terminaler Richtung der hydrolysierten Bindung mit P₁, P₂, P₃,..., P_n bezeichnet, während die Aminosäuren in C-terminaler Richtung mit P₁', P₂', P₃',..., P_n' beschrieben werden.

Abbildung 2 faßt die wichtigsten molekularen und katalytischen Eigenschaften der DP IV zusammen.

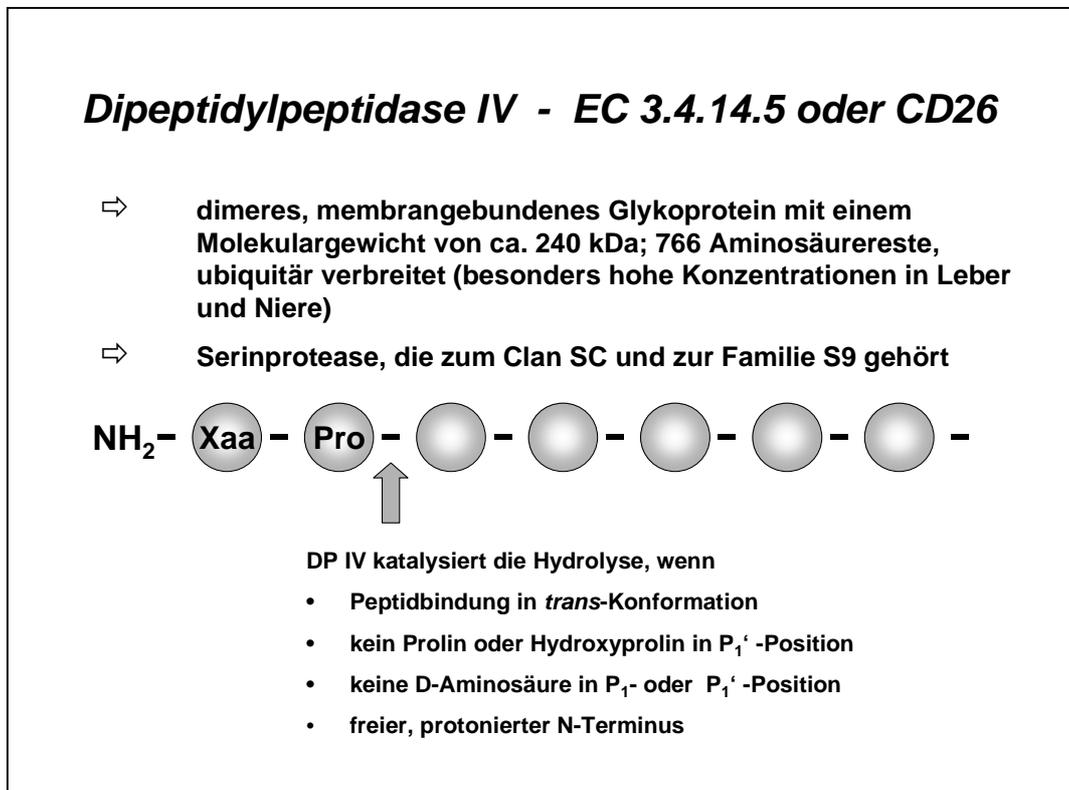


Abbildung 2: Zusammenfassung wichtiger molekularer und enzymatischer Eigenschaften der DP IV

1.3.1.3 Biologische Bedeutung der Dipeptidylpeptidase IV

Die DP IV ist sowohl als proteolytisches Enzym als auch als Bindungspartner in vielfältige biologische Prozesse involviert.

Zahlreiche Peptidhormone, Neuropeptide und Zytokine besitzen prolinreiche Regionen oder einen Prolylrest an einer für die Regulation der biologischen Aktivität dieser Polypeptide entscheidenden Position. Diese Prolylreste schützen einerseits vor unspezifischem proteolytischem Abbau und eröffnen andererseits die Möglichkeit, durch limitierte Proteolyse die biologische Wirkung zu determinieren.

Neuropeptid Y gehört zu den am intensivsten untersuchten biologisch aktiven Substraten der DP IV. Für Neuropeptid Y wurden bisher fünf verschiedene Rezeptortypen beschrieben, die in unterschiedliche Prozesse involviert sind (Gehlert, 1998). Die Abspaltung des N-terminalen Dipeptides Tyr-Pro generiert aus einem Y1-Rezeptor-Agonisten eine Verbindung,

die bevorzugt an den Y2-Rezeptor bindet (Blomqvist and Herzog, 1997). Für viele Peptidhormone (GLP-1, GIP, GRF) (Siegel *et al.*, 1999a; Yip and Wolfe, 2000; Frohman *et al.*, 1989), Chemokine (RANTES, MDC, SDF) (DeMeester *et al.*, 1999) und Neuropeptide (Enteroctatin, Substanz P, PP, PYY) (Bouras *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 1992; Mentlein *et al.*, 1993; Heymann and Mentlein, 1978) 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.

Eine weitere wichtige Funktion der DP IV ist ihre Beteiligung am Katabolismus prolinhaltiger Oligo- und Polypeptide (Tiruppathi *et al.*, 1990). Dazu trägt die hohe Konzentration des Enzyms in der Bürstensaummembran von Niere und Dünndarm bei. Die Hydrolyseprodukte werden spezifisch über protonenabhängige Peptidtransporter resorbiert (Doring *et al.*, 1998; Brandsch *et al.*, 1995).

Unabhängig von ihrer proteolytischen Aktivität wurde bereits vor einigen Jahren eine Beteiligung der DP IV an Interaktionen mit der extrazellulären Matrix beschrieben. Für Kollagen und Fibronectin konnten zwei separate Bindungsstellen an der DP IV nachgewiesen werden. Kollagen bindet in einer cysteinreichen Region zwischen den Aminosäureresten 238 und 495, während Fibronectin im Bereich der Aminosäurereste 469 bis 479 bindet (DeMeester *et al.*, 1999). Es wird vermutet, daß die DP IV eine Rolle in der Tumorgenese spielt. So konnte gezeigt werden, daß auf endothelialen Lungenzellen von Ratten exprimierte DP IV als Adhäsionsmolekül für Brustkrebszellen dient und dadurch die Besiedlung der Lunge durch diese Zellen ermöglicht. Dieser Prozeß wird vorrangig durch Fibronectin vermittelt, das - assoziiert mit der Oberfläche von Tumorzellen - als Hauptligand der DP IV fungiert (Cheng *et al.*, 1998). 1993 gelang Kameoka der Nachweis, daß lymphozytäre DP IV auf der Zelloberfläche mit Adenosindeaminase (EC 3.5.4.4; ADA) assoziiert und damit identisch mit dem bis dahin beschriebenen ADA-Bindeprotein ist. Die enzymatische Aktivität beider Proteine bleibt von dieser Bindung unbeeinflusst (DeMeester *et al.*, 1999). Die Bindungsdomäne der ADA an die DP IV konnte inzwischen eingegrenzt werden. Abbott *et al.* konnten nachweisen, daß die Aminosäurereste Leucin²⁹⁴ und Valin³⁴¹ der DP IV essentiell für die ADA-Bindung sind und daß gegen verschiedene Epitope gerichtete monoklonale Antikörper die ADA-Bindung verhindern (Abbott *et al.*, 1999). ADA katalysiert die irreversible Deaminierung des Adenosins und 2'Desoxyadenosins zu Inosin bzw. 2'Desoxyinosin. Adenosin hemmt die T-Zell-Proliferation, während ADA die T-Zell-Proliferation durch die Senkung der lokalen Adenosinkonzentration verstärkt. Erblisch bedingtes Fehlen von ADA-Aktivität verursacht schwere Störungen der zellulären und humoralen Immunantwort.

Im Immunsystem wird der DP IV ebenfalls große Bedeutung zugesprochen, obwohl ihre Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Die Expression von DP IV/CD26 auf T-Zellen wird von deren Differenzierungs- und Aktivierungsstatus reguliert. Auf ruhenden

B- und NK-Zellen kann keine DP IV/CD26 nachgewiesen werden, aber ihre Expression ist durch Stimulierung der Zellen induzierbar. Eine kleine Subpopulation von T-Zellen exprimiert DP IV/CD26 in hoher Konzentration auf ihrer Oberfläche. Diese sogenannten CD26^{bright}-T-Zellen sind für den größten Teil der Interleukin-2 Produktion verantwortlich. Sie sind sowohl für die Immunantwort auf bekannte Antigene und allogene Zellen als auch für die zytotoxische T-lymphozytäre Aktivität gegen Alloantigene notwendig. Bei Autoimmunerkrankungen kann eine hohe Zahl an DP IV/CD26⁺ Zellen am Entzündungsort gefunden werden. Auch wenn einige der durch CD26^{bright}-T-Zellen vermittelten Effekte nicht direkt mit der Expression der DP IV/CD26 zusammenhängen sollten, ist dennoch anzunehmen, daß einige Immunfunktionen indirekt über DP IV/CD26 beeinflußt werden können (DeMeester *et al.*, 1999).

Für die Aktivierung der T-Zellen sind letztlich zwei Signale notwendig: zunächst muß der T-Zell-Rezeptor-Komplex durch spezifische Peptidantigene oder monoklonale 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). Welche Regionen dieser beiden transmembranen Proteine in die Interaktion einbezogen sind, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Mit Hilfe synthetischer Inhibitoren der DP IV konnte in Zellkulturen gezeigt werden, daß der enzymatischen Aktivität der DP IV bei diesen Regulationsprozessen eine wichtige Rolle zukommt (Tanaka *et al.*, 1993b). Die Hemmung der DP IV-Aktivität führte zu einer Hemmung verschiedener Funktionen der T-Zellen. In diesem Zusammenhang wird das Prozessieren immunologisch aktiver Peptide durch die DP IV diskutiert (Ansorge *et al.*, 1995). Andererseits konnte auch gezeigt werden, daß die enzymatische Aktivität des Proteins für bestimmte regulatorische Funktionen bei der Aktivierung und Proliferation von Zellen nicht erforderlich ist (Hegen *et al.*, 1993).

Im Zusammenhang mit dem Infektionsmechanismus des HIV-1 wird eine Beteiligung von 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 gp120 (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 von DP IV/CD26 durch eine Interaktion mit dem HIV-Tat-(Transaktivator)-Protein (Gutheil *et al.*, 1994; Viscidi *et al.*, 1989; Hoffmann *et al.*, 1995) bzw. durch die proteolytische Modifizierung der Chemokine RANTES und SDF1- α . RANTES₃₋₆₈, das durch DP IV-katalysierte Hydrolyse entsteht, ist ein potenterer Inhibitor der HIV-1-Infektion als das intakte RANTES. Dieser Effekt wird auf eine veränderte Rezeptorspezifität des RANTES₃₋₆₈ zurückgeführt. RANTES₃₋₆₈ bindet hochaffin

an den CCR5-Rezeptor. Dieser Rezeptortyp wird ebenfalls vom Virus als Korezeptor für den Eintritt in die Wirtszelle genutzt. RANTES₃₋₆₈ konkurriert mit dem HIV-1 um die Bindung am CCR5-Rezeptor und hemmt somit den viralen Infektionsmechanismus (DeMeester *et al.*, 1999; Ohtsuki *et al.*, 2000).

1.3.2 Prolyl oligopeptidase

1.3.2.1 Vorkommen

Prolyl oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26) ist wie DP IV in der Lage, bevorzugt die Hydrolyse von Peptidbindungen auf der Carboxylseite von Prolin und - mit geringerer Effizienz - von Alanin zu katalysieren. Im Gegensatz zu DP IV ist POP eine Endopeptidase, die die Hydrolyse prolylhaltiger Peptidbindungen innerhalb der Peptidsequenz katalysiert. 1971 beschrieben Walter *et al.* erstmalig die Hydrolyse der Prolylleucylbindung des Oxytocin durch ein aus Uterushomogenaten partiell gereinigtes Enzym (Walter *et al.*, 1971). 1976 gelang Koida und Walter die Reinigung des Enzym aus Nierenhomogenaten, das die Hydrolyse der Pro-Arg-Bindung in Vasopressin katalysierte und bezeichneten es als „*Post-prolin-cleaving enzyme*“ (Koida and Walter, 1976). 1980 schlugen Barrett und McDonald für das Enzym den Namen „Prolylendopeptidase“ vor. 1992 erfolgte aufgrund der IUB-Nomenklatur die Umbenennung in „Prolyl oligopeptidase“.

Die POP ist ein zytosolisches, ubiquitär verbreitetes Enzym. So konnte POP in Mikroorganismen, Pilzen, Insekten, Pflanzen und einer Vielzahl von Vertebraten nachgewiesen werden. In Säugetieren wurden besonders hohe POP-Aktivitäten im Hirn und in der Niere detektiert. Die Reinigung des humanen Enzyms erfolgte bislang aus Hirn, Lunge, Serum, Muskel und Plazenta (Barrett *et al.*, 1998). Kürzlich wurde über eine Prolyl oligopeptidase aus dem pazifischen Hering *Clupea pallasii* berichtet (Yoshida *et al.*, 1999), die auf den Spermenschwänzen des Herings lokalisiert ist und durch die Interaktion mit *Herring sperm-activation protein* (HSAP) an der Regulation der Motilität der Spermien beteiligt ist.

1.3.2.2 Molekulare und katalytische Eigenschaften

Prolyl oligopeptidase ist ein monomeres Enzym, dessen Polypeptidkette in Abhängigkeit von der Spezies ein Molekulargewicht zwischen 62 000 und 77 000 Da hat. Der isoelektrische Punkt (pI) des Proteins liegt zwischen 4,5 und 4,9. Die POP aus *Flavobacterium meningoc-*

septicum bildet eine Ausnahme mit einem pI von 9,0. Aufgrund der Hemmbarkeit mit DFP wurde POP als Serinprotease klassifiziert und in die Prolyloligopeptidase Familie (S9) eingeordnet.

In den letzten Jahren wurde die cDNA der POP 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 POP aus verschiedenen Quellen (T-Zellen, Hirn) verfügbar. Des Weiteren konnten die Aminosäuresequenzen für die Enzyme aus Schweinehirn (Rennex, 1992), Rinderhirn (Yoshimoto, 1997), Maus (Ishino, 1998), *Aeromonas hydrophila* (Kanatami, 1993), *Flavobacterium meningosepticum* (Diefenthal, 1993), *Aeromonas punctata* (Li, 1999) sowie aus *Dictyostelium* (Williams, 1999) und *Sphingomonas capsulata* (Kabashima, 1998) aufgeklärt werden. Zwischen den Prolyloligopeptidasen aus Säugetieren konnten hohe Sequenzhomologien nachgewiesen werden (Schwein - Mensch: >97% (Fülöp *et al.*, 1998), Rind - Mensch: 95% und Rind - Schwein: 94% (Yoshimoto *et al.*, 1997), Maus - andere Säuger: ca. 96% (Ishino *et al.*, 1998)). Zwischen pro- und eukaryotischer POP beträgt die Homologie ca. 30 bis 40%.

1998 gelang Fülöp *et al.* die Kristallisation der POP aus Schweinemuskel und die Lösung der POP-Struktur (Fülöp *et al.*, 1998). Das Enzym ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer C-terminalen katalytischen und einer N-terminalen, sogenannten „Propeller-Domäne“. Die katalytische Triade (Ser⁵⁵⁴, His⁶⁸⁰ und Asp⁶⁴¹) wurde in einem zentralen Tunnel eines ungewöhnlichen β -Propellers lokalisiert. Die katalytische Domäne des Enzyms umfaßt die Bereiche der Aminosäurereste 1 bis 72 und 428 bis 710. Der N-Terminus besteht aus zwei kurzen antiparallelen β -Strängen und zwei langen Helices, die mit der größeren C-terminalen Region über Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und durch vielfache hydrophobe Wechselwirkungen verbunden sind. Wie bereits von Polgar (Polgar, 1992) vorausgesagt, weist dieser Bereich ein charakteristisches α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv auf. Die nicht-katalytische, oder auch β -Propellerdomäne, wird durch die Aminosäurereste 73 bis 427 gebildet. Die Propellerregion wird an der katalytischen Domäne durch hydrophobe Wechselwirkungen, Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen zweier Polypeptidketten fixiert. Die S₁-Bindungstasche gewährleistet eine hydrophobe Umgebung und eine optimale Paßform für den Prolylrest des Substrates. Die Oxyanion-Bindungsstelle ist eine essentielle Voraussetzung für den Katalysemechanismus von Serinproteasen. Das negativ geladene Oxyanion wird vom Carbonylsauerstoff der zu hydrolysierenden Bindung gebildet und durch zwei Wasserstoffbrücken stabilisiert. In Übereinstimmung mit der Familie der α/β -Hydrolasen wird das Oxyanion einerseits durch die Aminogruppe des dem katalytischen Serin benachbarten Asn⁵⁵⁵ und – im Unterschied zu α/β -Hydrolasen – andererseits durch die Hydroxylgruppe des Tyr⁴⁷³ stabilisiert. Die Relevanz dieses Tyrosylrestes für den Mechanismus der enzymkatalysierten Reak-

tion konnte inzwischen durch gerichtete Mutagenese von Szeltner bestätigt werden (Szeltner *et al.*, 2000). Ausgehend von der Struktur der POP vermuteten Fülöp *et al.*, daß die Propellerregion für den Substrateintritt verantwortlich ist und durch die Öffnung des Propellers die akzeptierte Substratgröße determiniert wird.

POP kann durch Thiolreagenzien gehemmt werden. Dafür scheint Cys²⁵⁵ verantwortlich zu sein, das sich in der Nähe des aktiven Zentrums befindet. Mittels gezielter Punktmutagenese wurde Cys²⁵⁵ durch Threonin, Alanin und Serin substituiert. Die Cys²⁵⁵→Thr-Mutante war insensitiv gegen N-Ethylmaleimide. Diese Mutation beeinflusste ebenfalls das pH-Profil der POP. Höhere K_m - bzw. K_i -Werte lassen auf eine schlechtere Bindung der Substrate und Inhibitoren an die Cys²⁵⁵→Thr-Mutante schließen (Szeltner *et al.*, 2000).

Untersuchungen zum Katalysemechanismus der POP zeigten, daß Tripeptide die minimale Substratstruktur darstellen (Bordusa and Jakubke, 1998). Aus einer Verlängerung der Peptidkette über die P₄-Position hinaus resultierte keine weitere Steigerung der enzymatischen Aktivität. Daraus wurde abgeleitet, daß die Substratbindungsstelle der POP aus drei Aminosäurebindungsregionen besteht (S₃ bis S₁). Darüber hinaus wurden für die S'-Bindungsseite zwei weitere Bereiche vorhergesagt, die an der Substratbindung beteiligt sind. Die Aminosäurereste, die diese Substratbindungsstellen bilden, konnten in der von Fülöp vorgeschlagenen Enzymstruktur identifiziert werden. Studien von Moriyama *et al.* sowie Taylor & Dixon zeigten, daß POP Peptide bis zu einer Kettenlänge von 30 Aminosäuren spaltet (Moriyama *et al.*, 1988; Taylor and Dixon, 1980). Eigene Untersuchungen mit einem Polypeptid der Struktur (GPG)_n weisen ebenfalls darauf hin, daß POP nur Peptide mit einem Molekulargewicht bis zu 3500 Da als Substrate akzeptiert (F. Rosche, persönliche Mitteilung). Inwieweit diese limitierte Substratgröße davon abhängig ist, daß das Substrat durch die Öffnung der Propellerdomäne zum aktiven Zentrum gelangen muß oder ob es einen anderen Mechanismus des Substrateintritts in das aktive Zentrum gibt (beispielsweise einen „Klappmechanismus“ zwischen katalytischer und Propellerdomäne), konnte bisher noch nicht geklärt werden.

1.3.2.3 Biologische Bedeutung

Viele Neuropeptide wie z.B. NP Y, Substanz P, TRH, Oxytocin und Vasopressin haben an Schlüsselstellen ihrer Sequenz einen Prolylrest (Yaron and Naider, 1993; Vanhoof *et al.*, 1995). Der Nachweis der *in vitro* Spaltung dieser Peptide durch zytosolische Prolylloligopeptidasen (Brzezinska-Slebodzinska and Adamczyk, 1979; Tate, 1981) und die Assoziation der POP mit synaptosomalen Membranen implizieren eine physiologische Rolle des Enzyms im Metabolismus der Neuropeptide. Neue Untersuchungen bestätigen diese These für Angiotensin und Bradykinin (Ferrario and Iyer, 1998; Dendorfer *et al.*, 1997).

Nachgewiesen werden konnte eine Beteiligung der POP an Lern- und Gedächtnisprozessen. Intraperitoneale Gaben spezifischer POP-Inhibitoren verhindern bei trainierten Ratten eine durch Scopolamin induzierte Amnesie (Yoshimoto *et al.*, 1987). Die Korrelation zwischen anti-amnesischem Effekt und den Inhibierungskonstanten der POP wird auf die Hemmung der POP-katalysierten Hydrolyse der Neuropeptide Arginin-Vasopressin, Substanz P und TRH zurückgeführt. Diese Neuropeptide wirken positiv auf die Steigerung von Lern- und Gedächtnisleistungen (Huston *et al.*, 1993; Hasenohrl *et al.*, 1990; Uvnas-Moberg *et al.*, 2000; Shinoda *et al.*, 1999). Die Inhibierung der POP stellt somit eine Möglichkeit einer begleitenden Therapie bei Amnesien dar, wie sie z.B. bei der Alzheimer'schen Krankheit vorkommen. Kontrovers wurde über eine Beteiligung der POP an der Entstehung des Plaque-bildenden β A4-Peptides aus dem *Amyloid precursor protein* (APP) diskutiert. Ein Charakteristikum der Alzheimer'schen Krankheit sind Plaques im Hirn der Patienten. Die Hauptkomponente dieser Plaques ist das β A4-Peptid. Das Peptid ist das gemeinsame Produkt der Aktivität der β - und γ -Sekretasen. Während die β -Sekretase für die Generierung des N-Terminus des β A4-Peptides verantwortlich ist, wird durch die Aktivität der γ -Sekretase der C-Terminus gebildet. Dabei entstehen in unterschiedlichen Mengen β A4₁₋₄₀ (Spaltung nach Valin), β A4₁₋₄₂ (Spaltung nach Alanin) sowie β A4₁₋₄₃ (Spaltung nach Threonin). Eine Hemmung beider Sekretasen gilt als vielversprechender Ansatz in der Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit. Beide Enzyme konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Aufgrund der Spezifität der γ -Sekretase und des hohen Anteils, den das β A4₁₋₄₂-Peptid an den Plaques hat, wurde spekuliert, daß POP ein potentieller Kandidat für die γ -Sekretase ist. Diese These wurde durch Untersuchungen mit JPT-4819 gestützt. JPT-4819 ist ein spezifischer und potenter Inhibitor der POP. Der Einsatz von JPT-4819 in Neuroblastoma-Zell-Linien führte zu einer Reduktion der β A4-Sekretion (Toide *et al.*, 1997; Shinoda *et al.*, 1997). Neuere Studien zeigten, daß die Hemmung der POP keinen Einfluß auf die Konzentration des β A4-Peptides

in einer mit dem 100 Aminosäurereste umfassenden C-terminalen Teil des APP transfizierten Neuroblastoma-Zell-Linie hatte (Johnston *et al.*, 1999).

Untersuchungen in *Dictyostelium discoideum* befaßten sich mit der Aufklärung des therapeutischen Effektes von Lithiumionen (Li^+). Li^+ werden häufig zur Behandlung von klinischen Depressionen eingesetzt. Veränderte POP-Aktivitäten sind mit unipolaren und bipolaren Depressionen assoziiert (Maes *et al.*, 1994). Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der POP und dem intrazellulären Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat-(IP_3)-Spiegel nachgewiesen werden, der darauf schließen läßt, daß die POP in die intrazelluläre Signaltransduktion via IP_3 involviert ist (Williams *et al.*, 1999).

1.4. Zielstellung der Arbeit

Peptidhormone oder Neuropeptide können in ihrer biologischen Wirkung durch N-terminale Modifizierungen determiniert werden. Viele dieser biologisch aktiven Verbindungen haben an für die Regulation ihrer Wirkung essentiellen Positionen ein Prolin (vgl. 1.2). Somit sind pro-linspezifische Proteasen Schlüsselstellen dieser Modulationen. Für die Peptidhormone GRF, GLP-1 und GIP konnte bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, daß ihre biologische Aktivität durch DP IV-katalysierte Hydrolyse determiniert wird. Ein Sequenzvergleich der Mitglieder der GRF-Superfamilie zeigt hohe N-terminale Homologien auf. Daher sollte in Anbetracht der an GRF-Analoga nachgewiesenen erweiterten Substratspezifität geprüft werden, ob auch solche Peptide der GRF-Familie Substrate der DP IV sind, die kein Prolin oder Alanin in P_1 -Position aufweisen. Erste Charakterisierungen der Substrateigenschaften sollten mit Hilfe von aus Schweineniere gereinigter DP IV erfolgen. Um die Bedeutung der Ergebnisse auch auf den humanen Organismus übertragen zu können, wurde in vergleichenden Untersuchungen humanes Serum benutzt.

Die Mitglieder der GRF-Familie GIP und Glukagon sind wichtige Regulatoren des Blutzuckerspiegels. Daher ist unter pathologischen Bedingungen (Hyper- bzw. Hypoglykämie) eine Verlängerung der biologischen Wirkung beider Hormone von Interesse. Ob N-terminale Modifizierungen zu Resistenz gegen DP IV-katalysierte Hydrolyse bzw. zu geringeren Hydrolysegeschwindigkeiten führen, sollte ebenfalls zunächst mit gereinigter DP IV_{Schwein} und daran anschließend mit humanem Serum analysiert werden. In Kooperation mit dem Arbeitskreis von R. Pederson (University of British Columbia, Vancouver, Canada) sollten ausgewählte GIP- und Glukagon-Analoga im Tiermodell auf ihre blutzuckermodifizierenden Eigenschaften getestet werden.

POP und DP IV gehören zur gleichen Proteasefamilie (S9). Sie weisen Ähnlichkeiten in ihrem enzymatischen Eigenschaften auf. Daher sollte untersucht werden, ob POP ebenfalls weitere Aminosäuren außer Prolin und Alanin in P₁-Position akzeptiert.

Hohe POP-Aktivität konnte im Hirn nachgewiesen werden. Dies legt den Schluß nahe, daß POP in das proteolytische Prozessieren von Neuropeptiden involviert ist. Anhand von zwei Modellpeptiden - CLIP und einer β A4-Peptidteilsequenz - sollte geprüft werden, ob diese Neuropeptide Substrate der POP sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von DP IV und POP bei der Vermittlung von Signalen zwischen Hormon-, Nerven- und Immunsystem zu untersuchen und zu prüfen, ob sie therapeutische Angriffspunkte für verschiedene Krankheitsbilder darstellen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Großgeräte

Großgeräte

LD-TOF-System 2025A	Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland
Oszilloskop LeCroy 9350	
Sample Prep Accessory HP G2024A	Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland
BIAcore 3000	Biacore AB, Uppsala, Schweden
Spektralphotometer Uvikon 950	Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland
Plattenphotometer HTS 7000	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Kapillarelektrophorese MDQ	Beckmann, München, Deutschland
Spektralphotometer Lambda 20	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
präparative HPLC	Merck, Darmstadt, Deutschland
BioCAD 700E	Perseptive Biosystems, Wiesbaden, Deutschland
Elektrophorese Phast System	Pharmacia, Freiburg, Deutschland

Chemikalien

Multi-Mark-Elektrophorese Marker	Novex, Frankfurt/M., Deutschland
Sepharose 6B	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
DEAE Sphadex A50	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
POROS HQ 20	Perseptive Biosystems, Wiesbaden, Deutschland
Mono S HR 5/5	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Fraktogel CM (M)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PD 10 - Entsalzungssäule	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Bradford Reagenz	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PACAP-27, PACAP-38	Bachem, Heidelberg, Deutschland
GRF	Bachem, Heidelberg, Deutschland
GRP	Bachem, Heidelberg, Deutschland
VIP	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Exendin	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Somatostatin-14, Somatostatin-28	Bachem, Heidelberg, Deutschland
CCK21	Bachem, Heidelberg, Deutschland
PHM	Bachem, Heidelberg, Deutschland

Secretin	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Glukagon und Analoga	Dr. S. Manhart, probiodrug
GIP und Analoga und Fragmente	Dr. S. Manhart, probiodrug
Hymenistatin-1, Fragmente und Analoga	H.-H. Ludwig, probiodrug
Isoleucyl-Thiazolidin	Dr. S. Kruber, probiodrug
Leptin	Bachem, Heidelberg, Deutschland
NP Y	Bachem, Heidelberg, Deutschland
PP Y	Bachem, Heidelberg, Deutschland
P YY	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Substanz P	Bachem, Heidelberg, Deutschland
GP-4NA	Dr. S. Manhart, probiodrug
GPP-4NA	Dr. S. Manhart, probiodrug

2.2 Methoden

2.2.1 Reinigung der Dipeptidylpeptidase IV aus Schweineniere

Schlachtfrische Schweinenieren aus dem Schlachthaus Köthen wurden in Nierenrinde und Nierenmark separiert. Das Nierenmark wurde verworfen und die Nierenrinde portioniert bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Gewebeaufschluß

Für eine Enzympräparation wurden 750 g Nierenrinde aufgetaut und mit 2,5 l eiskalter physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gewaschen, um das Gewebe möglichst blutfrei zu spülen. Das so erhaltene Ausgangsmaterial wurde in 0,75 l Saccharoselösung (0,02 M, 0,2% Triton X100) mittels einer Küchenmaschine grob homogenisiert und im Anschluß noch einmal mit einem Ultra-Turrax (Typ T25/10 Janke und Kunkel KG, Deutschland) fein aufgeschlossen. Das Gewebehomogenat wurde über Nacht bei 30°C gerührt und einer Autolyse unterzogen. Daran schloß sich eine Zentrifugation des Lysates bei 10 000*g für 25 min an.

Ammoniumsulfatfällung

Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde bei Raumtemperatur portionsweise mit feinkristallinem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 60% (w/v) versetzt und 30 min gerührt. Dem Überstand der nachfolgenden Zentrifugation (10 000*g, 30 min) wurde bei 4°C bis zu einer Sättigung von 85% (w/v) Ammoniumsulfat zugegeben. Diese Suspension wurde über Nacht bei 4°C gerührt und danach ein drittes Mal bei 10 000*g für 30 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 70 ml Na-Phosphatpuffer (20 mM, pH 6,0 – nachfolgend stets als Puffer A bezeichnet) aufgenommen und dreimal gegen 2 l dieses Puffers über Nacht dialysiert.

Gelfiltrationschromatographie

Die so erhaltene Proteinlösung wurde an einem Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 12 ml eingengt und auf eine mit Puffer A equilibrierte Gelfiltrationssäule (Sephacryl 6B, Pharmacia, 2,6*100 cm) mit einem Fluß von 0,15 ml/min aufgetragen und mit Puffer A bei einem Fluß von 0,25 ml/min nachgewaschen. Die DP IV-Aktivität enthaltenden Fraktionen eluierten nach ca. 36 h. Sie wurden auf ihre Aktivität getestet und gepoolt.

Kationenaustauschchromatographie

Um noch enthaltene Bestandteile an Hämoglobin und andere Farbpigmente zu entfernen, schloß sich eine Trennung an einer Fraktogel-CM(M) Matrix an (Merck). Die Säule (1,5*30 cm, BioRad) wurde mit Puffer A equilibriert. Die vereinigten Fraktionen wurden mit einem Fluß von 0,3 ml/min aufgetragen. Unter den gewählten Bedingungen bindet die DP IV nicht an die Austauschermatrix, sondern wird im Durchfluß detektiert.

Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde eine DEAE A50-Säule (1,5*30 cm, BioRad) genutzt. Als Puffer wurde Puffer A eingesetzt. Die Proteinlösung wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,3 ml/min aufgetragen. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine Bindung der DP IV an die Matrix. Nach dem Waschen der Säule mit 3 Säulenvolumina Puffer A konnte die DP IV durch einen linearen Salzgradienten in Puffer A (0 bis 0.3 M NaCl, 6 Säulenvolumina) bei 100 mM NaCl eluiert werden.

Feinreinigung mittels POROS HQ

Der letzte chromatographische Reinigungsschritt war eine Rechromatographie an einer POROS HQ 20-Säule. Dieses Material basiert auf einer Styropormatrix und erlaubt, da die Proteine die einzelnen Matrixmoleküle perfundieren können, eine Trennung bei sehr hohen Flußraten mit hervorragenden Ausbeuten. Die Trennung wurde an einer BioCAD-Station (Perseptive Biosystems) durchgeführt. POROS HQ ist ein starkes Anionenaustauschermaterial. Die Säule (4,6*100 mm) wurde mit 8 Säulenvolumina 20 mM Bis-Tris Propan pH 8,5 (Puffer B) equilibriert (Flußrate: 10 ml/min) und im Anschluß die Probe aufgetragen. Es schlossen sich ein Waschschrift (Puffer B, 4 Säulenvolumina) sowie die Elution des Proteins durch einen linearen Salzgradienten (15 Säulenvolumina, 0 bis 300 mM NaCl in Puffer B) an. Die erhaltenen Fraktionen wurden dem Aktivitätstest unterzogen, gepoolt und über eine PD 10 Säule entsalzt. Die so erhaltene Enzymcharge hatte eine spezifische Aktivität von 60 U/mg und wurde bei 4°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

2.2.2 Reinigung rekombinanter Prolyl oligopeptidase aus *Flavobacterium meningosepticum* exprimiert in *E. coli*

Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte in der Firma Weizheimer Malz (Andernach, BRD). Der gewonnene Periplasmaextrakt wurde im Rahmen einer Kooperationsvereinbarung zur Verfügung gestellt.

Die Reinigung erfolgte an einer MONO S HR 5/5 Säule (Pharmacia). Als chromatographisches System wurde eine präparative HPLC genutzt. Die Flußrate betrug während der gesamten Prozedur 1 ml/min. Die Equilibrierung der Säule erfolgte über 3 Säulenvolumina mit Puffer C (50 mM MES, pH 6,5). Nach dem Auftragen des Periplasmaextraktes wurden ungebundene Proteine mit 4 Säulenvolumina Puffer C heruntergewaschen, bevor die Elution der rPOP durch einen linearen NaCl-Gradienten (0 bis 400 mM NaCl in Puffer C) über 50 ml erfolgte. Die Fraktionen wurden auf POP-Aktivität getestet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Als Standard zur Erstellung der Eichkurve wurde Rinderserumalbumin verwendet.

2.2.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Reinheitskontrolle der gereinigten Enzymchargen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteinauftrennung nach Molekulargewicht erfolgte modifiziert durch SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 in 2x Probenpuffer aufgenommen, 2 min gekocht und vor dem Auftragen kurz zentrifugiert. Die Trennung der Proteine erfolgte für 30 min bei 20 mA/Gel und anschließend bei 40 mA/Gel.

Zur Entwicklung der SDS-Gele kamen alternativ Coomassie- (David *et al.*, 1993) bzw. Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) zur Anwendung.

2.2.5 Aktivitätsbestimmungen

Zur Bestimmung der Enzymaktivität während der Reinigungsprozedur und der kinetischen Parameter des Enzyms wurden spektralphotometrische Tests genutzt. Diese wurden an einem UV/VIS-Spektrophotometer (Lambda 20) als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Standardsubstrat wurde GP-4NA für DP IV und GPP-4NA für POP verwendet. Aus der Geschwindigkeit der Freisetzung des 4-NA bei $\lambda = 390$ nm kann unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$\Delta E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

die Enzymaktivität berechnet werden. Der Extinktionskoeffizient ε bei 390 nm beträgt $11,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die Schichtdicke d der Küvette beträgt 1 cm. Die Ausgangskonzentration des Substrates c ist bekannt.

Enzyme:

DP IV (MW 220 000 Da):

Das eingesetzte Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 60 U/mg (unter Standardbedingungen) und eine Proteinkonzentration von 0,8 mg/ml.

POP aus *Flavobacterium meningosepticum* (MW 76 000 Da)

Das eingesetzte Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 45 U/mg (unter Standardbedingungen) und eine Proteinkonzentration von 0,58 mg/ml.

Der Standardaktivitätstest setzte sich wie folgt zusammen:

40 mM HEPES, pH 7,6 ($I = 0,125$)

0.4 mM GP-4NA bzw. GPP-4NA

Die Enzymverdünnung für die enzymkinetischen Untersuchungen wurde so gewählt, daß während der Reaktion 5% Substratumsatz nicht überschritten wurden. Der pH-Wert des Puffers wurde mit KOH, die Ionenstärke mit KCl eingestellt. Das Puffer-Substrat-Gemisch wurde 15 min bei 30°C temperiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe des Enzyms und wurde über eine Minute bei 30°C verfolgt.

Die Substrate wurden freundlicherweise von der Abteilung Peptidsynthese der Firma probiodrug GmbH zur Verfügung gestellt bzw. von BACHEM bezogen.

2.2.6 Bestimmung der kinetischen Konstanten

2.2.6.1 Spektralphotometrische Tests

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter K_m , V_{max} bzw. k_{cat} der enzymkatalysierten Substrat-hydrolyse wurde die Substratkonzentration in einem Bereich von $\frac{1}{8}K_m$ bis $4K_m$ des erwarteten K_m -Wertes variiert. Die Enzymkonzentration war mindestens 4 Größenordnungen kleiner als die Substratkonzentration. Die ermittelten Initialgeschwindigkeiten wurden als Funktion der Zeit aufgetragen und mit Hilfe des Programms Grafit 4.03 (Erithacus Software Limited 1989-1998) wurden die Konstanten bestimmt.

2.2.6.2 Fluoreszenzspektrometrische Tests

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der POP erfolgte mittels Methylcoumarinderivaten. Der Test beruht auf der Steigerung der Fluoreszenz durch die enzymkatalysierte Abspaltung von 7-Amido-4-Methylcoumarin vom Substrat (Barrett, 1980). Als Substrate wurden Z-GP-AMC, Z-GA-AMC, Z-GS-AMC und Z-GT-AMC genutzt. Die zum Teil schlechte Löslichkeit der Verbindungen in Wasser machte es erforderlich, daß Z-GP-AMC in Acetonitril und die restlichen Verbindungen in DMSO gelöst wurden. Der Enzymtest wurde kontinuierlich bei 15°C an einem Spektrofluorimeter mit temperierbarem 4-fach Küvettenwechsler (Typ SFM 25, Kontron Instruments) durchgeführt. Die Datenverarbeitung erfolgte *on-line* mit der Software „Fluocol“, die freundlicherweise von Prof. Machleidt (LMU München) zur Verfügung ge-

stellt wurde und mit deren Hilfe die Produktkonzentration und die Produktzunahme direkt abgelesen werden konnten. Zur Bestimmung der Konstanten k_{cat} und K_m wurde die Substratkonzentration im Testansatz von 0,2 bis 2 K_m variiert. Da sich Z-GS-AMC und Z-GA-AMC besonders schlecht lösten, konnten hier nur Substratkonzentrationen bis 1,3 und 0,9 K_m eingesetzt werden. Die eingesetzte Enzymkonzentration lag mindestens fünf Größenordnungen unter der Substratkonzentration. Der verwendete Meßansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

1976 μ l	Meßpuffer (50 mM HEPES, pH 7,5; 200 mM NaCl, 1 mM EDTA)
20 μ l	10 mM DTT
2 μ l	Substratlösung
2 μ l	Enzymlösung

2.2.6.3 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Spektralphotometrische Tests zur K_m -Wert-Bestimmung können nur für Verbindungen eingesetzt werden, bei denen die Hydrolyse durch die eingesetzten Enzyme die Freisetzung eines chromophoren Restes bewirkt. Um die K_m -Werte biologisch aktiver Peptide zu bestimmen, wurde die CZE genutzt. Die Kapillarelektrophorese 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 einfache Identifizierung und Quantifizierung der Probe möglich. Bei der Kapillarzonenelektrophorese beruht die Trennung auf den Mobilitätsdifferenzen der Proben, die zu Beginn des Experimentes als konkrete 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. Die optimale Enzymkonzentration wurde jeweils in Vorversuchen ausgetestet, da sich die Substrateigenschaften der eingesetzten Peptide gegenüber DP IV zum Teil erheblich unterschieden. Folgende Standardbedingungen wurden gewählt:

Kapillare:	50 μ M x 30 cm, effektive Länge 20 cm
Laufpuffer:	0,1 M NaPhosphat pH 2,5
Injektion:	Druck 0.5psi, 5s
Detektion:	UV 200 nm

2.2.6.4 Bestimmung der K_i -Werte

Um die Hemmkonstanten der getesteten Verbindungen zu bestimmen, wurde der bereits beschriebene spektrophotometrische Test benutzt (vgl. S. 30). Es wurden je fünf verschiedene Inhibitorkonzentrationen mit drei 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. Zur Überprüfung der Richtigkeit des angenommenen Hemmtyps wurde eine Sekundärauftragung der Anstiege der Geraden aus dem DIXON-Plot gegen die reziproke Substratkonzentration durchgeführt.

