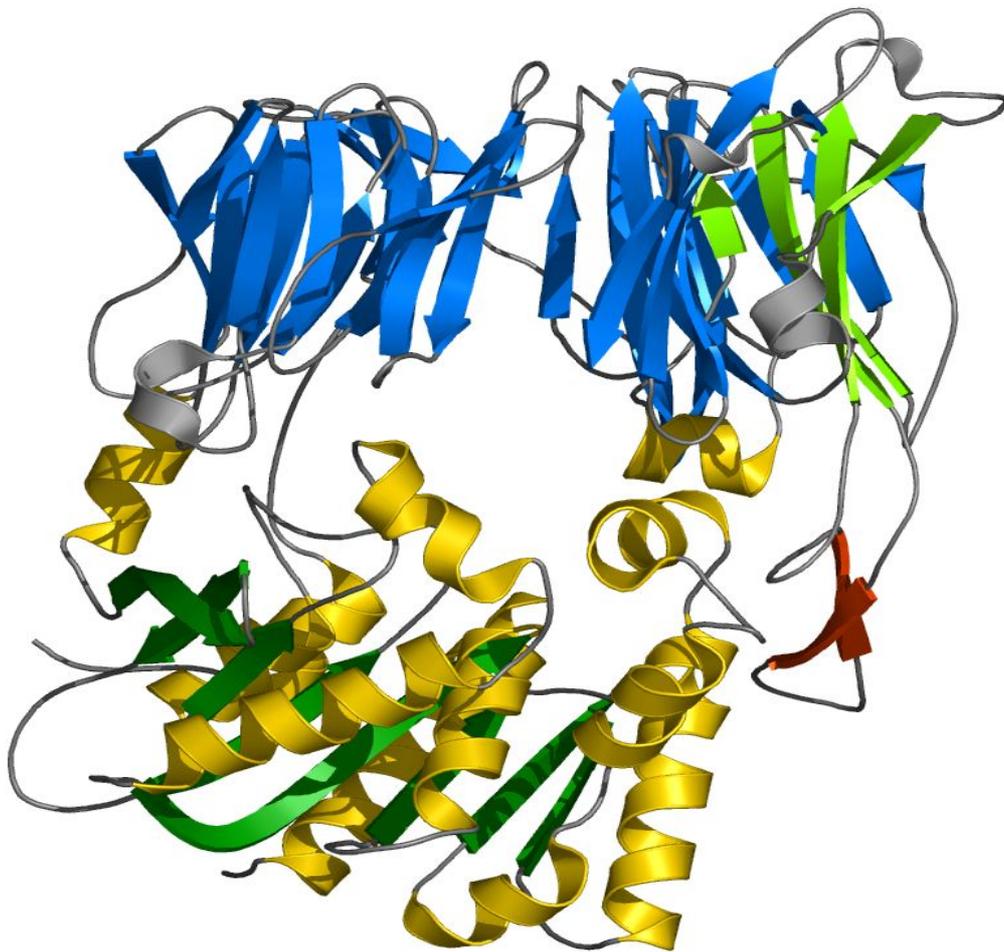


Röntgenstrukturanalyse und funktionelle Untersuchung der Dipeptidylpeptidase IV aus *Sus scrofa*



Michael Engel
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung
D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung für Strukturforschung

Röntgenstrukturanalyse und funktionelle Untersuchung der Dipeptidylpeptidase IV aus *Sus scrofa*

Michael Engel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Steffen J. Glaser
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 04.04.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Chemie am 17.05.2005 angenommen.

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2000 bis Oktober 2004 in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Prof. Dr. *Robert Huber* und Prof. Dr. *Wolfram Bode* durchgeführt.

Beiden möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, ihre stete Diskussionsbereitschaft und großzügige Förderung dieser Arbeit danken. Vor allem die große Freiheit bei der Arbeit und ihre wertvollen Anregungen haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Hinter jeder erfolgreichen Doktorarbeit steht ein Postdoc (frei nach einem deutschen Sprichwort). Der Postdoc, der unbeirrbar an die Lösbarkeit der DP IV-Struktur glaubte, ist Dr. *Hans Brandstetter*. Ich möchte ihm für seine fantastische Betreuung, seinen unermüdlichen Einsatz bei der Strukturlösung und seine herausragende Leistung in der Laufstaffel „Die Knackigen Grufties“, mit der wir gemeinsam erfolgreich als Amateure die Vereinsmannschaften des Landkreises das Rennen lehrten, danken. Er hat mich auf meinem Weg mit viel Wissen und Weisheit geleitet und begleitet.

Mit der Entwicklung des Free-Mounting-Systems wurden viele Projekte in Martinsried erst möglich. Ein besonderer Dank für den unermüdlichen Einsatz bei der Entwicklung und Wartung des Apparats, sowie der Durchführung unserer Experimente gilt Dr. *Reiner Kiefersauer*.

Was wäre die Abteilung ohne ihre TA *Marianne Braun* gewesen. Sie hat der Kristallisation der Proteine bei vielen Projekten auf die Sprünge geholfen. Hierfür einen herzlichen Dank.

Unseren Kooperationspartnern aus Halle von der Firma Probiodrug Dr. *Hans-Ulrich Demuth*, Dr. *Torsten Hoffmann*, Dr. *Leona Wagner*, Dr. *Ulrich Heiser*, Dr. *Susanne Manhardt*, Dr. *Michael Wermann* und Dr. *Joachim Bär* möchte ich für die Reinigung der DP IV, die hervorragenden biochemischen Arbeiten zur Charakterisierung des Proteins, die Synthese und Bereitstellung von Inhibitoren zur Komplexierung der DP IV und den ständigen Informationsaustausch danken.

Für Dr. *Klaus Maskos* möchte ich an dieser Stelle eine Kerze anzünden und einen ganz besonders großen Dank aussprechen. Mit seinem heiteren, optimistischen Naturell war er immer wie ein Leuchtturm in den Stürmen meiner Seefahrt durch die Doktorarbeit. Er hat mir von meinen ersten

Stunden in Martinsried bis zum heutigen Tag mit gutem Rat und Tat zur Seite gestanden und immer ein offenes Ohr für die Probleme eines Doktoranden gehabt. Er verstand es auf seine unkomplizierte Art meine Probleme zu erfassen, meine Bedenken zu zerstreuen und mich aufzuheitern wenn ich mit meinem Latein am Ende war.

In Dr. *Rainer Friedrich* habe ich den Freund gefunden, mit dem ich in allen Lebenslagen Freud und Leid teilte. Er hat die Notwendigkeit der korrekten Kameraführung bei Konferenzen eindrucksvoll unter Beweis gestellt, sowie die außerordentlichen Eigenschaften des *Rattus plueschicus* im Nahkampf bei Fernreisen nachgewiesen. Mit Nachdruck hat er stets auf einem ausgewogenen Verhältnis (3-3-3) beim Weißwurstfrühstück bestanden.

Ein hervorragender Wissenschaftler und ein akribischer Forscher ist Dr. *Peter Goettig*, dem ich meinen Dank für fruchtbare Diskussionen, gute Zusammenarbeit und Freundschaft auch neben der Arbeitszeit aussprechen möchte.