2.2.6.5 Qualitative Bestimmung der Hydrolyserate potentieller Substrate mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

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 kokristallisiert werden. Ein Laserpuls löst und ionisiert 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 die Masse ermittelt werden kann. Es wurde ein Ansatz aus Substrat und Enzym bei 37°C inkubiert. In definierten Zeitabständen wurden Proben entnommen. Durch Zugabe der Matrix wurde die Enzymreaktion gestoppt. Als Matrix wurde DHAP/DAHC (30 mg DHAP, 44 mg DAHC in 1 ml ACN/0,1% TFA im Verhältnis 1:1) genutzt. 5 µl des Inkubationsansatzes wurden mit 5 µl Matrixlösung gemischt. 1 µl dieser Mischung wurde auf den Probenhalter aufgetragen, kristallisiert und im Anschluß massenspektrometrisch analysiert.

Der Standardinkubationsansatz 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)

Die DP IV_{Schwein} für die Bestimmung der Halbwertszeiten des DP IV-katalysierten Abbaus wurde so verdünnt, daß ihre Aktivität (U/ml) der GP-4NA hydrolysierenden Aktivität der humanen Serums entsprach (40 mU/ml). Humanes Serum wurde von gesunden Spendern erhalten.

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten der enzymkatalysierten Substrathydrolyse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde der gleiche Inkubationsansatz wie für die qualitative Analyse der Peptidhormone genutzt (s.o.). In definierten Zeitabständen wurden dem Inkubationsansatz Proben entnommen. Bei den Untersuchungen mit humanem Serum wurden Zip-Tips der Firma Millipore verwendet, um störende Ionen, wie z.B. Na⁺, K⁺ oder Phosphat zu entfernen. Die Probennahme erfolgte nach dem Protokoll der Firma Millipore. Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurde eine in der Abteilung Massenspektrometrie der Firma probiodrug GmbH etablierte Methode angewendet (Pauly *et al.*, 1996).

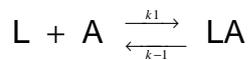
2.2.6.7 Biomolekulare Interaktionsanalyse

Für Interaktionsstudien zwischen Enzym und Liganden (in diesem Falle Substrate und Inhibitoren) stand ein BIAcore 3000 der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden) zur Verfügung.

Die biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) basiert auf einem Resonanzphänomen, das als „*surface plasmon resonance*“ (SPR) bezeichnet wird. In einem bestimmten Winkel einfallende Photonen geben ihre Energie an Elektronen des Goldfilms auf dem Sensor-Chip ab und bewirken damit eine Auslöschung in einem bestimmten Winkel einfallenden Lichts, dem Resonanzwinkel. Der Resonanzwinkel ist abhängig von der an der Oberfläche des Sensor-Chips gebundenen Masse, und seine Auslenkung wird in Form von Resonanzeinheiten (*resonance units*, RU) gemessen. Die Wechselwirkung von Ligand und Analyt führt zu einer Änderung der Massekonzentration auf der Chipoberfläche und demzufolge auch zu einer Änderung des Resonanzwinkels. Aufgezeichnet werden die RU als Funktion der Zeit. Diese Sensogramme veranschaulichen den zeitlichen Verlauf der Assoziations- und Dissoziationsprozesse während des Experimentes.

Die biomolekulare Interaktionsanalyse erlaubt eine direkte Verfolgung der Bindungskinetik zwischen Interaktionspartnern. Sie erfordert keine Markierung eines Reaktionspartners und gestattet eine Aufnahme der Reaktion in Echtzeit. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wird die Abhängigkeit der Änderung des Resonanzwinkels von der Konzentration des Analyten untersucht. Das heißt, ähnlich wie bei enzymkinetischen Experimenten wird der Analyt in verschiedenen Konzentrationen ober- und unterhalb des erwarteten K_D -Wertes über den an die Chipoberfläche gebundenen Liganden geleitet.

Bei einer 1:1-Bindung wird davon ausgegangen, daß an ein Molekül Ligand (L) ein Molekül Analyt (A) bindet. Vereinfacht stellt sich das Reaktionsschema folgendermaßen dar:



Nach dem Massenwirkungsgesetz läßt sich die Bindung durch die Assoziationskonstante K_A oder deren Reziprokes, die Dissoziationskonstante K_D beschreiben:

$$K_A = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[LA]}{[L] \cdot [A]} \quad \text{Gleichung (1)}$$

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[L] \cdot [A]}{[LA]} \quad \text{Gleichung (2).}$$

Die Berechnung der Assoziationskonstante für Gleichung (1) nach dem Massenwirkungsgesetz erfordert die Kenntnis der Konzentrationen des freien (ungebundenen) Liganden [L], des freien Analyten [A] und des Ligand-Analyt-Komplexes [LA] unter Gleichgewichtsbedingungen. Bekannt sind die jeweils im Experiment eingesetzten Gesamtkonzentrationen $[L_0]$ und $[A_0]$. Diese Konzentrationen setzen sich zusammen aus

$$[L_0] = [L] + [LA] \quad \text{und} \quad \text{Gleichung (3)}$$

$$[A_0] = [A] + [LA] \quad \text{Gleichung (4)}$$

Durch Einsetzen von Gleichung (3) in Gleichung (2), Multiplikation und Umstellen nach [LA] ergibt sich

$$[LA] = \frac{[A] \cdot [L_0]}{K_D + [A]} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Nach dem oben skizzierten Reaktionsschema bindet ein Molekül Ligand ein Molekül Analyt. In diesem Fall kann $[A]_{\text{gebunden}}$ mit [LA] gleichgesetzt werden, so daß für die Bindung eines Analyten an den Liganden mit einer Bindungsstelle folgende Gleichung resultiert

$$[A_{\text{gebunden}}] = \frac{[A] \cdot [L_0]}{K_D + [A]} \quad \text{Gleichung (6)}$$

Viele Proteine bestehen aus mehreren, oftmals identischen Untereinheiten. Für DP IV konnte nachgewiesen werden, daß sich die beiden Untereinheiten des Enzyms kinetisch gleich verhalten, so daß die Zahl n Bindungsstellen der Zahl der Untereinheiten gleichzusetzen ist

(Küllertz, 1978). Werden die einzelnen Bindungsstellen besetzt, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen, so gilt Gleichung (6) unabhängig davon, ob die Messungen an isolierten oder assoziierten Untereinheiten erfolgt. Der Ligand wird durch den Analyten stufenweise abgesättigt und Gleichung (6) ist für jede einzelne Bindungsstelle gültig. Durch Multiplikation von Gleichung (6) mit n (Zahl der Bindungsstellen) leitet sich Gleichung (7) ab (Bisswanger, 1994).

$$[A_{\text{gebunden}}] = \frac{n \cdot [L_0] \cdot [A]}{K_D + [A]} \quad \text{Gleichung (7).}$$

Diese Gleichung entspricht der Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik, was auf dem beiden Prozessen zugrunde liegenden Sättigungsverhalten beruht. In Analogie zur Enzymkinetik gibt es für die Bindungskinetik Linearisierungsverfahren zur Bestimmung der Konstanten. Es wurde der Scatchard-Plot angewendet. Der Quotient aus gebundenem Analyten und Gesamtmenge des Liganden $[L_0]$ wird als Sättigungsfunktion

$$r = \frac{[A_{\text{gebunden}}]}{[L_0]}$$

bezeichnet. Division von Gleichung (7) durch $[L_0]$ ergibt

$$r = \frac{n [A_{\text{frei}}]}{K_D + [A_{\text{frei}}]} \quad \text{Gleichung (8)}$$

Aus der Bildung des Reziproken von Gleichung (8) und Multiplikation mit $r n/K_D$ resultiert Gleichung (9)

$$\frac{r}{[A_{\text{frei}}]} = -\frac{1}{K_D} \cdot r + \frac{n}{K_D} \quad \text{Gleichung (9).}$$

Unter der Voraussetzung, daß jede individuelle Meßreihe mit ein und demselben Sensor-Chip durchgeführt wurde, ist die Ligandenkonzentration $[L_0]$ konstant. Die Sättigungsfunktion kann um die Makromolekülkonzentration $[L_0]$ reduziert werden. Somit vereinfacht sich r zu $[A_{\text{gebunden}}]$. Es wird der Quotient $\frac{[A_{\text{gebunden}}]}{[A_{\text{frei}}]}$ gegen die Konzentration des freien Analyten $[A_{\text{frei}}]$

aufgetragen. Bei einer 1:1 Bindungskinetik ergibt sich eine Gerade, deren Anstieg

$$\tan \alpha = -\frac{1}{K_D}$$

entspricht. Besitzt der Ligand mehrere Bindungsorte unterschiedlicher Affinität für den Analyten, so ist die graphische Auftragung nicht mehr linear und bei entsprechend großen Differenzen können die einzelnen Bindungskonstanten aus dem Diagramm ermittelt werden (Bisswanger, 1994).

Aminkopplung der DP IV an den CM5-Chip

Hierfür wurde DP IV_{Schwein} gegen 10 mM Actetat-Puffer pH 4,0 dialysiert. Die eingesetzte Charge hatte eine spezifische Aktivität von 38,5 U/mg und eine Proteinkonzentration von 0,58 mg/ml. CM5-Chips sind mit einer Dextranmatrix beladen. Die Kopplung der Liganden erfolgt über sekundäre Aminogruppen der Liganden mit den Carboxymethylgruppen (CM) der Matrix. Die Chipoberfläche wurde mit EDC/NHS für 12 min bei einer Flußrate von 20 µl/min nach dem mitgelieferten Standardprotokoll der Firma BIAcore AB aktiviert. Die Immobilisierung der DP IV erfolgte im manuellen Modus bei einer Flußrate von 5 µl/min, bis eine Erhöhung der Resonanzeinheiten (RU) um ca. 5500 RU erreicht war. Im Anschluß wurden überschüssige aktivierte funktionelle Gruppen durch Ethanolamin blockiert (Flußrate: 20 µl/min, 10 min).

NTA-Kopplung der rekombinanten POP mit His-tag

Zur Immobilisierung an den NTA-Chip (Nitriltriäcetylsäure - NTA) wurden rekombinante POP_{Flavo} (Wildtyp) bzw. POP_{Flavo} (Ala⁵⁵⁶-Mutante) in Elutionspuffer (HBS-P, BIAcore AB) verdünnt. Die Beladung der Chipoberfläche mit Nickel sowie die Bindung des Enzyms erfolgten nach dem Standardprotokoll der Firma BIAcore. Eine stabile Bindung konnte nicht erzielt werden. Zu Beginn jedes neuen Versuchs wurde die gebundene Enzymmenge bestimmt und gegebenenfalls zusätzlich Protein immobilisiert. Über den Verlauf der einzelnen Bindungsexperimente hinweg konnte die Konzentration gebundenen Enzyms als konstant betrachtet werden.

Bestimmung der Bindungskonstanten zwischen immobilisiertem Enzym und Liganden

Zur Bestimmung der K_D -Werte wurden Messungen mit Konzentrationsserien der entsprechenden Verbindung bei 25°C durchgeführt. Dabei wurde dem in der Software angebotenen Standardprotokoll gefolgt. Die Flußrate betrug 30 µl/min. Zur Analyse der Konzentrationsserien wurde die von BIAcore AB entwickelte BIAevaluation Software Version 3.0 verwendet. Um zu prüfen, ob das angenommene Bindungsmodell zutrifft, wurden die erhaltenen Daten im Scatchard-Plot aufgetragen.

2.2.7 Bestimmung der Aktivität humaner rekombinanter POP in U343 Zellen nach Inkubation mit einem Inhibitor

Zellaussaat

Je nach geplanter Wachstumsdauer erfolgte die Aussaat von 2 bis $9 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml Medium in Kulturschalen (Durchmesser 3 cm), so daß eine Endkonzentration von 1 bis $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml erreicht wurde.

Inhibitorinkubation

Die Zellen wurden einmalig mit auf 37°C temperiertem PBS gewaschen. Hymenistatin-1 (HS-1) wurde in entsprechender Konzentration in OptiMEM, einem serumfreien Medium (Lifetech Corporation, USA), verdünnt. Da HS-1 in höheren Konzentrationen schlecht löslich ist, wurde eine Stammlösung in DMSO hergestellt. Die Zellen wurden vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ mit den entsprechenden HS-1-Konzentrationen inkubiert.

Zellaufschluß

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS (37°C) gewaschen. Es wurden 250 µl eiskalten POP-Meßpuffers (vgl. S. 32), der 1 mM DTT enthielt, auf jede Kulturschale gegeben. Die Zellen wurden 2 min bei -70°C eingefroren und danach 3 min aufgetaut. Diese Prozedur wurde dreifach wiederholt. Nach dem letzten Auftauen wurden die Zellen abgeschabt und bei $15\,500 \times g$ 1 min zentrifugiert. Bis zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Zell-Lysate bei 4°C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (vgl. S. 29).

Bestimmung der POP-Aktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte im fluorimetrischen Test. Als Substrat wurde Z-GP-AMC genutzt. Es wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie für die Ermittlung der Substratspezifität der POP (vgl. S. 31).

3 ERGEBNISSE

3.1 Biologisch aktive Peptide mit Substrateigenschaften

3.1.1 GRF-Familie

Das Wissen über Eigenschaften und Funktion von Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) erfährt in den letzten Jahren einen enormen Zuwachs. Nachdem zunächst vorrangig der Katalysemechanismus des Enzyms im Mittelpunkt des Interesses stand, befassen sich gegenwärtige Forschungen mit der Beteiligung der DP IV an regulativen Prozessen, wie der Koordination hormonell vermittelter Signale oder der Steuerung der Immunantwort. Aufgrund der Prolinspezifität des Enzyms und seiner Beteiligung als Bindungspartner in Multirezeptorkomplexen (Fleischer, 1994) wird spekuliert, daß die DP IV ein wichtiges Regulationsprotein in Signaltransduktionsprozessen ist. Nahezu alle natürlichen Peptide mit Prolin oder Alanin an vorletzter N-terminaler Position sind Substrate der DP IV. Die Verkürzung um das N-terminale Dipeptid Xaa-Pro bzw. Xaa-Ala führt in vielen Fällen zu einer Aktivierung oder Deaktivierung oder einer veränderten Rezeptorspezifität bzw. -affinität des Peptides (Mentlein, 1999).

GRF gehört zur Familie der Glukagon/Secretin/VIP-Peptid-Familie - oder auch GRF-Familie. Diese Familie verfügt N-terminal über eine hohe Sequenzhomologie. Es wird angenommen, daß der C-Terminus der Peptide essentiell für die spezifische Rezeptorbindung ist und der N-Terminus die Weiterleitung des durch die Bindung der Peptide an ihre Rezeptoren ausgelösten Signals determiniert.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über diese Peptidfamilie. Die Peptide wurden nach N-terminalen Xaa-Pro, Xaa-Ala, Xaa-Ser und Xaa-Gly-Sequenzen geordnet. In Anbetracht der nachgewiesenen erweiterten Spezifität der DP IV war zu vermuten, daß alle Peptide Substrate des Enzyms darstellen.

Tabelle 2: Hormone der GRF-Familie und ihre N-terminalen Sequenzen

Peptidhormon	N-terminale Sequenz							
<i>Gastrin-releasing peptide</i> (GRP)	V	P	L	P	A	G	G	G
Enterostatin	A	P	G	P	A			
<i>Peptide histidine methionine</i> (PHM)	H	A	D	G	V	F	T	S
Cholecystokinin21 (CCK21)	L	A	P	S	G	N	V	S
<i>Glukagon-like peptide-2</i> (GLP-2)	H	A	D	G	S	N	S	D
<i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i> (GIP)	Y	A	E	T	P	I	S	D
<i>Glukagon-like peptide-1</i> (GLP-1)	H	A	E	G	T	F	T	S
<i>Growth-hormone releasing factor</i> (GRF)	Y	A	D	A	I	F	T	N
<i>Pituitary-adenylate cyclase activating polypeptide</i> (PACAP (27 und 38))	H	S	D	G	I	F	T	D
<i>Vasoactive intestinale peptide</i> (VIP)	H	S	D	A	V	F	T	D
Exendin-1	H	S	D	A	T	F	T	A
Exendin-2	H	S	D	A	I	F	T	E
Exendin-3	H	S	D	G	T	F	T	S
Exendin-4	H	G	E	G	T	F	T	S
Secretin	H	S	D	G	T	F	T	S
Glukagon	H	S	Q	G	T	F	T	S

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die Peptide der GRF-Familie Substrate der DP IV sind. Um Aussagen über die Substrateigenschaften der Mitglieder der GRF-Familie machen zu können, wurde zunächst untersucht, ob gereinigte DP IV_{Schwein} in der Lage ist, diese Peptide zu hydrolysieren. Die qualitative Untersuchung der Proteolyseprodukte der Peptide erfolgte mittels *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS).

Peptidhormone und DP IV_{Schwein} wurden bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Die Konzentration der DP IV_{Schwein} wurde so gewählt, daß die Aktivität des gereinigten Enzyms und die im Serum nachweisbare DP IV-Aktivität gegenüber dem Standardsubstrat Gly-Pro-4NA gleich groß waren (vgl. S. 33). Um die Produkte der DP IV-katalysierten Hydrolyse der Peptide der GRF-Familie zu charakterisieren, wurden in definierten Zeitabständen Proben entnommen und analysiert. Außer DP IV konnten verwandte Enzyme mit DP IV-ähnlicher Substratspezifität auch in humanem Serum nachgewiesen werden (Iwaki-Egawa *et al.*, 1998; Jacotot *et al.*, 1996; Duke-Cohan *et al.*, 1995). Um zu prüfen, ob die lösliche Form der DP IV bzw. Enzyme mit DP IV-ähnlicher Aktivität eine N-terminale Hydrolyse der Peptidhormone katalysieren und

streng spezifisch für Prolin oder Alanin in P₁-Position sind oder auch – wie DP IV – eine erweiterte Substratspezifität aufweisen, wurden die Peptidhormone in humanem Serum bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Eine dritte Versuchsreihe konzentrierte sich darauf, zu beweisen, daß DP IV-katalysierte Hydrolyse den Metabolismus der untersuchten gastrointestinalen Peptide im Serum beeinflusst. Deshalb wurde der Einfluß des spezifischen Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidin auf die im Serum enthaltene DP IV-Aktivität untersucht.

Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Studien für die einzelnen Peptide vorgestellt.

Gastrin-releasing peptide (GRP)

VPLPAGGGTV¹⁰ LTKMYPRGNH²⁰ WAVGHLM

Aufgrund der oben dargestellten Aminosäuresequenz des GRP kann DP IV die sequentielle Abspaltung zweier Dipeptide katalysieren. Die potentiellen Spaltstellen wurden hervorgehoben.

Wird GRP mit gereinigter DP IV_{Schwein} inkubiert, so wird das Peptid sofort zu GRP₃₋₂₇ verkürzt. Anschließend daran wird ein weiteres Dipeptid freigesetzt. Nach einer Stunde ist bereits nur noch GRP₅₋₂₇ nachweisbar. In Serum sind die gleichen Proteolyseprodukte detektierbar. Hauptfragment nach 24 Stunden Inkubation in Serum ist GRP₃₋₂₇. Isoleucyl-Thiazolidin hemmt die Hydrolyse des GRP durch die im Serum enthaltene DP IV-Aktivität mindestens 6 Stunden.

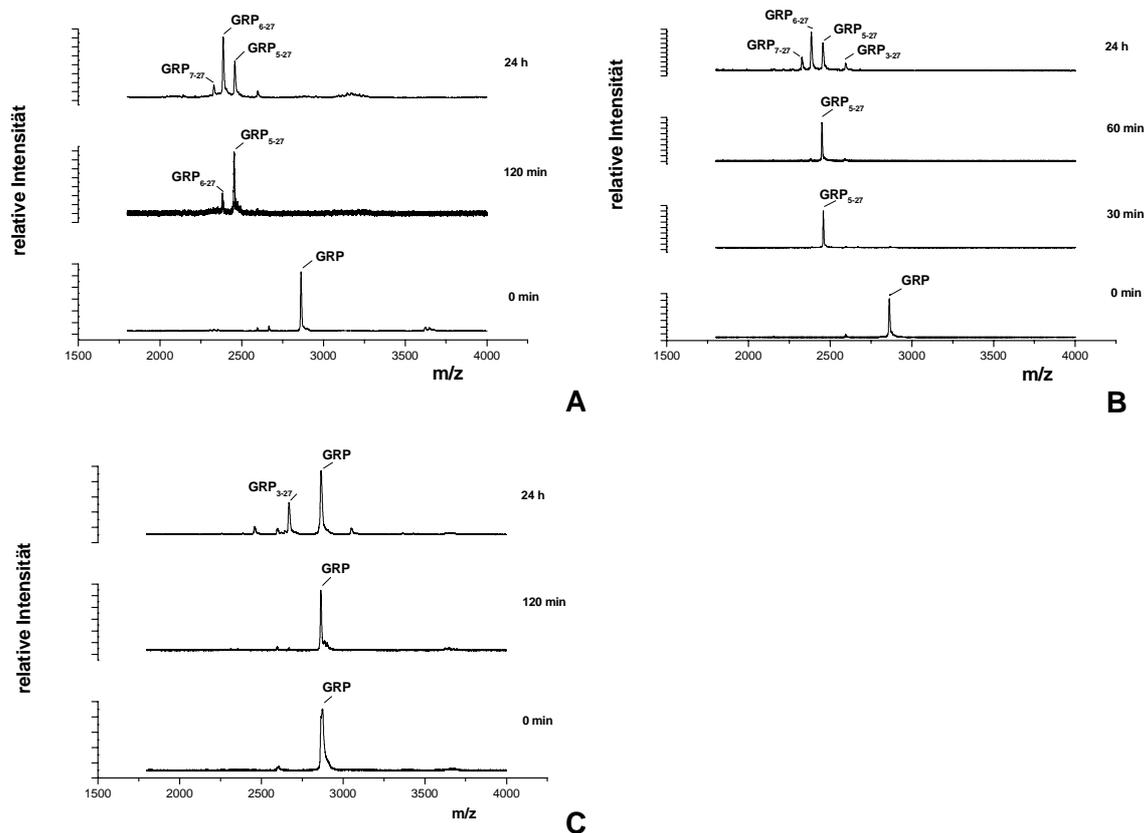


Abbildung 3: Massenspektren von GRP, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
 A) GRP + DP IV_{Schwein}, B) GRP + Serum, C) GRP + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Secretin

HSDGTFTSEL¹⁰ SRLREGARLQ²⁰ RLLQGLV

Die vollständige Freisetzung des N-terminalen Dipeptides HS erfolgt durch DP IV_{Schwein} innerhalb von 60 min. Eine weitere Verkürzung um das Dipeptid DG wäre theoretisch möglich, war jedoch nicht nachzuweisen. Nach 24 Stunden wurde ausschließlich das Fragment Secretin₃₋₁₉ nachgewiesen. Möglicherweise enthielt die genutzte Enzymcharge DP IV Spuren proteolytischer Fremdaktivitäten. In Serum erfolgte die DP IV-katalysierte Hydrolyse deutlich langsamer (vgl. Abbildung 4). Nach 24 Stunden waren in Serum ca. 60% des eingesetzten Secretins zu Secretin₃₋₂₇ umgesetzt. Isoleucyl-Thiazolidin inhibierte den aminoterminalen Abbau des Peptides im Serum.

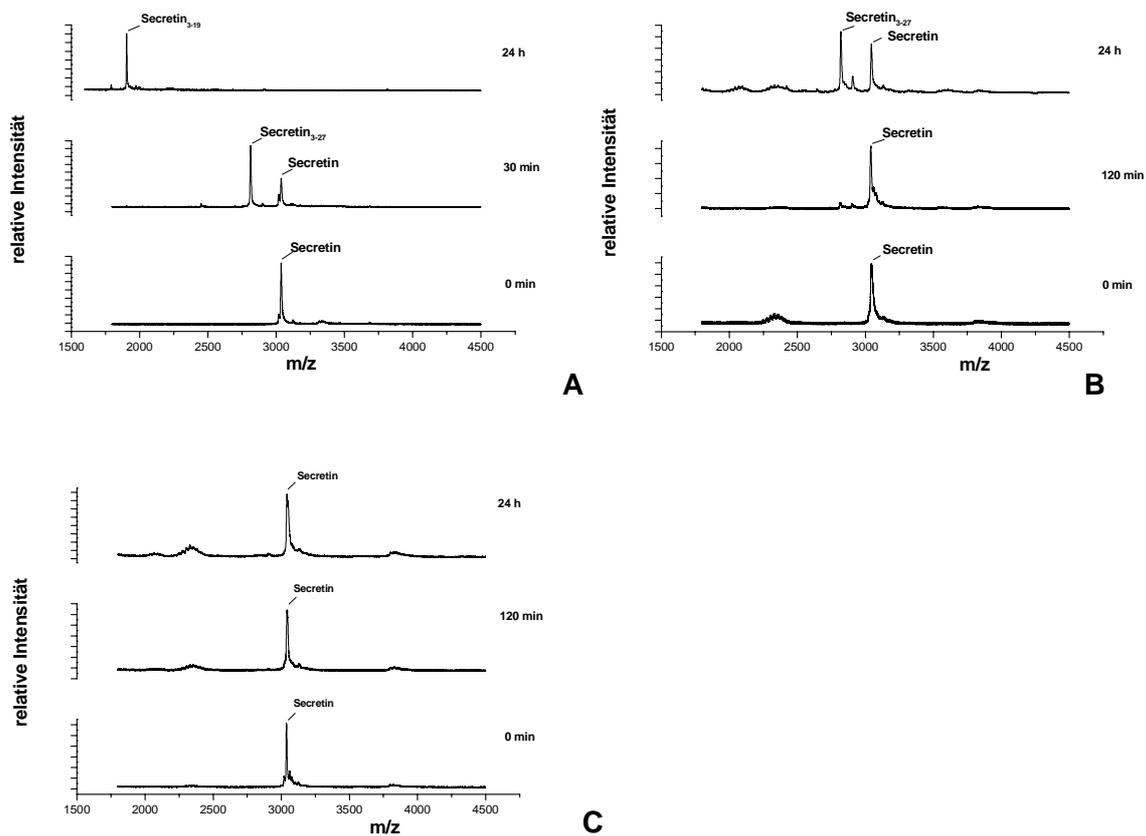


Abbildung 4: Massenspektren von Secretin, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
A) Secretin + DP IV_{Schwein}, B) Secretin + Serum, C) Secretin + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Peptide histidine methionine (PHM)

HADGVFTSDF¹⁰ SKLLGQLSAK²⁰ KYLES LM

PHM sollte ebenfalls sehr gute Substrateigenschaften für die DP IV aufweisen, da es an N-terminal vorletzter Position einen Alanylrest hat. Sowohl das gereinigte Enzym als auch die DP IV-Aktivität des Serums katalysieren die Hydrolyse der Alanylbindung effizient. Nach 30 min war fast ausschließlich das Katalyseprodukt PHM₃₋₂₇ nachweisbar. Eine weiterer DP IV-katalysierter proteolytischer Abbau wurde nicht beobachtet, obgleich das nun an P₁-Position stehende Glycin eine Hydrolyse erlauben würde. Nach 24 Stunden wurden im Inkubationsansatz mit gereinigter DP IV aus Schweineniere neben dem Hauptprodukt PHM₃₋₂₇ drei weitere Fragmente des PHM nachgewiesen. Isoleucyl-Thiazolidin hemmt die Hydrolyse des PHM über 24 Stunden in humanem Serum vollständig.

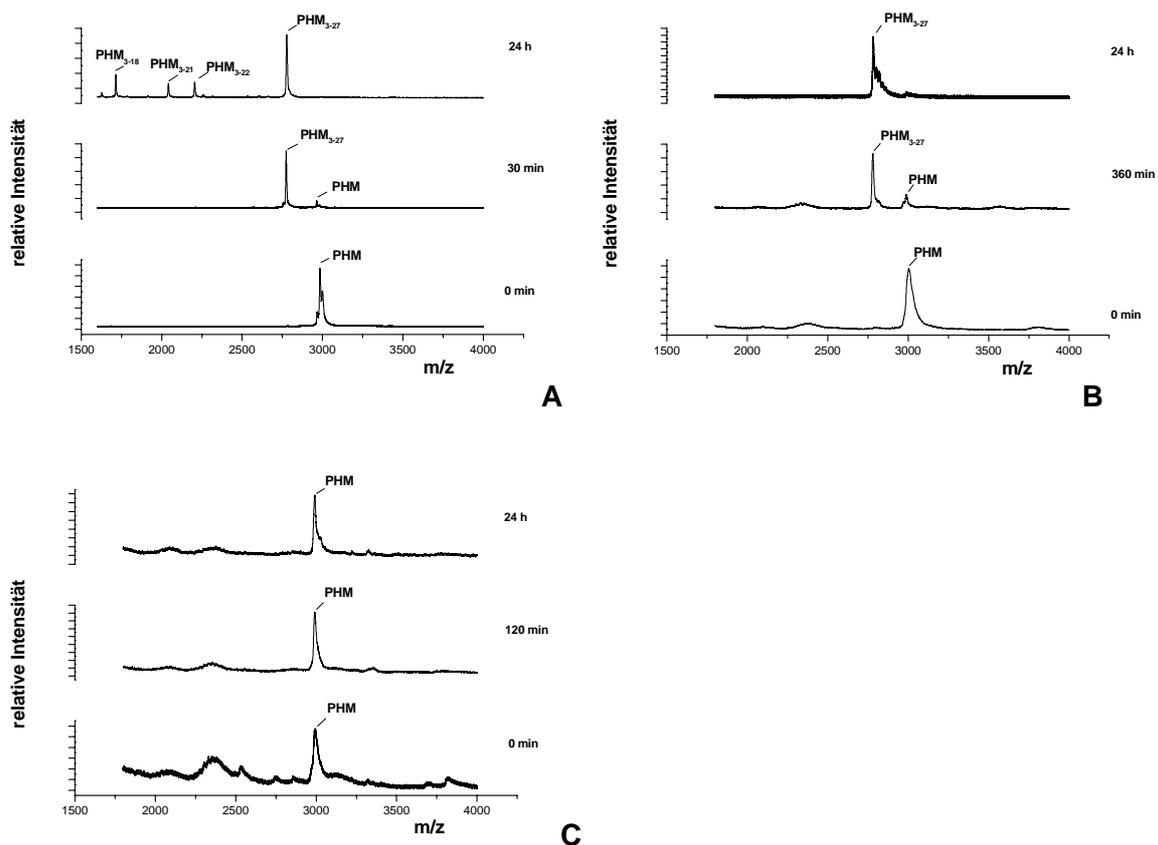


Abbildung 5: Massenspektren von PHM, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
 A) PHM + DP IV_{Schwein}, B) PHM + Serum, C) PHM + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Vasoactive intestinale polypeptide (VIP)

HSDAVFTDNY¹⁰ TRLRKQMAVK²⁰ KYLNSILN

VIP wird durch DP IV_{Schwein} sehr schnell zu VIP₃₋₂₈ umgesetzt. VIP₃₋₂₈ ist erneut Substrat für die DP IV_{Schwein} und wird sofort zu VIP₅₋₂₈ verkürzt. Die im Serum enthaltene DP IV-Aktivität spaltet ebenfalls das aminoternale Dipeptid ab. Wesentlich langsamer wird ein weiteres Dipeptid (DA) freigesetzt. Hauptabbauprodukt nach 24 Stunden ist VIP₃₋₂₈. Isoleucyl-Thiazolidin unterdrückt die N-terminale Proteolyse des VIP im Serum über 24 Stunden vollständig.

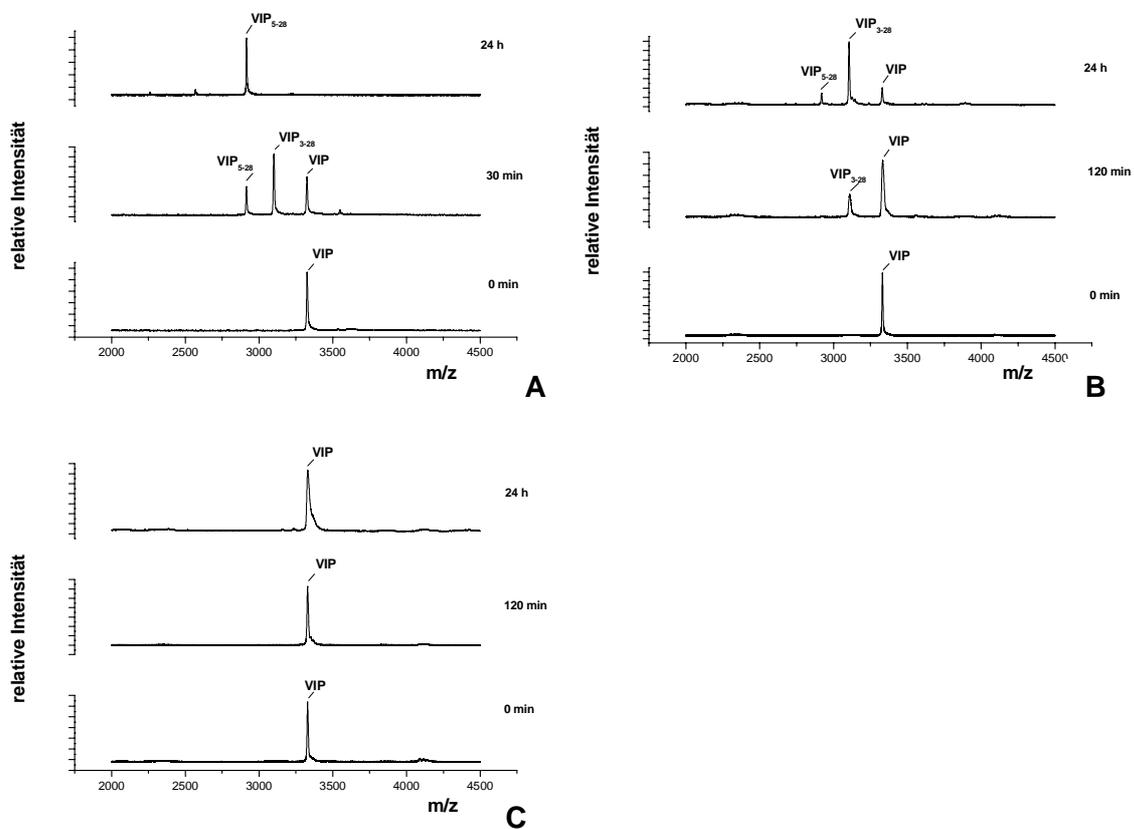


Abbildung 6: Massenspektren von VIP, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
A) VIP + DP IV_{Schwein}, B) VIP + Serum, C) VIP + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Growth hormone-releasing factor (GRF)

YADAIFTNSY¹⁰ RKVLGQLSAR²⁰ KLLQDIMSRQ³⁰ QGESNQRGA⁴⁰ RARL

Frohman *et al.* zeigten 1989 erstmals, daß DP IV das Enzym ist, das für die Inaktivierung des GRF hauptverantwortlich ist (Frohman *et al.*, 1989). Die hier vorgestellten Untersuchungen bestätigen Frohmans Ergebnisse, zeigen jedoch zusätzlich die Abspaltung eines weiteren Dipeptides. Initial wird das N-terminale Dipeptid YA abgespalten. Die nachfolgende Hydrolyse des zweiten Dipeptides DA erfolgt wesentlich langsamer, obwohl wiederum Alanin in P₁-Position eine effiziente Hydrolyse erlauben sollte. Isoleucyl-Thiazolidin hemmte die DP IV-katalysierte Proteolyse des GRF in Serum vollständig. Nach 24 Stunden Inkubationsdauer konnten neben dem Hauptprodukt GRF₁₋₄₄ weitere Fragmente nachgewiesen werden, die vermutlich durch die Aktivität von Carboxypeptidasen entstanden sind. Der Metabolismus des GRF in Serum führt über das N-terminale verkürzte Fragment GRF₃₋₄₄. Als Hauptmetabolit in Serum konnte GRF₂₁₋₄₄ nachgewiesen werden.

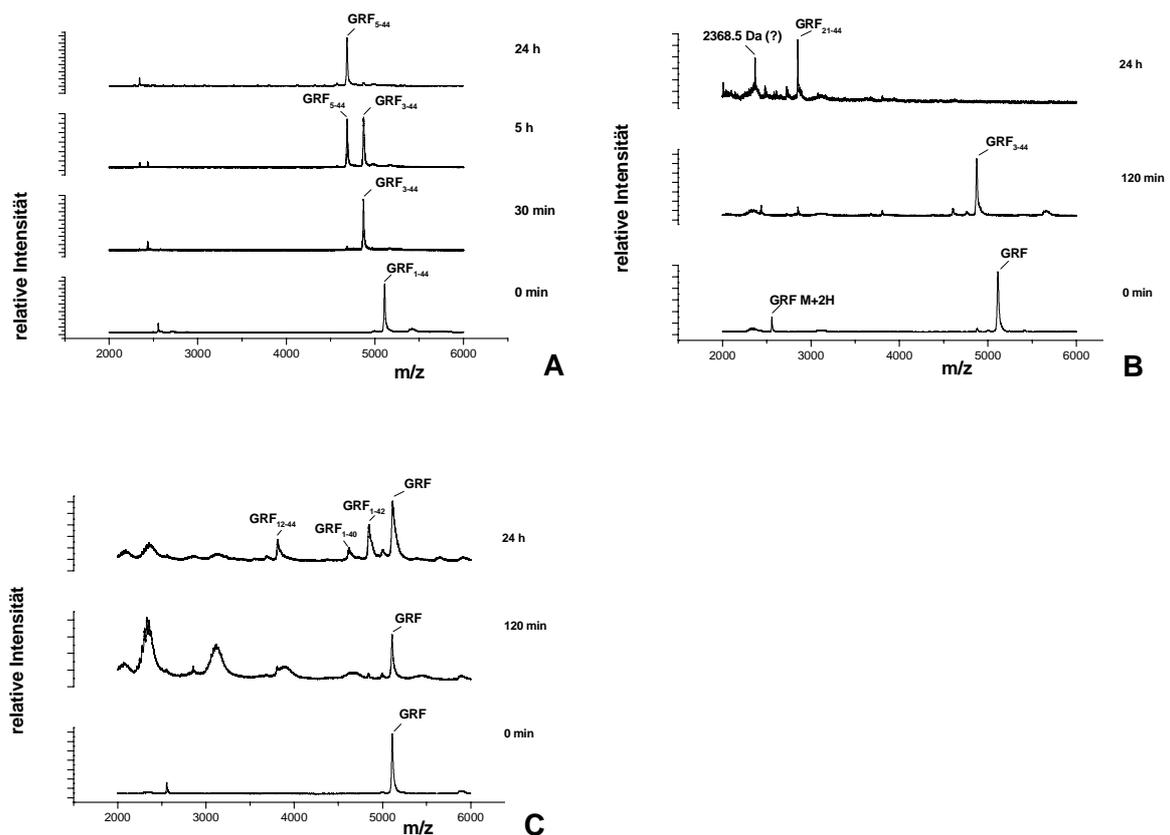


Abbildung 7: Massenspektren von GRF, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
 A) GRF + DP IV_{Schwein}, B) GRF + Serum, C) GRF + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Pituitary adenylate-cyclase activating peptide (PACAP-27)

HSDGIFTDSY¹⁰ SRYRKQMAVK²⁰ KYLA AVL

Isolierte DP IV katalysiert die sequentielle N-terminale Hydrolyse der Dipeptide His-Ser und Asp-Gly. Obgleich Serin an P₁-Position keine optimale Bindung des Substrates in das aktive Zentrum des Enzyms ermöglicht, wird unerwarteterweise innerhalb von 30 min mehr als die Hälfte des eingesetzten PACAP-27 zu PACAP-27₃₋₂₇ verkürzt. Im Serum wird das erste Dipeptid wesentlich langsamer abgespalten. Nach 4 Stunden Inkubation sind ca. 60% des PACAP-27 zu PACAP-27₃₋₂₇ verkürzt worden.

Isoleucyl-Thiazolidin hemmt die aminoterminal Proteolyse in humanem Serum vollständig.

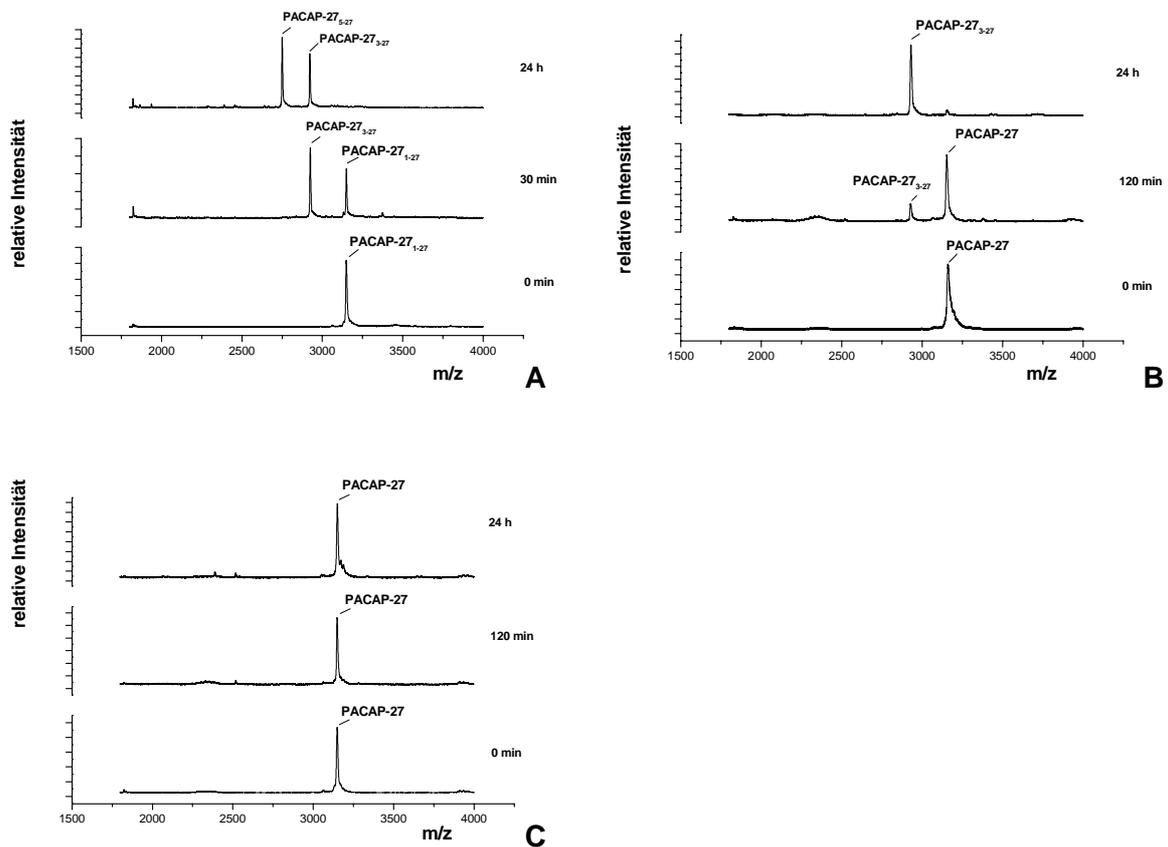


Abbildung 8: Massenspektren von PACAP-27, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
 A) PACAP-27 + DP IV_{Schwein}, B) PACAP-27 + Serum, C) PACAP-27 + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Pituitary adenylate-cyclase activating peptide (PACAP-38)

HSDGIFTDSY¹⁰ SRYRKQMAVK²⁰ KYLAAVLGKR³⁰ YRQRVKNK

PACAP-27 und PACAP-38 entstehen aus dem gleichen Vorläuferpeptid. Ihre physiologischen Wirkungen und ihre lokalen Konzentration sind gewebespezifisch und unterscheiden sich (Odum *et al.*, 1998; Martinez-Fuentes *et al.*, 98 A.D.). Deshalb wurde ebenfalls PACAP-38 getestet, um zu prüfen, ob die Kettenlänge des Peptides Einfluß auf die Proteolyse von Nicht-Prolin und Nicht-Alanin-Substraten der DP IV hat. PACAP-38 wird durch gereinigte DP IV schneller als PACAP-27 um zwei N-terminale Dipeptide verkürzt (vgl. Abbildung 8A und 9A). Im Verlauf des Inkubationsexperimentes mit Serum waren keine DP IV Katalyseprodukte nachzuweisen. Es wurden C- und N-terminale Fragmente detektiert, die durch endoproteolytische Enzymaktivitäten entstanden sein könnten. Isoleucyl-Thiazolidin beeinflusste diese proteolytischen Aktivitäten nicht. Als Hauptmetaboliten in humanem Serum wurden PACAP-38₁₋₂₁, PACAP-38₂₂₋₃₈ sowie PACAP-38₁₉₋₃₈ nachgewiesen.

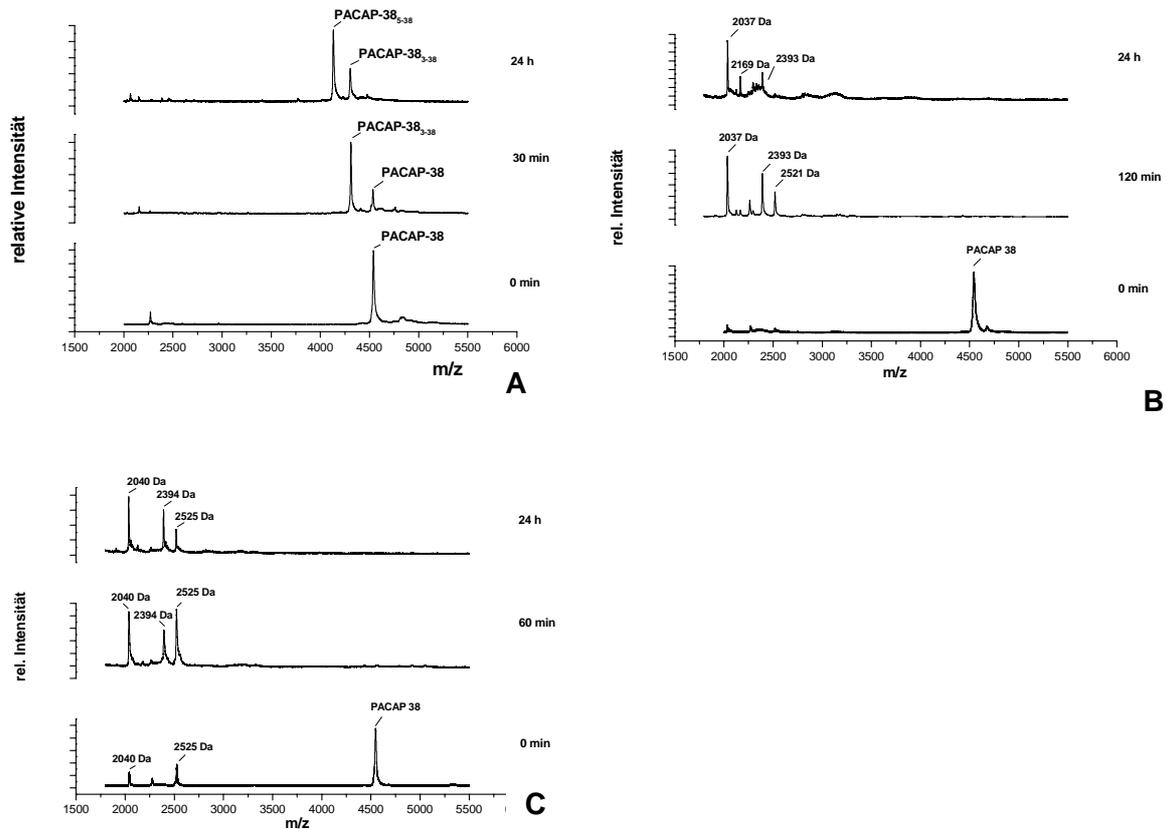


Abbildung 9: Massenspektren von PACAP-38, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
 A) PACAP-38 + DP IV_{Schwein}, B) PACAP-38 + Serum, C) PACAP-38 + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Cholecystokinin21 (CCK21)

KAPSGRMSIV¹⁰ KNLQNLDP SH²⁰ R

Erwartungsgemäß ist CCK21 gegen die DP IV_{Schwein}-katalysierte Hydrolyse resistent, da ein Prolin in P₁'-Position die Hydrolyse der Alanylbindung verhindert. Das Peptid bleibt im Inkubationsansatz mit DP IV_{Schwein} über 24 Stunden stabil. Wird CCK21 mit Serum inkubiert, wird zunächst CCK21₂₋₂₁ und anschließend CCK₄₋₂₁ generiert. Isoleucyl-Thiazolidin verzögert den Abbau des CCK21 im Serum, kann ihn jedoch nicht vollständig unterdrücken.

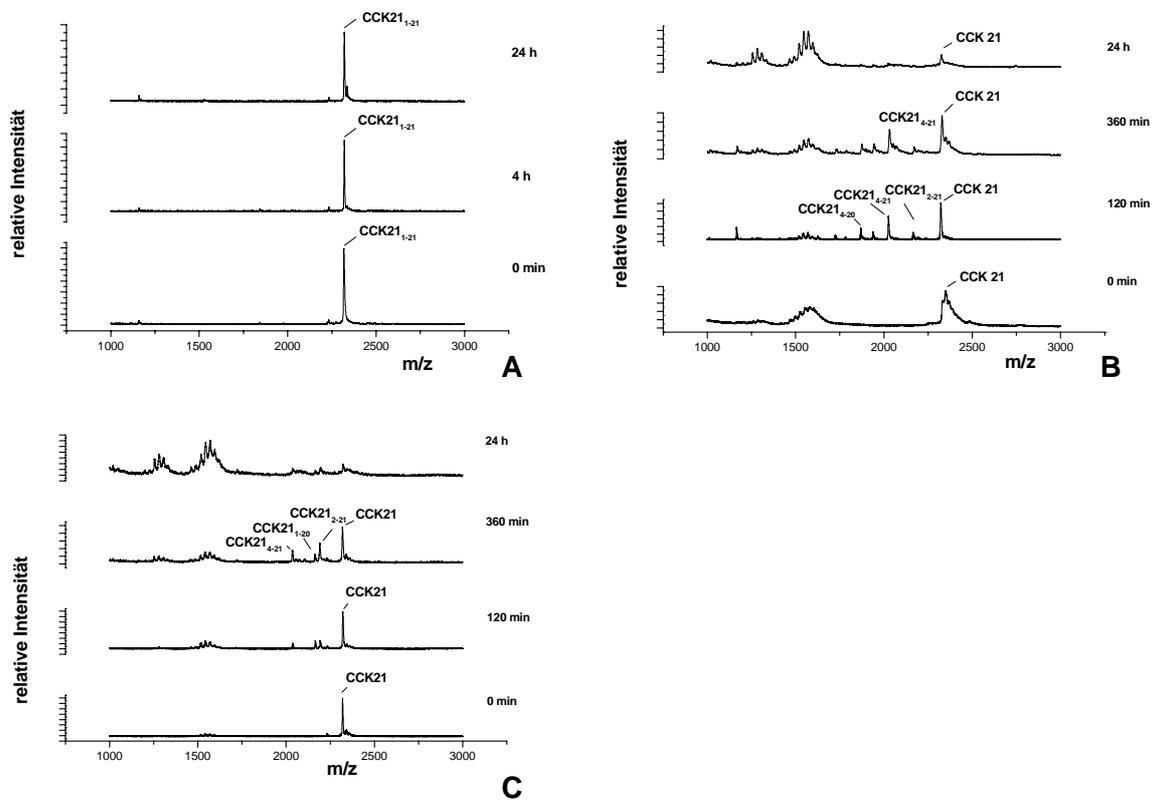


Abbildung 10: Massenspektren von CCK21, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
 A) CCK21 + DP IV_{Schwein}, B) CCK21 + Serum, C) CCK21 + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Somatostatin 14 (SMS-14)



Interessant an dieser Peptidsequenz ist die Ausbildung der Disulfid-Brücke zwischen Cys³ und Cys¹⁴. Die DP IV hydrolysiert die Gly-Cys-Peptidbindung, d.h. die zyklische Struktur der Restsequenz schränkt die katalytische Aktivität des Enzyms nicht ein.

Durch die Inkubation von SMS-14 mit humanem Serum entstehen als Hauptfragmente SMS-14₂₋₁₄ und SMS-14₃₋₁₄. Erwartungsgemäß hatte daher die Hemmung der DP IV-Aktivität im Serum durch Isoleucyl-Thiazolidin keinen Einfluß auf die Hydrolyse des SMS-14. Die Reaktion wurde über 24 Stunden verfolgt. Bereits nach 460 min sind in diesen Inkubationsansätzen sowohl SMS-14 als auch dessen Proteolysefragmente nicht mehr nachweisbar.

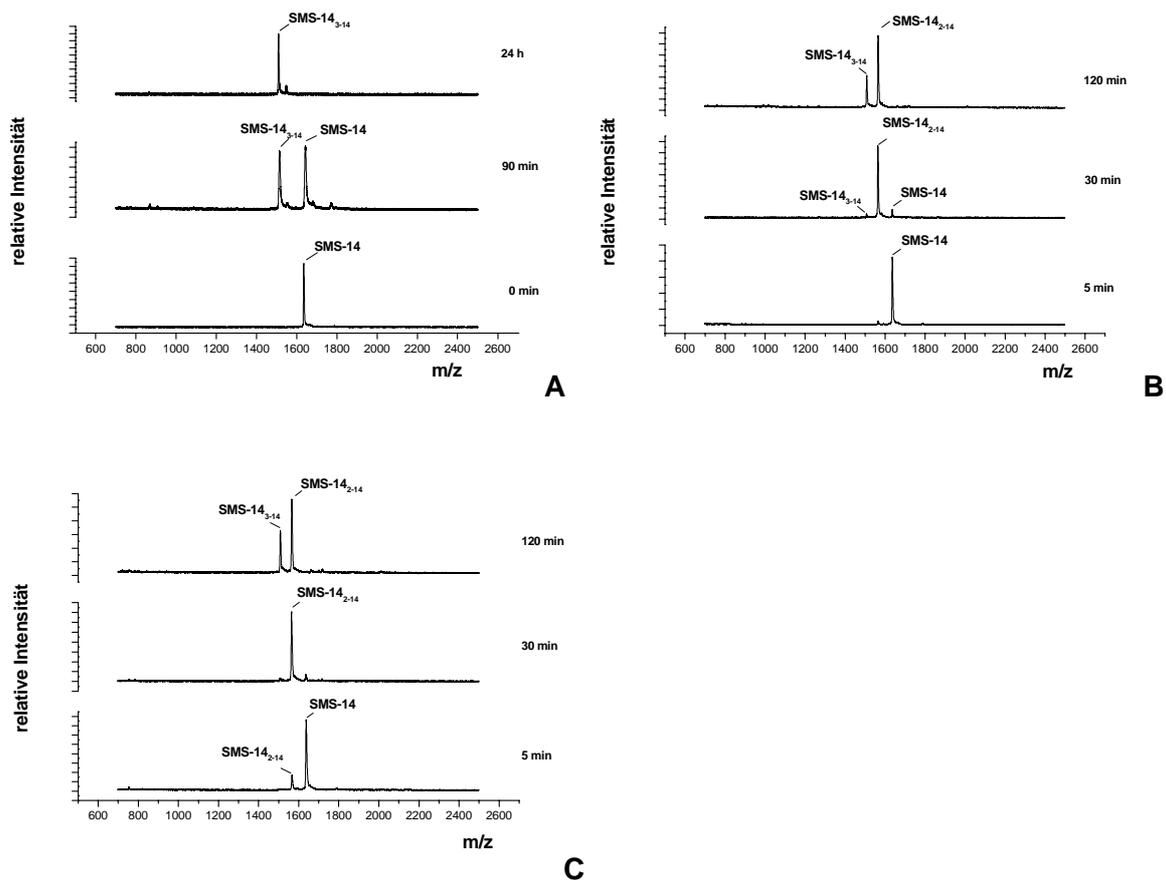


Abbildung 11: Massenspektren von SMS-14, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
 A) SMS-14 + DP IV_{Schwein}, B) SMS-14 + Serum, C) SMS-14 + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Somatostatin 28 (SMS-28)



SMS-28 stellt für die DP IV eine sehr gute Substratstruktur dar, da Alanin in P₁-Position eine effiziente Katalyse ermöglichen sollte. Die Inkubation von SMS-28 mit DP IV führt erwartungsgemäß zu einer schnellen aminoterminalen Verkürzung des SMS-28 zu SMS-28₃₋₂₈. Als Hauptabbauprodukt wurde nach 24 Stunden SMS-28₇₋₂₈ detektiert. Das Dipeptid Asn-Ser ist unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachweisbar. Der primäre Hydrolyseschritt bei Inkubation von SMS-28 in humanem Serum ist die N-terminale Abspaltung des Dipeptides Ser-Ala. Weitere nachgewiesene Fragmente könnten durch carboxypeptidatische und endoproteolytische Aktivitäten gebildet worden sein. Nach 460 min waren weder SMS-28 noch Fragmente des Peptides detektierbar. Aus der Hemmung der DP IV-Aktivität im Serum durch Isoleucyl-Thiazolidin resultiert eine durch vermutlich Aminopeptidasen katalysierte Abspaltung des Serins¹ (vgl. Abbildung 12). Nach 460 min war ebenfalls kein Peptid oder Peptidfragment nachweisbar.

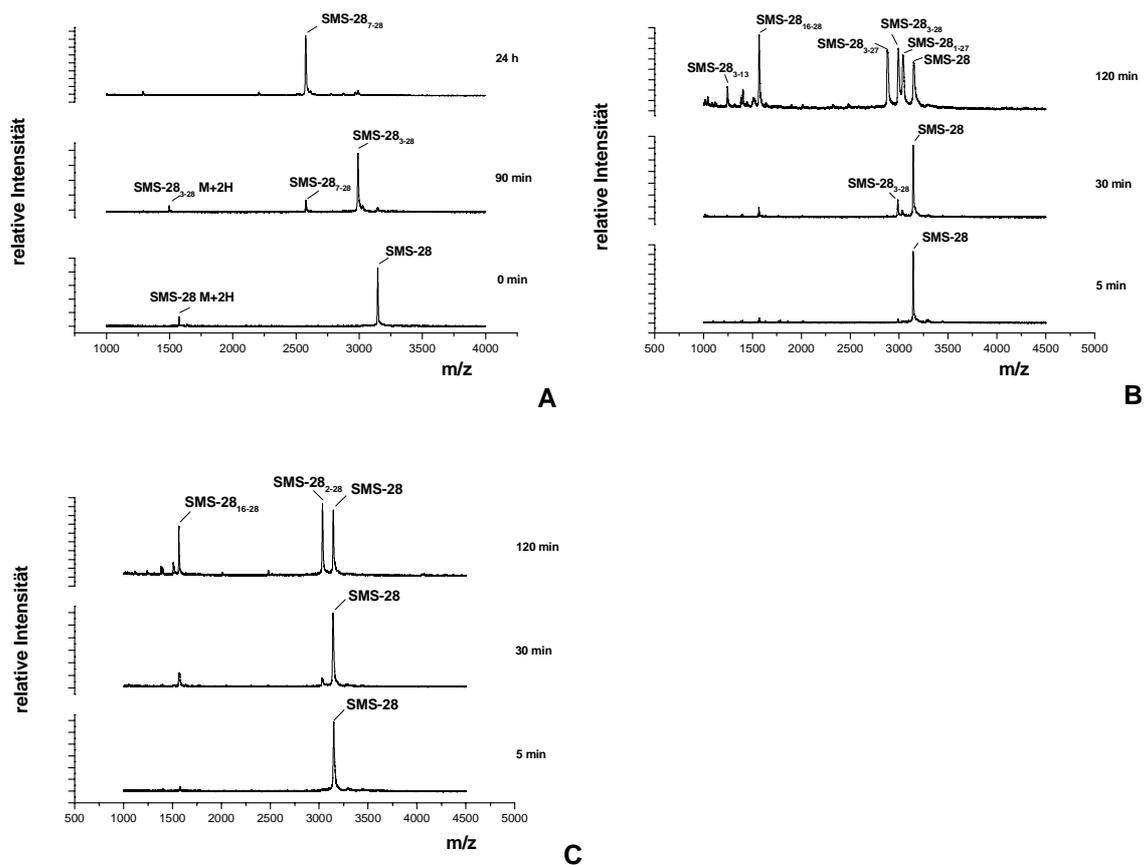


Abbildung 12: Massenspektren von SMS-28, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C
 A) SMS-28 + DP IV_{Schwein}, B) SMS-28 + Serum, C) SMS-28 + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen zur Inaktivierung der Hormone der GRF-Familie durch DP IV_{Schwein} und humanes Serum kurz zusammengefaßt werden.

Die getesteten Peptidhormone wurden durch die DP IV_{Schwein} N-terminal verkürzt. Die einzige Ausnahme stellt das CCK21 dar. Isoleucyl-Thiazolidin hemmte die DP IV-katalysierte proteolytische Verkürzung aller untersuchter Peptide (Daten nicht gezeigt). Es konnte bestätigt werden, daß höhermolekulare Substrate mit Serin und Glycin in P₁-Position durch DP IV umgesetzt werden.

Die Untersuchungen mit gereinigter DP IV stellen ein künstliches System dar, das nur hypothetische Rückschlüsse auf einen möglichen Umsatz der Peptide *in vivo* zuläßt. Die meisten der analysierten Peptidhormone werden von endokrinen Drüsen produziert und in die Blutzirkulation des Körpers abgegeben. Deshalb wurden die Inkubationsansätze unter identischen Bedingungen wiederholt. Statt des gereinigten Enzyms erfolgte der Zusatz von humanem Serum.

Erstmals konnte gezeigt werden, daß die im Serum nachweisbare DP IV-Aktivität, die Hydrolyse auch solcher Peptidbindungen katalysiert, an denen Serin und Glycin in P₁-Position beteiligt sind. Es konnte beobachtet werden, daß die Spaltung der Prolin- und Alanin-Substrate etwas langsamer als durch gereinigte DP IV erfolgte, währenddessen Serin- und Glycin-Substrate in Serum deutlich langsamer umgesetzt wurden. Die hydrolytische Aktivität der DP IV_{Schwein} gegen das niedermolekulare Substrat GP-4NA wurde so gewählt, daß sie mit der im Serum bestimmten GP-4NA-Hydrolysegeschwindigkeit vergleichbar war.

Isoleucyl-Thiazolidin inhibierte die Proteolyse der Peptide im Inkubationsansatz mit humanem Serum mindestens 6 Stunden.

Um Aussagen über die Substrateigenschaften der Peptide der GRF-Superfamilie zu ermöglichen, wurden die kinetischen Konstanten der DP IV-katalysierten Hydrolyse ausgewählter Peptide mittels Kapillar-Elektrophorese bestimmt. Diese Peptide repräsentieren die Serin-, Glycin- und Alanin-Substratfamilien. Die K_m-Werte liegen in mikromolaren Bereich und unterscheiden sich maximal um eine Größenordnung (vgl. Tabelle 3, S. 53). Des weiteren wurde anhand zusätzlicher massenspektrometrischer Untersuchungen die Halbwertszeit des DP IV-katalysierten Abbaus der Peptide bestimmt.

Tabelle 3 faßt die ermittelten kinetischen Konstanten der DP IV-katalysierten Hydrolyse der untersuchten Peptidhormone zusammen.

Tabelle 3: Kinetische Konstanten der durch DP IV oder DP V-ähnliche Aktivitäten katalysierten Hydrolyse der Peptide der GRF-Familie (n.b. = nicht bestimmt)

Peptid	Anzahl der Aa	Aa in P ₂ - und P ₁ -Position	K _m [μM]	k _{cat} /K _m [M ⁻¹ s ⁻¹]	t _{1/2} [min] des Abbaus durch		Hemmbarkeit durch Ile-Thia
					DP IV _{Schwein}	humanes Serum	
GRP	27	VP	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+
GRF	44	YA	n.b.	n.b.	4,71	12,21	+
PHM	27	HA	35,3	3,66*10 ⁵	10,78	25,94	+
² GLP-1	29	HA	4,5	4,3*10 ⁵	37,1	49,8	+
² GIP	42	YA	34,0	2,2*10 ⁵	2,53	2,76	+
SMS-28	28	SA	5,8	2,19*10 ⁵	46,89	— ³	** ⁴
PACAP27	27	HS	n.b.	n.b.	218,80	> 625,00	+
PACAP38	38	HS	n.b.	n.b.	12,6	—	+
Secretin	27	HS	62,9	1,32*10 ⁶	144,34	> 625,00	+
CCK21	21	KA	n.b.	n.b.	—	—	+
VIP	28	HS	n.b.	n.b.	118,46	474,98	+
SMS-14	14	AG	42,0	1,17*10 ³	165,05	— ³	** ⁴
Glukagon	29	HS	3,8	2,0*10 ⁵	13,03	232,90	+

Die höchsten k_{cat}/K_m -Werte wurden für Alanin-Substrate bestimmt. Die k_{cat}/K_m -Werte für das Glycin- und das Serinsubstrat liegen 2 bzw. 3 Größenordnungen niedriger (vgl. Tabelle 3), was für die geringere katalytische Effizienz der DP IV gegenüber diesen Substraten spricht.

² Daten aus (Mentlein *et al.*, 1993)

³ Unterliegen im Serum keiner DP IV-katalysierten Proteolyse

⁴ Proteolyse durch Isoleucyl-Thiazolidin nicht beeinflussbar

3.2 Glukagon und Glukagon - Analoga

Glukagon ist ein aus 29 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Es wird als Propeptid in den α -Zellen der Bauchspeicheldrüse und in endokrinen Zellen der intestinalen Mukosa synthetisiert. In Abhängigkeit vom Synthesort wird Proglukagon unterschiedlich prozessiert. Als Hauptprodukte entstehen im Pankreas Glukagon und im Dünndarm *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) und *Glucagon-like peptide-2* (GLP-2) (vgl. S. 9).

3.2.1 Glukagon

HSQGTFTSDY¹⁰ SKYLDSRRAQ²⁰ DQVQWLMNT

Der Glukagon-Metabolismus wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Für den Glukagon-Abbau in der Leber wird vorrangig das zytosolische Enzym Dipeptidylpeptidase I (DP I, auch Cathepsin C) verantwortlich gemacht (McDonald *et al.*, 1969; Rao *et al.*, 1997). In Anbetracht der erweiterten Substratspezifität der DP IV ist es denkbar, daß sie sowohl in die Regulation der biologischen Aktivität des Glukagons involviert ist, als auch, daß sie den initialen Schritt im Abbau des Glukagons katalysiert. Um zu prüfen, ob DP IV für die Inaktivierung des Glukagons in der Zirkulation verantwortlich ist, wurde der Abbau des Glukagons durch gereinigte DP IV_{Schwein} und in humanem Serum untersucht. Glukagon besitzt an P₁-Position einen Serinrest.

DP IV_{Schwein} katalysierte die Freisetzung des N-terminalen Dipeptides His-Ser. Sequentiell wurde ein weiteres Dipeptid (Gln-Gly) abgespalten. Als Hauptfragment nach 18 Stunden Inkubationsdauer wurde Glukagon₅₋₂₉ nachgewiesen. Der initiale Schritt des Glukagon-Metabolismus in humanem Serum ist ebenfalls die Proteolyse des aminoterminalen His-Ser-Peptides. Als Hauptprodukt des enzymatischen Abbaus des Glukagons wurde eine Verbindung mit dem Molekulargewicht 3242,6 Da detektiert. Das Molekulargewicht dieses Hydrolyseproduktes ist 17 Da kleiner als das Molekulargewicht des erwarteten Produktes Glukagon₃₋₂₉. Die Verbindung Glukagon₃₋₂₉-17 Da ist resistent gegen weiteren proteolytischen Abbau. Sowohl die Hydrolyse durch DP IV_{Schwein} als auch durch die DP IV-Aktivität des Serums konnten durch Isoleucyl-Thiazolidin vollständig inhibiert werden (vgl. Abbildung 13).

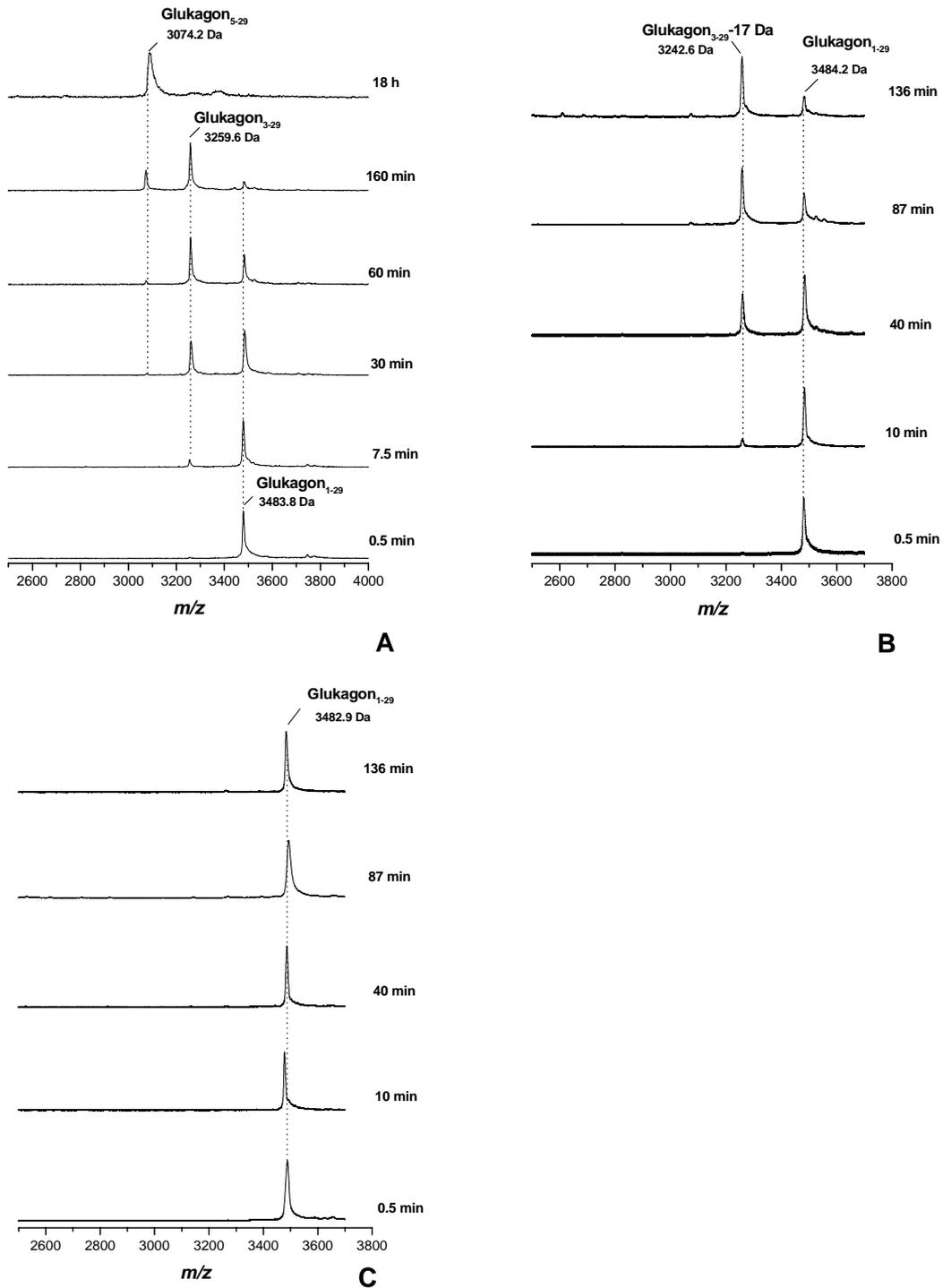


Abbildung 13:

Massenspektren von Glukagon, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C

A) Glukagon + DP IV_{Schwein}, B) Glukagon + Serum, C) Glukagon + Serum + Isoleucyl-Thiazolidin

Um die These zu verifizieren, daß DP IV- und nicht DP I-katalysierte Hydrolyse des Glukagons der initiale Schritt des Glukagon-Metabolismus in der Niere ist, wurde Glukagon mit DP I bei verschiedenen pH-Werten und unter Zusatz des Inhibitors GF-NHO-Bz inkubiert. GF-NHO-Bz inhibiert die Aktivität der DP I irreversibel und spezifisch (D. Schlenzig, persönliche Mitteilung).

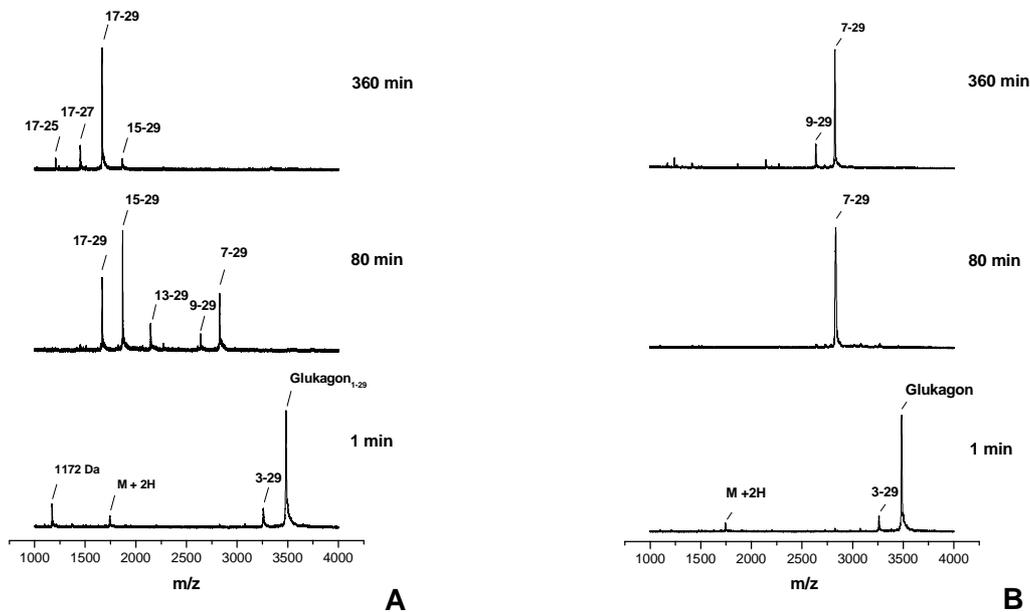


Abbildung 14: Massenspektren von Glukagon, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP I_{Mensch} bei 37°C in A) 40 mM MES-Puffer (pH 6,0), B) 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4)

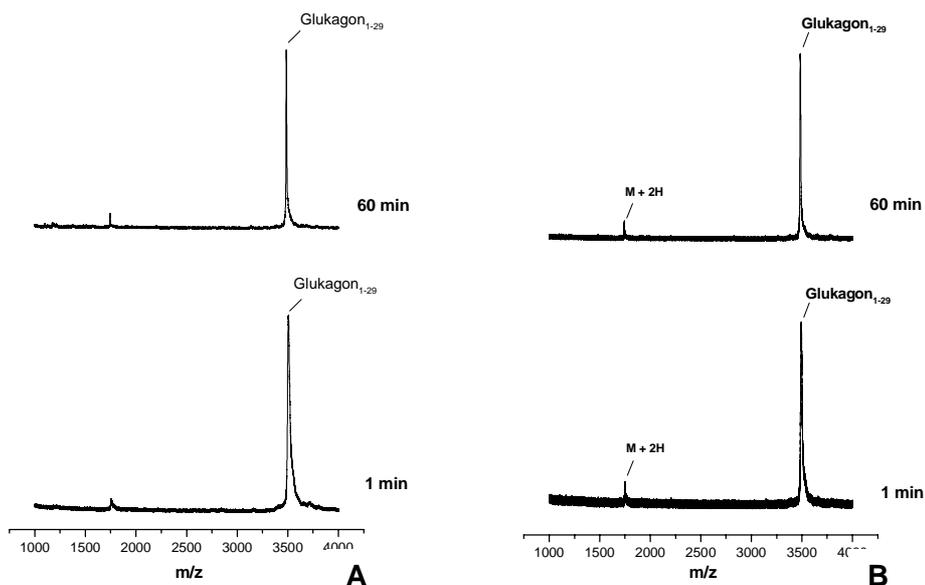


Abbildung 15: Massenspektren von Glukagon, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP I_{Mensch} bei 37°C in A) 40 mM MES-Puffer (pH 6,0) und GF-NHO-Bz, B) 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) und GF-NHO-Bz

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl DP I als auch DP IV *in vitro* Glukagon als Substrat akzeptieren und daß die gewählten Inhibitoren den Abbau des Glukagons durch die jeweiligen Proteasen hemmen.

Die DP IV kommt in besonders hohen Konzentrationen in den proximalen Tubuli der Glomeruli der Niere vor. Um die Rolle des DP IV oder DP I katalysierten Glukagonabbaus in der Niere zu untersuchen, wurden drei Inkubationsansätze gewählt:

- Inkubation des Glukagons im Nierenhomogenat
- Inkubation des Glukagons mit GF-NHO-BZ im Nierenhomogenat
- Inkubation des Glukagons mit einem Inhibitorcocktail (Isoleucyl-Thiazolidin, EDTA, GF-NHO-Bz).

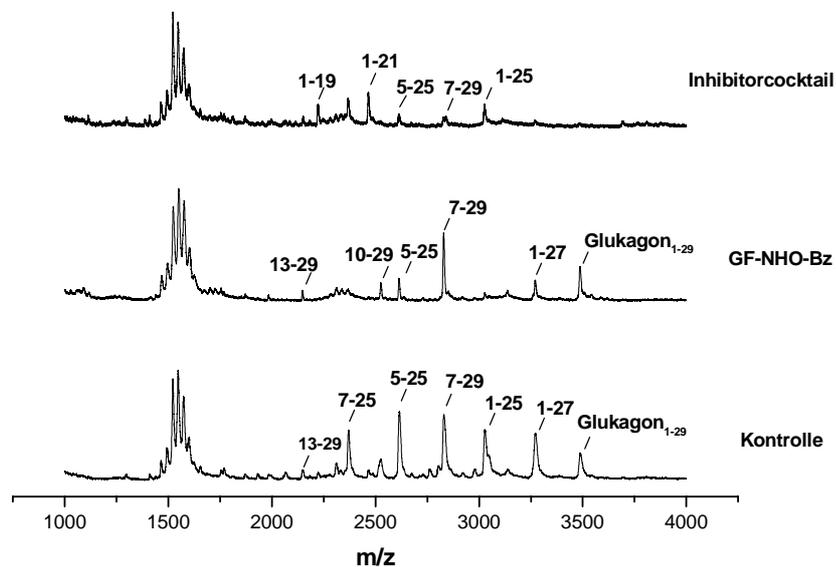


Abbildung 16: Massenspektren von Glukagon, das in Nierenhomogenaten unter verschiedenen Inhibitorzusätzen inkubiert wurde

Weder der Zusatz der einzelnen Inhibitoren noch die Verwendung eines Cocktails aus den vorgestellten Verbindungen konnten den Abbau des Glukagons in Nierenhomogenaten unterdrücken (vgl. Abbildung 16). Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte kein initialer Abbauschritt des Glukagons beobachtet werden, der auf die enzymatische Aktivität von DP IV oder DP I zurückführbar wäre.

3.2.2 Glukagon-Analoga

N-terminal stabilisierte Glukagon-Analoga könnten eingesetzt werden, um hypoglykämische Zustände, wie sie oft bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II auftreten, zu behandeln. Aminoterminal modifizierte Glukagon-Analoga wurden auf ihre Substrateigenschaften gegenüber DP IV untersucht. Um den N-Terminus zu stabilisieren, wurden die Aminosäuren in P₁- bzw. P₁'-Position substituiert, so daß kein oder nur ein sehr langsamer Abbau durch DP IV möglich sein sollte. Die Stabilität der Verbindungen gegen einen proteolytischen Angriff durch die DP IV wurde durch den bereits beschriebenen *in vitro* Inkubationsansatz getestet. Die in definierten Zeitabständen entnommenen Proben wurden mittels MALDI-TOF MS analysiert. Es wurden die Halbwertszeiten des Peptidabbaus sowohl durch DP IV_{Schwein} als auch durch die DP IV-Aktivität des humanen Serums bestimmt (vgl. Tabelle 4, S. 60).

Wie aufgrund der Kenntnisse über die Substratspezifität zu erwarten war, ist [D-Ser²]-Glukagon durch DP IV nicht angreifbar. Dagegen konnte im Serum ein sehr schneller Abbau des Peptides verzeichnet werden, der nicht durch DP IV-katalysierte Proteolyse erklärbar war. Bereits nach 60 min war nur noch [D-Ser²]-Glukagon₁₋₁₇ detektierbar.

Aus der Einführung einer negativen Ladung in P₁-Position durch Phosphorylierung des Serins² zu [(P)Ser²]-Glukagon resultierte ebenfalls eine vollständige Stabilisierung der Verbindung gegen DP IV_{Schwein}. Bei Inkubation mit Serum wurde eine Dephosphorylierung am (P)Ser² und im Anschluß daran die Abspaltung des N-terminalen Dipeptides beobachtet.

Substitution des Serins² durch Glycin verlangsamte die Proteolysegeschwindigkeit durch DP IV_{Schwein}. Die Abbaugeschwindigkeit im Serum wurde durch diesen Aminosäureaustausch nicht signifikant verringert.

[D-Gln³]-Glukagon wurde unerwartet (Demuth and Heins, 1995; Bongers *et al.*, 1992) durch gereinigte DP IV_{Schwein} als Substrat akzeptiert. Im Serum dagegen stabilisiert dieser Austausch das Peptid über 24 Stunden. Lediglich ein geringer Umsatz zu [D-Gln³]-Glukagon₃₋₂₉ und Glukagon₅₋₂₉ war nach 24 Stunden nachweisbar.

Um die Auswirkungen der Modifikationen in der Aminosäuresequenz auf die Bindungseigenschaften an das Enzym zu untersuchen, wurden Protein-Peptid-Interaktionsstudien durchgeführt. Hieraus können Aussagen über Bindungskapazität und die Affinität des Liganden abgeleitet werden. Die Affinität der Glukagon-Analoga zur DP IV verglichen mit nativem Glukagon wurde mit Hilfe der *Surface plasmon resonance*-(SPR)-Technik bestimmt (vgl. S. 34).