Für die gute Freundschaft während der Doktorarbeit, die so manchen grauen Arbeitsalltag erhellte und die anstrengenden Konferenztage in Tiers verkürzte möchte ich Dr. *Rupert Lang* danken.

„The one and only“ Dr. *John Lee Richardson* hat sich mit seinem „very british english“ beim Korrekturlesen der englischen Texte verdient gemacht.

Dr. *Ulrich Rester* danke ich für die Einführung in die Proteinkristallisation.

Mein Dank gilt auch Dr. *Hans-Georg Beisel* für seine Einführungen in einige kristallographische Programme und die vielen fruchtvollen Diskussionen. Hier seien auch alle „X-People“ erwähnt, die für die Installation und Konfiguration der kristallographischen Software in der Abteilung zuständig sind und ohne deren Engagement die Durchführung kristallographischer Arbeiten nicht möglich wäre. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. *Saulius Grazulis* für die Überlassung vieler äußerst hilfreicher Skripte, die die Arbeit am Computer deutlich vereinfacht und automatisiert haben.

Meine Kollegen Dr. *Martin Augustin*, Dr. *Michael Blaesse*, Dr. *Pablo Fuentes-Prior*, Dr. *Michael Groll*, Dr. *Norman Kairies*, Dr. *Tobias Ullrich*, *Cora Keil*, *Anna Tochowicz*, *Martin Locher* und

Rasso Willkomm sorgten im Büro, dem „Kinderzimmer“, für so manche heitere Stunde und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Den Laborkollegen *Dr. Manuel Than*, *Dr. Ulf Marquardt*, *Dr. Michael Worbs*, *Dr. Michael Koch*, *Katia Wenig*, *Kerstin Rohr* und *Milko Velarde* möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor, ihren fachkundigen Rat und die vielen Anregungen danken.

Den Sekretärinnen *Renate Rüller*, *Gina Beckmann*, *Monika Schneider* und *Monika Bumann* danke ich für ihre immer während freundliche Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten. *Renate Rüller* kümmerte sich nicht nur stets sofort um alle unmöglichen Probleme, sondern hatte auch immer Zeit für ein paar nette Worte.

Werner Dersch und *Ottmar Paul* danke ich für die Wartung und Reparatur der technischen Geräte in der Arbeitsgruppe und ihre Hilfe in praktischen und technischen Fragen. Ohne ihren Einsatz wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch *Dr. Hans Bartunik* und *Dr. Gleb Bourenkow* für die gute Unterstützung während der Aufenthalte am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

Auch die Mitarbeiter des Institutsrechenzentrums *Dr. Harald Lehnert*, *Dr. Bernhard Busch*, *Horst Worsch* und *Günther Franz* möchte ich hier noch erwähnen, die für die Bereitstellung und Wartung der Infrastruktur zur elektronischen Datenverarbeitung zuständig sind.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern für ihre immerwährende Liebe, den starken Rückhalt und für die finanzielle Unterstützung.

Ines möchte ich für ihr Verständnis, ihre Geduld und die vielen wunderschönen Stunden, die ich in den letzten Jahren mit ihr verbringen durfte, danken.

Teile dieser Arbeit wurden oder werden veröffentlicht in:

Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H.-U., & Brandstetter, H. (2003) „The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(9): 5063-8.

Engel, M., Hoffmann, T., Wermann, M., Manhardt, S., Heiser, U., R., Huber, R., Demuth, H.-U. & Bode, W. „Rigidity and Flexibility of Dipeptidyl Peptidase IV: Crystal Structures of and Docking Experiments with DP IV Complexes.“ *Manuskript in Vorbereitung*.

Kongressberichte über Bestandteile dieser Arbeit:

18th, 19th, 20th and 21th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors - Recent Developments - in Tiers, Italy, 2000, 2001, 2003, and 2004: Oral Presentations.

57th Harden Conference - Proteinase Structure and Function in Oxford, UK, 9 - 13 September 2003: Poster Presentation (1st Poster Prize).

Congress of the International Society on Fibrinolysis and Proteolysis (ISFP) in Melbourne, Australia, 21 – 25 March 2004: Oral Presentation (ISFP Special Achievement Award).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1. Proteolyse.....	3
1.1.1. Metalloproteinasen.....	5
1.1.2. Aspartatproteinasen.....	6
1.1.3. Cysteinproteinasen.....	6
1.1.4. Serinproteinasen.....	7
1.2. Dipeptidylpeptidase IV.....	9
1.2.1. Charakterisierung.....	9
1.2.2. Substratspezifität.....	11
1.2.3. Inhibition.....	12
1.2.4. Biologische Bedeutung.....	15
1.3. Kristallographie.....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Chemikalien und Geräte.....	21
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure.....	22
2.2.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
2.2.3. Färben von Proteingelen.....	22
2.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	23
2.3. Biochemische Methoden.....	23
2.3.1. Analytische Ultrazentrifugation.....	23
2.3.2. CD-Spektroskopie.....	23
2.4. Reinigung von DP IV.....	23
2.5. Sequenzierung porciner DP IV cDNA.....	25
2.6. Inhibitor-Synthese.....	25
2.6.1. p-Iodo-Phe-Pyr-CN.....	25
2.6.2. tBuGly-Pro-Ile.....	26
2.6.3. SC3/2.....	27
2.6.4. AEBSF.....	28
2.7. Aktivitätsbestimmung der DP IV.....	28
2.8. Kristallisation und Kristalltransformation.....	28
2.9. Datensammlung und Auswertung.....	30
2.10. Strukturlösung.....	30
2.11. Modellbau und Verfeinerung.....	31

2.12. Analyse des Modells.....	32
2.13. Graphische Darstellung.....	33
2.14. PDB Zugangscodes.....	33
3. Ergebnisse.....	34
3.1. Sequenz der DP IV aus <i>Sus scrofa</i>	34
3.2. Gesamtstruktur und Aufbau der Untereinheiten.....	35
3.2.1. Der β -Propeller.....	38
3.2.2. Die katalytische Domäne.....	41
3.3. Das Aktive Zentrum und die Substraterkennung.....	41
3.3.1. Kristallstruktur des p-Iodo-Phe-pyr-CN -DP IV-Komplexes.....	44
3.3.2. Kristallstruktur des tBuGPI-DP IV-Komplexes.....	45
3.3.3. Kristallstruktur des SC3/2-DP IV-Komplexes.....	48
3.3.4. Kristallstruktur des AEBSF-DP IV-Komplexes.....	49
3.4. Zugang und Austritt des Substrates vom Aktiven Zentrum.....	51
4. Diskussion.....	52
4.1. Oligomerisierung von membrangebundenem und löslichem DP IV.....	52
4.2. Funktionelle Rolle der Oligomerisierung.....	53
4.3. Substratpräferenz und katalytischer Mechanismus.....	53
4.4. Strukturelle Basis der Substratspezifität.....	55
4.5. Rigidität und Flexibilität des aktiven Zentrums.....	56
4.6. Stabilität des tetraedrischen Übergangszustands.....	57
4.7. Vergleich der β -Propeller Architekturen.....	59
4.8. Substrateintritt und Produktaustritt vom aktiven Zentrum.....	59
4.9. Vergleich mit der Prolyloligopeptidase.....	61
4.10. Interaktion mit anderen Komponenten.....	63
4.11. DP IV als pharmakologisches Zielprotein.....	63
A. Anhang.....	65
A.1. Biochemische Daten.....	65
A.2. Kristallographische Daten.....	66
A.3. Kristallographische Begriffe.....	70
A.4. Nomenklatur der Aminosäuren.....	75
A.5. Liste der Verwendeten Abkürzungen.....	76
Abbildungsverzeichnis.....	79
Literaturverzeichnis.....	82

Zusammenfassung

Das membrangebundene Glykoprotein Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) ist ein einzigartiges, multifunktionales Protein, das sowohl als Rezeptor als auch als prolinspezifische Peptidase agieren kann. Für die vorliegende Arbeit wurde die Kristallstruktur des nativen Proteins aus Schweineniere bei einer Auflösung von 1.8 Å sowie der Komplexe desselben mit dem dipeptidischen Substratanalog p-Iodo-Phe-Pyr-CN (2.8 Å), dem Tripeptid tButyl-Gly-Pro-Ile (2.7 Å), dem Piperazinderivat 7-Benzyl-1,3-dimethyl-8-piperazin-1-yl-3,7-dihydro-purin-2,6-dion (2.1 Å), und dem Sulfonylfluorid 4-(2-Aminoethyl)-benzen-sulfonylfluorid (2.0 Å) bestimmt. Die Kristallstrukturen enthalten jeweils vier Monomere pro asymmetrischer Einheit in einer 2–2–2 symmetrischen, tetrameren Anordnung. Die Tetramerisierung der DP IV stellt einen Schlüsselmechanismus dar, der die Wechselwirkung mit anderen Zellkomponenten regelt. Jede Untereinheit besteht aus zwei strukturellen Domänen, einer N-terminalen β -Propeller-Domäne mit „offener Velcro“-Topologie und einer C-terminalen α/β -Hydrolasedomäne. Mit Hilfe des kovalent an das aktive Zentrum bindenden dipeptidischen Inhibitors p-Iodo-Phe-Pyr-CN konnten Schlüsselstellen der Substraterkennung, wie das Glu205–Glu206 Leitmotiv, welches die Aminopeptidaseaktivität der DP IV kennzeichnet, und die Oxyaniontasche, die den P₁-Carbonyl-Sauerstoff für die postproline Spaltung bindet und aktiviert, bestimmt werden.

Die Flexibilität bzw. Rigidität des aktiven Zentrums und ihr Einfluß auf die Substrathydrolyse konnte durch die weiteren Inhibitorstrukturen gezeigt werden. Das Piperazin- und das Sulfonylsäure-Derivat bilden eine kompakte Packung mit dem aktiven Zentrum der DP IV, die eine Ver-

schiebung der Seitenketten des katalytischen Ser630 und des räumlich benachbarten Tyr547 zur Folge hat. Das Tripeptid ist wie ein echtes Substrat über starke Interaktionen seiner α -Ammoniumgruppe und der P₁-Pro-Seitenkette unter Bildung eines tetraedrischen Intermediats mit dem Ser630 O γ gebunden. Der Grund für die Stabilität des Intermediats liegt in der Stabilisierung der His740-Imidazoliumgruppe durch die benachbarte Carboxylgruppe vom C-Terminus des Substratanlogs, die einen Protontransfer zur Abgangsgruppe verhindert. Mit Hilfe der Kristallstrukturen konnten Modelle für den Eintritt der Substrate in das abgeschirmte aktive Zentrum sowie den Austritt der Reaktionsprodukte erstellt werden.

1. Einleitung

1.1. Proteolyse

Die durch eine Peptidase katalysierte hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung wird Proteolyse genannt. Man unterscheidet zwei Kategorien:

- limitierte Proteolyse: Eine Proteinase spaltet eine einzige oder nur wenige, meist sehr spezifische Peptidbindungen eines Zielproteins, was zu dessen Aktivierung oder Prozessierung führt (Hubbard, 1998).
- unlimitierte Proteolyse: Proteine werden in ihre Aminosäurebestandteile oder kleine Peptide zerlegt. Dafür werden sie normalerweise in höheren Eukaryonten zuerst an das Protein Ubiquitin gekoppelt, was sie für schnelle ATP-abhängige Hydrolyse durch das Proteasom markiert (Glickman & Ciechanover, 2002). Sie können jedoch auch in ein Zellkompartiment wie Lysosomen transferiert werden, wo sie durch verschiedene Enzyme schnell abgebaut werden (Pillay et al., 2002).

Die *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) schlug 1984 die Verwendung des Begriffs „Peptidase“ für die Enzymuntergruppe der Peptidbindungshydrolyasen vor (EC 3.4). Der weitverbreitete Name „Protease“ ist damit synonym. Eine Exopeptidase (EC 3.4.11-19) spaltet eine oder nacheinander wenige Aminosäuren vom N- oder C-Terminus eines Substrates ab, eine Endopeptidase (EC 3.4.21-99) hydrolysiert interne Peptidbindungen abseits des N- oder C-Terminus. Die Endopeptidasen werden auch Proteinasen genannt (Barrett et al., 1998).

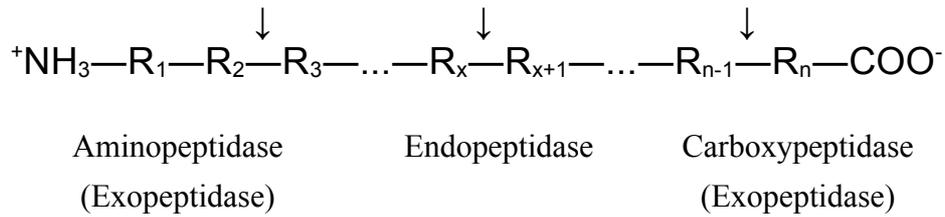


Abbildung 1: Spaltstellen verschiedener Peptidasen

Zur Hydrolyse der Peptidbindung wird ein Protonenüberträger und ein Nukleophil benötigt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind fünf mechanistische Proteinaseklassen bekannt: Metallo-, Aspartat-, Cystein-, Threonin- und Serin-Proteinasen. Die jeweiligen Mechanismen unterscheiden sich fundamental. Bei Serin-, Threonin- und Cystein-Proteinasen ist das Nukleophil Teil der Seitenkette des aktiven Serins, Threonins bzw. Cysteins, bei Aspartat- und Metalloproteinasen jedoch ein aktiviertes Wassermolekül.