Abbildung 17 zeigt ein typisches Sensogramm der Bindung eines Polypeptides an immobilisierte DP IV. Mittels des BIAevaluation-(3.0)-Programms wurden die Konzentrationen für den

ungebundenen (freien) und gebundenen Analyten im Gleichgewicht berechnet. Der Quotient aus der Konzentration des gebundenen durch die Konzentration des freien Analyten wurde als Funktion der Konzentration des freien Analyten im Scatchard-Plot aufgetragen (vgl. Abbildung 17A).

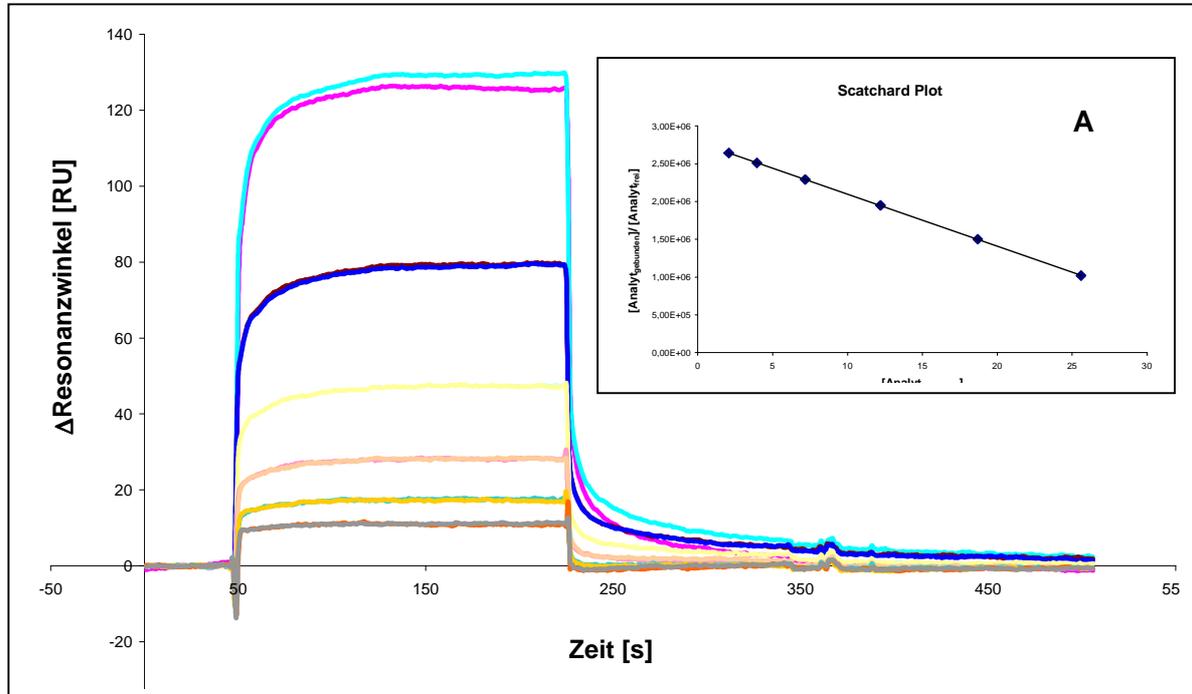


Abbildung 17: Zeitabhängigkeit der Änderung des Resonanzwinkels auf einem mit DP IV_{Schwein} beladenen CM5-Chip bei verschiedenen Konzentrationen des Analyten ([Gly²]-Glukagon)
A) Auftragung der berechneten Analytenkonzentrationen im Scatchard-Plot

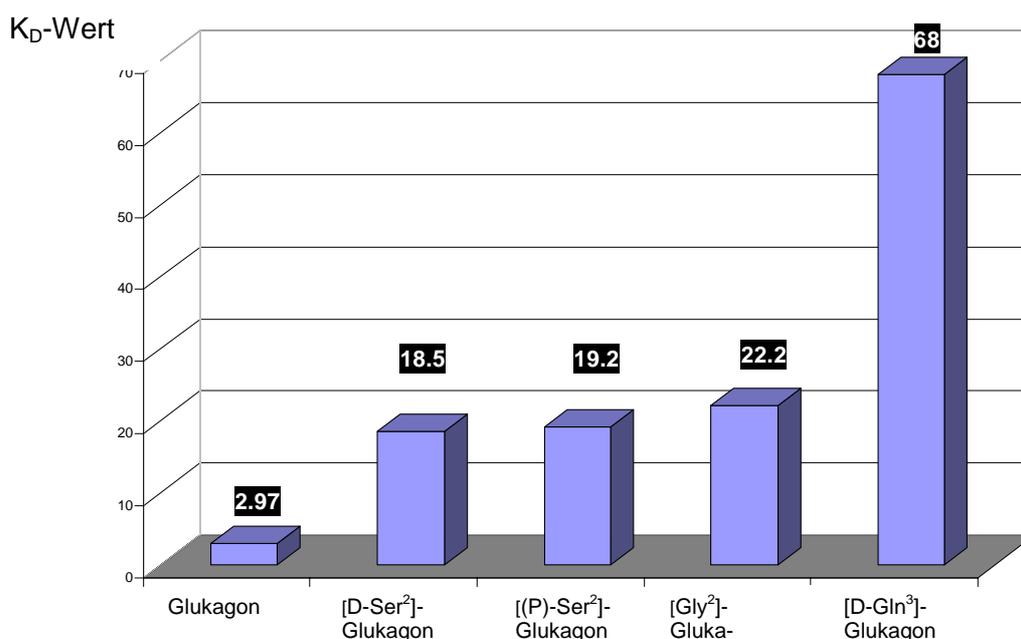
Hohe Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten des Glukagons und seiner Analoga an die DP IV kennzeichnen diese Bindungskinetik. Innerhalb weniger Sekunden stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Analyt (Glukagon bzw. Glukagon-Analoga) und Ligand (immobilisierte DP IV_{Schwein}) ein. Die Dissoziation des Analyten erfolgt, wie aus

Abbildung 17 gut ersichtlich, ebenfalls innerhalb weniger Sekunden. Vergleicht man nun die Bindungskonstanten mit den Halbwertszeiten des DP IV-katalysierten Abbaus der einzelnen Verbindungen, so besteht ein direkter Zusammenhang zwischen niedrigen K_D -Werten und kleinen Halbwertszeiten des enzymkatalysierten Abbaus (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Halbwertszeit des DP IV-katalysierten Abbaus von Glukagon und -Analoga

Substanz	MW [Da]		Halbwertszeit $t_{1/2}$ [min]		Bindungskonstante K_D [μM]
	berechnetes	bestimmtes	DP IV _{Schwein}	Serum	
Glukagon	3482,8	3482,9	$18,8 \pm 0,5$	$336,0 \pm 36$	$2,97 \pm 0,01$
[D-Ser ²]-Glukagon	3482,8	3485,2	stabil	$46,7 \pm 4,0$	$18,50 \pm 0,1$
[(P)Ser ²]-Glukagon	3562,8	3564,1	stabil	$584,1 \pm 72$	$19,20 \pm 0,2$
[Gly ²]-Glukagon	3451,8	3452,0	$27,7 \pm 2,1$	$355,0 \pm 37$	$22,20 \pm 0,1$
[D-Gln ³]-Glukagon	3482,8	3483,9	$118,0 \pm 8,2$	$801,0 \pm 79$	$68,00 \pm 4,8$

Der K_D -Wert für Glukagon liegt im μM -Bereich und stimmt sehr gut mit dem durch kapillarelektrophoretische Messungen bestimmten K_m -Wert überein (vgl. Tabelle 3, S. 53). Unabhängig von der Konfiguration oder der Ladung der Aminosäure in P_1 -Position verschlechtert sich der Wert der Bindungskonstante, wenn das native Serin in P_1 -Position ersetzt wird. Einen noch stärkeren Einfluß auf die Affinität zum Enzym hat die Konfiguration der Aminosäure in P_1' -Position. Liegt diese in D-Konfiguration vor, so reduziert sich die Affinität um das 23fache. Abbildung 18 veranschaulicht den Einfluß der Modifikationen der Aminosäurereste in P_1 - bzw. P_1' -Position auf die Bindung der Peptide an immobilisierte DP IV.

**Abbildung 18: Vergleich der Bindungskonstanten von Glukagon und -Analoga an immobilisierte DP IV_{Schwein}**

3.3 *Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) und GIP-Analoga*

Y**A**E**G**T**F**I**S**D**Y**¹⁰ S**I**A**M**D**K**I**H**Q**Q**²⁰ D**F**V**N**W**L**L**A**Q**K**³⁰ G**K**K**N**D**W**K**H**N**I**⁴⁰ T**Q**

Modifikationen des N-Terminus können das Hormon vor proteolytischem Angriff schützen aber auch gleichzeitig seine Rezeptorbindungseigenschaften verändern. Es wurde eine Serie von GIP-Analoga verschiedener Kettenlänge synthetisiert und zunächst in ihren Substrat- und Bindungseigenschaften gegenüber DP IV untersucht.

Die Halbwertszeiten des Abbaus von GIP und GIP-Analoga durch gereinigte DP IV_{Schwein} wurden mittels MALDI-TOF MS bestimmt (vgl. Tabelle 5). Es wurde ein Inkubationsansatz aus Peptid und Enzym genutzt, dem in definierten Zeitabständen Proben entnommen und diese dann massenspektrometrisch analysiert wurden (vgl. S. 33).

Es konnten keine Unterschiede in der Halbwertszeit des Abbaus von GIP₁₋₄₂ und GIP₁₋₃₀ festgestellt werden. Bindungsexperimente an rekombinanten GIP-Rezeptoren ergaben (S. Hinke, persönliche Mitteilung), daß beide Peptide über vergleichbare Rezeptoraffinitäten verfügen und ein ähnliches cAMP-Stimulierungspotential aufweisen. Basierend auf der Theorie, daß für die Bindung des GIP an seinen Rezeptor und die Stimulierung des Rezeptors zwei Bindungsstellen notwendig sind, wurden für die Modifikationsanalyse GIP₁₋₃₀ und GIP₁₋₆ als Modellpeptide zugrunde gelegt.

Das um das N-terminale Dipeptid Tyr-Ala verkürzte Fragment GIP₃₋₄₂ ist ebenfalls ein potentielles Substrat der DP IV. Im Inkubationsexperiment war es jedoch über 24 Stunden stabil gegen enzymkatalysierte Hydrolyse.

Der Einbau von Serin, Glycin und Valin in aminoterminal vorletzter Position der Peptidkette führt zu verlängerten Halbwertszeiten, also zu einer Stabilisierung des GIP, verhindert jedoch nicht dessen Abbau.

Die Einführung von Pro³ in P_{1'}-Position unterdrückte erwartungsgemäß den proteolytischen Abbau durch DP IV. Ebenso ergab die Substitution der Aminosäuren in P₁- oder P_{1'}-Position durch D-Ala² bzw. NMeGlu³ DP IV-resistente GIP-Analoga. Die Reduzierung der Peptidbindung zu TyrAlaψ(CH₂NH)GIP₃₋₃₀ verhinderte ebenfalls die N-terminale Hydrolyse durch DP IV. Der Einbau der D-Aminosäure in P_{1'}-Position (Glu³→D-Glu³) reduzierte die Hydrolysegeschwindigkeit (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Halbwertszeiten des DP IV katalysierten Abbaus von GIP, GIP-Fragmenten und GIP-Analoga bestimmt mittels MALDI-TOF MS

Substanz	N-terminale Sequenz	MW [Da]		Halbwertszeit $t_{1/2}$ [min]
		berechnetes	bestimmtes	
GIP _{1-42a}	YAEG....	4983,64	4983,9	2,56 ± 0,12
GIP _{1-30a}	YAEG.....	3552,02	3553,3	2,68 ± 0,16
GIP _{3-42a}	EG...	4749,38	4751,4	stabil ⁵
[D-Ala ²]-GIP _{1-30a}	Y-[D-A]-EG	3552,02	3553,8	stabil
[N-MeGlu ³]-GIP _{1-30a}	YA-[Me-E]-G....	3565,07	3566,1	stabil
[D-Glu ³ -GIP] _{1-30 OH}	YA-[D-Glu]-G....	3551,07	3553,0	40,32 ± 4,8
[Pro ³]-GIP _{1-30 OH}	YAPG....	3519,07	3522,9	stabil
[Ser ²]-GIP _{1-30a}	YSEG....	3567,07	3568,0	137,11 ± 12,3
[Val ² -GIP] _{1-30a}	YAEG....	3579,12	3580,7	298,34 ± 92,2
[Gly ² -GIP] _{1-30a}	YGEG....	3537,04	3539,1	150,01 ± 27,3
[YAψ(CH ₂ NH)]-GIP _{3-30a}	YA ψ(CH ₂ NH)EG..	3537,07	3539,0	stabil
GIP _{1-6a}	YAEG....	685,74	686,9	< 7,50
[D-Ala ²]-GIP _{1-6a}	Y-[D-A]-EG..	685,74	686,7	stabil
[Gly ²]-GIP _{1-6a}	YGEG....	671,71	672,0	stabil
[Ser ²]-GIP _{1-6a}	YSEG....	701,74	702,0	79,03 ± 12,2
[Pro ² -GIP] _{1-6a}	YPEG....	711,78	712,7	< 7,50
[Val ² -GIP] _{1-6a}	YVEG....	713,79	715,2	stabil
[Pro ³ -GIP] _{1-6a}	TAPG..	653,78	655,0	stabil
GIP _{1-14OH}	YAEG..	1567,75	1567,3	6,21 ± 1,1
GIP _{1-13OH}	YAEG....	1435,57	1435,6	11,54 ± 2,5
GIP _{1-15OH}	YAEG....	1681,85	1682,6	35,02 ± 5,2
GIP _{7-30a}	ISDY....	2882,31	2886,9	130,11 ± 10,6

Inwieweit Kettenlänge und damit die Ausprägung von Sekundärstrukturen Einfluß auf die Hydrolyse von Nicht-Prolin-Substraten hat, wurde an verschiedenen GIP-Fragmenten untersucht.

⁵ Nach 24h waren nur 13% GIP₃₋₄₂ zu GIP₅₋₄₂ abgebaut. Daher kann die Verbindung als stabil betrachtet werden.

[Ser²]-GIP₁₋₆ wurde verglichen mit [Ser²]-GIP₁₋₃₀ schneller abgebaut. [Gly²]-GIP₁₋₆ und [Val²]-GIP₁₋₆ waren im Gegensatz zu den entsprechenden GIP₁₋₃₀-Analoga über die gesamte Versuchsdauer stabil gegen DP IV-katalysierte Proteolyse (vgl. Tabelle 5 und Abbildung 19).

Ein ebenfalls unerwartetes Ergebnis erbrachte die Bestimmung der Halbwertszeiten für die C-terminal verkürzten Fragmente GIP₁₋₁₃, GIP₁₋₁₄ und GIP₁₋₁₅. Es war anzunehmen, daß die Halbwertszeit mit zunehmender Länge der Peptidkette steigt. Tatsächlich wurde nicht GIP₁₋₁₃ sondern GIP₁₋₁₄ am schnellsten ($t_{1/2} = 6,2$ min, vgl. Tabelle 5) um das N-terminale Dipeptid verkürzt. Ursache hierfür könnte die Ausbildung von Sekundärstrukturen sein, die im Falle des GIP₁₋₁₄ eine schnellere Katalyse erlauben. Abbildung 19 veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der N-terminalen Hydrolyse von [Val²]-GIP₁₋₃₀ und [Val²]-GIP₁₋₆ bzw. [Ser²]-GIP₁₋₃₀ und [Ser²]-GIP₁₋₆.

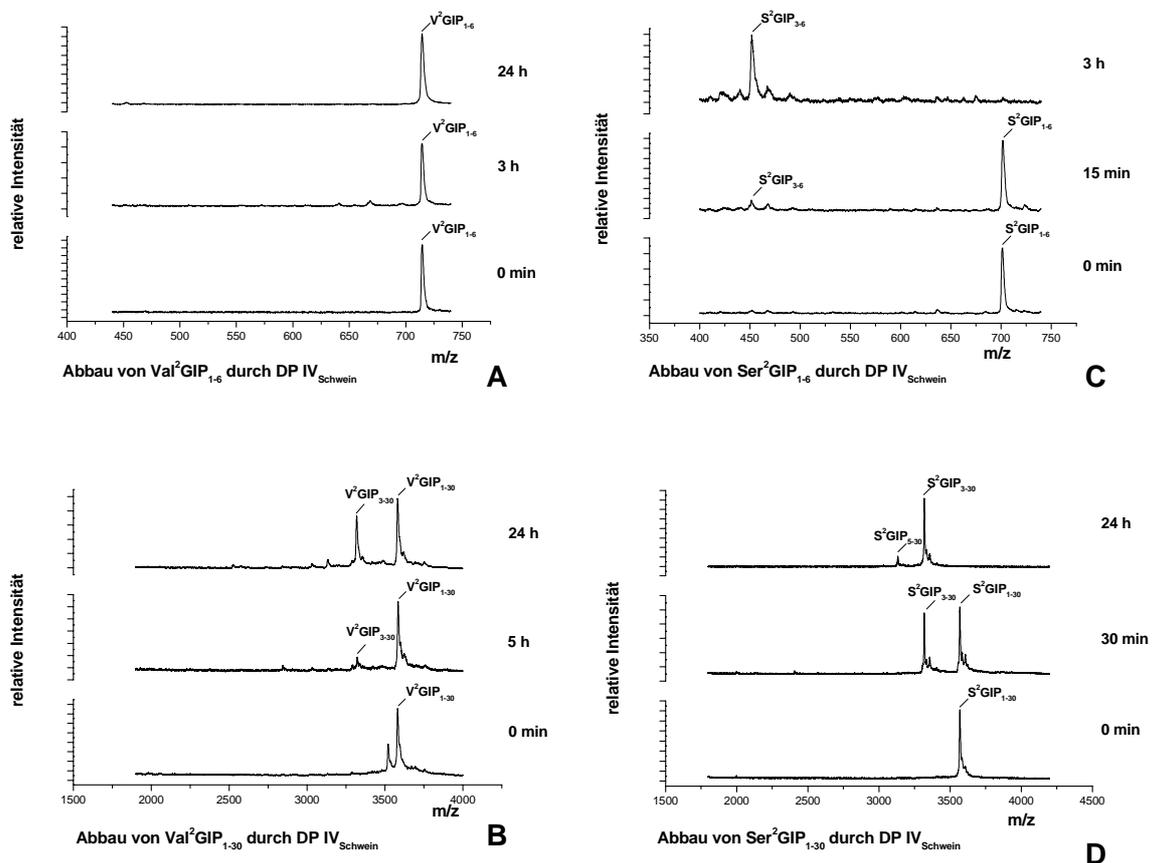


Abbildung 19: Massenspektren von A) [Val²]-GIP₁₋₆, B) [Val²]-GIP₁₋₃₀, C) [Ser²]-GIP₁₋₆ und D) [Ser²]-GIP₁₋₃₀, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit DP IV_{Schwein} bzw. humanem Serum in 40mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C

Zusätzlich zu der Untersuchung der Substrateigenschaften wurden die Bindungseigenschaften ausgewählter Peptide an immobilisierte DP IV mittels biomolekularer Interaktionsanalyse (SPR-Technik) untersucht. Da [Ser²]-GIP₁₋₆ DP IV-katalysiert gespalten wird, während [Gly²]-GIP₁₋₆ und [Val²]-GIP₁₋₆ keine Substrate der DP IV sind, sollten insbesondere die Eigenschaften der Hexapeptide [Ser²]-GIP₁₋₆, [Gly²]-GIP₁₋₆, [Val²]-GIP₁₋₆ analysiert werden. Für die Bindungsstudien wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie für die Studien mit Glukagon und seinen Analoga gewählt (vgl. S. 34 ff.).

Tabelle 6: Vergleich der Halbwertszeiten des Abbaus von GIP, GIP-Analoga und -Fragmenten mit deren Bindungskonstanten an immobilisierte DP IV

GIP/ GIP-Fragmente/ GIP-Analoga	Halbwertszeit der DP IV- katalysierten Hydrolyse t _{1/2} [min]	DP IV-Bindung	
		K _D [μM]	χ ²
GIP ₁₋₄₂	2,56 ± 0,12	1,74	0,10
GIP ₃₋₄₂	stabil	3,15	0,33
[D-Glu ³]-GIP ₁₋₃₀	40,33 ± 4,8	5,13	0,15
GIP ₁₋₃₀	2,68 ± 0,16	9,51	1,15
YAψ(CH ₂ NH)-GIP ₃₋₃₀	stabil	9,63	0,83
[Ser ²]-GIP ₁₋₃₀	137,14 ± 12,3	9,89	1,90
[Gly ²]-GIP ₁₋₃₀	150,02 ± 27,3	19,61	1,96
[Val ²]-GIP ₁₋₃₀	298,04 ± 92,2	35,22	1,70
[D-Ala ²]-GIP ₁₋₃₀	stabil	44,51	0,75
[Ser ²]-GIP ₁₋₆	79,04 ± 12,1	-	-
[Gly ²]-GIP ₁₋₆	stabil	-	-
[Val ₂]-GIP ₁₋₆	stabil	-	-

Tabelle 6 faßt die Ergebnisse der Enzym/Peptid-Interaktionsstudien zusammen. Den niedrigsten K_D-Wert, also die höchste Affinität zu DP IV haben GIP₁₋₄₂ und das N-terminal verkürzte Fragment GIP₃₋₄₂. Die Reduzierung der zu spaltenden Peptidbindung zu YAψ(CH₂NH)-GIP₃₋₃₀ hat keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des Peptides. Es wird vom Enzym als Bindungspartner erkannt, jedoch nicht mehr katalytisch umgesetzt. Auch Serin an zweiter N-terminaler Position ändert die Affinität zu DP IV nicht. Der Einbau von Glycin oder Valin an dieser Position erhöht den K_D-Wert. Für alle drei Hexapeptid-Analoga des GIP konnte keine Bindungskonstante ermittelt werden. Möglicherweise lag,

bedingt durch das geringe Molekulargewicht dieser Verbindungen, die Detektion der Interaktion an der Nachweisgrenze.

Aus den Ergebnissen der biomolekularen Interaktionsstudien für die GIP-Analoga leitet sich bezogen auf den K_D -Wert nachfolgende Ordnung für die Aminosäure in P_1 -Position ab:

Ala < Ser < Gly < Val

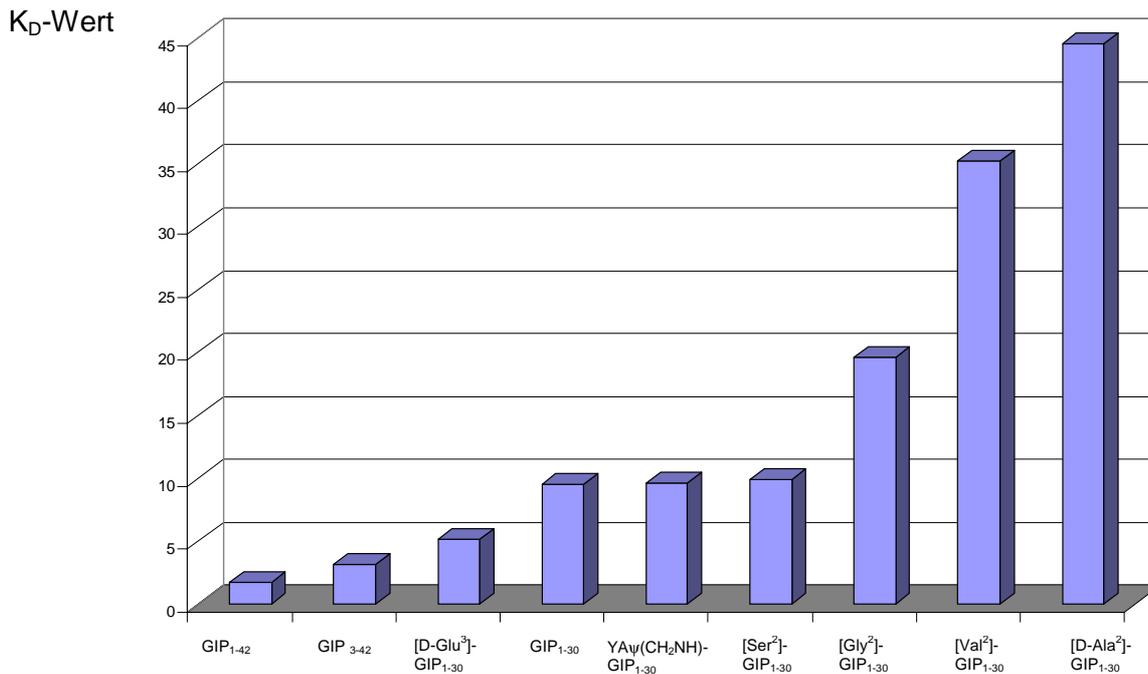


Abbildung 20: Vergleich der Bindungskonstanten von GIP, GIP-Fragmenten und GIP-Analoga an immobilisierte DP IV_{Schwein}

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Substitution der Aminosäuren in P_1 - bzw. P_1' -Position zu einer verzögerten DP IV-katalysierten Hydrolyse der Analoga führen oder vom Enzym nicht mehr als Substrate akzeptiert werden. Im Gegensatz zu Glukagon, das mit Einführung einer D-Aminosäure in P_1' -Position signifikant schlechtere Bindungseigenschaften gegenüber DP IV aufweist, scheint für die Bindung des GIP an DP IV die Aminosäure in P_1 -Position eine wichtigere Rolle zu spielen.

3.4 Untersuchungen zur Substratspezifität der POP

Zur biologischen Funktion der POP gibt es bislang keine gesicherten Erkenntnisse. Viele Neuropeptide und Peptidhormone wie z.B. *Thyrotropin-releasing hormone* (TRH), Neuropeptid Y (NP Y) und Substanz P haben an für die Regulation ihrer Aktivität wichtigen Stellen Prolin in ihrer Sequenz. Aufgrund ihrer Spezifität sollte die Prolyl oligopeptidase an der Reifung und dem Abbau solcher biologisch aktiver Peptidhormone oder Neuropeptide via limitierte Proteolyse beteiligt sein (Mentlein, 1988; Yaron and Naider, 1993). Seit längerem wird eine Funktion der POP im Lern- und Gedächtnisprozeß (Shishido *et al.*, 1998) bzw. sehr kontrovers eine Beteiligung der Prolyl oligopeptidase an der Generierung der die Alzheimer'sche Krankheit charakterisierenden senilen Plaques aus dem *Amyloid precursor protein* (APP) diskutiert (vgl. S. 23) (Kato *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1996; Shinoda *et al.*, 1997; Toide *et al.*, 1997).

Eine POP-katalysierte post-Alaninspaltung zwischen Ala⁴² und Thr⁴³ in der APP Sequenz könnte zur Bildung des β A₄₁₋₄₂ Peptides führen. Aus der Literatur ist nicht bekannt, daß POP Valin, Serin oder Threonin in P₁-Position akzeptiert (Nomura, 1986). Das heißt, daß die POP entweder eine breitere Substratspezifität aufweisen muß oder die Bildung der β A₄-Peptide einem anderen Mechanismus, z.B. der konzertierten Wirkung verschiedener Proteasen, unterliegt. Wie bereits gezeigt (vgl. S. 39 ff.), ist DP IV in der Lage, neben Prolin und Alanin in P₁-Position auch andere Aminosäuren zu akzeptieren. Da sich beide Enzyme hinsichtlich ihres Katalysemechanismus ähnlich verhalten (Demuth and Heins, 1995), sollte geprüft werden, ob die POP ebenfalls andere Aminosäuren in P₁-Position erkennt und somit als potentielle γ -Sekretase diskutiert werden kann.

3.4.1 Einfluß der P₁-Aminosäure auf die Substrathydrolyse

3.4.1.1 Niedermolekulare Substrate

Anhand von niedermolekularen Modellpeptiden wurde die Kinetik der Proteolyse von Substraten untersucht, die kein Prolin in P₁-Position haben. Zur Verfügung standen sowohl rekombinant in *E. coli* exprimierte POP aus *Flavobacterium meningosepticum* (POP_{Flavo}) und am Beginn der Experimente aus Schweineniere gereinigte POP (POP_{Schwein}). Das ebenfalls rekombinant in *E. coli* exprimierte humane Enzym war erst später verfügbar, so daß ein Teil der qualitativen Untersuchungen nicht mit dem humanen Enzym durchgeführt werden konnte. Die Sequenzhomologie zwischen der eukaryotischen und der prokaryotischen POP be-

trägt 30% und im Bereich der katalytischen Domäne ca. 60%. In einem fluoreszenzspektrometrischen Aktivitätstest wurden die kinetischen Konstanten der Hydrolyse verschiedener Modellsubstrate bestimmt, die in P₁-Position kein Prolin aufweisen und mit den kinetischen Konstanten der Hydrolyse eines Prolin-Substrates verglichen. Die Abhängigkeit der enzymkatalysierten Hydrolysegeschwindigkeit von der Substratkonzentration zeigt hyperbolen Charakter (Michalis-Menten-Kinetik).

Die kinetischen Messungen wurden bei 5 verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt. Die Konstanten der enzymatisch katalysierten Reaktion wurden mittels nichtlinearer Regression errechnet (vgl. S. 31).

Tabelle 7: Kinetische Konstanten der POP-katalysierten Substrathydrolyse (POP aus *Flavobacterium meningosepticum*, rekombinant exprimiert in *E. coli*)

Substrat	K _m [M]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [M ⁻¹ s ⁻¹]
Z-Gly-Pro-AMC	1,48*10 ⁻⁵ ± 1,40*10 ⁻⁶	64,76	4,38*10 ⁶
Z-Gly-Ala-AMC	3,44*10 ⁻⁵ ± 5,86*10 ⁻⁶	8,94	2,60*10 ⁵
Z-Gly-Ser-AMC	3,04*10 ⁻⁵ ± 5,97*10 ⁻⁶	0,313	1,03*10 ⁴
Z-Gly-Thr-AMC	5,97*10 ⁻⁵ ± 5,25*10 ⁻⁶	0,0131	2,19*10 ²

Tabelle 8: Kinetische Konstanten der POP-katalysierten Substrathydrolyse (humane POP, rekombinant exprimiert in *E. coli*)

Substrat	K _m [M]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [M ⁻¹ s ⁻¹]
Z-Gly-Pro-AMC	8,69*10 ⁻⁶ ± 5,60*10 ⁻⁷	4,046	5,06*10 ⁵
Z-Gly-Ala-AMC	1,52*10 ⁻⁵ ± 2,30*10 ⁻⁶	0,761	5,01*10 ⁴
Z-Gly-Ser-AMC	2,86*10 ⁻⁵ ± 1,83*10 ⁻⁶	0,261	9,16*10 ³
Z-Gly-Thr-AMC	1,70*10 ⁻⁵ ± 2,61*10 ⁻⁶	0,115	6,76*10 ³

Aus den Tabellen 7 und 8 geht hervor, daß der K_m-Wert des Substrates weitgehend unabhängig von der Aminosäure in P₁-Position ist. Die K_m-Werte liegen sowohl für das bakterielle als auch für das humane Enzym unabhängig von der Aminosäure in P₁-Position in der gleichen Größenordnung und differieren nur wenig. k_{cat}/K_m, ein Maß für die katalytische Effizienz eines Enzyms, zeigt jedoch anschaulich, daß der Umsatz für das Prolin-Substrat am effek-

tivsten erfolgte. Die Hydrolyse des Serin bzw. Threonin enthaltenden Substrates durch die humane POP erfolgt mit fast gleicher katalytischer Effizienz, während für den Umsatz des Threonin-Substrates durch bakterielle POP wesentlich höhere Proteinkonzentrationen eingesetzt werden müssen. Dies äußert sich in den Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung sehr deutlich. Der k_{cat}/K_m -Wert für Z-GT-AMC liegt zwei Größenordnungen unter dem k_{cat}/K_m -Wert von Z-GS-AMC.

3.4.1.2 Biologisch aktive Polypeptide

Das adrenocorticotrope Hormon (ACTH, Corticotropin) ist ein Neuropeptid, das im Hypophysenvorderlappen durch limitierte Proteolyse aus dem Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC) freigesetzt und in die Blutzirkulation abgegeben wird (Bertagna, 1994). ACTH stimuliert in der Nebennierenrinde die Sekretion von Glucocorticoiden. *Corticotropin-like intermediate lobe peptide* (CLIP, ACTH₁₈₋₃₉) ist ein Teilpeptid des ACTH das u.a. in die Regulation des „Rapid eye movement“- (REM)-Schlafes involviert ist. Wetzel konnte 1994 erstmals zeigen, daß intracerebroventrikuläre Applikation N-terminaler CLIP-Fragmente eine signifikante Verlängerung der REM-Schlaf-Episoden zur Folge hatte (Wetzel *et al.*, 1994; Wetzel *et al.*, 1997). Besonders effektiv wirkte das Pentapeptid ACTH₂₀₋₂₄. Es kann aus CLIP, das der ACTH-Teilsequenz ACTH₁₈₋₃₉ entspricht, durch die Aktivität der beiden prolinspezifischen Peptidasen POP und DP IV freigesetzt werden.

APVKVYPNVA¹⁰ EDESAEAFPL²⁰ EF – CLIP-Sequenz

Die potentiellen Spaltstellen für DP IV (Pro²) und POP (Pro⁷, Ala¹⁰, Ala¹⁵, Ala¹⁷, Pro¹⁹) wurden hervorgehoben.

Zunächst wurde quantitativ untersucht, ob CLIP und ein die Spaltstelle der γ -Sekretase überspannendes Fragment des β A4-Peptides durch POP hydrolysiert werden können. Die Peptide wurden mit POP_{Flavo} und POP_{Schwein} inkubiert (zum Zeitpunkt dieser Experimente stand noch keine humane POP zur Verfügung). Den Inkubationsansätzen wurden in definierten Zeitabständen Proben entnommen und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert (vgl. S. 33). Sowohl CLIP als auch die gewählte Modellsequenz des β A4-Peptides (β A4₃₇₋₄₄) wurden POP-katalysiert gespalten. Als Hauptmetaboliten der CLIP-Proteolyse entstehen CLIP₁₋₇ (= ACTH₁₈₋₂₄), CLIP₈₋₂₂ (= ACTH₂₅₋₃₉) sowie CLIP₈₋₁₉ (= ACTH₂₅₋₃₆). Da in der Literatur

die Metaboliten überwiegend mit den ACTH-Fragmenten bezeichnet werden, soll dies nachfolgend auch hier angewandt werden.

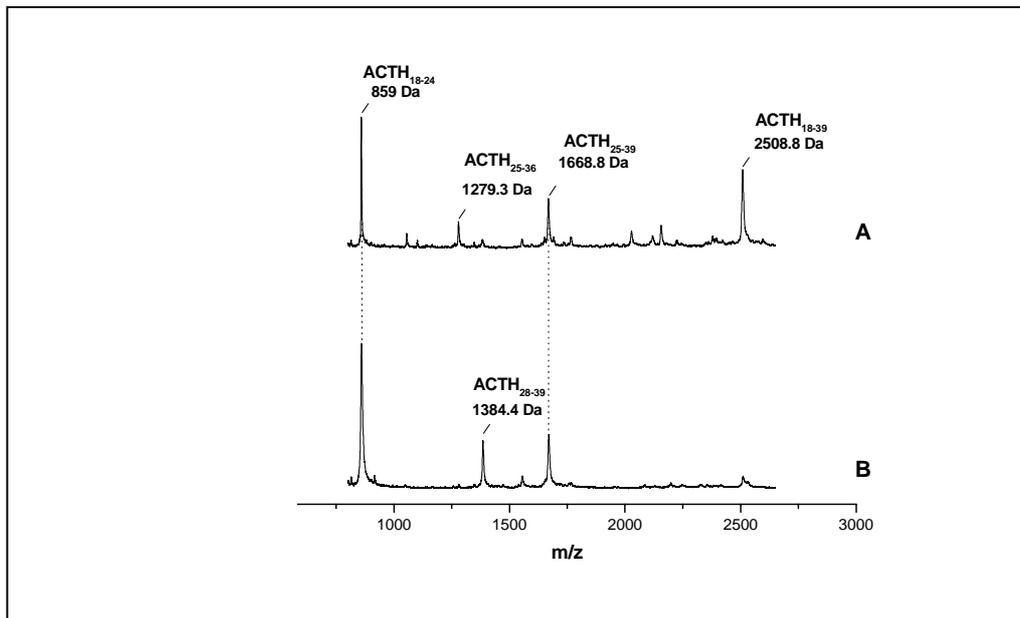


Abbildung 21: Massenspektren von CLIP (ACTH₁₈₋₃₉), aufgenommen nach 2 h Inkubation des Substrates mit POP_{Schwein} (A) und POP_{Flavo} (B) in 40 mM Tris/HCl (pH 7,6) bei 37°C

Hauptabbauprodukt der proteolytischen Spaltung des β A4₃₇₋₄₄ ist β A4₃₇₋₄₂. Proteolyse, die zur Bildung der Fragmente β A4₃₇₋₄₀ und β A4₃₇₋₄₃ führt, wurde mit POP_{Flavo} nicht beobachtet. Bei Inkubation mit POP_{Schwein} konnte nach ca. 22 Stunden in geringen Mengen β A4₃₇₋₄₃ detektiert werden (vgl. Abbildung 22).

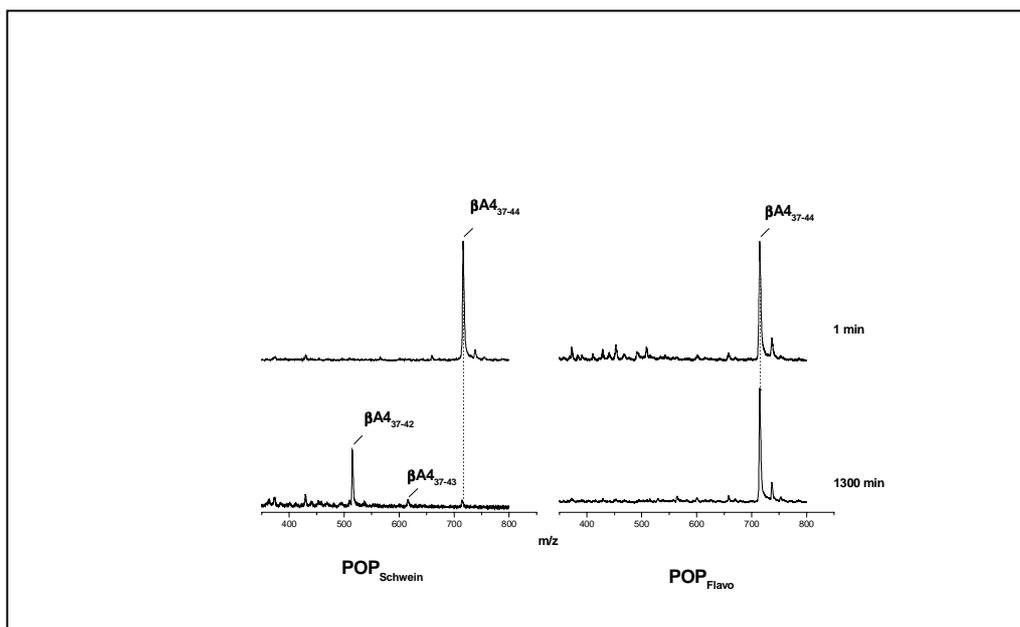


Abbildung 22: Massenspektren von β A4₃₇₋₄₄, aufgenommen während der Inkubation des Substrates mit POP_{Flavo} und POP_{Schwein} in 40mM Tris/HCl (pH 7,6) bei 37°C

3.4.2.2 Sequentielle CLIP-Hydrolyse

Wie bereits gezeigt (vgl. Tabelle 7 und Tabelle 8, S. 67), weisen eukaryotisches und prokaryotisches Enzym Unterschiede in ihrer Spezifität gegenüber Modellsubstraten auf. Um zu prüfen, ob dieses unterschiedliche Verhalten auch für die Proteolyse potentieller natürlicher Substrate zutrifft, wurde CLIP mit rekombinanter POP aus *Flavobacterium meningosepticum* und einer aus Schweineniere isolierten POP inkubiert. POP_{Flavo}- bzw. POP_{Schwein}-katalysierte Hydrolyse des Substrates führte zu unterschiedlichen Reaktionsprodukten.

Im ersten Schritt wird durch die Aktivität beider Enzyme ACTH₂₄₋₃₉ gebildet. Im zweiten Schritt greifen die Enzyme unterschiedliche Peptidbindungen an (vgl. Peptidsequenz S. 68 und Abbildung 21, S. 69). Während das Säugerenzym durch Spaltung der Bindung nach Pro³⁶ ACTH₂₅₋₃₆ generiert, greift das bakterielle Enzym die Bindung nach Ala²⁷ an und es entsteht ACTH₂₈₋₃₉.