Die Nomenklatur zur Beschreibung der Bindetaschen zur spezifischen Erkennung eines Substrats wurde 1967 eingeführt (Schechter & Berger 1967). Die Bindetaschen (subsites) für die Aminosäuren des Substrats werden mit dem Buchstaben S bezeichnet, während die Aminosäuren, die dort binden, P genannt werden. Von der zu spaltenden Peptidbindung in Richtung des N-Terminus werden die Aminosäuren mit P₁, P₂, P₃ usw. durchnummeriert. Für die Bezeichnung in Richtung des C-Terminus werden die Symbole P₁' , P₂' , P₃' usf. verwendet. Die zu spaltende Bindung (↓) liegt somit zwischen P₁ und P₁' . Entsprechend werden die Bindetaschen ...S₃ S₂ S₁ ↓ S₁' S₂' , S₃'... genannt:

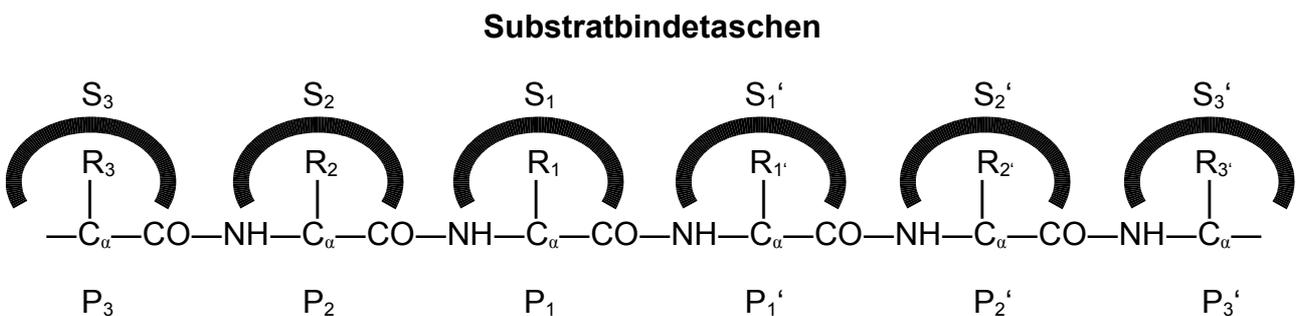


Abbildung 2: Nomenklatur von Substratbindetaschen und Substratresten nach Schechter und Berger

1.1.1. Metalloproteinasen

Metalloproteinasen besitzen ein katalytisch aktives, zweiwertiges Kation (Zn^{2+}), das die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung noch stärker polarisiert und damit die nukleophile Attacke auf die Peptidbindung durch ein glutamatgebundenes Wasser ermöglicht. Oft ist das Zinkion durch zwei Histidinreste (meist in der Sequenz HEXXH) und ein Glutamat (z.B. Thermolysin) bzw. ein drittes Histidin (z.B. Astacin) gebunden, es gibt jedoch auch andere Möglichkeiten zur Bindung von Kationen (Hooper, 1994).

Die Metzincine sind eine Untergruppe der Metalloproteinasen, die Zink über das verlängerte Motiv HEXXHXXGXXH binden. Alle Metzincine besitzen ein konserviertes Methionin (im sogenannten „Met-turn“), das zur Stabilisierung des aktiven Zentrums beiträgt, und eine typische Faltung in ein fünfsträngiges β -Faltblatt und drei α -Helices (Bode et al., 1996; Stöcker & Bode, 1995).

Die Matrix-Metalloproteinasen (Matrixine, MMPs) sind eine Untergruppe der Metzincine und zerfallen in vier Gruppen, je nach Substratspezifität oder Domänenstruktur. Alle MMPs außer den beiden kleinsten (Matrilysin und MMP26) enthalten eine Hämopexin- (oder Vitronectin-) artige Domäne, die mit der katalytischen Domäne über ein prolinreiches Scharnier verbunden ist und zur Substraterkennung beiträgt (McCawley & Matrisian, 2001). Eine Untergruppe, die der MT-MMPs (MMP14-17, 24-25), zeichnet sich durch eine C-terminale Transmembrandomäne bzw. eine GPI-Erkennungsregion aus. Dadurch kommt die katalytische Domäne auf der Zelloberfläche zu liegen, wo sie unter anderem pro-Gelatinase A aktiviert (Johnson et al., 1998). Die MMPs werden durch mindestens vier physiologische Inhibitoren reguliert (*tissue*-Inhibitoren der Metalloproteinasen, TIMPs), von denen jeder eine spezifische Rolle zu spielen scheint (Fassina et al., 2000).

Die ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase domain*) sind eine Familie von mehr als 21 Mitgliedern, die in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen involviert sind. Sie alle besitzen eine Pro-, eine Metalloproteinasen-, eine disintegrinartige, eine cysteinreiche, eine EGF-artige, eine Transmembran- und eine cytoplasmatische Domäne (Wolfsberg et al., 1995). Durch Wechselwirkungen

von ADAMs mit Integrinen werden Zellen in Kontakt mit anderen Zellen oder extrazellulärer Matrix gebracht. Die katalytischen Domänen der ADAMs gehören zur Familie der Reprolysinen oder Adamalysinen mit einem konservierten HEXGHXXGXXHD-Motiv (Primakoff & Myles, 2000).

1.1.2. Aspartatproteinasen

Die meisten Aspartatproteinasen gehören zur Pepsin-Familie, die sowohl Verdauungsenzyme wie Pepsin und Chymosin als auch das lysosomale Kathepsin D sowie prozessierende Enzyme wie Renin umfasst. Eine zweite Familie enthält virale Proteinasen (Retropepsine, z.B. HIV-Proteinase; Rawlings & Barrett, 1995). Aspartatproteinasen bestehen aus zwei homologen, meist durch Genduplikation entstandenen Domänen, zwischen denen die Aminosäuren des aktiven Zentrums angeordnet sind (Tang et al., 1978). Jede Domäne trägt einen Aspartylrest zur katalytischen Dyade bei, Asp32 und Asp215 in Pepsin-Nummerierung. Eines der beiden Aspartate ist bei dem für die Katalyse idealen pH-Wert ionisiert, das andere nicht. Retropepsine sind jedoch Monomere und dimerisieren zu ihrer Aktivierung. Die nukleophile Attacke erfolgt über zwei gleichzeitige Protonenübertragungen: von einem Wassermolekül zur katalytischen Dyade und von der Dyade auf den Carbonyl-Sauerstoff des Substrats unter Spaltung der Peptidbindung. Diese Säure-Base-Katalyse („*push-pull*“-Mechanismus) verläuft über einen nicht-kovalenten tetraedrischen Übergangszustand (Polgar, 1987).

1.1.3. Cysteinproteinasen

Zu den Cysteinproteinasen gehören neben den Legumainen, Gingipainen und Caspasen die papain-ähnlichen Cysteinproteinasen, die lysosomalen Kathepsine B, H, L und S in Säugetieren, die cytosolischen Calcium-aktivierten Calpaine sowie Proteinasen aus Parasiten (z.B. Trypanosoma; Rawlings & Barrett, 1994). Beim Katalysevorgang, an dem ein Cystein (Cys25 in der Papain-Nummerierung) und ein Histidin (His159) beteiligt sind, bildet sich ein kovalentes tetraedrisches Zwischenprodukt (Angelides & Fink, 1979). Die Thiolation von Cys25, die als Nukleophil fungiert, wird durch die

Bildung eines Ionenpaars mit der benachbarten Imidazoliumgruppe von His159 stabilisiert (Polgar, 1974).