Mit dem Ziel einer weiteren Charakterisierung der kinetischen Eigenschaften beider Enzyme wurden die Konstanten der primären Hydrolyse des CLIP (ACTH₁₈₋₃₉) durch Kapillarzonenelektrophorese (CZE) bestimmt.

Tabelle 9: Kinetische Konstanten der primären Hydrolyse des CLIP katalysiert durch POP_{Flavo} und POP_{Schwein}

Methode	Enzym	k_{cat} [s ⁻¹]	K_m [M]	k_{cat}/K_m [mM ⁻¹ s ⁻¹]
CZE	POP _{Schwein}	0,13	8,70*10 ⁻⁶	15,0
	POP _{Flavo}	54,81	1,06*10 ⁻⁵	5170,4

Vergleicht man die k_{cat}/K_m -Werte für das Enzym aus den verschiedenen Spezies, so ist klar erkennbar, daß die Hydrolyse des CLIP durch POP_{Flavo} effizienter erfolgt als durch das aus Säugergewebe isolierte Enzym. Der k_{cat}/K_m -Wert für das aus Schwein gereinigte Enzym dagegen liegt zwei Größenordnungen niedriger. Ein Vergleich der Halbwertszeiten des proteolytischen Abbaus des CLIP (es wurden für das Substrat GPP-4NA vergleichbare Aktivitäten POP_{Schwein} und POP_{Flavo} eingesetzt), ergab einen dreißigmal schnelleren Umsatz des Peptides durch das bakterielle Enzym.

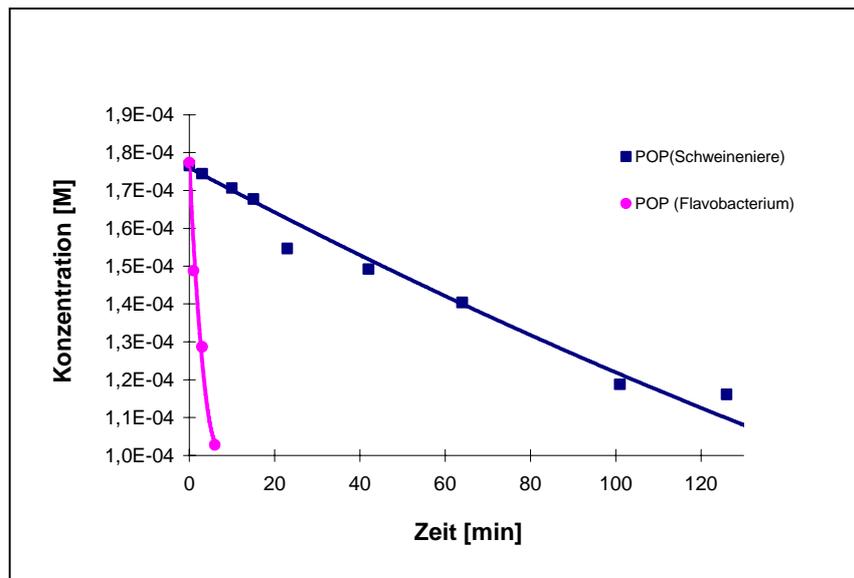


Abbildung 23: Abnahme der CLIP-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit während der Inkubation mit POP_{Flavo} bzw. POP_{Schwein}

Es konnte gezeigt werden, daß CLIP (ACTH₁₈₋₃₉) durch Prolyl oligopeptidase aus *Flavobacterium meningosepticum* und aus Schwein *in vitro* enzymatisch abgebaut wird. Dabei entstehen, abhängig von der Spezies aus der die POP gereinigt wurde, verschiedene Fragmente.

Da das Vorläuferpeptid Proopiomelanocortin, das die ACTH- und CLIP-Sequenz enthält, in der Hypophyse produziert wird, wurde geprüft, ob die Inkubation des CLIP mit Hypophysenhomogenaten aus Schwein gleiche Proteolysefragmente ergibt wie die Inkubation des Peptides mit gereinigtem Enzym.

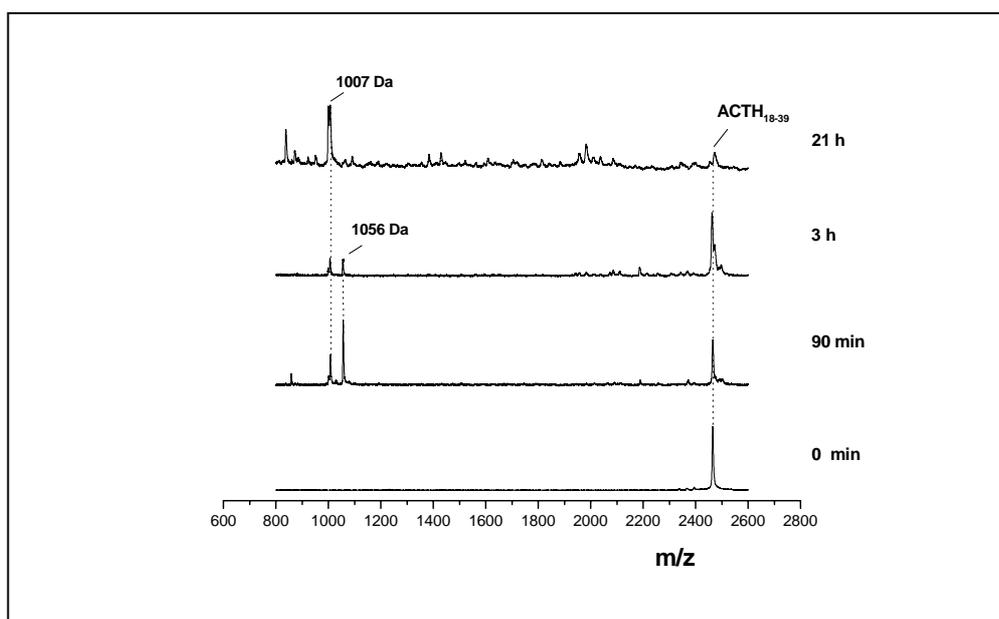


Abbildung 24: Massenspektren von CLIP, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation mit Schweinehypophysenhomogenat

Während der ersten drei Stunden der Inkubation von CLIP mit Hypophysenhomogenat aus Schwein, konnte kein proteolytischer Abbau beobachtet werden. Die Verbindungen mit den Massen 1007 Da und 1056 Da sind sofort nach Zugabe des Hypophysenhomogenates nachweisbar. Sie sind keine Abbauprodukte des CLIP. Nach 21stündiger Inkubation ist ein Abbau des CLIP zu verzeichnen. Mit dem angewandten Versuchsansatz konnte der Mechanismus dieses Abbaus jedoch nicht nachvollzogen werden. Es konnten weder durch DP IV- noch POP-Aktivität entstandene Proteolysefragmente von CLIP nachgewiesen werden.

3.4.3 Einfluß von Hymenistatin-1 und seiner Derivate auf Eigenschaften der POP

Hymenistatin-1 (HS-1) ist ein zyklisches Oktapeptid, das aus dem pazifischen Meeresschwamm *Hymeniacidon* isoliert wurde. Cebrat *et al.* (Cebrat *et al.*, 1996; Gaymes *et al.*, 1997) konnten zeigen, daß Hymenistatin-1 *in vivo* eine dem Cyclosporin A ähnliche immunsuppressive Wirkung hervorruft, wenn auch höhere Konzentrationen notwendig sind, um vergleichbare Effekte zu erzielen. Welchem Mechanismus die Supprimierung der Immunantwort durch HS-1 folgt, ist bislang nicht aufgeklärt worden. Hymenistatin-1 enthält in seiner Sequenz drei Prolinreste. Aufgrund der prolinreichen Struktur ist es denkbar, daß Hymenistatin-1 neben Immunophilinen auch mit POP interagiert.

Um den Einfluß des linearen Analogons des Hymenistatin-1 (lineares HS-1), Hymenistatin-1 (HS-1) und Rapamycin auf die katalytische Aktivität der POP zu untersuchen, wurde ein photometrischer Test genutzt. Die Strukturen der Verbindungen sind in Abbildung 25 dargestellt.

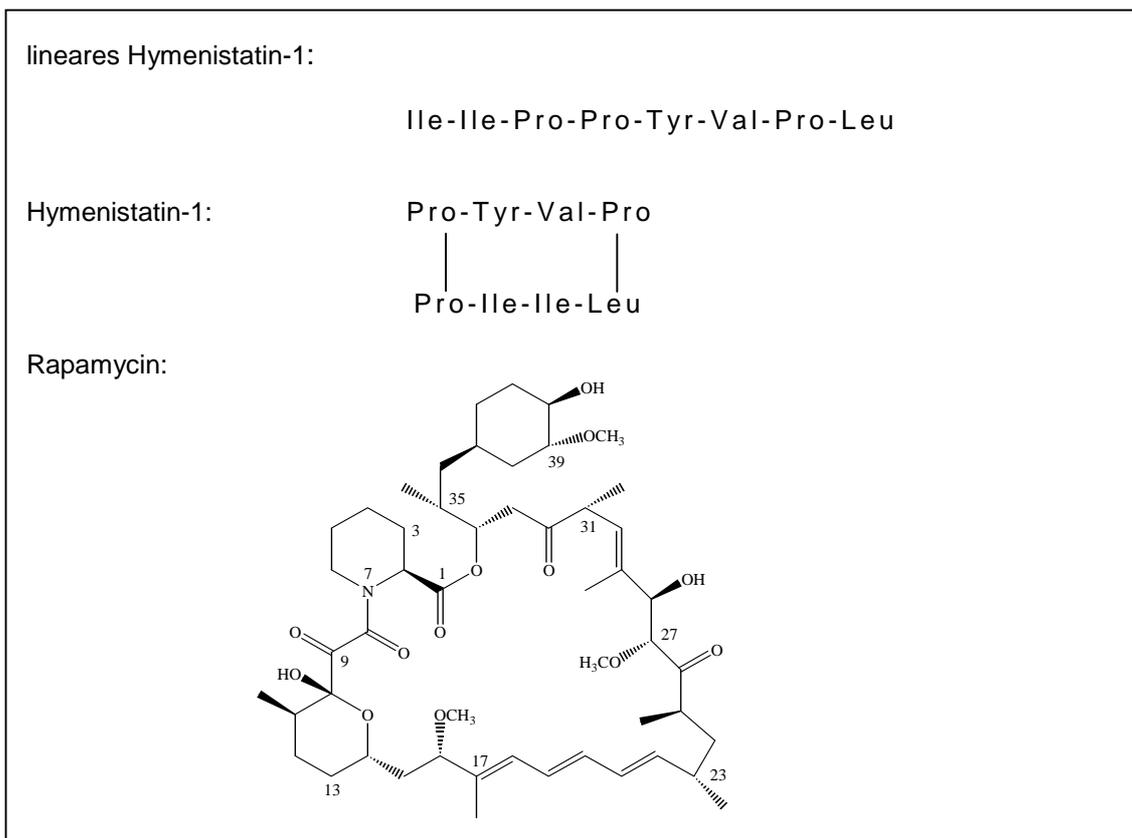


Abbildung 25: Strukturen von linearem HS-1, HS-1 und Rapamycin

Tabelle 10 faßt die ermittelten Hemmkonstanten zusammen. Im Vergleich zu Rapamycin weist die Peptidstruktur des Hymenistatins bessere inhibitorische Eigenschaften auf. Die Inhibierungskonstante K_i ist ca. zwei Größenordnungen kleiner als die des Rapamycins. Die Makrolidstruktur des Rapamycins verfügt wahrscheinlich über schlechtere Erkennungsdeterminanten für das Enzym, woraus eine schlechtere Bindung an die POP und damit ein schlechterer K_i -Wert resultieren kann. Um zu prüfen, ob die Hemmkinetik tatsächlich einem kompetitiven Mechanismus folgt, wurde eine Sekundärauftragung durchgeführt (vgl. Abbildung 26) .

Tabelle 10: Konstanten der Inhibierung der POP-katalysierten GPP-4NA Hydrolyse durch HS-1, HS-1-Analoga und Rapamycin

Substanz	K_i – Wert $\cdot 10^7$ M
Rapamycin	$202,04 \pm 39,8$
lineares Hymenistatin-1	$4,61 \pm 0,42$
lineares Hymenistatin-1 ₍₅₋₈₎	$8,63 \pm 0,57$
Hymenistatin-1	$4,71 \pm 0,40$

Die nachfolgende Abbildung zeigt als ausgewähltes Beispiel die Hemmung der POP-katalysierten Substrathydrolyse durch HS-1 in der Sekundärauftragung der Anstiege aus dem DIXON-Diagramm als Funktion der reziproken Substratkonzentration. In dieser Sekundärauftragung durchläuft die Gerade den Koordinatenursprung. Das belegt, daß die Hemmung einem kompetitiven Mechanismus folgt.

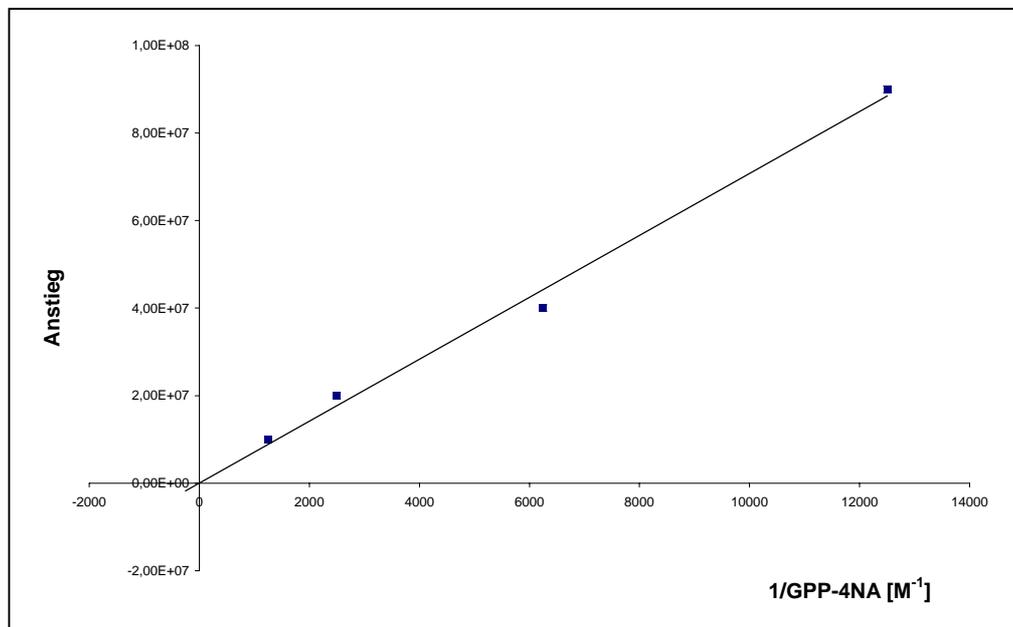


Abbildung 26: Sekundärauftragung zur Bestimmung des Hemmtyps der POP-katalysierten GPP-4NA Hydrolyse durch HS-1

Mittels biomolekularer Interaktionsstudien konnten diese Konstanten, die die Bindung des Inhibitors an sein Target im Gleichgewicht beschreiben (bisher ausgedrückt als K_i -Werte) bestätigt werden. Da die rekombinant exprimierte POP über einen Histidin-*tag* (*His-tag*) verfügt, wurde für diese Untersuchungen ein Chip gewählt, auf dessen Oberfläche eine hohe Konzentration von Nitriltriacetylsäure (NTA) immobilisiert wird. Die NTA beladene Oberfläche wird mit Nickel-Ionen gesättigt, so daß über den Versuchszeitraum eine stabile Bindung zwischen dem *His-tag* des Proteins und der Chipoberfläche gewährleistet ist. Diese Form der Immobilisierung ermöglicht eine Fixierung des Liganden ohne die Proteinfaltung zu beeinflussen. Es wurden keine Unterschiede in den Bindungskonstanten für das lineare HS-1 und HS-1 gefunden. Als Kontrolle wurde ebenfalls der K_D -Wert für die Bindung des HS-1 an Enzym ohne *His-tag* (auf einen CM5-Chip gekoppelt) bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen Immobilisierungsmethoden die Bindung des Liganden an das Enzym nicht beeinflussen.

Tabelle 11: Vergleich der Bindungskonstanten von linearem HS-1 bzw HS-1 an immobilisierte POP_{Flavo}

Substanz	K _D -Wert *10 ⁻⁷ M	χ ²
lineares Hymenistatin (His-tag -Protein)	5,68	0,87
Hymenistatin-1 (His-tag -Protein)	6,81	1,51
Hymenistatin-1 (Wildtyp-Protein)	6,53	2,07

Aufgrund der Sequenz des linearen Peptides war zu vermuten, daß sowohl lineares HS-1 als auch die davon abgeleitete Teilsequenz, lineares HS-1₅₋₈, Substrate der POP darstellen. Diese Hypothese wurde durch Inkubation von HS-1, linearem HS-1 und linearem HS-1₅₋₈ mit POP geprüft. In definierten Zeitabständen wurden dem Inkubationsansatz Proben entnommen. Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde der Reaktionsverlauf verfolgt. Beide linearen Peptide wurden als Substrate erkannt (vgl. Abbildung 27). HS-1 dagegen wurde nicht als Substrat akzeptiert und stellt somit einen echten kompetitiven Inhibitor des Enzyms dar.

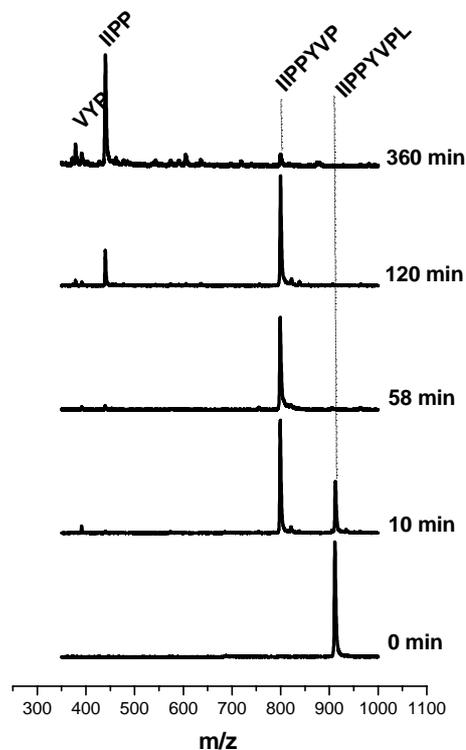


Abbildung 27: Massenspektrum von linearem HS-1, zeitabhängig aufgenommen während der Inkubation mit POP_{Flavo} in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C

Soll eine Substanz *in vivo* wirksam sein, so muß sie zunächst an ihren Wirkort, also in die Zelle transportiert werden. Eine erste Charakterisierung der Transporteigenschaften des HS-1 erfolgte durch Inkubation von HS-1 auf U343-Zellen. Diese Zell-Linie ist eine Neuroblastoma-Zell-Linie und wurde etabliert, um humane POP rekombinant exprimieren zu können. Abbildung 28 zeigt die POP_{human}-Restaktivität in den Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitorkonzentration. 50% der POP-Aktivität in U343-Zellen konnten mit 100 µM HS-1 gehemmt werden. Das heißt, HS-1 wird in die Zellen transportiert. Es sind relativ hohe Konzentrationen notwendig, um einen inhibitorischen Effekt zu erreichen.

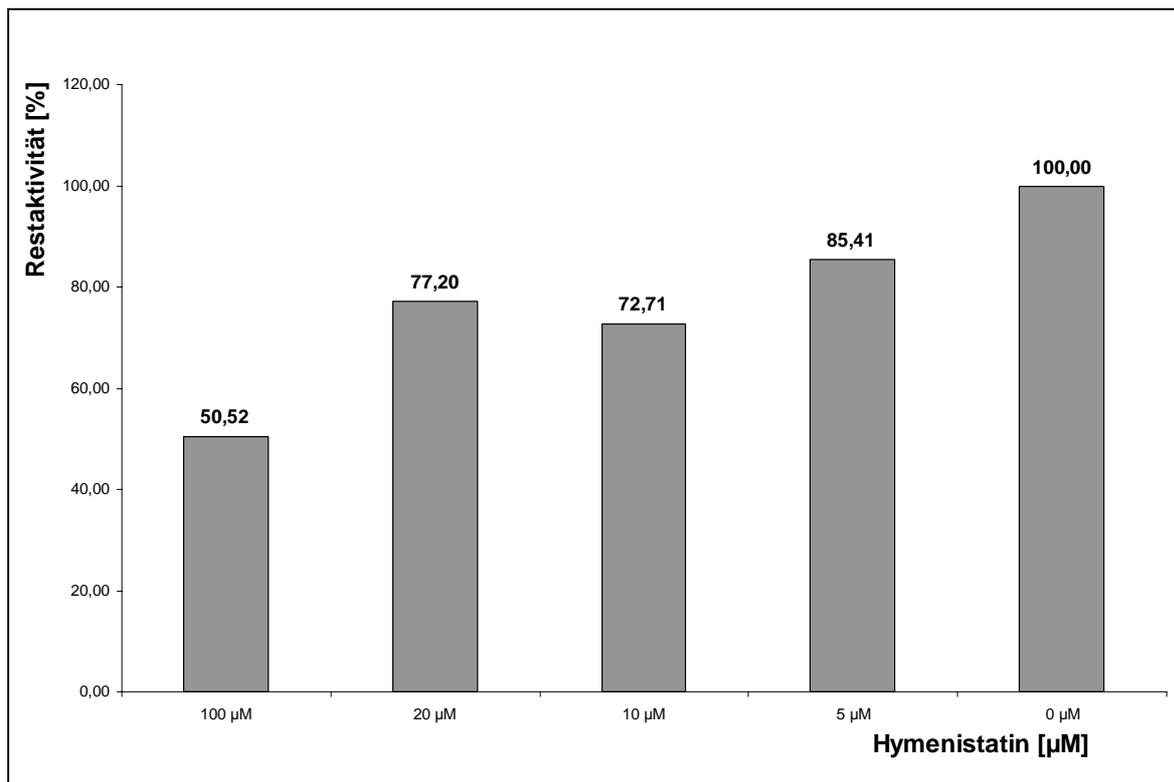


Abbildung 28: Vergleich der Restaktivitäten der POP-katalysierten Z-GP-AMC-Hydrolyse nach Inkubation von U343-Zellen mit HS-1

Um die molekularen Mechanismen der Immunsuppression durch HS-1 zu charakterisieren, wurde der Einfluß von HS-1 und linearem HS-1 auf verschiedene Signalwege in T-Zellen untersucht. Diese Experimente wurden im Arbeitskreis von Prof. S. Ansorge (Universität Magdeburg) durchgeführt.

Die Signaltransduktion spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zelldifferenzierung und Zellproliferation. Zu den Hauptsignaltransduktionswege gehört die „mitogen-aktivierte Protein-(MAP)-Kinase“-Kaskade, die eine Form der zellulären Reaktion auf Stressoren und Pathogene darstellt.

Es konnte gezeigt werden, daß HS-1 und lineares HS-1 keinen Einfluß auf den p42/44-MAP-Kinase Weg haben. HS-1 kann zu einer Aktivierung der p38MAP-Kinase führen. Dieser Effekt wird sowohl durch das Peptid allein als auch nach Stimulierung der T-Zellen durch anti-CD3 erzielt. Die anti-CD3 induzierte Aktivierung der Proteinkinase B wurde durch HS-1 und lineares HS-1 gehemmt. Um nachzuweisen, ob diese Ergebnisse ursächlich auf eine Inhibierung der POP zurückführbar sind, wurden in dem gleichen System zwei verschiedene spezifische POP Inhibitoren eingesetzt. Z-F-P-Pyrrolidid ist ein reversibler Inhibitor der POP ($K_i = 1 \cdot 10^{-6} \text{M}$). Die Hemmung der POP durch Z-F-A-CMK folgt dagegen einem irreversiblen Mechanismus ($k_{inact} = 87,6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Beide Verbindungen hatten keinen Einfluß auf die p38MAP-Kinase Aktivierung, d.h. daß dieser Transduktionsweg unabhängig von der POP durch HS-1 aktiviert wird. Die Hemmung der anti-CD3 induzierten Proteinkinase B Aktivierung konnte durch beide Inhibitoren erzielt werden. Es wurde also gezeigt, daß die POP in die Signaltransduktion über Proteinkinase B involviert ist.

4 DISKUSSION

Die Iminosäure Prolin ist ein wichtiges strukturbildendes Element von Peptiden und Proteinen. Sie hat entscheidenden Einfluß auf die Sekundär- und Tertiärstruktur dieser Moleküle. Nur wenige hochspezifische Enzyme sind der Lage, die Hydrolyse prolylhaltiger Peptidbindungen effizient zu katalysieren. Somit stellt der Einbau der Iminosäure Prolin in die Peptidkette einen Schutz vor unspezifischem enzymatischem Abbau dar. Viele biologisch aktive Peptide besitzen N-terminal an ihrer vorletzten Aminosäureposition einen Prolylrest. Die Proteolyse prolynhaltiger Peptide durch hochspezifische Enzyme kann nicht nur der Peptidmetabolisierung dienen, sondern auch zu Strukturveränderungen führen, deren Folge eine Änderung der biologischen Aktivität der Peptide ist (Yaron and Naider, 1993; DeMeester *et al.*, 1999; Mentlein, 1999).

Die proteolytischen Enzyme Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und Prolyloligopeptidase (POP) gehören zu diesen prolinspezifischen Proteasen. Eine Aufklärung ihrer biologischen Funktion ist von besonderem Interesse, da eine Vielzahl biologisch aktiver Peptide als potentielle Substrate beider Enzyme beschrieben worden sind und ihnen wichtige Funktionen in der Modulation so hochkomplexer Prozesse wie der Regulation des Glukose- und Energiehaushaltes oder der Lern- und Gedächtnisprozesse zugeschrieben werden (Schols *et al.*, 1998). (Struyf *et al.*, 1999; Mentlein, 1999)

Für DP IV wurde beschrieben, daß sie ebenfalls selektiv, aber weniger effizient die Hydrolyse solcher Peptidbindungen katalysiert, an denen in P₁-Position Serin, Glycin oder Valin beteiligt sind (Bongers *et al.*, 1992). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß diese erweiterte Substratspezifität der DP IV auch von physiologischer Relevanz (z.B. Glukagon) ist und daß die Mitglieder der GRF-Superfamilie Substrate der DP IV sind. In diesem Kontext sollen Funktion und Eigenschaften der DP IV als multifunktionelle, regulatorische Protease diskutiert werden. Unter besonderer Berücksichtigung der Beeinflußbarkeit der enzymatischen Aktivität stellt das Enzym einen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung pathologischer Zustände, wie z.B. Diabetes mellitus oder Adipositas dar.

Des weiteren werden die Ergebnisse zu kinetischen Eigenschaften der POP und deren potentielle Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen in Relation zum aktuellen Stand der Forschung gesetzt.

4.1 Erweiterte Substratspezifität der DP IV

4.1.1 Substrate mit Serin, Glycin oder Valin in P₁-Position

DP IV akzeptiert neben Prolin und Alanin auch andere Aminosäuren in P₁-Position (Bongers *et al.*, 1992). Deshalb untersuchten Mentlein *et al.*, ob diese erweiterte Substratspezifität ebenfalls auf die in humanem Serum beobachtete DP IV-ähnliche Aktivität zutrifft. Dazu wurde die Metabolisierung der Peptidhormone GLP-1, GIP, PHM und VIP in humanem Serum mittels HPLC analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß Prolin- und Alaninsubstrate (GLP-1, GIP, PHM) umgesetzt werden. Eine Hydrolyse des in P₁-Position Serin enthaltenden Peptides VIP wurde jedoch nicht beobachtet (Mentlein *et al.*, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, daß alle getesteten Peptide der GRF-Familie, also auch solche mit Serin in P₁-Position, Substrate der DP IV sind. Da Cholecystokinin 21 (CCK21) in P₁'-Position ein Prolin aufweist und die DP IV nicht in der Lage ist, die Hydrolyse von Pro-Pro-Bindungen zu katalysieren, ist dieses Peptid nicht direkt durch DP IV angreifbar (vgl. S. 17, S. 52).

Sterische Einschränkungen um die zu spaltende Peptidbindung sollten Einfluß auf die katalytische Aktivität der DP IV haben. Zyklisierung zwischen Asp³ und Lys¹² im GRF-Analogen *cyclo*^{3,12}[Ala¹⁵]GRF(1-29)-NH₂ verringerte die Proteolysegeschwindigkeit durch DP IV um zwei Größenordnungen (Bongers *et al.*, 1992). Demgegenüber wurde mit der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß Somatostatin-14 (SMS-14) als Substrat durch die DP IV akzeptiert wird, obwohl SMS-14₃₋₁₄ durch eine Disulfidbrücke zwischen Cystein³ und Cystein¹⁴ zyklisiert vorliegt (vgl. Ergebnisse, S. 50). Die Inaktivierung von SMS-14 in der Blutzirkulation folgt einem anderen Weg. Vermutlich Aminopeptidasen katalysieren die sequentielle Abspaltung der beiden N-terminalen Aminosäuren Alanin und Glycin.

Als Hauptabbauprodukt der Proteolyse von SMS-28 durch DP IV wurde SMS-28₇₋₂₈ nachgewiesen (vgl. Ergebnisse, S. 51). Dieses Fragment kann Produkt sequentieller proteolytischer Angriffe der DP IV auf das erste Reaktionsprodukt SMS-28₃₋₂₈ sein. Das Hydrolyseprodukt von SMS-28₃₋₂₈, SMS-28₅₋₂₈, war nicht nachweisbar. Anhand der bekannten k_{cat}/K_m -Werte für die DP IV-katalysierte Proteolyse des [Ser²]-GRF (Bongers *et al.*, 1992) kann gefolgert werden, daß die Hydrolyse der Peptidbindung Ser⁴-Arg⁵ der geschwindigkeitslimitierende Schritt dieser sequentiellen Spaltung ist. Das entstandene SMS-28₅₋₂₈ wird sofort durch die DP IV angegriffen und unter Freisetzung des Dipeptides Arg-Pro zu SMS-28₇₋₂₈ abgebaut.

Um zu zeigen, daß die Inaktivierung der Peptidhormone der GRF-Familie in der Zirkulation ebenfalls durch die Aktivität der DP IV erfolgt, wurde der Abbau der Peptide in humanem Serum untersucht. In den letzten Jahren wurden jedoch verschiedene Enzyme mit DP IV-

bzw. DP IV-ähnlicher Aktivität im Serum beschrieben. Diese Proteine besitzen eine von DP IV/CD26 differente Primärstruktur (Jacotot *et al.*, 1996; Duke-Cohan *et al.*, 1995; Iwaki-Egawa *et al.*, 1998). Über ihre enzymologischen Eigenschaften ist wenig bekannt. So wird Attractin, zunächst als DPPT-L bezeichnet, der Hauptanteil der im Serum enthaltenen DP IV-Aktivität zugeschrieben (Duke-Cohan *et al.*, 1995). Demgegenüber geht aus Untersuchungen von Durinx *et al.* hervor, daß 95% der DP IV-ähnlichen Aktivität des Serums auf DP IV/CD26 zurückführbar sind (Durinx *et al.*, 2000). Obwohl keine Sequenzhomologie zwischen DP IV und Attractin besteht, weist Attractin ähnliche Eigenschaften wie DP IV auf. Es hydrolysiert gleichfalls artifizielle, niedermolekulare Substrate mit Prolin oder Alanin an P₁-Position. Das pH-Optimum ist leicht in das basische Milieu verschoben. Während die DP IV am effizientesten bei einem pH-Wert von 7,6 arbeitet, bevorzugt Attractin einen pH-Bereich um 8,5. Ob sich das katalytische Verhalten gegenüber länger-kettigen Substraten ebenfalls ähnelt, ist noch nicht genauer untersucht worden. Das bisher größte beschriebene DP IV-Substrat, das Chemokin RANTES, wird ebenfalls durch Attractin umgesetzt. Nach Abspaltung des ersten N-terminalen Dipeptides (Ser-Pro) katalysiert die DP IV die Hydrolyse eines weiteren Dipeptides (Tyr-Ser), während Attractin nicht in der Lage ist, dieses zweite Dipeptid freizusetzen (Duke-Cohan *et al.*, 2000). Das heißt, daß Attractin nicht an der Hydrolyse von Substraten beteiligt sein sollte, die Serin, Glycin oder Valin in P₁-Position haben. Aus den hier vorgestellten Untersuchungen geht hervor, daß alle im Serum enthaltenen Enzyme mit DP IV-ähnlicher Aktivität durch Isoleucyl-Thiazolidin, einen substratanalogen kompetitiven Inhibitor der DP IV, gehemmt werden können. Die Hemmkonstanten von Isoleucyl-Thiazolidin für DP IV respektive DP IV-ähnliche Aktivität humanen Serums unterscheiden sich nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Inwieweit Enzyme mit DP IV-ähnlicher Aktivität ebenfalls gastrointestinale Peptidhormone als Substrat akzeptieren, kann aus den erhaltenen Daten nicht gefolgert werden, da eine Differenzierung der Aktivität der einzelnen Enzyme im Serum bisher nicht möglich ist. Die qualitative Analyse der massenspektrometrischen Untersuchungen zum Metabolismus der Peptide der GRF-Familie zeigte, daß sich die Halbwertszeit der Prolin- und Alanin-Substrate beim Abbau durch Serum-DP IV-Aktivitäten in etwa verdoppelte. Größere Unterschiede traten bei der Hydrolyse der Serin- und Glycin-Substrate zutage. Diese wurden in Serum mindestens um den Faktor vier (VIP) langsamer abgebaut (vgl. Tabelle 3, S. 53). Auf die Ursache dieses verzögerten Abbaus kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Denkbar ist, daß nur die lösliche Form der DP IV den Substratumsatz katalysiert und deshalb geringere Abbaugeschwindigkeiten beobachtet werden. Alternativ könnten DP IV-ähnliche Enzyme diese Substrate als Liganden erkennen, aber nicht deren Hydrolyse katalysieren, so daß durch ihre Bindung die effektive Substratkonzentration erniedrigt wird, was sich ebenfalls in einer geringeren Hydrolyserate äußern kann. Letztlich kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, daß die Hydrolyse länger-kettiger

Substrate durch Protein-Protein-Interaktion der Enzyme mit Serumkomponenten gehemmt wird, wenn diese für die Katalyse essentielle sekundäre Bindungsstellen besetzen.

Somatostatin-14 wurde nicht durch die Serum-DP IV-Aktivität hydrolysiert, jedoch von der aus Schweineniere gereinigten DP IV N-terminal verkürzt. Das könnte einerseits auf bessere Substrateigenschaften von SMS-14 für Aminopeptidasen hinweisen. Andererseits kann dies auch in von DP IV unterschiedlichen Substratanforderungen der DP IV-ähnlichen Enzyme des Serums begründet sein. Ein weiteres Indiz dafür, daß sich die Eigenschaften der DP IV-ähnlichen Enzyme des Serums von denen der DP IV unterscheiden, ergaben Experimente mit Metformin. Metformin ist ein niedermolekulares, orales Antidiabetikum. Mannucci *et al.* beschrieben kürzlich, daß Metformin die Aktivität der DP IV hemmt (Mannucci *et al.*, 2000). Um diese Aussage zu verifizieren, wurde im Kontext der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Metformin auf die DP IV-katalysierte Inaktivierung von GLP-1 untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Metformin in hohen Konzentrationen (1 mM) die Halbwertszeit des Abbaus von GLP-1 durch gereinigte DP IV_{Schwein} verkürzt, während geringere Konzentrationen (10 µM) keine Effekte zeigten. Die DP IV-Aktivität im Serum gegenüber GLP-1 blieb durch 1 mM Metformin unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Inwieweit einzelne Enzyme oder die Gesamtheit der DP IV-ähnlichen Enzyme des Serums die Hydrolyse bioaktiver Peptide mit Prolin, Alanin oder Serin an vorletzter Aminosäureposition katalysieren, muß in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Ließe sich differenzieren, welche Enzyme an welchem Peptidmetabolismus beteiligt sind und wären diese selektiv durch differenzierende Effektoren beeinflussbar, so könnten hochwirksame und nebenwirkungsarme Medikamente zur Therapie von z.B. Adipositas oder inflammatorischen Erkrankungen entwickelt werden.

Es konnte beobachtet werden, daß ein Teil der analysierten Peptide in der Blutzirkulation nicht durch DP IV oder DP IV-ähnliche enzymatische Aktivitäten abgebaut wird. Cholecystokinin₂₁ (CCK₂₁) wird durch Aminopeptidasen zu CCK₂₋₂₁ verkürzt und ist nun durch DP IV angreifbar. Somatostatin-14 unterliegt im Serum ebenfalls durch Aminopeptidasen katalysierter Hydrolyse.

Im Verlauf des Inkubationsexperimentes von PACAP-38 in Serum konnten keine DP IV-Katalyseprodukte detektiert werden (siehe auch Ergebnisse S. 48). Die nachgewiesenen N- und C-terminalen Fragmente können durch endoproteolytische Aktivitäten entstanden sein. PACAP-38 verfügt mit Lys²⁰-Lys²¹ z.B. über eine Spaltstelle für Peptidasen, die zwischen basischen Aminosäuren spalten.

Ein ähnlicher Effekt wurde beim Abbau des GRF in humanem Serum beobachtet. Den initialen Schritt der Inaktivierung des GRF stellt die DP IV-katalysierte Hydrolyse zu GRF₃₋₄₄ dar. Als Hauptmetabolit wurde GRF₂₁₋₄₄ nachgewiesen. Dieses Fragment könnte durch die

Aktivität von Endoproteasen mit Spezifität für basische Aminosäuren in P₁-Position, z.B. Trypsin, gebildet worden sein. Die Stabilisierung des N-Terminus durch Hemmung der DP IV-Aktivität mittels Isoleucyl-Thiazolidin führt zu einem stark verlangsamten proteolytischen Abbau des Peptides und zu einem veränderten Fragmentmuster. Aufgrund der detektierten Teilpeptide kann vermutet werden, daß eine Abbaustabilisierung des aminoterminalen Bereiches zu vorwiegend durch Carboxypeptidasen katalysierter Proteolyse führt.

Aus der Hemmung der DP IV-Aktivität im Serum durch Isoleucyl-Thiazolidin resultierte ein verzögerter Abbau bzw. die Resistenz der Peptidhormone gegen Proteolyse. Für alle untersuchten Peptide geht aus der Literatur hervor, daß ein intakter N-Terminus essentielle Voraussetzung für die Erkennung spezifischer Rezeptoren und die Auslösung der Signalkaskade ist (Vandermeers *et al.*, 1992; Juarranz *et al.*, 1999; Robberecht *et al.*, 1986; Hinke *et al.*, 2000; Kieffer *et al.*, 1995). Daraus kann abgeleitet werden, daß die enzymatische Hydrolyse durch DP IV der initiale Schritt der Inaktivierung der Peptidhormone der GRF-Familie im Serum ist.

Um Aussagen über die biologische Relevanz des DP IV-katalysierten Metabolismus der untersuchten Peptidhormone zu ermöglichen, wurden mit Hilfe der Kapillarzonenelektrophorese die kinetischen Konstanten K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m der DP IV gegenüber ausgewählten Peptiden bestimmt. Die Konzentration der Peptidhormone im Organismus liegt im pico- bis nanomolaren Konzentrationsbereich. Daher muß für die Beurteilung der Substrateigenschaften unter physiologischen Bedingungen die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_{cat}/K_m herangezogen werden. Ist die Substratkonzentration sehr viel kleiner als die Enzymkonzentration, so wird die Reaktionsgeschwindigkeit von der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes bestimmt. Diese Bildungsgeschwindigkeit kann nicht größer werden als die diffusionskontrollierte Begegnung von Enzym und Substrat. Das kinetische Optimum wird durch k_{cat}/K_m -Werte zwischen 10^8 und $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ charakterisiert (Stryer, 1990). Die ermittelten K_m -Werte liegen im mikromolaren Bereich unabhängig von der Aminosäure in P₁-Position (vgl. Tabelle 3, S. 53). Es stellt sich die Frage, ob DP IV weiterhin als prolinspezifische Protease bezeichnet werden kann, wenn sie auch andere Aminosäuren in P₁-Position akzeptiert. Anhand des k_{cat}/K_m -Wertes läßt sich jedoch die Präferenz des Enzyms für Prolin- und Alanin-Substrate klar nachweisen.

Wie bereits aus der Literatur für Neuropeptid Y (NP Y), *Peptide YY* (P YY) oder *Pancreatic Polypeptide* (PP) bekannt ist, kann die Proteolyse des N-Terminus der Peptidhormone ihre Spezifität für bestimmte Rezeptoren verändern und somit andere biologische Reaktionen auslösen (Medeiros and Turner, 1996; Gerald *et al.*, 1996; Mentlein *et al.*, 1993). Rezeptorstudien für andere gastrointestinale Peptidhormone mit den entsprechenden N-terminalen Fragmenten (z.B. für den VIP/PACAP-Rezeptor) sind nicht publiziert, so daß zunächst nur

eine Inaktivierung der gastrointestinalen Peptidhormone durch die Aktivität der DP IV diskutiert werden kann.

Alle analysierten gastrointestinalen Peptide sind in unterschiedlicher, zum Teil entgegengesetzter Weise in die Regulation der Nahrungsaufnahme involviert. So stimulieren die Incretine GIP und GLP-1 sowie PACAP die Glukose-induzierte Insulinsekretion, die zu einer Verringerung der Blutglukosekonzentration führt. Glukagon wird bei niedrigem Blutglukosespiegel ausgeschüttet und stimuliert cAMP-vermittelt die Glykogenolyse. Von Guo *et al.* wurde gezeigt, daß P YY die GIP-stimulierte Insulinfreisetzung hemmt (Guo *et al.*, 1989). Da, durch diese Arbeit nachgewiesen, die Peptidhormone der GRF-Superfamilie ebenso wie die Neuropeptide NP Y und P YY Substrate der DP IV sind (Mentlein *et al.*, 1993; Kieffer *et al.*, 1995), muß es Mechanismen geben, die die Aktivität der Peptidhormone so regulieren, daß sie, angepaßt an die Situation des Stoffwechsels, ihre Funktionen erfüllen können. Diese Feinregulation kann durch *feed-back*-Mechanismen, lokal begrenzte oder zeitlich limitierte Sekretion oder durch unterschiedliche Affinitäten der Substrate zu der sie inaktivierenden Protease erfolgen. Anhand der ermittelten kinetischen Konstanten kann vermutet werden, daß Hormone die endokrin wirksam sind (z.B. Glukagon, GLP-1 oder GIP), also durch die Zirkulation im Organismus an ihren Wirkort transportiert werden, eine gewisse Resistenz gegen DP IV erfordern, um als biologisch aktive Peptide ihren Wirkort zu erreichen. Demgegenüber werden lokal wirkende Peptide wie NP Y, GRF oder P YY durch DP IV schnell und effizient hydrolysiert (Mentlein, 1999).

Die Wirkung der DP IV-katalysierten Hydrolyse auf zwei ausgewählte Peptide wird in den folgenden Abschnitten besprochen.

4.1.1.1 Glukagoninaktivierung durch DP IV-katalysierte Hydrolyse

Glukagon ist ein aus 29 Aminosäuren aufgebautes Peptidhormon, das in den α -Zellen der Bauchspeicheldrüse und in den endokrinen Zellen der intestinalen Mukosa als Propeptid exprimiert wird. In Abhängigkeit vom Syntheseort entstehen im Pankreas vorwiegend Glukagon und im Dünndarm GLP-1. Bisher wurde angenommen, daß Glukagon durch Dipeptidylpeptidase I (DP I, Cathepsin C, EC 3.4.14.1) inaktiviert wird. Die DP I ist eine lysosomal lokalisierte Cysteinprotease mit breiter Substratspezifität. Ihre Substrate sind Polypeptide, von deren unsubstituierten N-Termini sie Dipeptide abspaltet. DP I kann die Hydrolyse nicht katalysieren, wenn sich Arginin oder Lysin in P_1 -Position bzw. Prolin in P_1' -Position befinden. DP I wurde in vielen Geweben von Säugetieren nachgewiesen. Besonders hohe Konzentra-

tionen wurden in Milz und Niere gefunden. Ihre vorrangige physiologische Funktion scheint der Abbau von Proteinen in den Lysosomen zu sein (Barrett *et al.*, 1998). Es wird ebenfalls vermutet, daß DP I eine Rolle im Glukagon-Metabolismus der Leber spielt. Jedoch scheint der hepatische Abbau des Glukagons von untergeordneter Bedeutung bei der Regulation der Aktivität des Glukagons zu sein. Der Umstand, daß Glukagon bei seiner Passage durch perfundierte Rattenleber nicht abgebaut wird, stützt diese These (Hildebrandt *et al.*, 1991); (Talor *et al.*, 1983).

1993 wiesen Poulson & Hansen DP IV in den α -Zellen sekretorischer Granulae des Pankreas nach (Poulson *et al.*, 1993). 1999 konnte durch Grondin *et al.* eine Kolo-kalisation von DP IV und Glukagon in Zellen der Langerhans'schen Inseln gezeigt werden (Grondin *et al.*, 1999). Aufgrund der in dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen zur erweiterten Substratspezifität lag es nahe, Glukagon als potentielles DP IV-Substrat zu analysieren.

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl gereinigte DP IV_{Schwein} als auch die DP IV-Aktivität des Serums die Freisetzung des N-terminalen Dipeptides His-Ser katalysieren. Das resultierende Fragment Glukagon₃₋₂₉ wurde durch DP IV_{Schwein} um ein weiteres Dipeptid zu Glukagon₅₋₂₉ verkürzt. Eine ähnliche schrittweise Hydrolyse durch DP IV wurde bereits von Proost *et al.* für das *Macrophage-derived chemokine* (MDC) beschrieben (Proost *et al.*, 1999). Die Inkubation von Glukagon in humanem Serum erzeugte ein Peptid, dessen Molekulargewicht 17 Da geringer war als das des erwarteten Produktes Glukagon₃₋₂₉. Synthetisches Glukagon₃₋₂₉ wurde durch humanes Serum ebenfalls schnell in die 17 Da leichtere Peptidform überführt. Das läßt darauf schließen, daß zunächst durch die DP IV-Aktivität des Serums das N-terminale Dipeptid freigesetzt wird und das entstandene Glukagon₃₋₃₉ durch ein Enzym des Serums am aminoterminalen Glutamin zyklisiert wird. Diese Zyklisierung führt zur Abspaltung einer NH₃-Gruppe (17 Da). Enzyme, die eine solche Zyklisierungsreaktion katalysieren können, sind Transglutaminasen. Sie bewirken die Ausbildung einer neuen γ -Amid-Bindung zwischen der γ -Carboxamidgruppe des Glutamins und primären Aminen (Aeschlimann and Thomazy, 2000; Hohenadl *et al.*, 1995). Da das entstandene Peptid resistent gegen weitere DP IV-katalysierte Proteolyse ist, muß an der Zyklisierung die α -Amino- oder γ -Carboxamidgruppe des Glutamins beteiligt sein. Zu den potentiellen Reaktionsprodukten, die ein Molekulargewicht von 3242,6 Da aufweisen, gehören: [pGlu³]-Glukagon₃₋₂₉, cyclo¹⁻¹²-Glukagon₃₋₂₉, cyclo¹⁻²⁰-Glukagon₃₋₂₉ oder cyclo¹⁻²⁴-Glukagon₃₋₂₉. Fischer & Spieß beschrieben ein weiteres Enzym, das in der Lage ist, N-terminale Glutaminreste in Pyroglutamin zu überführen (Fischer and Spiess, 1987). Bezogen auf Glukagon sollte das Produkt dieser durch Glutaminyl-Zyklase (auch QC, EC 2.3.2.5) katalysierten Reaktion [pGlu³]-Glukagon₃₋₂₉ sein. Synthetisches [pGlu³]-Glukagon₃₋₂₉ konnte mittels HPLC, CZE und MALDI-TOF MS nicht vom Produkt der Zyklisierung im Serum (Glukagon₃₋₂₉-17 Da) unterschieden werden. Eine weitere

Charakterisierung des für die Zyklisierung verantwortlichen Enzyms erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit von S. Schilling, der QC-Aktivität im Serum nachweisen konnte.

Der bis dato postulierte proteolytische Abbau des Glukagons durch DP I in der Blutzirkulation konnte nicht nachgewiesen werden, da sich im humanen Serum keinerlei DP I-Aktivität detektieren ließ. Ein hochspezifischer Inhibitor der DP I supprimierte die Hydrolyse des Glukagons im Serum nicht (F. Rosche, persönliche Mitteilung). Da in der Literatur ebenfalls eine Inaktivierung des Glukagons in der Niere diskutiert wird, wurde die Rolle des DP IV oder DP I katalysierten Glukagonabbaus in der Niere untersucht. Es wurden drei Inkubationsansätze gewählt (vgl. Abbildung 16, S. 57). Der Zusatz von EDTA inhibiert alle Metalloproteasen, denen durch die Chelatbildung mit EDTA die für ihre Aktivität notwendigen Metallionen entzogen werden. Isoleucyl-Thiazolidin hemmt die Aktivität der DP IV. DP II, ein Schwesterenzym der DP IV mit ähnlichen kinetischen Eigenschaften, das ebenfalls durch Isoleucyl-Thiazolidin inhibiert wird, kommt nur in geringen Mengen in der Niere vor und sollte auch aufgrund seiner Substratspezifität nicht in den Glukagonmetabolismus involviert sein. Aus den Massenspektren kann gefolgert werden, daß am Abbau des Glukagons in der Niere eine Vielzahl anderer proteolytischer Enzyme beteiligt ist.

Die hier vorgestellten *in vitro*-Experimente zeigen, daß die DP IV als eines der hauptverantwortlichen Enzyme in die Inaktivierung des Glukagons in der Zirkulation des Organismus involviert sein kann (vgl. S. 54ff.).

Um diese These zu prüfen und die Auswirkungen des N-terminalen Glukagonabbaus und seiner Zyklisierung auf die biologische Aktivität des Glukagons zu charakterisieren, wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. R. Pederson (University of British Columbia, Vancouver, Canada) weitere Studien in Rattenmodellen durchgeführt. Es wurde der Abbau von Glukagon durch DP IV_{Schwein} und durch Plasma von Wistar-Ratten in einem Bioassay untersucht. Glukagon wurde zunächst unter verschiedenen Bedingungen vorinkubiert und dann subcutan oder *i.v.* Ratten gespritzt. Durch diesen Test kann der Effekt des Glukagons auf die Blutglukosekonzentration bestimmt werden. Die Injektion des entweder mit gereinigter DP IV oder mit Rattenplasma vorinkubierten Glukagons führte zu einem kompletten Verlust seiner hyperglykämischen Wirkung in der Ratte. Im Gegensatz dazu verhinderte der DP IV-Inhibitor Isoleucyl-Thiazolidin im Vorinkubationsansatz aus Glukagon und Rattenserum bzw. aus Glukagon und gereinigter DP IV den Verlust der biologischen Aktivität des Glukagons. Dieses Ergebnis wurde durch Inkubationsstudien von Glukagon im Plasma normaler Fischer-Ratten (d.h. CD26⁺/DP IV⁺) und in Plasma von DP IV-negativen japanischen Fischer-Ratten gestützt. Die von japanischen Fischer-Ratten exprimierte DP IV hat eine Mutation von Gly⁶³³ zu Arg⁶³³. Diese Mutation trifft das aktive Zentrum der DP IV. Deshalb ist das Protein katalytisch inaktiv. Eine weitere Folge dieser Mutation ist der verstärkte und sehr schnelle Abbau des Proteins im endoplasmatischen Retikulum, so daß japanische Fischer-

Ratten als CD26⁻/DP IV⁻ betrachtet werden können (Tsuji *et al.*, 1992). Eine vernachlässigbare, geringe Restaktivität des Rattenplasmas gegen das Standardsubstrat GP-4NA resultiert wahrscheinlich aus den Aktivitäten der Enzyme mit DP IV-ähnlicher Aktivität. Inkubation von Glukagon im Plasma normaler Fischer-Ratten bewirkte den Verlust der biologischer Aktivität, während die Inkubation im Plasma DP IV-negativer Ratten keinerlei Auswirkung auf die Glukose-freisetzenden Eigenschaften des Glukagons hatte (Hinke *et al.*, 2000).

Ergänzende Experimente erfolgten an CHO-K1-Zell-Linien, die mit dem humanem Glukagon-Rezeptor transfiziert wurden und diesen überexprimieren. Zunächst wurden die *in vitro* nachgewiesenen Produkte der DP IV-Katalyse auf agonistische bzw. antagonistische Wirkungen am Glukagon-Rezeptor untersucht. Alle Fragmente wiesen schwache agonistische Eigenschaften auf. Das Potential, die cAMP-Produktion zu stimulieren, nahm in folgender Reihenfolge ab:

Glukagon > [pGlu³]Glukagon₃₋₂₉ > Glukagon₃₋₂₉ > Glukagon₅₋₂₉.

Da die Peptide nur schwache Agonisten waren, wurden sie ebenfalls auf ihre antagonistischen Eigenschaften hin untersucht. Einzig Glukagon₅₋₂₉ wirkte antagonistisch auf die Stimulation von cAMP durch 1 nM Glukagon₁₋₂₉ (Hinke *et al.*, 2000). Die Zyklisierung des N-terminalen Gln³ von Glukagon₃₋₂₉ zu [pGlu³]-Glukagon ändert dessen Affinität zum Glukagonrezeptor und sein Adenylatzyklase-stimulierendes Potential. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des intakten N-Terminus des Glukagons für die Auslösung der biologischen Antwort nach Rezeptorbindung.

Um weitere Aussagen über Struktur-Wirkungsbeziehungen zu ermöglichen, erfolgte eine N-terminale Modifizierung des Glukagons.

Der Einbau einer D-Aminosäure in P₁-Position führte zu einem DP IV-resistenten Glukagonanalogon. Andererseits wird [D-Ser²]-Glukagon in humanem Serum sehr schnell abgebaut ($t_{1/2} = 46,7$ min). Die Molekulargewichte der nachgewiesenen Peptidfragmente entsprechen [D-Ser²]-Glukagon₁₋₁₇ und [D-Ser²]-Glukagon₁₋₁₆. Das heißt, der proteolytische Abbau erfolgt zwischen Arg¹⁷ und Arg¹⁸. Er könnte Resultat einer tryptischen Aktivität sein und weist darauf hin, daß ein intakter, natürlicher N-Terminus auch für eine Resistenz gegen Endoproteasen verantwortlich ist, die wahrscheinlich strukturell begründet ist. Weiterhin wurde für das Fragment [D-Ser²]-Glukagon₁₋₁₇ ein durch Carboxypeptidasen katalysierter Abbau zu [D-Ser²]-Glukagon₁₋₁₆ beobachtet.

Unabhängig von der beobachteten verstärkten proteolytischen Zugänglichkeit verfügt [D-Ser²]-Glukagon als einziges der getesteten N-terminal modifizierten Glukagonanaloge über eine erhöhte Bioaktivität (Hinke *et al.*, 2000). Möglicherweise beruht dieses erhöhte Glukose-stimulierende Potential auf der effizienteren Bindung der Proteolyse-resistenten

[D-Ser²]-Glukagonfragmente an den Rezeptor. Es ist denkbar, daß diese Fragmente gute Agonisten sind.

Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. So wurde der Einfluß von Miniglukagon (Glukagon₁₉₋₂₉) (Dalle *et al.*, 1999) sowie zweier N-terminaler Glukagonfragmente – Glukagon₁₋₁₄ und Glukagon₁₋₂₁ – auf die Insulinsekretion untersucht (Ohneda *et al.*, 1992). Glukagon₁₋₁₄ bewirkte bei gleichzeitiger Glukoseinfusion einen leicht erhöhten Plasmainsulinspiegel. Der Mechanismus dieses Effektes wurde nicht aufgeklärt. Miniglukagon hemmt dosisabhängig zu 80 bis 100% die durch Glukose, Glukagon, GLP-1 oder Glibenclamid stimulierte Insulinsekretion. Es hatte keinen Effekt auf die cAMP-Produktion. Deshalb ist eine über den Glukagonrezeptor vermittelte Wirkung auszuschließen. Elektrophysiologische Experimente führten zu dem Schluß, daß Miniglukagon zu einer Membranhyperpolarisation führt, die möglicherweise auf der Öffnung von Kalium-Kanälen beruht. Aus den bislang generierten Daten kann nicht geschlossen werden, ob der Glukose-stimulierende Effekt von [D-Ser²]-Glukagon rezeptorvermittelt wird oder auf einem anderen Signalweg erfolgt. Hierfür sind weiterführende Experimente notwendig.

Die Konfigurationsänderung auf der carboxyterminalen Seite der hydrolysierten Peptidbindung (Gln³ → D-Gln³) hat, verglichen mit Glukagon, eine ca. sechsfach reduzierte Abbaugeschwindigkeit durch DP IV zur Folge. Diese Modifikation führte zu einer erheblich schlechteren Bindung am Glukagonrezeptor, die sich auch in einem, verglichen mit Glukagon, geringeren Glukose-stimulierenden Potential ausdrückt.

Erwartungsgemäß resultiert aus der Phosphorylierung des Serin² zu [(P)Ser²]-Glukagon und der dadurch eingeführten negativen Ladung in P₁-Position ebenfalls ein gegen DP IV-Aktivität stabiles Peptid (Kaspari *et al.*, 1996). In der Zirkulation verhindert diese Phosphorylierung den DP IV-katalysierten Abbau des [(P)Ser²]-Glukagons jedoch nicht. Aus den zeitabhängig aufgenommenen Massenspektren der Inkubation von [(P)Ser²]-Glukagon kann gefolgert werden, daß zunächst eine Dephosphorylierung des (P)Ser² erfolgt. Das entstehende Glukagon kann danach wiederum ungehindert durch DP IV oder Enzyme mit DP IV-Aktivität angegriffen werden. Die erhöhte Halbwertszeit der phosphorylierten Verbindung läßt darauf schließen, daß die Dephosphorylierung des (P)Ser² der Reaktionsschritt ist, der die Abbaugeschwindigkeit dieser Verbindung im Serum limitiert.

4.1.1.2 Eigenschaften von Analoga und Fragmenten *des Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)*

GIP₁₋₄₂ gehört neben GLP-1 zu den Incretinen, 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 stimuliert die Insulinfreisetzung, die verstärkte Aufnahme von Glukose in Muskelgewebe 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 Diabetes mellitus Typ II (Altersdiabetes, *Non-insulin dependent diabetes mellitus* - NIDDM) erkannt (Deacon *et al.*, 1998; Holst and Deacon, 1998; Marguet *et al.*, 2000; Nauck *et al.*, 1996; Nauck *et al.*, 1997; Nauck, 1998). Intensive Untersuchungen über Struktur-Wirkungsbeziehungen erfolgten jedoch nur an GLP-1 (Burcelin *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 1998; Siegel *et al.*, 1999b; Siegel *et al.*, 1999a). Basierend auf Erkenntnissen, die für die spezifische Bindung des GIP an seinen Rezeptor und für die Auslösung der biologischen Antwort verschiedene Bereiche des GIP verantwortlich machen (Morrow *et al.*, 1996; Gelling *et al.*, 1997), wurde die Synthese von GIP-Analoga und -Fragmenten konzipiert, die schlechte oder keine Substrate der DP IV sind. Es wurden deren Eigenschaften als Substrate der DP IV untersucht (vgl. S.61 ff.).

Aus Modifikationen der Aminosäure in P₁-Position im Modellpeptid GIP₁₋₃₀ resultierten Verbindungen mit erhöhter Halbwertszeit des Abbaus durch DP IV. Die Halbwertszeit verlängerte sich um das 53- ([Ser²]-GIP₁₋₃₀, [Gly²]-GIP₁₋₃₀) bis 111-fache ([Val²]-GIP₁₋₃₀). Untersuchungen zu den kinetischen Eigenschaften von Nicht-Prolin und Nicht-Alanin-Substraten der DP IV wurden bereits von Bongers *et al.* (Bongers *et al.*, 1992) anhand verschiedener GRF-Analoga durchgeführt. Dabei ergab sich für die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_{cat}/K_m folgende Reihenfolge in Abhängigkeit von der Aminosäure in P₁-Position:

Abu > Pro > Ala >> Ser > Gly = Val >> Leu

Diese Verhältnisse spiegeln sich auch in den Halbwertszeiten für [Ser²]-GIP₁₋₃₀, [Gly²]-GIP₁₋₃₀ und [Val²]-GIP₁₋₃₀ wider. Die Halbwertszeit des DP IV-katalysierten Abbaus für [Val²]-GIP₁₋₃₀ ist jedoch rund zweifach länger als für [Gly²]-GIP₁₋₃₀. Die in biomolekularen Interaktionsstudien bestimmten Bindungskonstanten K_D für diese Peptide an immobilisierte DP IV korrespondieren mit diesen Ergebnissen. Der K_D -Wert für [Val²]-GIP beträgt das doppelte des K_D -Wertes von [Gly²]-GIP₁₋₃₀ (vgl. S. 65). Diese Resultate sprechen im Fall der GIP-Analoga dagegen, daß Peptidbindungen mit Glycin oder Valin in P₁-Position ähnlich effizient hydroly-

sirt werden, wie es aus der oben aufgeführten Reihenfolge der k_{cat}/K_m -Werte für die GRF-Analoga zu schließen gewesen wäre.

[Ser²]-GIP₁₋₆ wurde, verglichen mit [Ser²]-GIP₁₋₃₀, schneller durch DP IV hydrolysiert. Dieses Resultat stimmt gut mit den von Nausch *et al.* sowie Hoffmann *et al.* publizierten Daten überein, daß die Effizienz der DP IV-katalysierten Hydrolyse mit steigender Peptidkettenlänge abnimmt (Nausch *et al.*, 1990; Hoffmann *et al.*, 1993). Demgegenüber wurden [Gly²]-GIP₁₋₆ und [Val²]-GIP₁₋₆ über die gesamte Versuchsdauer nicht durch DP IV angegriffen (vgl. S. 63). Einerseits ist die katalytische Effizienz des Umsatzes von Substraten mit Glycin und Valin in P₁-Position geringer, andererseits wurde [Ser²]-GIP₁₋₆ schneller hydrolysiert als die entsprechende längerkettige Verbindung, so daß die schlechteren kinetischen Eigenschaften keine hinreichende Erklärung für die Resistenz gegen die DP IV-katalysierte Hydrolyse sind (Bongers *et al.*, 1992). Denkbar ist, daß für den Umsatz von Glycyl- und Valylsubstraten eine Fixierung des Peptides in einer weiteren Bindungsstelle notwendig ist, um die Katalyse im aktiven Zentrum zu ermöglichen. Die beiden Hexapeptide wären demzufolge nicht in der Lage, diese Bindungsstelle zu erreichen. Diese Auffassung wird durch modelltheoretische Arbeiten gestützt, auf die in einem späteren Abschnitt detaillierter eingegangen wird (Brandt, 2000).

Einige der in dieser Arbeit vorgestellten GIP-Analoga wurden in ergänzenden *in vitro* Experimenten auf ihre physiologischen Eigenschaften untersucht. Diese Versuche erfolgten ebenfalls im Arbeitskreis von Prof. R. Pederson (University of British Columbia, Vancouver, Canada) an mit dem humanen GIP-Rezeptor transfizierten CHO-K1-Zellen. Für die Bindung an den Rezeptor und die Stimulation der Adenylatzyklase ist das Peptidfragment GIP₁₋₃₀ notwendig. Alle auf diesem Modell basierenden, in dieser Arbeit untersuchten Analoga zeigen eine nur wenig reduzierte Affinität zum Rezeptor (drei- bis vierfach größere IC₅₀-Werte verglichen mit GIP₁₋₃₀). Die Einführung von D-Aminosäuren in P₁- und P_{1'}-Position (Ala²→D-Ala²; Glu³→D-Glu³) verringerte das Potential der Peptide die Adenylatzyklase zu stimulieren nur gering. Einen stärkeren Einfluß auf diese Eigenschaft hatte die Substitution des Ala². Diese Modifikation hatte auf die Bindung an den GIP-Rezeptor keine Auswirkungen, verminderte aber die Stimulierung der Adenylatzyklase drastisch. Keines der untersuchten C-terminal verkürzten Fragmente (GIP₁₋₆, GIP₁₋₁₃, GIP₁₋₁₄, GIP₁₋₁₅) konnte an den rekombinanten GIP-Rezeptor binden bzw. ihn aktivieren (Kühn-Wache *et al.*, 2000). Unter Berücksichtigung der Bindungs- und Aktivierungseigenschaften der GIP-Fragmente und GIP-Analoga wären daher nur [D-Glu³]-GIP₁₋₃₀, [D-Ala²]-GIP₁₋₃₀ und [Ser²]-GIP₁₋₃₀ von pharmakologischem Interesse.

Die Bedeutung des GIP für die Regulation des Blutglukosespiegels wird in der Literatur sehr unterschiedlich diskutiert. Konsens besteht darin, daß es einen direkten und indirekten Effekt des GIP auf die Stimulation der Insulinsekretion gibt. In immunozytochemischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß im Dünndarm des Hundes die GIP-

produzierenden K-Zellen gleichmäßig verteilt im Duodenum und Jejunum vorkommen, während 73% der GLP-1 produzierenden L-Zellen im Jejunum lokalisiert wurden. Der mittlere Teil des Dünndarms enthält 69% der K-Zellen und 51% der L-Zellen. 30% der L-Zellen in dieser Region sind benachbart zu K-Zellen. Die Autoren schließen daraus, daß ein parakriner Effekt des GIP auf die GLP-1-Sekretion sehr wahrscheinlich ist (Damholt *et al.*, 1999). Miyawaki *et al.* untersuchten die Regulation des Blutglukosespiegels in GIP-Rezeptor-*knock out*-Mäusen. Wurde Glukose intraperitoneal appliziert, so gab es im Glukose-Toleranz-Test keine Unterschiede zwischen GIP-Rezeptor *-/-* und *+/+* Mäusen. Wurde die Glukose oral verabreicht, so wiesen die Rezeptor-negativen Mäuse höhere maximale Glukosekonzentrationen und einen geringeren Insulinspiegel auf. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas vorrangig durch Glukose und GIP reguliert wird. Es wird postuliert, daß die Unterbrechung der GIP/GIP-Rezeptor-Achse, wie sie bei Diabetikern des Typs II vorkommt, zur Entstehung des Diabetes beitragen kann (Miyawaki *et al.*, 1999). Weitere Hinweise, daß eine Stabilisierung der Incretine GIP und GLP-1 gegen DP IV-katalysierte Hydrolyse einen therapeutischen Effekt auf Diabetes Typ II haben können, ergeben sich aus den Versuchen von Marguet *et al.*, die die Glukosehomöostase in DP IV-*knock-out*-Mäusen analysierten. Diese Mäuse verfügen lediglich über geringe DP IV-ähnliche Aktivitäten. CD26/DP IV konnte durch Antikörper nicht nachgewiesen werden. Wurden GLP-1 oder GIP im Plasma von DP IV *-/-* Mäusen inkubiert, so wurde nach 4 Stunden lediglich Endoproteolyse beobachtet. Die Tiere zeigten nach einem oralen Glukose-Toleranz-Test signifikant geringere Blutglukosekonzentrationen verglichen mit den Kontrolltieren. Ebenso wurden höhere Insulin- und GLP-1₇₋₃₆-Spiegel nachgewiesen. Das heißt, die Stabilisierung der Incretine führte zu einer verbesserten Glukose-Toleranz. Eine verlangsamte DP IV-katalysierte Hydrolyse kann entweder durch die Applikation von Inhibitoren der DP IV oder, wie im Rahmen dieser Arbeit untersucht, durch Substitution von für die Katalyse wichtigen Aminosäuren in der Peptidsequenz der Substrate erfolgen. Ein verlangsamter Abbau der endogenen Peptidhormone oder der exogen verabreichten Peptidanaloga hat zwei Vorteile:

- Das Hormon stimuliert seinen Rezeptor länger und erhöht damit die biologische Antwort auf den Ausgangsstimulus (z.B. erhöhte Blutglukosespiegel oder Fettaufnahme).
- Das Hormon wird dennoch abgebaut, so daß Nebeneffekte wie eine Hypoglykämie oder antigene Wirkungen minimiert werden.

Unter diesem Aspekt betrachtet, kristallisierten sich die Verbindungen [D-Glu³]-GIP₁₋₃₀ und [Ser²]-GIP₁₋₃₀ als potentielle Antidiabetika heraus. Beide Peptide verfügen über gute Rezeptorbindungseigenschaften und ein hohes insulinstimulierendes Potential. Eine weitere Optimierung der Peptidanaloga wäre denkbar durch weiterführende Untersuchungen zu Struktur-

Wirkungsbeziehungen. Aus den bislang in der Literatur publizierten Daten ist zu schließen, daß es mehrere Bindungsstellen am Rezeptor gibt. Bindungsstudien mit C-terminalen GIP-Fragmenten an isolierten, perfundierten Ratten-Pankreata zeigten, daß GIP₁₉₋₃₀ seine insulinotropen Eigenschaften behielt (Morrow *et al.*, 1996). Eine andere Studie mit GIP-Fragmenten, deren Wirkung am rekombinant in CHO-K1-Zellen exprimierten GIP-Rezeptor untersucht wurde, weist darauf hin, daß GIP₆₋₃₀ die hochaffine Bindungsregion für den Rezeptor enthält (Gelling *et al.*, 1997). In Anlehnung an Experimente zu Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen *Corticotropin-releasing factor* (CRF) (Beyermann *et al.*, 2000) und seinem Rezeptor wäre die Synthese von GIP-Analoga, die sich aus N- und C-terminalen Fragmenten des GIP (verknüpft durch helikale Linker) zusammensetzen, denkbar. Durch Bindungsstudien am GIP-Rezeptor könnte geprüft werden, ob es tatsächlich zwei oder mehrere Bindungsstellen für das GIP gibt, die essentiell für die Bindung am Rezeptor und dessen Aktivierung sind.

4.2 Mechanismus DP IV-katalysierter Hydrolyse von Substraten mit Serin, Valin oder Glycin in P₁-Position

4.2.1 Hydrolyse von Prolinsubstraten

Die DP IV ist durch den klassischen Inhibitor Diisopropylfluorophosphat inaktivierbar und wird somit als Serinprotease klassifiziert. Die Anordnung der katalytischen Triade (Ser, Asp, His) (David *et al.*, 1993) und der Katalysemechanismus unterscheiden die DP IV von den klassischen Serinproteasen der Subtilisine (Asp, His, Ser) und Chymotrypsine (His, Asp, Ser) (Rawlings *et al.*, 1991). Infolge der Sequenzhomologie um den aktiven Serylrest und der Anordnung der katalytischen Triade wird die DP IV gemeinsam mit der POP in die Prolylolygopeptidasefamilie (S9) eingeordnet (Rawlings & Barrett 1994). Für Serinproteasen gilt allgemein, daß durch die Substratbindung eine Konformationsänderung im Enzym induziert wird, die zu einem Protonentransfer vom aktiven Serin auf das Histidin führt. Das so entstandene Histidiniumion wird durch den Aspartylrest stabilisiert. Das aktivierte Serin greift nun nukleophil die zu hydrolysierende Bindung des Substrates unter Ausbildung eines ersten tetrahedralen Intermediates an. Dieses negativ geladene tetrahedrale Addukt wird durch ein Wasserstoffbrückenbindungssystem im sogenannten „oxyanion hole“ stabilisiert. Aus dem Zerfall dieses Intermediates entsteht das Acylenzym. Durch die Hydrolyse des Acylenzyms werden über ein zweites tetrahedrales Intermediat letztendlich das Reaktionsprodukt und das freie Enzym generiert.

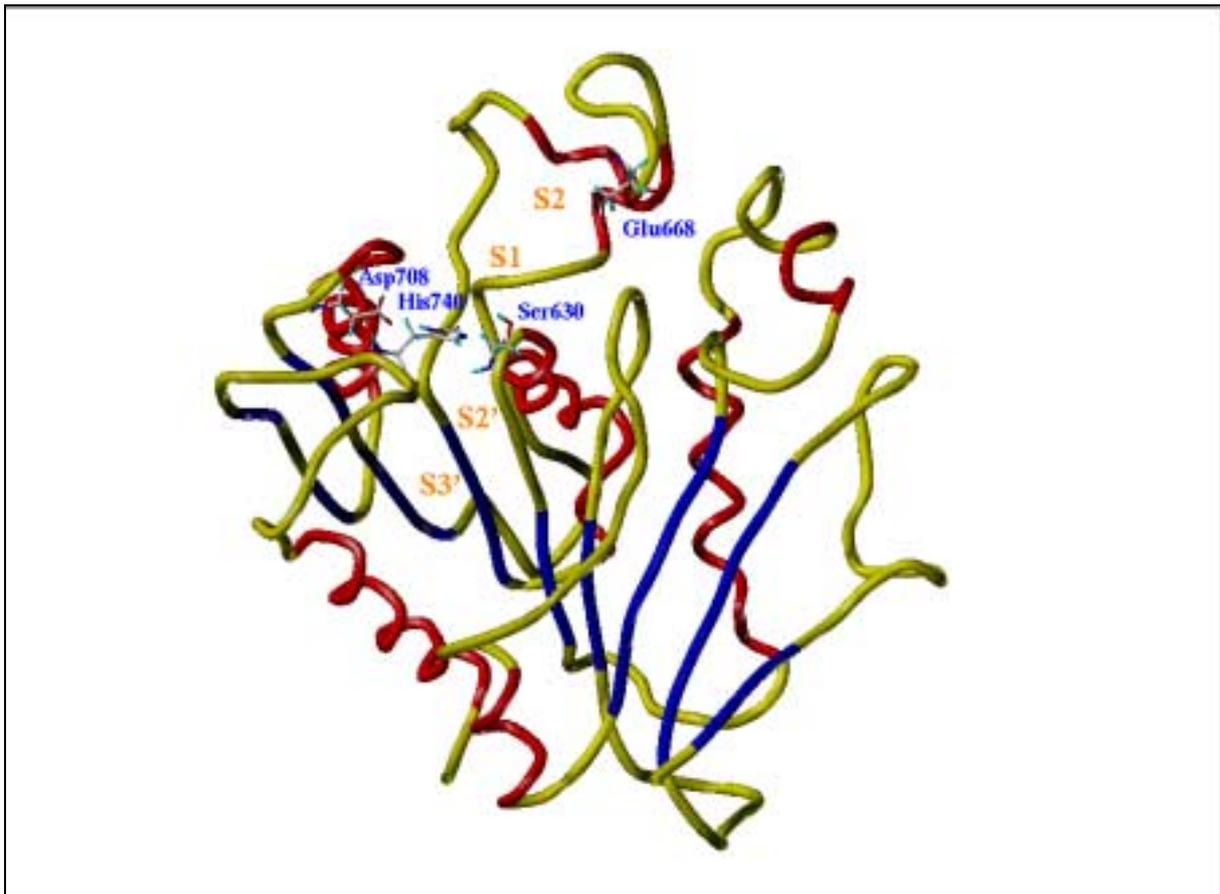


Abbildung 29: 3D-Darstellung des Modells der Sekundärstruktur der katalytischen Domäne der DP IV, basierend auf der Röntgenkristallstruktur der POP und Homologiemodelling

Aufgrund umfangreicher kinetischer Untersuchungen und an der Struktur der POP orientierter modelltheoretischer Berechnungen wird als Mechanismus der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse folgendes Modell diskutiert:

Die S_1 -Bindungsstelle der DP IV, die für die Erkennung des Prolylrestes des Substrates verantwortlich ist, wird durch drei Tyrosylreste (Tyr^{666} , Tyr^{547} und Tyr^{631}) sowie Val^{556} auf dem Boden dieser Bindungstasche repräsentiert. In einer sandwichartigen Struktur wird das Prolin in der P_1 -Position des Substrates durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Tyrosylresten Tyr^{631} und Tyr^{666} so positioniert, daß sich die zu spaltende Peptidbindung senkrecht zur Hydroxylgruppe des aktiven Serylrestes orientiert. Die Stabilisierung des im tetrahedralen Intermediat entstehenden Oxyanion erfolgt durch die phenolische Hydroxylgruppe eines weiteren, in die S_1 -Bindungsseite weisenden Tyrosylrestes (Tyr^{547}). Aus diesen modelltheoretischen Betrachtungen geht ebenfalls hervor, daß der protonierte und positiv geladene N-Terminus des Substrates mit der Seitenkette des Glutamylrestes Glu^{688} interagiert. Des weiteren wird eine zweite Bindungsstelle vorgeschlagen, die als S_2' - bis S_5' -Bindungsregion für

Liganden beschrieben werden kann (Brandt, 2000). Der hier vorgestellte Mechanismus basiert auf Studien am Modell der katalytischen Domäne der DP IV und der aus röntgenkristallographischen Experimenten gewonnenen Struktur der POP. Die Propellerdomäne wurde für diese Untersuchungen nicht betrachtet.

Anhand der Tertiärstruktur der POP und mittels gerichteter Punktmutation konnte für die POP gezeigt werden, daß der in der N-terminalen Propellerregion lokalisierte Cysteinrest Cys²⁵⁵ für die Katalyse wichtig ist (Szeltner *et al.*, 2000). Arbeiten von Abbott *et al.* weisen darauf hin, daß auch am Katalysemechanismus der DP IV zwei Glutamyreste in Position 205 und 206 der postulierten Propellerdomäne der DP IV beteiligt sind (Abbott *et al.*, 1999).

Als alternative Hypothese wird für DP IV und POP ein Substrat-unterstützter Katalysemechanismus diskutiert. Dieses Modell versucht zwei grundlegende Fragen zu beantworten:

1. Kann es zur Ausbildung bestimmter Konformationen prolinhaltiger Peptide kommen, die eine Substraterkennung durch DP IV oder POP begünstigen?
2. Können sich solche Konformationen oder Übergänge zwischen diesen fördernd auf die Katalyse und damit auf das kinetische Verhalten von DP IV und POP auswirken?

Es ist bekannt, daß prolinhaltige Dipeptide in wäßrigen Lösungen in mehreren Konformationen vorliegen können. Ebenfalls nachgewiesen werden konnte, daß Xaa-Pro-4-Nitroanilide in einem im Gleichgewicht befindlichen Gemisch von *cis*- und *trans*-Isomeren vorliegen. Es wird jedoch nur die *trans*-Form der Substrate produktiv an das Enzym gebunden. Aus diesen Besonderheiten wurde folgender Katalysemechanismus abgeleitet:

1. Die *trans*-Form der Substrate wird nichtkovalent an das Enzym gebunden. Bezogen auf die DP IV sollte der protonierte N-Terminus durch möglicherweise intramolekulare Wechselwirkung mit dem Carbonylsauerstoff der Imidgruppierung den Angriff des Nucleophils erleichtern.
2. Aus diesem nucleophilen Angriff resultiert eine negative Partialladung am Carbonylsauerstoffatom und der Übergang des Kohlenstoffs vom planaren zum tetrahedralen Zustand. Eine Reihe damit verbundener konformativer Veränderungen im Substratmolekül bewirkt dann eine erleichterte Rotation um die Xaa-Pro-Peptidbindung. Die Stabilisierung der *trans*-Konformation wird aufgehoben.
3. Es bildet sich die *cis*-Konformation des kovalenten Enzym-Substrat-Komplexes aus. Dieses erste tetrahedrale Intermediat wird möglicherweise durch eine Wasserstoffbrücke vom N-Terminus her stabilisiert. Die sterischen und elektronischen Eigenschaften des Komplexes bewirken eine Lösung der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung.

Der entstandene Xaa-Pro-Serylester befindet sich in relativ hydrophober Umgebung und daher kann die *trans*-Konformation des Esters nicht mehr durch intramolekulare Wasser-

stoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Ein wahrscheinlich basenkatalysierter Angriff eines Wassermoleküls ist energetisch erleichtert, es erfolgt wie zuvor beschrieben die Ausbildung eines zweiten tetrahedralen Intermediates und letztendlich werden das freie Enzym regeneriert sowie das Xaa-Pro-Dipeptid freigesetzt.

Es wird gefolgert, daß post-prolinspaltende Peptidasen mittels Bindungsspaltung eine *cis-trans*-Isomerisierung „katalysieren“ (Demuth, 1988; Demuth and Heins, 1995).

4.2.2 Katalyse von Substraten mit Serin, Valin und Glycin in P₁-Position

Angesichts des optimalen Arrangements der katalytischen Triade für Prolin in P₁-Position stellt sich die Frage, wie eine Katalyse der Spaltung von Serin-, Glycin-, Valin- oder Threoninsubstraten erfolgen kann. Aufgrund der Beobachtung, daß die Hydrolyse der Fragmente [Val²]-GIP₁₋₆ und [Gly²]-GIP₁₋₆ durch DP IV nicht katalysiert werden kann, die länger-kettigen Fragmente [Val²]-GIP₁₋₃₀ sowie [Gly²]-GIP₁₋₃₀ demgegenüber Substrate der DP IV sind, lag die Vermutung nahe, daß für die Hydrolyse von Substraten mit Ser, Val oder Gly in P₁-Position weitere sekundäre Wechselwirkungen notwendig sind. Von Brandt wurde bereits eine zweite hydrophobe Bindungstasche vermutet, die in die Bindung von HIV-Tat-Protein oder Chemokinen involviert sein könnte (Brandt, 2000). Da eine Tertiärstruktur des Glukagons in der Brookhaven Datenbank (*Protein data bank*, PDB) verfügbar ist, wurde durch Moleküldynamiksimulationen die in Abbildung 30 dargestellte Struktur der Wechselwirkungen zwischen Glukagon und DP IV errechnet (W. Brandt, persönliche Mitteilung).