1.1.4. Serinproteinasen

In die Klasse der Serinproteinasen gehören z.B. Säugerenzyme wie Chymotrypsin, Trypsin, Elastase oder Kallikrein, die Furine, viele bakterielle Proteinase (z.B. Subtilisin) und die α/β -Hydrolasen.

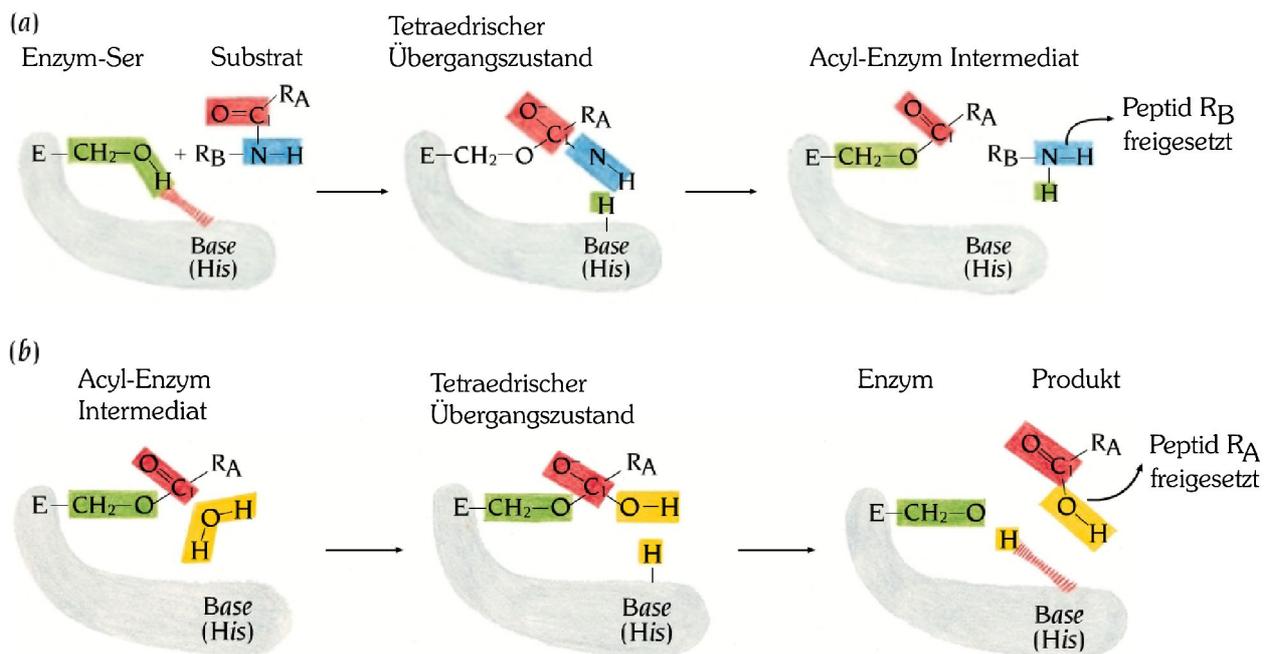


Abbildung 3: Mechanismus der Peptidbindungsspaltung bei Serinproteinasen. (a) Bildung des Acyl-Enzym-Intermediats. (b) Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediats. (Entnommen aus Branden & Tooze, 1999)

Drei Reste sind für die Katalyse essentiell: Serin, Histidin und Aspartat. Sie bilden die sogenannte „katalytische Triade“ (Dodson & Wlodawer, 1998). Der erste katalytische Schritt ist eine Acylierung, wobei über einen negativ geladenen tetraedrischen Übergangszustand unter Spaltung der Peptidbindung ein kovalentes Acyl-Enzym-Zwischenprodukt zwischen dem Substrat und dem Serin entsteht. Bei der Deacylierung erfolgt ein nucleophiler Angriff eines Wassermoleküls auf diesen labilen Komplex, wobei das Peptid freigesetzt und die Hydroxylgruppe des Serins wiederhergestellt wird. Histidin agiert als Base und übernimmt ein Proton vom reaktiven Serin (Kraut, 1977).

Die erste dreidimensionale Kristallstruktur einer chymotrypsinartigen Serinproteinase wurde 1967 von α -Chymotrypsin bestimmt (Matthews et al., 1967). Aus diesem Grunde dient die Struktur dieses Enzyms als Referenz und die Nummerierung seiner Aminosäuren (beginnend mit 16) wird verwendet, um topologisch äquivalente Aminosäuren in anderen Proteinen der Familie zu bezeichnen (Chymotrypsinogen-Nummerierung). Dabei erhalten hinsichtlich Chymotrypsinogen inserierte Reste ein Buchstabensuffix (A, B, C ...).

Chymotrypsinartige Proteinase besteht aus zwei sechssträngigen antiparallelen β -Faltblättern (β -Barrel), die in einem *Greek-Key*-Motiv angeordnet sind (β 1-4), gefolgt von einer antiparallelen Haarnadelschleife (β 5/6). An der Grenze zwischen den beiden *Barrels* liegen die Reste der katalytischen Triade, wobei His57 und Asp102 in Subdomäne I, Ser195 aber in Subdomäne II liegen (Blow, 1968). Die Rückgrat-Amide von Xaa193 und Ser195 bilden die sogenannte „Oxyaniontasche“ (Robertus et al., 1972), in die die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung zu liegen kommt.

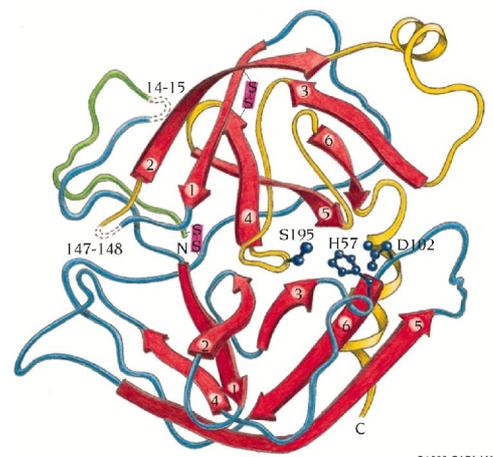


Abbildung 4: Faltung von α -Chymotrypsin (Entnommen aus Branden & Tooze, 1999)

Diese Arbeit wird sich mit einer Serinproteinase, der Dipeptidylpeptidase IV, beschäftigen

1.2. Dipeptidylpeptidase IV

1.2.1. Charakterisierung

Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26, ADAbp, EC 3.4.1.2.5) ist eine multifunktionale Serinexopeptidase, die aufgrund ihrer Sekundärstruktur in der katalytischen Domäne zu den α/β -Hydrolasen gehört. Durch ihre Sequenzhomologie um den Serylrest im aktiven Zentrum, der Anordnung der katalytischen Triade und der Strukturhomologie im C-terminalen Teil wird die DP IV zusammen mit der Prolyl oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26) und der Acylaminoacylpeptidase (EC 3.4.19.1) in die Prolyl oligopeptidase-Familie (S9) eingeordnet (Rawlings et al., 2004). Sie wurde von Hopsu-Havu und Glenner (1966) erstmals aus Rattenleber isoliert. In späteren Arbeiten wurde ihre Lokalisierung in Bakterien, Pilzen, Insekten und Pflanzen beschrieben (Yoshimoto & Tsuru, 1982; Bordallo et al., 1984; Beauvais et al., 1997; Casey & Meyer, 1985; Tsakalidou et al., 1998; Kreil et al., 1980; Stano et al., 1994; Stano et al., 1997). Bei Säugern konnte die DP IV unter anderem in der Placenta, Niere, Leber, Pankreas und im Serum nachgewiesen werden. Dabei findet man besonders hohe Konzentrationen in den Bürstensaummembranen des Verdauungstraktes und in den proximalen Tubuli der Niere (Yaron & Naider, 1993).