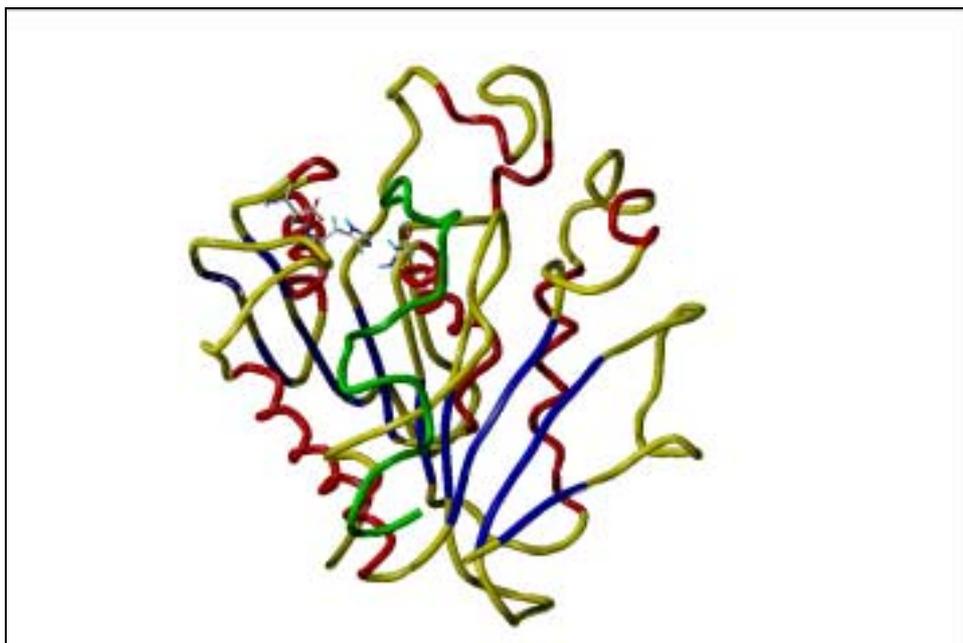


Abbildung 30: 3D-Darstellung des Modells der Sekundärstruktur der katalytischen Domäne der DP IV mit Glukagon (grün) als Liganden

Der Übersichtlichkeit halber wurde darauf verzichtet, die einzelnen Interaktionen zwischen Ligand (Glukagon) und Enzym graphisch darzustellen. Eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen Ligand und Enzym sorgt dafür, daß das Serin in P₁-Position so zum aktiven Serylrest der DP IV positioniert wird, daß die Hydrolyse der Peptidbindung katalysiert werden kann. Anhand der Sekundärstrukturen kann vermutet werden, daß das N-terminale Histidin des Glukagon eine Salzbrücke mit dem Glutamyrest Glu⁶⁶⁸ ausbildet und die Seitenkette schwache hydrophobe Wechselwirkungen mit Valin⁶⁶⁵ eingeht. Der Carbonylsauerstoff des Serin²-Restes des Glukagons bildet zur phenolischen Hydroxylgruppe des Tyr⁵⁴⁷ eine Wasserstoffbrückenbindung aus, die eine katalytisch produktive Positionierung der zu spaltenden Peptidbindung gewährleistet. Die Amidgruppe der Hauptpeptidkette des Glutamin³ des Glukagons kann mit der Carbonylgruppe des Asparagylrestes⁷¹⁰ der DP IV interagieren. Denkbar ist ebenfalls die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung von der Seitenkette des Glutamin³ (Glukagon) zur Seitenkette des Glutamyrestes⁵⁵³ (DP IV). Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Seitenkette des Phenylalanin⁶ und Isoleucin⁷⁴² sorgen ebenso für eine Stabilisierung der Glukagonbindung an die DP IV wie die Interaktion des Serylrestes⁸ mit der Seitenkette des Serin⁵⁵². Zusätzlich erscheinen weitere Wechselwirkungen zwischen Lysin¹² und Aspartat⁵⁵⁶, Aspartat¹⁵ und Arginin⁵⁶⁰ sowie zwischen Arginin¹⁷ und Aspartat⁵⁵⁶ wahrscheinlich, die die Hypothese der Existenz einer zweiten hydrophoben Bindungsregion, insbesondere für die Bindung längererkettiger Liganden, stützen.

Aus den Untersuchungen zu Substrateigenschaften von [Ser²]-GIP₁₋₆ und [Val²]-GIP₁₋₆ folgte, daß [Ser²]-GIP₁₋₆ DP IV-katalysiert gespalten wird, während [Val²]-GIP₁₋₆ und [Gly²]-GIP₁₋₆ nicht umgesetzt wurden. Worin unterscheiden sich die Substrateigenschaften von [Ser²]-GIP₁₋₆ und [Val²]-GIP₁₋₆ für DP IV? Hierzu wurden ebenfalls modelltheoretische Betrachtungen angestellt. Abbildung 31 zeigt die Anordnung von [Ser²]-GIP₁₋₆ im Modell des aktiven Zentrums der DP IV.

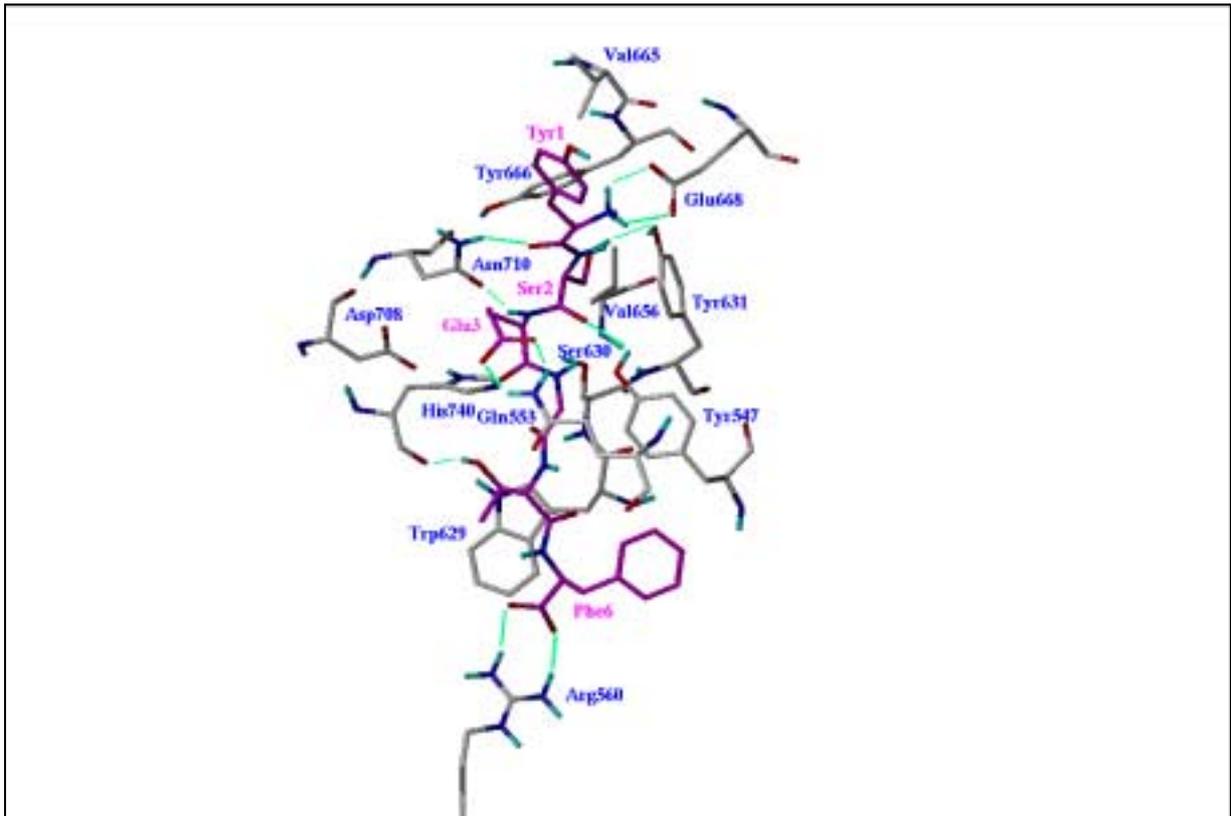


Abbildung 31: Molekülgraphische Darstellung der Wechselwirkung von $[\text{Ser}^2]\text{-GIP}_{1-6}$ mit dem Modell des katalytischen Zentrums der DP IV (Magenta-Kohlenstoffe = Ligand, blaue Beschriftung = Aminosäurereste der DP IV, Magenta-Beschriftung = Aminosäurereste des Liganden, grüne Linien symbolisieren essentielle H-Brücken)

Es ist gut erkennbar, daß auch für dieses Hexapeptid stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Glutamat³ und Glutamin⁵⁵³ und Threonin⁵ und Histidin⁷⁴⁰ sowie eine Salzbrücke zwischen dem C-terminalen Phenylalanin⁶ und Arginin⁵⁶⁰ eine optimale Positionierung der zu hydrolysierenden Peptidbindung zum aktiven Serylrest des Enzyms gewährleisten. Dafür spricht ebenfalls der Abstand des ω -Serylhydroxylsauerstoffs zum Kohlenstoff der zu spaltenden Bindung von 3,3 Å, der einem für den nukleophilen Angriff optimalen Abstand entspricht. In Abbildung 32 ist ein Modell des nach dem nukleophilen Angriff des ω -Serylhydroxylsauerstoffs auf die Carbonylgruppe des Serin² entstehenden tetrahedralen Intermediates dargestellt. Das Oxyanion wird durch eine Wasserstoffbrücke zu Tyrosin⁵⁴⁷ und aufgrund der Interaktion des positivierten Histidins zur NH-Gruppe der zu spaltenden Bindung stabilisiert.

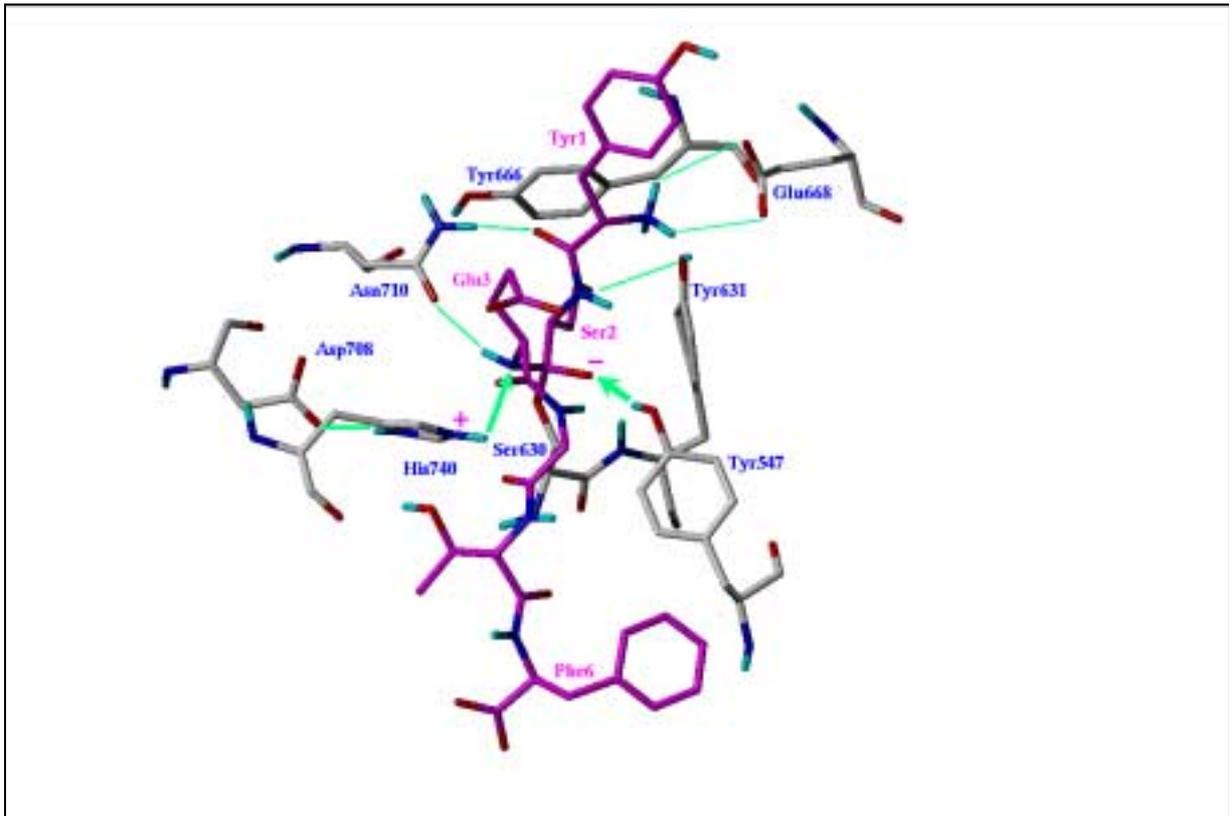


Abbildung 32: energetisch optimierte Struktur des postulierten tetrahedralen Intermediates, das sich nach dem Angriff des nukleophilen Serylrestes des aktiven Zentrums der DP IV auf die Carbonylgruppe des Serylrestes des Substrates ausbildet

Dockingstudien mittels spezieller Moleküldynamiksimulationen mit dem Fragment [Val²]-GIP₁₋₆ legen den Schluß nahe, daß die Interaktion des Valylrestes in P₁-Position mit Tyrosin⁶⁶⁶ des Enzyms stark erschwert ist. Es ergibt sich in diesem Modell ein Bindungsabstand zwischen dem ω -Serylhydroxylsauerstoffs des aktiven Serins und der Carbonylgruppe des Valin² von 5,8 Å, der eine Reaktion unmöglich macht (Abbildung 33). Dennoch sollte das Peptid über gute Bindungseigenschaften verfügen, so daß sich aus den theoretischen Betrachtungen ableiten ließ, daß [Val²]-GIP₁₋₆ ein potenter kompetitiver Inhibitor der DP IV sein kann. Diese Hypothese wurde im enzymkinetischen Test geprüft, konnte aber nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Des weiteren wird deutlich, daß Substrate mit Valin in P₁-Position schlecht in die S₁-Bindungsstelle der DP IV passen und daher zusätzlicher sekundärer Interaktionen zwischen Valylsubstrat und Enzym bedürfen, die zu einer solchen Fixierung des Substrates führen, die eine produktive Bindung im aktiven Zentrum und damit die Bindungsspaltung erlaubt.

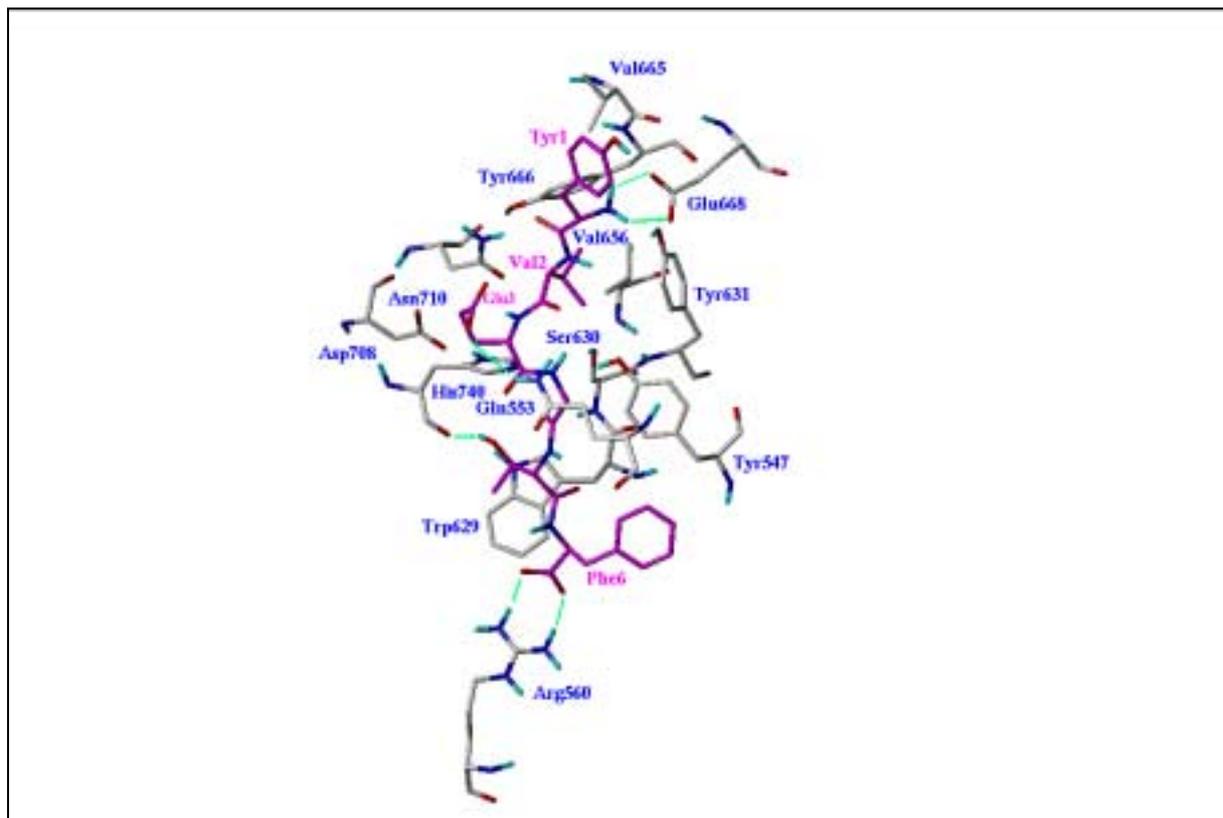


Abbildung 33: Modell möglicher Wechselwirkungen zwischen [Val²]GIP₁₋₆ und dem aktiven Zentrum der DP IV (Magenta-C-Atome = Ligand, Magenta-Beschriftung = Aminosäurereste des Liganden, blaue Beschriftung = Aminosäurereste der DP IV, grüne Linien symbolisieren essentielle Interaktionen)

Ausgehend von diesen Überlegungen sollte es möglich sein, Effektoren der DP IV zu entwickeln, die differenzierend die Hydrolyse niedermolekularer oder hochmolekularer Substrate beeinflussen. Es ist geplant, die aufgestellten Hypothesen in weiterführenden Experimenten zu prüfen. So könnte eine Konsensussequenz der GRF-Familie (TFTSDY), die der Sequenz Glukagon₅₋₁₀ entspricht, bereits an eine sekundäre Bindungsstelle binden. Diese Bindung dürfte die Hydrolyse des niedermolekularen Substrates GP-4NA nicht behindern. Demgegenüber sollte die Hydrolyse längerer Peptide (insbesondere solcher, die kein Prolin oder Alanin in P₁-Position haben) nicht mehr durch DP IV katalysierbar sein, weil die zu einer optimalen Positionierung der zu spaltenden Peptidbindung notwendige sekundäre Bindungsstelle nicht mehr verfügbar ist.

4.3 POP-katalysierte Hydrolyse von Substraten mit Serin oder Threonin in P₁-Position

Ähnlichkeiten im Katalysemechanismus von POP und DP IV (Demuth and Heins, 1995; Yaron and Naider, 1993) führten zu ihrer gemeinsamen Einordnung in die Proteasefamilie S9. Aus der Literatur ist nicht bekannt, daß die POP ebenso wie die DP IV andere Aminosäuren als Prolin oder Alanin in P₁-Position akzeptiert. So lag es nahe zu untersuchen, ob auch Substrate mit Serin oder Threonin in P₁-Position von POP katalytisch umgesetzt werden können. Diese Annahme wurde sowohl mit bakterieller POP (*Flavobacterium meningosepticum*) als auch mit POP aus Säugern (Schwein bzw. Mensch) geprüft. Erwartungsgemäß wurden die dazu genutzten niedermolekularen Modellpeptide durch die Enzyme aus beiden Spezies hydrolysiert. Unterschiede zwischen bakterieller POP und POP aus Säugern zeigten sich im Vermögen, die post-Threonin-Bindung zu spalten (vgl. S. 67). Der k_{cat}/K_m -Wert der POP_{Flavo} für die katalytische Spaltung von Z-GS-AMC ist zwei Größenordnungen größer als der für Z-GT-AMC. POP aus Säugern katalysierte diese Modellsubstrate mit nahezu gleicher katalytischer Effizienz. Differenzen im Katalyseverhalten wurden auch bei der Hydrolyse des CLIP (ACTH₁₈₋₃₉) beobachtet. Während POP_{Schwein} im zweiten Schritt die Hydrolyse einer Prolylbindung katalysierte, griff POP_{Flavo} eine Alanylbindung an. Wie bereits bei den niedermolekularen artifiziellen Substraten beobachtet, ist POP_{Flavo} nicht in der Lage, die Hydrolyse der post-Threoninbindung zu katalysieren. Dieses Ergebnis konnte anhand eines β A4-Modellpeptides bestätigt werden: POP_{Schwein} katalysierte die post-Threonin-Spaltung, während das Peptid resistent gegen den Angriff von POP_{Flavo} war (vgl. S. 69). Sequenzvergleiche zwischen POP aus beiden Spezies zeigten, daß eine Sequenzhomologie im Bereich der katalytischen Domäne von ca. 60% besteht. Von Szeltner *et al.* (Szeltner *et al.*, 2000) wurde aufgrund gerichteter Mutagenese und kinetischer Analyse der Mutanten vermutet, daß Cystein²⁵⁵ aus der Propellerregion der POP_{Schwein} wichtig für den Katalysemechanismus des Enzyms ist. Diesen Cysteinrest gibt es in der Sequenz der POP aus *Flavobacterium meningosepticum* nicht. Eine Röntgenkristallstruktur der POP_{Flavo} existiert noch nicht. Daher kann nur vermutet werden, daß aus der Tertiärstruktur beider Enzyme Unterschiede in der Katalyse anderer Aminosäuren als Prolin und Alanin in P₁-Position ableitbar sind. An dieser Stelle sei noch einmal darauf verwiesen, daß die Werte der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die Hydrolyse von Z-GP-AMC und Z-GA-AMC für POP_{Flavo} zwei Größenordnungen über denen für humane POP liegen. Differenzierungen zwischen den enzymatischen Aktivitäten erscheinen durchaus sinnvoll, da *Flavobacterium meningosepticum* ein pathogener Mikroorganismus ist und eine solche veränderte Substratspezifität zu seiner Pathogenität gegen den Wirt beitragen kann. Insbesondere könnte mit einer Infektion durch *Flavobacteri-*

um *meningospeticum* ein drastisch erhöhter Abbau prolinhaltiger Neuropeptide im Hirn einhergehen, die in inflammatorische Prozesse involviert sind, wie beispielsweise Substanz P.

4.4 Funktion von POP in Signaltransduktionsprozessen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Hymenistatin-1 (HS-1), ein zyklisches Oktapeptid des pazifischen Meeresschwammes *Hymeniacidon*, ein potenter kompetitiver Inhibitor der Aktivität der POP ist. Verglichen mit Rapamycin verfügt HS-1 über bessere inhibitorische Eigenschaften (vgl. Tabelle 10, S. 73). Die Makrolidstruktur des Rapamycins ist möglicherweise zu starr, um gut in das aktive Zentrum der POP gelangen zu können. Unter der Annahme, daß der vorgeschlagene Katalysemechanismus der POP einen Transport der Liganden durch den β -Propeller erfordert (Fülöp *et al.*, 1998) ist es denkbar, daß sterische Wechselwirkungen zwischen Rapamycin und der POP den Zugang zum aktiven Zentrum erschweren. Eine POP-Mutante, die nur aus der katalytischen Domäne besteht, könnte Aufschluß darüber geben, ob die Bindung des Rapamycins im aktiven Zentrum ähnlich effizient erfolgt wie die von HS-1 und somit der „Weg“ zum aktiven Zentrum limitierend für die Wirkung der Effektoren ist.

Es ist bekannt, daß HS-1 immunsuppressiv wirkt, seine zellulären Targets konnten bisher jedoch nicht aufgeklärt werden (Cebrat *et al.*, 1996). Eines der Hauptprobleme bei der Transplantation von Organen ist die Abstoßung des fremden Gewebes vom Empfängerorganismus. Um diesen Prozeß zu minimieren, werden Substanzen eingesetzt, die die Immunantwort unterdrücken. Rapamycin, Cyclosporin A und FK506 sind immunsuppressive Wirkstoffe. Sie entfalten ihre Wirkung erst durch Bildung eines heterotetrameren Komplexes aus Immunophilin, Calmodulin und Calcineurin. Rapamycin und FK506 binden an *FK506-binding protein* (FKBP). Cyclosporin A (CsA) interagiert mit Cyclophilin. Der Rapamycin-FKBP-Komplex wiederum tritt in Wechselwirkung mit *mammalian target of rapamycin* (mTOR), was eine Regulation von Wachstums- und Proliferationsprozessen ermöglicht. CsA und FK506 wirken über Kalzium-abhängige Signalwege, führen zu einer selektiven Blockierung der Transkription verschiedener Zytokin-Gene und hemmen so die Aktivierung der T-Lymphozyten. Alle Immunophiline weisen Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase-(PPIase)-Aktivität auf. Zur Charakterisierung der molekularen Mechanismen der Immunsuppression durch HS-1 wurde der Einfluß dieser Verbindung auf verschiedene Signalwege in T-Zellen untersucht (vgl. S. 72 ff.). Die Signaltransduktion spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Zellfunktionen, Zelldifferenzierung und Zellproliferation. Sie vermittelt Signale von

außerhalb der Zelle zum Zellkern. Die „mitogen-aktivierte Protein-(MAP)-Kinase“-Kaskade ist einer der Hauptsignaltransduktionswege in der zellulären Antwort auf Stressoren und Pathogene.

Die Transduktionswege über MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases*, oder auch p42/44) werden insbesondere durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren stimuliert, können jedoch ebenfalls über Zytokine aktiviert werden.

Die Proteinkinase B (PKB oder auch Akt) gehört zur Familie der ubiquitär exprimierten Serin/Threonin-Kinasen. PKB wird durch PI3-Kinasen als Antwort auf Mitogene und Überlebensfaktoren aktiviert. PI3-Kinasen sind in die Regulation vielfältiger Zellfunktionen involviert. Dazu gehören u.a. die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, die Histamin Freisetzung, die Aktivierung der Neutrophilen und der Glukoseaufnahme durch den Glut4-Transporter in der Muskulatur. PI3-Kinasen bilden Phospholipide, die als *second messenger* fungieren. Diese sekundären Botenstoffe binden an PKB und ermöglichen eine Bindung der Kinase an die Plasmamembran. Eine daraus resultierende Konformationsänderung ist die Voraussetzung für die vollständige Aktivierung der PKB durch weitere Kinasen. PKB kann dann u.a. die Phosphorylierung eines Translationsrepressors (4E-BP) stimulieren. 4E-BP gehört zu einer Familie von Translationsrepressoren, deren Bindung an ihr Zielmolekül die Überlebensmechanismen der Zelle verstärken (Galetic *et al.*, 1999).

Es konnte nachgewiesen werden, daß HS-1 die Streß-induzierbare p38MAP-Kinase aktiviert. Dieser Effekt könnte auf die Aktivierung eines Enzyms in dieser Signalkaskade zurückführbar sein. Sie ist jedoch unabhängig von der Aktivität der POP, da POP-spezifische Inhibitoren keinen Einfluß auf die p38 MAP-Kinase hatten. Dagegen ließ sich klar zeigen, daß sowohl HS-1 als auch lineares HS-1 die anti-CD3 induzierte Aktivierung der Proteinkinase B hemmen. PKB ist eine durch Wachstumsfaktoren regulierte Kinase, die die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten katalysiert. Sie ist ebenfalls ein wichtiger Mediator der physiologischen Effekte des Insulins (Downward, 1998). Stimulation der PKB-Aktivität schützt die Zellen vor Apoptose durch Phosphorylierung und Inaktivierung des Apoptose-fördernden BAD-Proteins (Galetic *et al.*, 1999). Eine Hemmung der PKB-Aktivität könnte somit ein Ansatz für die Therapie von verschiedenen Krebsarten sein, die durch die Aktivierung von „Überlebens-Signalwegen“ resistent gegen die Behandlung mit Zytostatika sind.

Wie kann POP den PKB-Signalweg beeinflussen?

Abbildung 34 veranschaulicht eine Möglichkeit der Interaktion.

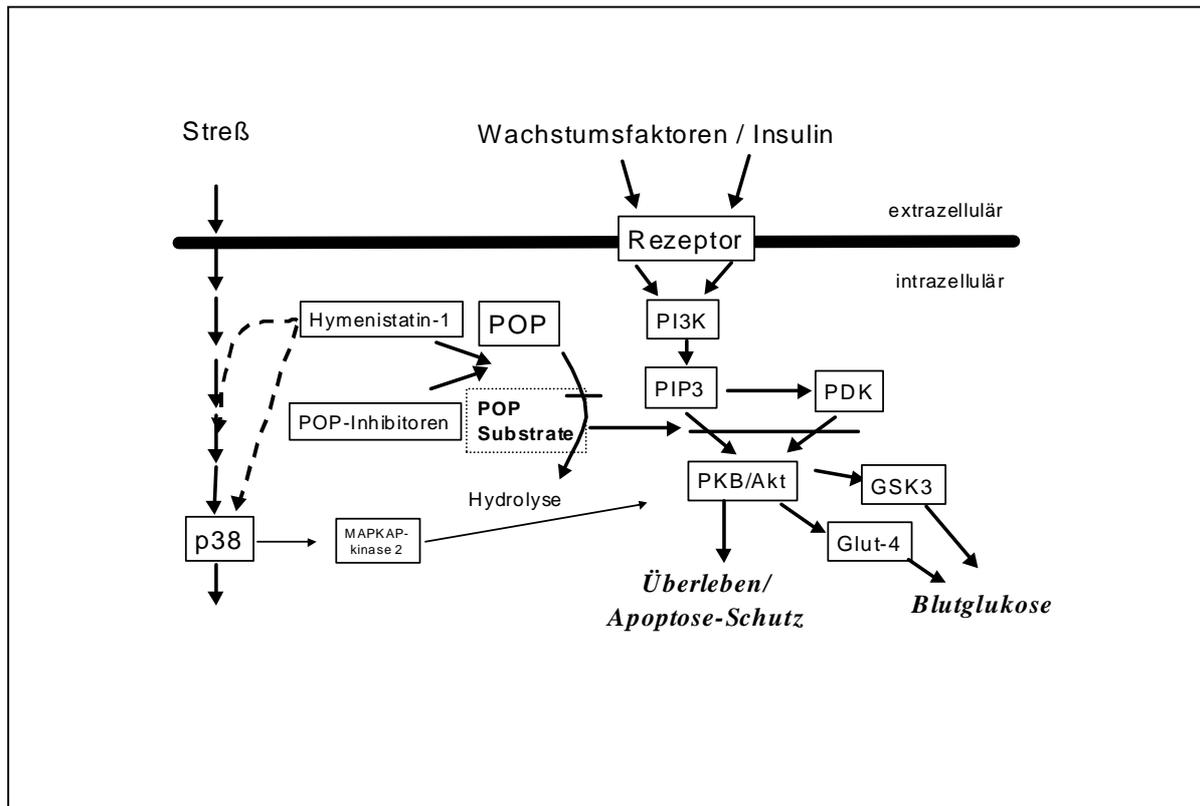


Abbildung 34: Schematische Darstellung eines Modells möglicher Interaktionen zwischen POP, Inhibitoren der POP und Komponenten der über PKB vermittelten Signalkaskade (PIP₃ - Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat; PKB - Proteinkinase B, PDK - PIP₃-dependent kinase, GSK - Glykogensynthase-Kinase 3, Glut 4 - skeletaler Glukose-Transporter 4, PI3K - Phosphoinositid 3-OH Kinase)

Denkbar ist, daß Substrate der POP die Aktivierung der PKB hemmen. Durch POP-katalysierte Hydrolyse können diese Verbindungen inaktiviert werden. Eine Hemmung der POP-Aktivität hätte also eine Hemmung der PKB-Aktivierung zur Folge. Ebenso ist es möglich, daß Hydrolyseprodukte von Substraten der POP für die Aktivierung der PKB notwendig sind. Diese Verbindungen könnten einerseits direkt mit PKB interagieren, z.B. als Bindungspartner, oder sie treten in Wechselwirkung mit PIP₃ bzw. PDK und unterstützen die Aktivierung der PKB durch PIP₃ bzw. PDK. Eine Hemmung der POP-katalysierten Hydrolyse solcher Substrate würde die Aktivierung der PKB verhindern und somit könnten die PKB-vermittelten Signalwege nicht aktiviert werden. Wie POP-vermittelte Effekte auf Signalkaskaden, die Wachstums- und Lebensprozesse kontrollieren, wirken, konnte aus den hier vorgestellten Versuchen nicht geschlußfolgert werden.

Weitere Hinweise darauf, daß POP in Signaltransduktionsprozesse involviert ist, fanden Williams *et al.* (Williams *et al.*, 1999). Die Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* ist durch Lithiumionen (Li⁺) beeinflussbar. Daher wurde *Dictyostelium* als Modellorganismus gewählt,

um den Effekt von Li^+ auf den Organismus zu charakterisieren. Lithiumionen finden in der Behandlung von Depressionen Anwendung. Eine Li^+ -resistente Mutante wurde isoliert und es konnte gezeigt werden, daß dieser Mutante das *Dictyostelium* Prolyl oligopeptidase Gen (dpoA) fehlt. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von POP-Aktivität und dem Anstieg der intrazellulären Inositoltrisphosphat (IP_3)-Konzentration hergestellt werden. In Wildtypzellen wurde durch Inkubation mit einem POP-spezifischen Inhibitor die gleiche Wirkung erzielt. Die IP_3 -Konzentrationserhöhung resultiert aus einer verstärkten Dephosphorylierung von Inositol-(1,3,4,5,6)-Pentakisphosphat. Verminderte POP-Aktivität wirkt der Li^+ verursachten Reduzierung des IP_3 -Spiegels entgegen (Williams *et al.*, 1999). POP beeinflusst also IP_3 -abhängige Signaltransduktionsmechanismen. An welchen Stellen POP in diese Prozesse eingreift und welches ihre Zielmoleküle sind, muß durch weitere Experimente aufgeklärt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Substratspezifität von Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und Prolyloligopeptidase (POP) näher zu charakterisieren. Insbesondere der Einfluß der Aminosäure in P₁-Position von nieder- und höhermolekularen Substraten auf die Affinität und das Katalyseverhalten der Enzyme stand im Mittelpunkt des Interesses.

Die Substrateigenschaften der Peptide der GRF-Familie für DP IV_{Schwein} bzw. für DP IV-ähnliche Aktivitäten humanen Serums wurden mittels MALDI-TOF MS untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß auch die in humanem Serum enthaltene DP IV-ähnliche Aktivität die Hydrolyse von Substraten mit Serin, Valin oder Glycin in P₁-Position katalysiert. Am Beispiel der Peptidhormone der GRF-Familie wurde nachgewiesen, daß die DP IV-katalysierte Hydrolyse der initiale Schritt der Inaktivierung dieser Peptidhormone in der Zirkulation des Organismus ist. Des weiteren konnte *in vitro* durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren gezeigt werden, daß DP IV oder ein Enzym mit DP IV-ähnlicher Aktivität des Serums Glukagon N-terminal verkürzt und damit in seiner biologischen Wirkung terminiert. Untersuchungen zum Effekt endogen verabreichten Glukagons in Wistar-Ratten bestätigen diese Ergebnisse. Mit DP IV-Inhibitor oder mit dem Serum DP IV-negativer Ratten vorinkubiertes und subcutan oder *i.v.* appliziertes Glukagon behielt seine hyperglykämische Wirkung während mit DP IV oder dem Serum von Wistar-Ratten vorinkubiertes Glukagon biologisch inaktiv war.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur erweiterten Substratspezifität der DP IV wurden der Synthese von GIP- und Glukagon-Analoga zugrunde gelegt. Diese Verbindungen wurden durch MALDI-TOF MS und biomolekulare Interaktionsstudien in ihren Substrateigenschaften für DP IV charakterisiert. Da sie schlechte oder keine Substrate der DP IV sind, wurde ihr Einfluß auf den Blutglukosespiegel im Tiermodell untersucht. Bis auf eine Ausnahme führte die Modifikation des N-Terminus des Glukagons zu Analoga mit verminderter Bioaktivität. Lediglich für [D-Ser²]-Glukagon konnte eine erhöhte Potential die Adenylatzyklase zu stimulieren festgestellt werden. Der Austausch des Ala² am GIP N-Terminus reduzierte das Potential des GIP die Adenylatzyklase zu stimulieren drastisch. Unter pharmakologischen Gesichtspunkten kristallisierten sich aus den untersuchten Verbindungen [D-Glu³]-GIP und [Ser²]-GIP als potentielle Antidiabetika heraus.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur erweiterten Substratspezifität der DP IV und POP wurden für modelltheoretische Betrachtungen genutzt, um diese erweiterte Substratspezifität zu erklären. Anhand dieser Theorie kann postuliert werden, daß ein wesentlicher Teil der

Substratspezifität und Selektivität von DP IV und POP auf intramolekulare Wechselwirkungen, insbesondere mit dem C-Terminus höhermolekularer Substrate zurückführbar ist. Es wird auf der Basis eines aus Molekülsimulationsstudien hervorgegangenen Modells der Interaktion von DP IV und Ligand eine zweite sekundäre Bindungsstelle vermutet, die für die Bindung und Katalyse von Substraten mit Serin, Valin, Glycin oder Threonin in P₁-Position essentiell ist. D.h., daß aufgrund von sekundären Wechselwirkungen die Selektivität des Enzyms für Prolin aufgehoben sein kann. Gleichzeitig resultiert daraus die Möglichkeit, die Katalyse von hoch- und niedermolekularen Substraten spezifisch zu beeinflussen.

Erstmalig konnte POP-katalysierte Hydrolyse niedermolekularer Substrate mit Serin und Threonin an P₁-Position nachgewiesen werden. Die kinetischen Konstanten der durch bakterielle POP und POP aus Säugern katalysierten Substratspaltung nieder- und höhermolekularer Peptide unterscheiden sich signifikant. Diese Unterschiede könnten als Ausgangspunkt genutzt werden, um zwischen Isoenzymen bzw. Enzymen aus verschiedenen Quellen durch Inhibitoren differenzieren zu können. Eine derartige Differenzierung würde es erlauben, die Aktivität prolinspezifischer Proteasen invasiver Mikroorganismen selektiv zu beeinflussen ohne die entsprechenden Enzyme des Wirtsorganismus ebenfalls zu hemmen.

Das zyklische Oktapeptid Hymenistatin-1 (HS-1) wurde durch spektrophotometrische Tests und mittels MALDI-TOF MS als kompetitiver Inhibitor der POP charakterisiert. Es ist bekannt, daß HS-1 immunsuppressiv wirkt. Seine zellulären Targets sind bisher jedoch nicht aufgeklärt. Daher wurde der Einfluß von HS-1 auf verschiedene Signalwege in T-Zellen untersucht. Aus diesen Experimenten kann abgeleitet werden, daß POP an der Proteinkinase B-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist.

6 ABSTRACT

The present thesis investigated the substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and prolyloligopeptidase (POP). Thereby, the focus was on the affinity of novel substrates, especially the preference for the amino acid in P₁-position within hormones of the growth hormone-releasing factor (GRF)-family was studied.

Using the MALDI-TOF mass spectrometry, the cleavage of GRF-family peptides by DP IV or DP IV-like activity in human serum was characterized. It has been shown, for the first time, that DP IV-like activity within human serum hydrolyzes peptide bonds after serine, valine or glycine residues. The K_m and k_{cat}/K_m -values of different substrates displayed no correlation to the amino acid in P₁-position. The half-life of the peptides with serine or glycine in P₁-position was 4-fold and 7-fold prolonged compared to alanine, with DP IV and in human serum, respectively. It has been hypothesized that, at least partially, DP IV is responsible for the initially inactivation step of hormones of the GRF-family.

Furthermore, glucagon was found to be truncated by DP IV *in vitro* and in human serum, resulting in an inactivation of biological activity. Based on the obtained results variants of glucagon and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) were designed. Variation of the P₁ and P₁'-position in glucagon resulted in an impaired or abolished truncation by DP IV, as shown by MALDI-TOF mass spectrometry. I.e. the affinity constant (K_D) for glucagon increased at least 10-fold if Ser² have been substituted by phosphoserine or D-serine residues. In addition, using the glucagon variants in an animal model revealed an *in vivo* significance of the presented data.

Using the obtained kinetic data and the X-ray structure of prolyloligopeptidase (POP), a model was developed to explain the observed novel substrate specificity. Presumably intramolecular interactions between the C-terminal part of the oligopeptides and the enzyme are prerequisite for an acceptance of serine, valine or glycine in P₁-position. The existence of a second binding site, contributing to a binding of "non-proline" substrates, has been postulated.

Similar to DP IV, the substrate specificity of prolyloligopeptidase has been investigated. K_m as well as k_{cat} values with various substrates differed between mammalian or bacterial POP. For example the half-life of the corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) was thirty fold shorter incubated with bacterial POP compared to the mammalian enzyme. The K_m value of the initial cleavage step was two order of magnitude higher for bacterial POP.