Die homodimere, membranständige Form der DP IV gehört zur Klasse der integralen Membranproteine vom Typ II (Hong & Doyle, 1990). Das Molekulargewicht des Monomers wurde in Abhängigkeit von der Spezies, der Herkunft des Gewebes und dem Grad der Glykosylierung mit 110 kDa bis 150 kDa (Wolf et al., 1978; Ikehara et al., 1994; Kahne et al., 1996) beschrieben.

Die N-glykosidisch mit dem Protein verbundenen Zucker (Bartles et al., 1985; Yamashita et al., 1988) machen einen Anteil von 10 % bis 27 % der Protease aus (Erickson & Kim, 1983; Bartles et al., 1985). Durch gezielte Punktmutationen potentieller Glykosylierungsstellen konnte die Abhängigkeit der biologischen Stabilität und Proteinfaltung, sowie die enzymatische Aktivität und die Zielsteuerung der DP IV innerhalb der Zelle von der domänenspezifischen Glykosylierung nachgewiesen werden (Fan et al., 1997).

Das katalytisch aktive Dimer besteht aus zwei von einander unabhängigen Einheiten mit jeweils vollständigen aktiven Zentren, die durch elektrostatische Wechselwirkungen miteinander verbunden sind (Kullertz et al., 1978). Die Tertiärstruktur unterteilt das Monomer in fünf funktionelle Domänen. Am N-Terminus befindet sich die kurze, hochkonservierte, aus 6 Aminosäuren bestehende cytosolische Domäne, gefolgt von einer 22 Reste langen Transmembrandomäne (Reutter et al., 1995). Die über ein flexibles Segment mit dem Membrananker verbundene, 738 Aminosäuren zählende extrazelluläre Region unterteilt sich in drei weitere Domänen: eine glykosylierte Domäne mit neun potentiellen Glykosylierungsstellen, eine cysteinreiche Domäne und die C-terminale katalytische Domäne (Marguet et al., 1992) (Abb. 5).

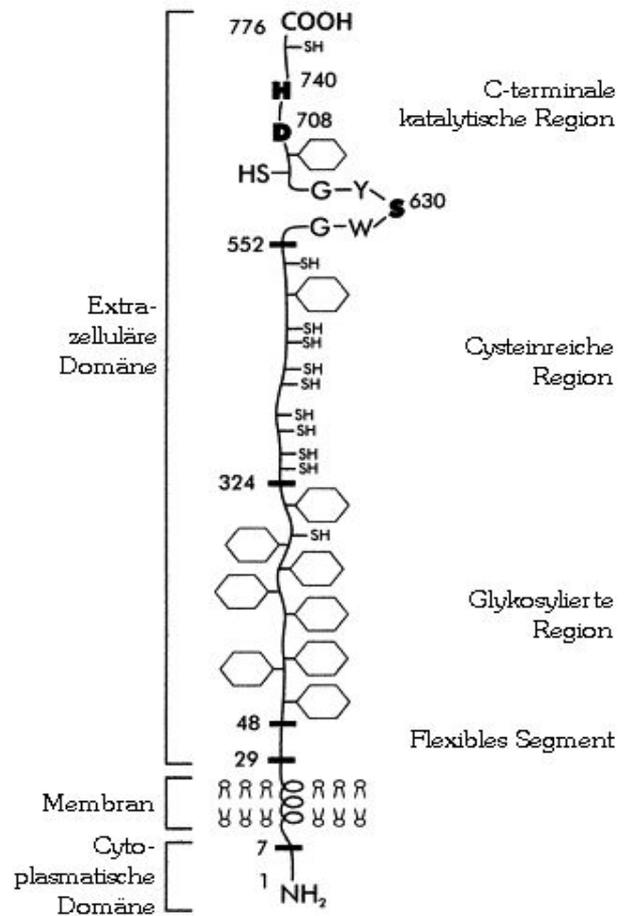


Abbildung 5: Das Fünf-Domänenmodell der DP IV (Entnommen aus Mentlein, 1999).

Die cDNA-Sequenz der DP IV weist zwischen Pro- und Eukarionten eine Homologie von ca. 30 % auf (Kabashima et al., 1996; Kajiyama et al., 2002). Innerhalb der Eukarionten ist sie mit 85-92 % deutlich konservierter (Reutter et al., 1995; Misumi et al., 1992; Darmoul et al., 1992).

Durch gezielte Punktmutation innerhalb stark konservierter Bereiche der katalytischen Domäne wurde die katalytische Triade (Ser630, Asp708, His740) identifiziert (Ogata et al., 1992; David et al., 1993). Die typische Konsensussequenz von Serinproteasen, Esterasen und Lipasen Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly konnte um das katalytisch aktive Ser630 nachgewiesen werden (Brenner, 1988; Polgár, 1992). Die DP IV ist als Serinprotease durch die klassischen Serinprotease-Inhibitoren Diisopropylfluorophosphat und Phenylmethylsulfonylfluorid inaktivierbar (Kenny et al., 1976). Die

Anordnung der katalytischen Triade und der Katalysemechanismus unterscheiden sie aber von den Serinproteasenfamilien der Subtilisine (S8; Asp, His, Ser) und Chymotrypsine (S1; His, Asp, Ser), (Brandt et al., 1996; Rawlings et al., 1991).

Neben dem membrangebundenen Enzym konnten auch lösliche Formen der DP IV aus humanem Urin (Chikuma et al., 1990) und Serum (Hino et al., 1975) isoliert werden. Zur Herkunft der DP IV-Aktivität im Serum gibt es verschiedene Modelle. Nach Duke-Cohan und Morimoto (1995, 1996) handelt es sich um ein DP IV-ähnliches Protein (DPPTL/ Attractin) mit einem Molekulargewicht von 175 kDa, das durch Stimulation von T-Zellen freigesetzt wird. Dagegen wurde von Durinx und Mitarbeitern (Durinx et al., 2000) gezeigt, daß 95% der Serum-DP IV-Aktivität bezüglich ihrer biochemischen, enzymatischen und antigenischen Eigenschaften dem CD26 zuzuordnen sind. Die in der Literatur erwähnten T-Zelloberflächenproteine 1F7, Tp103, Ta1 (Morimoto et al., 1989; Hegen et al., 1990) und CD26 sind identisch mit der DP IV (von Bonin et al., 1998).

1.2.2. Substratspezifität

Die DP IV spaltet Xaa-Pro-Dipeptide am N-Terminus von Oligo- und Polypeptiden ab. In der P₁-Position akzeptiert sie neben Prolin auch Ala, Pip, Hyp (mit einer katalytischen Effizienz von $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 10^3$ bis $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und Dhp (Heins et al., 1988) sowie in ihrer Ringgröße variierende prolinanalogue Reste ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 10^5$ bis $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Rahfeld et al., 1991a). Zusätzlich toleriert sie in P₁ Abu ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) Ser, Val, Gly ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und Leu ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Bongers et al., 1992). Darüber hinaus hydrolysiert die DP IV aus Schweineinier auch synthetische Derivate des Growth-Hormone-Releasing-Factor (Somatoliberin) aus Rind mit Threonin in P₁-Stellung (Martin et al., 1993). Dipeptidische p-Nitroanilide mit Glycin und Alanin in P₁-Position, sowie deren N-alkylierte Derivate werden nach Ergebnissen von Schutkowski (Schutkowski et al., 1994) ebenfalls gespalten.

In der P₁'-Position akzeptiert die DP IV alle Aminosäuren mit Ausnahme von Pro, Hyp, N-alkylierte Reste und D-Aminosäuren (Kenny et al., 1976). Prolylreste in P₁' führen zum Verlust der

internen Wasserstoffbrücke vom Stickstoff der P₁'-Aminosäure zum Carbonyl-Sauerstoff der P₂-Aminosäure (Brandt et al., 1996) (siehe Abb. 21C).

In der P₂-Position werden alle proteino-genen Aminosäuren akzeptiert, jedoch mit einer deutlichen Bevorzugung von Resten mit einer hydrophoben oder verzweigten Seitenkette (Heins et al., 1988). Substrate, mit in P₂-Positi-on phosphorylierten Aminosäuren (Kaspari et al., 1996) oder Peptide, die eine Thioxoaminoa-

cylprolyl-Bindung enthalten (Schutkowski et al., 1994), werden im Vergleich zu den entspre-chenden nichtphosphorylierten bzw. eine Amidbindung enthaltenden Peptiden um bis zu drei Grö-ßenordnungen schlechter durch die DP IV hydrolysiert.

Als Voraussetzung für die Substraterkennung muß die Aminosäure in P₁ in L-Konfiguration vorliegen. Dies gilt auch für die Aminosäure in P₂, wenn Pro in P₁ gebunden wird. Bei Ala in P₁ werden auch D-Aminosäuren in P₂ toleriert (Heins et al., 1988). Neben einem ungeschützten, pro-tonierten N-Terminus (Heins et al., 1988), muß für eine effektive Substrathydrolyse die Konformati-on der Peptidbindung zwischen P₂-P₁ in trans vorliegen (Fischer et al., 1983). Als bisher größtes na-tives Substrat der DP IV wurde das Chemokin RANTES mit 68 Aminosäuren beschrieben (Ora-vecz et al., 1997; Proost et al., 1998b).

1.2.3. Inhibition

Die DP IV wird als Serinprotease von klassischen Serinproteaseinhibitoren wie Diisopropylfluo-rophosphat (DFP,) (Barth et al., 1974; Kenny et al., 1976) irreversibel aber unspezifisch gehemmt. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS) und Diethyl-p-nitrophenylphosphat sind deutlich weniger

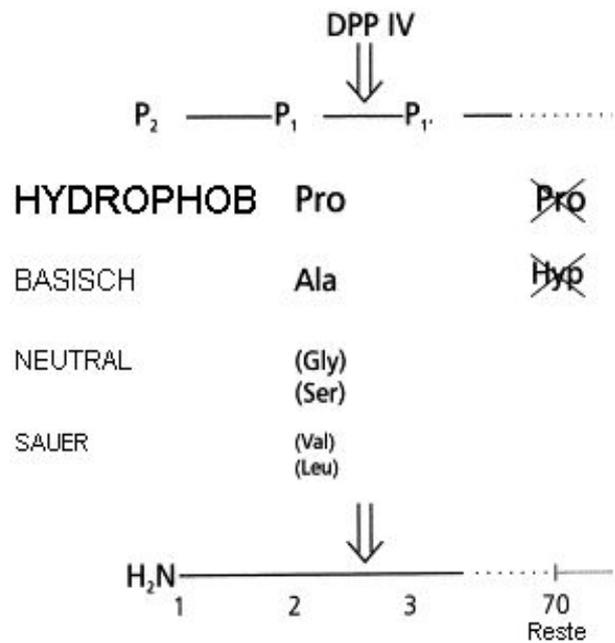


Abbildung 6: Substratspezifität der DP IV. (Entnommen aus Mentlein, 1999).

wirksam (Kenny et al., 1976; Yoshimoto & Tsuru, 1982; Shibuya-Saruta et al., 1996). Schwermetalle wie Zink, Cadmium, Quecksilber und Blei inhibieren die Enzymaktivität der DP IV ebenfalls (Barth et al., 1974; Bella et al., 1982; Püschel et al., 1982). Die einzigen bekannten natürlichen Inhibitoren der DP IV sind neben den Xaa-Pro- und Xaa-Ala-Dipeptiden das HIV-1 Tat-Protein (Wrenger et al., 1997) und der N-Terminus des TXA₂-Rezeptors (Wrenger et al., 2000). Ihre inhibitorische Wirkung ist auf die N-terminale Xaa-Yaa-Pro-Sequenz zurückzuführen.

Die DP IV wird durch ihre Hydrolyseprodukte (Xaa-Pro- und Xaa-Ala-Dipeptide) kompetitiv mit K_i -Werten im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-3} gehemmt (Yaron & Naider, 1993; Born et al., 1994). Oligopeptide wie Tetraprolin ($K_i = 6 \times 10^{-4}$ M) hemmen ebenfalls kompetitiv (Harada et al., 1982, Hoffmann et al., 1995). Die von Umezawa et al. (1984) beschriebene kompetitive Hemmung durch Diprotin A (Ile-Pro-Ile) und Diprotin B (Val-Pro-Leu) wurde von Rahfeld et al. (1991b) widerlegt. Die Autoren konnten nachweisen, daß es sich bei beiden Peptiden um Substrate der DP IV handelt (Diprotin A: $k_{cat}/K_m = 3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Diprotin B: $k_{cat}/K_m = 1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Durch Entfernung der Carboxylgruppe von Dipeptiden erhält man die produktanalogen Aminosäurepyrrolidide, die um eine Größenordnung besser hemmen als die ihnen zugrunde liegenden Peptide (Born et al., 1994). Die Weiterentwicklung dieser Verbindungen zu Aminosäurethiazolididen, Aminosäure-2-cyano-pyrrolididen und Aminosäure-4-cyanothiazolididen führt zu einer Verbesserung der Hemmkonstanten um bis zu vier Größenordnungen (Born et al., 1994; Li et al., 1995; Ashworth et al., 1996a; Ashworth et al., 1996b). Mit Ausnahme der letztgenannten werden alle Verbindungstypen in biologischen Systemen eingesetzt (Schon et al., 1991; Jiang et al., 1997; Reinhold et al., 1994, Reinhold et al., 1998b).