Using spectrophotometric assays or MALDI-TOF mass spectrometry, it has been shown that the cyclic octapeptide Hymenistatin-1 (HS-1) is a competitive inhibitor of POP ($K_i = 4,71 \pm$

0,40*10⁻⁷M). Knowing that HS-1 exhibits immunosuppressive activity on a unknown cellular target, the influence of this inhibitor on various signaling pathways in T-cells has been studied. The inhibition of POP revealed no specific influence on the extracellular signal-regulated kinase (ERK1 and ERK2) pathways. In contrast, HS-1 as well as specific POP inhibitors repressed the anti-CD3 induced activation of proteinkinase B. The results strongly suggest that POP is involved in the proteinkinase B-mediated signal transduction in T-cells.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbott, C.A., McCaughan, G.W., and 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.
2. Abbott, C.A., McCaughan, G.W., Levy, M.T., Church, W.B., and Gorrell, M.D. (1999). Binding to human dipeptidyl peptidase IV by adenosine deaminase and antibodies that inhibit ligand binding involves overlapping, discontinuous sites on a predicted beta propeller domain. *Eur J Biochem* 266, 798-810.
3. Aeschlimann, D. and Thomazy, V. (2000). Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases [In Process Citation]. *Connect Tissue Res* 41, 1-27.
4. Ahmad, S., Wang, L., and Ward, P.E. (1992). Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 260, 1257-1261.
5. Akrawi, A.F. and Bailey, G.S. (1976). Purification and specificity of prolyl dipeptidase from bovine kidney. *Biochim Biophys Acta* 422, 170-178.
6. Ansorge, S., Bühling, F., Hoffmann, T., Kähne, T., Neubert, K., and Reinhold, D. (1995). DP IV/CD26 on human lymphocytes: Functional roles in cell growth and cytokine regulation. In *Dipeptidylpeptidase IV (CD26) in metabolism and the immune response*. B. Fleischer, ed. (Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 163-184.
7. Bannon, A.W., Seda, J., Carmouche, M., Francis, J.M., Norman, M.H., Karbon, B., and McCaleb, M.L. (2000). Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. *Brain Res* 868, 79-87.
8. Barrett, A.J. (1980). Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem J* 187, 909-912.
9. Barrett, A.J., Rawlings N.D., and Woessner, J.F. (1998). *Handbook of proteolytic enzymes* (London: Academic Press).
10. Barrett, A.J. and Rawlings, N.D. (1992). Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 373, 353-360.
11. Bayliss, W.M. and Starling, E.H. (1902). Mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol (Lond)* 28, 235-334.
12. Bertagna, X. (1994). Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23, 467-485.

13. Beyermann, M., Rothemund, S., Heinrich, N., Fechner, K., Furkert, J., Dathe, M., Winter, R., Krause, E., and Bienert, M. (2000). A role for a helical connector between two receptor binding sites of a long-chain peptide hormone. *J Biol Chem* 275, 5702-5709.
14. Bisswanger, H. (1994). *Enzymkinetik (Theorie und Methoden)* (Tübingen: VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim).
15. Blomqvist, A.G. and Herzog, H. (1997). Y-receptor subtypes--how many more? *Trends Neurosci* 20, 294-298.
16. Blum, H., Eyer, h., and Gross, H.J. (1987). improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
17. Bongers, J., Lambros, T., Ahmad, M., and Heimer, E.P. (1992). Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs. *Biochim.Biophys.Acta* 1122, 147-153.
18. Bordallo, C., Schwencke, J., and Suarez, R.M. (1984). Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 173, 199-203.
19. Bordusa, F. and Jakubke, H.D. (1998). The specificity of prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningoseptum*: Mapping the S' subsites by positional scanning via acyl transfer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6, 1775-1780.
20. Bouras, M., Huneau, J.F., Luengo, C., Erlansson-Albertsson, C., and Tomé, D. (1995). Metabolism of enterostatin in rat intestine, brain membranes, and serum: differential involvement of proline-specific peptidases. *Peptides* 16, 399-405.
21. 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* 72:248-54, 248-254.
22. Brandsch, M., Brandsch, C., Prasad, P.D., Ganapathy, V., Hopper, U., and 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.
23. Brandt, W. (2000). Development of a tertiary-structure model of the C-terminal domain of DPP IV [In Process Citation]. *Adv Exp Med Biol* 477, 97-101.
24. Brenner, S. (1988). The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *NATURE* 334, 528-530.
25. Broder, C.C., Nussbaum, O., Gutheil, W.G., Bachovchin, W.W., and Berger, E.A. (1994). CD26 antigen and HIV fusion? [letter; comment]. *Science* 264, 1156-1159.

26. Brown, J.C. and Pederson, R.A. (1970). A multiparameter study on the action of preparations containing cholecystokinin-pancreozymin. *Scand J Gastroenterol* 5, 537-541.
27. Brzezinska-Slebodzinska, E. and Adamczyk, J. (1979). Partial purification and characterization of the oxytocin-inactivating enzymes from chicken liver. *Acta Biochim Pol* 26, 407-416.
28. Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (1999). Long-lasting antidiabetic effect of a dipeptidyl peptidase IV-resistant analog of glucagon-like peptide-1. *Metabolism* 48, 252-258.
29. Callebaut, C., Krust, B., Jacotot, E., and Hovanessian, A.G. (1993). T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells [see comments]. *Science* 262, 2045-2050.
30. Cebrat, M., Wieczorek, Z., and Siemon, I.Z. (1996). Immunosuppressive activity of hymenistatin I. *Peptides* 17, 191-196.
31. Cheng, H.C., Abdel-Ghany, M., Elble, R.C., and 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.
32. Creutzfeldt, W. (1979). The incretin concept today. *Diabetologia* 16, 75-85.
33. Dalle, S., Smith, P., Blache, P., Le-Nguyen, D., Le Brigand, L., Bergeron, F., Ashcroft, F.M., and Bataille, D. (1999). Miniglucagon (glucagon 19-29), a potent and efficient inhibitor of secretagogue-induced insulin release through a Ca²⁺ pathway. *J Biol Chem* 274, 10869-10876.
34. Damholt, A.B., Kofod, H., and Buchan, A.M. (1999). Immunocytochemical evidence for a paracrine interaction between GIP and GLP-1-producing cells in canine small intestine. *Cell Tissue Res* 298, 287-293.
35. Darmoul, D., Lacasa, M., Baricault, L., Marguet, D., Sapin, C., Trotot, P., Barbat, A., and 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.
36. David, F., Bernard, A.M., Pierres, M., and 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 non-classical serine hydrolases. *J Biol Chem* 268, 17247-17252.
37. Deacon, C.F., Hughes, T.E., and 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.

38. DeMeester, I., Korom, S., Van Damme, J., and Scharp, S. (1999). CD26, let it cut or cut it down [In Process Citation]. *Immunol Today* 20, 367-375.
39. Demuth, H.-U. Studien zur Entwicklung und zum Funktionsmechanismus irreversibler Inhibitoren von Serinproteasen unter besonderer Berücksichtigung post-prolinspaltender Enzyme. 5-107. 1988. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät.
40. Demuth, H.-U. and Heins, J. (1995). On the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. In *Dipeptidyl peptidase IV (CD26) in metabolism and immune response*. B. Fleischer, ed. (pp. 1
41. Dendorfer, A., Vordermark, D., and Dominiak, P. (1997). Degradation of bradykinin by bovine tracheal epithelium and isolated epithelial cells. *Br J Pharmacol* 120, 121-129.
42. Doring, F., Will, J., Amasheh, S., Clauss, W., Ahlbrecht, H., and Daniel, H. (1998). Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J Biol Chem* 273, 23211-23218.
43. Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-267.
44. Duke-Cohan, J.S., Morimoto, C., Rocker, J.A., and Schlossman, S.F. (1995). A novel form of dipeptidylpeptidase IV found in human serum. *J Biol Chem* 270, 14107-14114.
45. Duke-Cohan, J.S., Tang, W., and Schlossman, S.F. (2000). Attractin: a cub-family protease involved in T cell-monocyte/macrophage interactions [In Process Citation]. *Adv Exp Med Biol* 477, 173-185.
46. Dupré, J., Ross, S.A., Watson, D., and Brown, J.C. (1973). Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* 37, 826-828.
47. Durinx, C., Lambeir, A.M., Bosmans, E., Falmagne, J.B., Berghmans, R., Haemers, A., Scharpe, S., and DeMeester, I. (2000). Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* 267, 5608-5613.
48. Engelhardt, H., Beck, W., and Schmitt, T. (1994). *Kapillarelektrophorese* (Braunschweig, Wiesbaden: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH).
49. Ewald, C.A. and Boas, J. (1880). *Virchows archive* 104, 271-305.

50. Fan, H., Meng, W., Kilian, C., Grams, S., and 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.
51. Feller, A.C. and Parwaresch, M.R. (1980). [Selective staining of T-lymphoblastic leukemia cells by glycyl-prolyl-4-methoxy-beta-naphthylamiden-peptidase (DAP IV) (author's transl)]. *Klin Padiatr* 192, 150-153.
52. Ferrario, C.M. and Iyer, S.N. (1998). Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept* 78, 13-18.
53. Filipsson, K., Karlsson, S., and Ahren, B. (1998). Evidence for contribution by increased cytoplasmic Na⁺ to the insulinotropic action of PACAP38 in HIT-T15 cells. *J Biol Chem* 273, 32602-32607.
54. Fischer, W.H. and Spiess, J. (1987). Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3628-3632.
55. Fleischer, B. (1994). CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunology today* 15, 180-183.
56. Frohman, L.A., Downs, T.R., Heimer, E.P., and 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.
57. Fülöp, V., Bocskei, Z., and Polgar, L. (1998). Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* 94, 161-170.
58. Galetic, I., Andjelkovic, M., Meier, R., Brodbeck, D., Park, J., and Hemmings, B.A. (1999). Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase - Significance for diabetes and cancer. *Pharmacol. Ther.* 82, 409-425.
59. Gaymes, T.J., Cebrat, M., Siemion, I.Z., and Kay, J.E. (1997). Cyclolinopeptide A (CLA) mediates its immunosuppressive activity through cyclophilin-dependent calcineurin inactivation. *FEBS Letters* 418, 224-227.
60. Gehlert, D.R. (1998). Multiple receptors for the pancreatic polypeptide (PP-fold) family: Physiological implications. *Proc Soc Exp Biol Med* 218, 7-22.
61. Gelling, R.W., Coy, D.H., Pederson, R.A., Wheeler, M.B., Hinke, S., Kwan, T., and McIntosh, C.H. (1997). GIP(6-30amide) contains the high affinity binding region of GIP and is a potent inhibitor of GIP1-42 action in vitro. *Regul Pept* 69, 151-154.

62. Gelling, R.W., Wheeler, M.B., Xue, J., Gyomory, S., Nian, C., Pederson, R.A., and McIntosh, C.H. (1997). Localization of the domains involved in ligand binding and activation of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Endocrinology* 138, 2640-2643.
63. Gerald, C., Walker, M.W., Criscione, L., Gustafson, E.L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K.E., Vaysse, P., Durkin, M.M., Laz, T.M., Linemeyer, D.L., Schaffhauser, A.O., Whitebread, S., Hofbauer, K.G., Taber, R.I., Branchek, T.A., and Weinschenk, R.L. (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake [see comments]. *NATURE* 382, 168-171.
64. Grondin, G., Hooper, N.M., and LeBel, D. (1999). Specific localization of membrane dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV in secretion granules of two different pancreatic islet cells. *J Histochem.Cytochem.* 47, 489-497.
65. Guo, Y.S., Singh, P., Draviam, E., Greeley, G.H.J., and Thompson, J.C. (1989). Peptide YY inhibits the insulinotropic action of gastric inhibitory polypeptide. *Gastroenterology* 96, 690-694.
66. Gutheil, W.G., Subramanyam, M., Flentke, G.R., Sanford, D.G., Munoz, E., Huber, B.T., and 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.
67. Hasenohrl, R.U., Gerhardt, P., and Huston, J.P. (1990). Substance P enhancement of inhibitory avoidance learning: mediation by the N-terminal sequence. *Peptides* 11, 163-167.
68. Hegen, M., Mittrücker, H.-W., Hug, R., Demuth, H.U., Neubert, K., Barth, A., and Fleischer, B. (1993). Enzymatic activity of CD26 (dipeptidylpeptidase IV) is not required for its signalling function in T cells. *Immunobiol.* 189, 483-493.
69. Heins, J., Welker, P., Schonlein, C., Born, I., Hartrodt, B., Neubert, K., Tsuru, D., and 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.
70. Heymann, E. and Mentlein, R. (1978). Liver dipeptidyl aminopeptidase IV hydrolyzes substance P. *FEBS Lett.* 91, 360-364.
71. Hildebrandt, W., Blech, W., and Kohnert, K.D. (1991). Kinetic studies on hepatic handling of glucagon using the model of non-recirculating perfused rat livers. *Horm Metab Res* 23, 410-413.

72. Hinke, S.A., Pospisilik, J.A., Demuth, H.U., Mannhart, S., Kuhn-Wache, K., Hoffmann, T., Nishimura, E., Pederson, R.A., and McIntosh, C.H. (2000). Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) degradation of glucagon. Characterization of glucagon degradation products and DPIV-resistant analogs. *J Biol Chem* 275, 3827-3834.
73. Hoffmann, T., Faust, J., Neubert, K., and Ansorge, S. (1993). Dipeptidyl peptidase (CD26) IV and aminopeptidase N (CD13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS* 336, 61-64.
74. Hoffmann, T., Reinhold, D., Kähne, T., Faust, J., Neubert, K., Frank, R., and 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. *Journal of Chromatography A* 716, 355-362.
75. Hohenadl, C., Mann, K., Mayer, U., Timpl, R., Paulsson, M., and Aeschlimann, D. (1995). Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminaseC-catalyzed modification. *J Biol Chem* 270, 23415-23420.
76. Holst, J.J. (1996). Glucagon, glucagon-like peptide-1 and their receptors: an introduction. *Acta Physiol.Scand* 157, 309-315.
77. Holst, J.J. and Deacon, C.F. (1998). Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47, 1663-1670.
78. Hopsu-Havu, V.K. and Glenner, G.G. (1966). A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie.* 7, 197-201.
79. Huston, J.P., Hasenohrl, R.U., Boix, F., Gerhardt, P., and Schwarting, R.K. (1993). Sequence-specific effects of neurokinin substance P on memory, reinforcement, and brain dopamine activity. *Psychopharmacology (Berl)* 112, 147-162.
80. Ishino, T., Ohtsuki, S., Homma, K., and 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.
81. Iwaki-Egawa, S., Watanabe, Y., Kikuya, Y., and Fujimoto, Y. (1998). Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem (Tokyo.)* 124, 428-433.
82. Jacotot, E., Callebaut, C., Blanco, J., Krust, B., Neubert, K., and Barth, A. (1996). Dipeptidyl-peptidase IV- β , a novel cell-surface-expressed protein with dipeptidyl-peptidase IV activity. *Eur.J.Biochem.* 239, 248-258.

83. Johnston, J.A., Jensen, M., Lannfelt, L., Walker, B., and Williams, C.H. (1999). Inhibition of prolylendopeptidase does not affect gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in a human neuroblastoma cell line [In Process Citation]. *Neurosci.Lett.* 277, 33-36.
84. Juarranz, M.G., Van Rampelbergh, J., Gourlet, P., de Neef, P., Cnudde, J., Robberecht, P., and Waelbroeck, M. (1999). Vasoactive intestinal polypeptide VPAC1 and VPAC2 receptor chimeras identify domains responsible for the specificity of ligand binding and activation. *Eur J Biochem* 265, 449-456.
85. Kabashima, T., Ito, K., and Yoshimoto, T. (1996). Dipeptidyl peptidase IV from *Xanthomonas maltophilia*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme. *J.Biochem.* 120, 1111-1117.
86. Kabashima, T., Yoshida, T., Ito, K., and 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.
87. Kaspari, A., Diefenthal, T., Grosche, G., Schierhorn, A., and Demuth, H.U. (1996). Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease the cleavage by proline-specific peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1293, 147-153.
88. Kato, A., Fukunari, A., Sakai, Y., and 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.
89. Kato, T., Hama, T., Kojima, K., Nagatsu, T., and Sakakibara, S. (1978b). Excretion of X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase in human urine as determined with a new fluorogenic substrate. *Clin Chem* 24, 1163-1166.
90. Kato, T., Nagatsu, T., Fukasawa, K., Harada, M., Nagatsu, I., and Sakakibara, S. (1978a). Successive cleavage of N-terminal Arg1--Pro2 and Lys3-Pro4 from substance P but no release of Arg1-Pro2 from bradykinin, by X-Pro dipeptidyl-aminopeptidase. *Biochim.Biophys.Acta* 525, 417-422.
91. Kenny, A.J., Booth, A.G., and Macnair, R.D. (1977). Peptidases of the kidney microvillus membrane. *Acta Biol Med Ger* 36, 1575-1585.
92. Kieffer, T.J., McIntosh, C.H., and Pederson, R.A. (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136, 3585-3596.
93. Kiyama, M., Hayakawa, M., Shiroza, T., Nakamura, S., Takeuchi, A., Masamoto, Y., and Abiko, Y. (1998). Sequence analysis of the *Porphyromonas gingivalis* dipeptidyl peptidase IV gene. *Biochim Biophys Acta* 1396, 39-46.
94. Koida, M. and Walter, R. (1976). Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *J Biol Chem* 251, 7593-7599.

95. Kreil, G., Haiml, L., and Suchanek, G. (1980). Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. Evidence for a new type of precursor--product conversion. *Eur J Biochem* 111, 49-58.
96. Kubota, A., Yamada, Y., Yasuda, K., Someya, Y., Ihara, Y., Kagimoto, S., Watanabe, R., Kuroe, A., Ishida, H., and Seino, Y. (1997). Gastric inhibitory polypeptide activates MAP kinase through the wortmannin-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 171-175.
97. Kühn-Wache, K., Manhart, S., Hoffmann, T., Hinke, S.A., Gelling, R., Pederson, R.A., McIntosh, C.H., and Demuth, H.U. (2000). Analogs of glucose-dependent insulinotropic polypeptide with increased dipeptidyl peptidase IV resistance [In Process Citation]. *Adv Exp Med Biol* 477, 187-195.
98. Küllertz, G. Mechanistische Untersuchungen der enzymatischen Peptidhydrolyse am Beispiel der Dipeptidylpeptidase IV gestützt auf nichtenzymatische Hydrolyseuntersuchungen von Peptidarylamiden mit Hilfe von sekundären Deuterium-Isotopieeffekten. 1978. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
99. La Barre, J. and Still, E.U. (1930). Studies on the physiology of secretin. *Am J Physiol* 91, 649-653.
100. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *NATURE* 227, 680-685.
101. Lambeir, A.M., Pereira, J.F.D., Chacón, P., Vermeulen, G., Heremans, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., DeMeester, I., and Scharpé, S. (1997). A prediction of DPP IV/CD26 domain structure from a physico-chemical investigation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta* 1340, 215-226.
102. Lazaro, I., Naniche, D., Signoret, N., Bernard, A.M., Marguet, D., Klatzmann, D., Dragic, T., Alizon, M., and 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.
103. Lojda, Z. (1988). Dipeptidyl peptidases of human lymphocytes. *Czech Med* 11, 181-194.
104. Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Meltzer, H.Y., D'Hondt, P., and Cosyns, P. (1994). Lower serum prolyl endopeptidase enzyme activity in major depression: further evidence that peptidases play a role in the pathophysiology of depression. *BIOLPSYCHIATRY* 35, 545-552.

105. Mannucci, E., Ognibene, A., Cremasco, F., Bardini, G., Mencucci, A., Pierazzouli, E., Ciani, S., Messeri, G., and Rotella, C.M. (2000). Effects of Metformin on Baseline and Oral Glucose-Induced Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in Obese Non-Diabetic Subjects. *Diabetes 49(Suppl. 1)*, Abstract number 472
106. Marguet, D., Baggio, L., Kobayashi, T., Bernard, A.M., Pierres, M., Nielsen, P.F., Ribbel, U., Watanabe, T., Drucker, D.J., and Wagtmann, N. (2000). Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A 97*, 6874-6879.
107. Marguet, D., Bernard, A.M., Vivier, I., Darmoul, D., Naquet, P., and 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.
108. Martin, R.A., Cleary, D.L., Guido, D.M., Zurcher-Neely, H.A., and Kubiak, T.M. (1993). Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) from pig kidney cleaves analogs of bovine growth hormone-releasing factor (bGRF) modified at position 2 with Ser, Thr or Val. Extended DPP-IV substrate specificity? *Biochim.Biophys.Acta 1164*, 252-260.
109. Martinez-Fuentes, A.J., Castano, J.P., GraciaNavarro, F., and Malagon M.M. (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP27 activate common and distinct intracellular signaling pathways to stimulate growth hormone secretion from porcine somatotropes. *Endocrinology 139*, 5116-5124.
110. McDonald, K., Callahan, P.X., Zeitman, B.B., and Ellis, S. (1969). Inactivation and degradation of glucagon by dipeptidyl aminopeptidase I (cathepsin C) of rat liver. *J Biol Chem 244*, 6199-6208.
111. McIntosh, C.H., Bremsak, I., Lynn, F.C., Gill, R., Hinke, S.A., Gelling, R., Nian, C., McKnight, G., Jaspers, S., and Pederson, R.A. (1999). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulation of lipolysis in differentiated 3T3-L1 cells: wortmannin-sensitive inhibition by insulin. *Endocrinology 140*, 398-404.
112. Medeiros, M.d. and Turner, A.J. (1996). Metabolism and functions of neuropeptide Y. *Neurochem Res 21*, 1125-1132.
113. Mentlein, R. (1988). Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett. 234*, 251-256.
114. Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides [In Process Citation]. *Regul.Pept. 85*, 9-24.
115. Mentlein, R., Dahms, P., Grandt, D., and Kruger, R. (1993). Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul Pept 49*, 133-144.

116. Mentlein, R., Gallwitz, B., and Schmidt, W.E. (1993). Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 214, 829-835.
117. Misumi, Y., Hayashi, Y., Arakawa, F., and 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.
118. Miyawaki, K., Yamada, Y., Yano, H., Niwa, H., Ban, N., Ihara, Y., Kubota, A., Fujimoto, S., Kajikawa, M., Kuroe, A., Tsuda, K., Hashimoto, H., Yamashita, T., Jomori, T., Tashiro, F., Miyazaki, J., and Seino, Y. (1999). Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14843-14847.
119. Morgan, L.M. (1996). The metabolic role of GIP: physiology and pathology. *Biochem Soc Trans* 24, 585-591.
120. Morimoto, C., Lord, C.I., Zhang, C., Duke-Cohan, J.S., Letvin, N.L., and 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.
121. Moriyama, A., Nakanashi, M., Takenaka, O., and Sasaki, M. (1988). Porcine muscle endopeptidase: limited proteolysis of tryptic peptides from hemoglobin β -chains at prolyl and alanyl bonds. *Biochimica et Biophysica Acta* 956, 151-155.
122. Morrow, G.W., Kieffer, T.J., McIntosh, C.H., MacGillivray, R.T., Brown, J.C., St.Pierre, S., and Pederson, R.A. (1996). The insulinotropic region of gastric inhibitory polypeptide; fragment analysis suggests the bioactive site lies between residues 19 and 30. *Can J Physiol Pharmacol* 74, 65-72.
123. Nardi, M., Chopin, M.C., Chopin, A., Cals, M.M., and 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.
124. Nauck, M.A. (1998). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* 35, 117-129.
125. Nauck, M.A., Holst, J.J., Willms, B., and 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.
126. Nauck, M.A., Wollschlager, D., Werner, J., Holst, J.J., Orskov, C., Creutzfeldt, W., and Willms, B. (1996). Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* 39, 1546-1553.

127. Nausch, I., Mentlein, R., and Heymann, E. (1990). The degradation of bioactive peptides and proteins by dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 371, 1113-1118.
128. Nomura, K. (1986). Specificity of prolyl endopeptidase. *FEBS Lett.* 209, 235-237.
129. O'Harte, F.P.M., Mooney, M.H., and Flatt, P.R. (1999). NH₂-terminally modified gastric inhibitory polypeptide exhibits amino-peptidase resistance and enhanced antihyperglycemic activity. *Diabetes* 48, 758-765.
130. Odum, L., Petersen, L.J., Skov, P.S., and Ebskov, L.B. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells. *Inflamm.res.* 47, 488-492.
131. Ogata, S., Misumi, Y., Tsuji, E., Takami, N., Oda, K., and Ikehara, Y. (1992). Identification of the active site residues in dipeptidyl peptidase IV by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31, 2582-2587.
132. Ogata, S., Misumi, Y., and 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. *Journal of Biological Chemistry* 264, 3596-3601.
133. O'Harte, F.P.M., AbdelWahab, Y.H.A., Conlon, J.M., and Flatt, P.R. (2000). Amino terminal glycation of gastric inhibitory polypeptide enhances its insulinotropic action on clonal pancreatic B-cells. *Biochim Biophys Acta* 1425, 319-327.
134. Ohneda, A., Ohneda, K., and Koizumi, F. (1992). Insulin releasing action of N-terminal peptides of glucagon in dogs. *Tohoku J Exp Med* 167, 287-295.
135. Ohtsuki, T., Tsuda, H., and Morimoto, C. (2000). Good or evil: CD26 and HIV infection. *J Dermatol Sci* 22, 152-160.
136. Parker, J.C., Andrews, K.M., Rescek, D.M., Masefski, W.J., Andrews, G.C., Contillo, L.G., Stevenson, R.W., Singleton, D.H., and Suleske, R.T. (1998). Structure-function analysis of a series of glucagon-like peptide-1 analogs. *J Pept.Res* 52, 398-409.
137. Pauly, R.P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C.H.S., Pederson, R.A., and 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.

138. Polgar, L. (1992). Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family. *FEBS Lett* 311, 281-284.
139. Polgar, L. and 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.
140. Poulson, M., Hansen, G., Dabelsteen, E., Hoyer, P., Norén, O., and Sjöström, H. (1993). Dipeptidyl peptidase IV is sorted to the secretory granules in pancreatic islet A-cells. *J Histochem Cytochem* 41, 81-88.
141. Proost, P., Struyf, S., Schols, D., Opdenakker, G., Sozzani, S., Allavena, P., Mantovani, A., Augustyns, K., Bal, G., Haemers, A., Lambeir, A.M., Scharpe, S., Van Damme, J., and De, M., I (1999). Truncation of macrophage-derived chemokine by CD26/ dipeptidyl- peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction. *J Biol Chem* 274, 3988-3993.
142. Puschel, G., Mentlein, R., and Heymann, E. (1982). Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem* 126, 359-365.
143. Rao, N.V., Rao, G.V., and Hoidal, J.R. (1997). Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression. *J Biol Chem* 272, 10260-10265.
144. Rawlings, N.D., Polgar, L., and Barrett, A.J. (1991). A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochem.J.* 279, 907-911.
145. Rehfeld, J.F. (1998). The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol.Rev.* 78, 1087-1108.
146. Robberecht, P., Coy, D.H., de Neef, P., Camus, J.C., Cauvin, A., Waelbroeck, M., and Christophe, J. (1986). Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) and N-terminally modified VIP analogs with rat pancreatic, hepatic and pituitary membranes. *Eur J Biochem* 159, 45-49.
147. Schechter, I. and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papan. *Biochem Biophys.Res Commun.* 27, 157-162.
148. Schols, D., Proost, P., Struyf, S., Wuyts, A., De, M., I, Scharpe, S., Van Damme, J., and De Clercq, E. (1998). CD26-processed RANTES(3-68), but not intact RANTES, has potent anti-HIV- 1 activity. *Antiviral Res* 39, 175-187.
149. Schols, D., Proost, P., Struyf, S., Wuyts, A., DeMeester, I., Scharpe, S., VanDamme, J., and DeClercq, E. (1999). CD26-processed RANTES(3-68), but not intact RANTES, has potent anti- HIV-1 activity (Vol 39, pg 175, 1998). *Antivir.Res* 40, 189-190.

150. Scholzen, T., Armstrong, C.A., Bunnett, N.W., Luger, T.A., Olerud, J.E., and Ansel, J.C. (1998). Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp.Dermatol.* 7, 81-96.
151. Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Kaiyala, K.J., and Woods, S.C. (1999). Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Amer.J Clin Nutr.* 69, 584-596.
152. Shinoda, M., Miyazaki, A., and 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.
153. Shinoda, M., Toide, K., Oshawa, I., and Kohsaka, S. (1997). Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid β protein in NG108-15 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 235, 641-645.
154. Shishido, Y., Furushiro, M., Tanabe, S., Taniguchi, A., Hashimoto, S., Yokokura, T., Shibata, S., Yamamoto, T., and Watanabe, S. (1998). Effect of ZTTA, a prolyl endopeptidase inhibitor, on memory impairment in a passive avoidance test of rats with basal forebrain lesions. *Pharm.Res* 15, 1907-1910.
155. Siegel, E.G., Gallwitz, B., Scharf, G., Mentlein, R., MorysWortmann, C., Folsch, U.R., Schrezenmeir, J., Drescher, K., and Schmidt, W.E. (1999a). Biological activity of GLP-1-analogues with N-terminal modifications. *Regul.Peptides* 79, 93-102.
156. Siegel, E.G., Scharf, G., Gallwitz, B., Mentlein, R., MorysWortmann, C., Folsch, U.R., and Schmidt, W.E. (1999b). Comparison of the effect of native glucagon-like peptide I and dipeptidyl peptidase IV-resistant analogues on insulin release from rat pancreatic islets. *Eur J Clin Invest.* 29, 610-614.
157. Smith, R.E., Talhouk, J.W., Brown, E.E., and 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.
158. Stano, J., Kovacs, P., Nemeč, P., and Neubert, K. (1994). Dipeptidyl Peptidase from *Lactococcus lactis* spp. *leactis*: Purification and Properties. *Biologia* 49, 905-910.
159. Strader, C.D., MacIntyre, D.E., Candelore, M.R., and Parker, E.M. (1997). Molecular approaches to the discovery of new treatments for the obesity. *Current Opinions in Chemical Biology* 1, 204-209.

160. Straub, S.G. and Sharp, G.W. (1996). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates insulin secretion via increased cyclic AMP and $[Ca^{2+}]_i$ and a wortmannin-sensitive signalling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 369-374.
161. Struyf, S., Proost, P., Schols, D., DeClercq, E., Opdenakker, G., Lenaerts, J.P., Dethoux, M., Parmentier, M., DeMeester, I., Scharpe, S., and VanDamme, J. (1999). CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemoattractant potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3. *J Immunol* 162, 4903-4909.
162. Stryer, L. (1990). *Biochemie* (Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH).
163. Szeltner, Z., Renner, V., and 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.
164. Szeltner, Z., Renner, V., and Polgar, L. (2000). The noncatalytic beta-propeller domain of prolyl oligopeptidase enhances the catalytic capability of the peptidase domain. *J Biol Chem* 275, 15000-15005.
165. Talor, Z., Emmanouel, D.S., and Katz, A.I. (1983). Glucagon degradation by luminal and basolateral rabbit tubular membranes. *Am J Physiol* 244, F297-F303
166. Tanaka, T., Camerini, D., Seed, B., Torimoto, Y., Dang, N.H., Kameoka, J., Dahlberg, H.N., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1992a). Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26 [published erratum appears in *J Immunol* 1993 Mar 1;150(5):2090]. *J Immunol* 149, 481-486.
167. Tanaka, T., Kameoka, J., Yaron, A., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1993b). The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4586-4590.
168. 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.
169. Tatemoto, K. (1982). Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79, 5485-5489.
170. Taylor, W.L. and Dixon, J.E. (1980). Catabolism of neuropeptides by a brain proline endopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 94, 9-15.
171. Tiruppathi, C., Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Roesel, R.A., Whitford, G.M., and Leibach, F.H. (1990). Hydrolysis and transport of proline-containing peptides in renal brush-border membrane vesicles from dipeptidyl peptidase IV-positive and dipeptidyl peptidase IV-negative rat strains. *J Biol Chem* 265, 1476-1483.

172. Toide, K., Shinoda, M., Iwamoto, Y., Fujiwara, T., Okamiya, K., and Uemura, A. (1997). A novel endopeptidase inhibitor, JTP-4819, with potential for treating alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 83, 147-151.
173. Torimoto, Y., Dang, N.H., Vivier, E., Tanaka, T., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1991). Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J Immunol* 147, 2514-2517.
174. Tsuji, E., Misumi, Y., Fujiwara, T., Takami, N., Ogata, S., and Ikehara, Y. (1992). An active-site mutation (Gly633-->Arg) of dipeptidyl peptidase IV causes its retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 31, 11921-11927.
175. Unger, R.H. and Eisentraut, A.M. (1969). Entero-insular axis. *Arch Intern Med* 123, 261-266.
176. Usdin, T.B., Mezey, E., Button, D.C., Brownstein, M.J., and Bonner, T.I. (1993). *Endocrinology* 133, 2861-2870.
177. Uusitupa, M.I., Karvonen, M.K., Pesonen, U., and Koulu, M. (1998). Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism [editorial]. *Ann.Med* 30, 508-510.
178. Uvnas-Moberg, K., Eklund, M., Hillegaard, V., and Ahlenius, S. (2000). Improved conditioned avoidance learning by oxytocin administration in high-emotional male Sprague-Dawley rats. *Regul Pept* 88, 27-32.
179. Vandermeers, A., Vandeborre, S., Hou, X., de Neef, P., Robberecht, P., Vandermeers-Piret, M.C., and Christophe, J. (1992). Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur J Biochem* 208, 815-819.
180. Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., and Scharpé, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9, 736-744.
181. Viscidi, R.P., Mayur, K., Lederman, H.M., and Frankel, A.D. (1989). Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science* 246, 1606-1608.
182. Vlasak, R., Vilas, U., Strobl, B., and Kreil, G. (1997). cDNA cloning and expression of secreted *Xenopus laevis* dipeptidyl aminopeptidase IV. *Eur J Biochem* 247, 107-113.
183. Walter, R., Shlank, H., Glass, J.D., Schwartz, I.L., and Kerenyi, T.D. (1971). Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* 173, 827-829.

184. Wetzel, W., Balschun, D., Janke, S., Vogel, D., and Wagner, T. (1994). Effects of CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide) and CLIP fragments on paradoxical sleep in rats. *Peptides* 15, 237-241.
185. Wetzel, W., Wagner, T., Vogel, D., Demuth, H.U., and Balschun, D. (1997). Effects of the CLIP fragment ACTH 20-24 on the duration of REM sleep episodes. *Neuropeptides* 31, 41-45.
186. Williams, R.S., Eames, M., Ryves, W.J., Viggars, J., and 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.
187. Yaron, A. and Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* 28, 31-81.
188. Yip, R.G. and Wolfe, M.M. (2000). GIP biology and fat metabolism. *Life Sci* 66, 91-103.
189. Yoshida, K., Inaba, K., Ohtake, H., and Morisawa, M. (1999). Purification and characterization of prolyl endopeptidase from the Pacific herring, *Clupea pallasii*, and its role in the activation of sperm motility. *Develop.Growth Differ.* 41, 217-225.
190. Yoshida, K., Nakajima, S., Ootani, T., Saito, A., Amano, N., Takano, K., Uchiyama, Y., and Haruki, E. (1996). Serum prolyl endopeptidase activities of patients with senile dementia of the alzheimer type and of those with vascular dementia. *J.Clin.Biochem.Nutr.* 21, 227-235.
191. Yoshimoto, T., Kado, K., Matsubara, F., Koriyama, N., Kaneto, H., and Tsuru, D. (1987). Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J Pharmacobiodyn* 10, 730-735.
192. Yoshimoto, T., Miyazaki, K., Haraguchi, N., Kitazono, A., Kabashima, T., and Ito, K. (1997). Cloning and expression of the cDNA encoding prolyl oligopeptidase (prolyl endopeptidase) from bovine brain. *Biol Pharm Bull* 20, 1047-1050.
193. Yoshimoto, T. and Tsuru, D. (1982). Proline-specific dipeptidyl aminopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *J Biochem (Tokyo)* 91, 1899-1906.
194. Zunz, E. and La Barré, J. (1929). Contributions a l'étude des variations physiologiques de la secretion interne du pancreas: relations entre les secretions externe et interne du pancreas. *Arch Int Physiol Biochim* 31, 20-44.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. habil. Hans-Ulrich Demuth für die Überlassung dieses spannenden Themas: Sein Interesse am Fortgang der Versuche und seine rege Diskussionsbereitschaft haben entscheidend dazu beigetragen, daß die Arbeit in der vorliegenden Form entstanden ist.

Herrn Prof. Dietmar Schomburg danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Fachbereich anzufertigen und für seine Unterstützung bei der Lösung vielfältiger „technischer“ Probleme.

Meinen Kollegen der Firma „probiodrug Gesellschaft für Arzneimittelforschung mbH“ danke ich für viele anregende Diskussionen und das stimulierende Arbeitsklima. Ihre Hilfe bei der Erarbeitung und Aneignung neuer experimenteller Methoden waren während der gesamten Promotionszeit sehr wichtig für mich. Insbesondere danke ich Dr. Torsten Hoffmann für die motivierenden Gespräche in so mancher kritischen Phase während der Arbeit im Labor und während der Erstellung der Promotionsschrift.

Herrn Dr. Wolfgang Brandt danke ich sehr herzlich für die modelltheoretischen Betrachtungen zum Katalysemechanismus der DP IV.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises um Prof. R.A. Pederson sei an dieser Stelle für Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Glukagon- und GIP-Fragmente gedankt.

Bei Dr. Thilo Kähne bedanke ich mich für die Hilfe bei der Analyse des Einflusses von Inhibitoren der POP auf verschiedene Signaltransduktionswege.

Ich danke allen Freunden, die mir während der ganzen Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen, stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und mich immer wieder ermutigt haben. Ein großer Dank geht an Dr. Andreas Reichert und Anke Gerhardt für die schnelle und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Meiner Familie – meinem Mann Ulf Wache, meinem Sohn Richard und meiner Schwiegermutter Hannelore Wache – gilt der größte Dank. Ihre liebevolle Geduld und Nachsicht, ihre Anteilnahme an den großen und kleinen Problemen, ihre Freude über Erfolge und ihre spontane Hilfe bei der Bewältigung der Alltagsorganisation waren ein zuverlässiger Rückhalt. Ich danke meinen Eltern für ihre Liebe und alles, was sie mir mit auf meinen Lebensweg gegeben haben. Ohne sie wäre ich diesen Weg nicht gegangen. Leider konnte ich meiner Mutter ihren größten Wunsch nicht mehr erfüllen – das Ende dieser Arbeit zu erleben.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. habil. Dietmar Schomburg betreut worden.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- *Analogs of glucose-dependent insulinotropic polypeptide with increased dipeptidyl peptidase IV resistance*
Kühn-Wache, K.; Manhart, S.; Hoffmann, T. Hinke, S.A.; Gelling, R.; Pederson, R.A.; McIntosh, C.H.; Demuth, H.-U. (2000)
Adv Exp Med Biol 477, 187-195
- *Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) degradation of glucagon. Characterization of glucagon degradation products and DP IV-resistant analogs*
Hinke, S.A.; Pospisilik, J.A.; Demuth, H.-U.; Manhart, S.; Kühn-Wache, K.; Hoffmann, T.; Nishimura, E.; Pederson, R.A.; McIntosh, C.H. (2000)
J Biol Chem 275, 3827-3834
- *Verfahren zur Steigerung des Blutglukosespiegels in Säugern*
Demuth, H.-U.; Hoffmann, T.; Kühn-Wache, K.; Rosche, F. (1999)
EP 0 995 440 A1

LEBENS LAUF

Kerstin Kühn-Wache
 Heinrich-und-Thomas-Mann-Straße 27
 06108 Halle (Saale)

Persönliche Angaben:

- Familienstand: verheiratet, 1 Kind
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Alter: 31 Jahre
- Geburtstag und –ort: 20.02.1969 in Bamako (Mali)

Ausbildung:

09/1975 – 08/1985	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Roßlau
09/1985 – 08/1987	Erweiterte Oberschule (Abiturstufe) in Roßlau
09/1987 – 10/1992	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle
01/1992 – 10/1992	Diplomarbeit zum Thema „Isolation und Charakterisierung einer prolinspezifischen Exopeptidase - Dipeptidylpeptidase II“ unter Anleitung von Dr. J. Heins in der Abteilung Wirkstoff-Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/1992 – 01/1994	wissenschaftliche Mitarbeit im Sonderforschungsprojekt „Prolinspezifische Proteasen – Peptidwirkstoffe als Pharmaka“ (BMFT, Projektträger BEO 0310259A3) unter Leitung von PD Dr. H.-U. Demuth
02/1994 – 10/1994	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Wirkstoff-biochemie des Hans-Knöll-Instituts Jena
11/1994 – 04/1996	Erziehungsurlaub
05/1996 – 03/1998	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Wirkstoff-biochemie des Hans-Knöll-Instituts Jena Beginn der experimentellen Arbeiten zur Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung von Bindungsdomänen humaner Dipeptidylpeptidase IV“ unter Leitung von PD Dr. H.-U. Demuth
seit 04/1998	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Firma probiodrug GmbH in Halle, Fortführung der Dissertationsarbeit

seit SS 2000

Promotiosstudentin im Fach Biologie an der Universität zu
Köln