Die irreversiblen, substratanalogen Chlormethylketone (Demuth, 1989) und die Peptidylammoniummethylketone (Steinmetzer et al., 1993) aus der Gruppe der *Slow-Binding*-Inhibitoren, weisen K_i -Werte im mikromolaren Bereich auf. Durch über den freien N-Terminus induzierte intramolekulare Reaktionen sind sie in wässriger Lösung jedoch sehr instabil.

Die bisher potentesten Inhibitoren der DP IV (Pargellis et al., 1997) stellen die Peptidylphosphonsäuren (Coutts et al., 1996; Pargellis et al., 1997) dar. Als Übergangszustandsanaloge Verbindungen hemmen sie entsprechend einem *Slow-Tight-Binding*-Mechanismus (Gutheil & Bachovchin, 1993) mit K_i -Werten im pikomolaren Bereich. Trotz der unter physiologischen Bedingungen

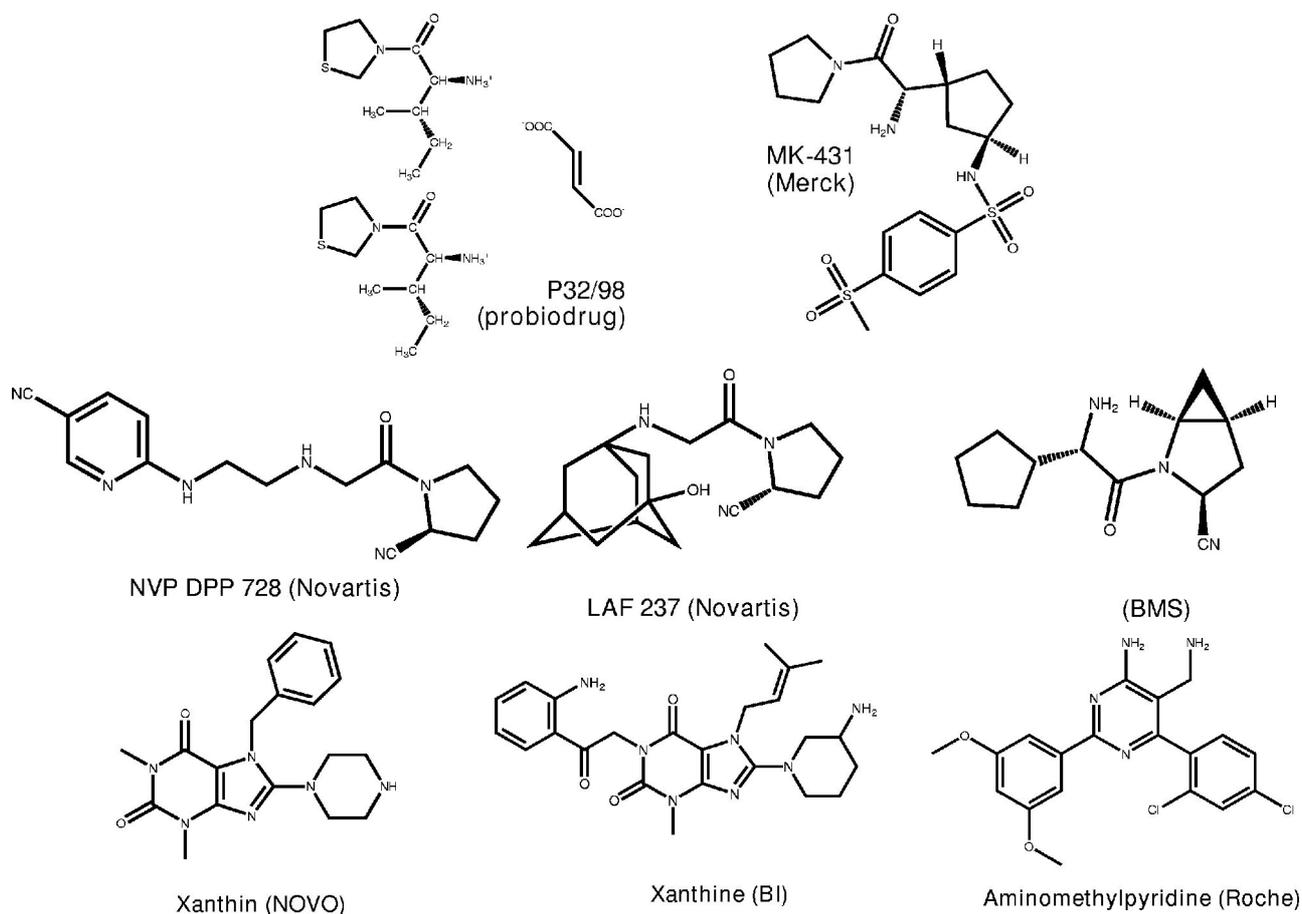


Abbildung 7: Beispiele von Vertretern der drei Substanzklassen von in der Humanerprobung befindlichen DP IV Inhibitoren. (nach Demuth, 2004)

beobachteten Zyklisierung (Snow et al., 1994; Sudmeier et al., 1994; Pargellis et al., 1997), die zu einem drastischen Aktivitätsverlust führt, finden die Verbindungen in biologischen Systemen Anwendung (Bristol et al., 1995; Jeanfavre et al., 1996). Das Pro-boroPro aus dieser Gruppe ist ein spezifischer, reversibler Inhibitor mit einer Hemmkonstante von 16 pM.

Peptidyl-(α -aminoalkyl) Phosphonatester und Diphenylphosphonatester sind spezifische irreversible Inhibitoren der DP IV und zeichnen sich durch eine hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen aus (Boduszek et al., 1994). Durch die langsame aber stabile Inaktivierung des En-

zyms (Lambeir et al., 1996) finden sie ebenfalls in biologischen Systemen Anwendung (De Meester et al., 1997).

Aufgrund der Fülle an Inhibitoren sei für eine umfassende Darstellung auf zwei Reviews verwiesen (Augustyns et al., 1999; Lambeir et al., 2003).

Die Entwicklung spezifischer DP IV-Inhibitoren führte zu zahlreichen Verbindungstypen, die sich in ihrem Inhibierungsmechanismus deutlich unterscheiden. Unter den inzwischen Tausenden Einzelverbindungen lassen sich die in der Humanerprobung befindlichen in drei Substanzklassen einordnen (Abb. 7). Zu den reversiblen, produktanalogen Pyrrolididen und Thiazoliden gehören der P32/98 von Probiodrug und der MK-431 von Merck. Das aktive Zentrum kovalent modifizierende, produktanaloge Cyanopyrrolidide sind der NVP DPP 728 und der LAF 237 von Novartis. Zu den reversiblen nicht-peptidischen Heterozyklen zählen Xanthin von NOVO, das Xanthin-Derivat von BI und das Aminomethylpyridin-Derivat von Roche (Demuth, 2004).

1.2.4. Biologische Bedeutung

Die enorme Bedeutung der DP IV leitet sich von ihrer Beteiligung an zahlreichen biologischen Prozessen ab. Die Multifunktionalität im Säugerorganismus ist dabei nicht nur ein Resultat der enzymatischen Aktivität.

Proteaseaktivität

Zahlreiche Peptidhormone, Neuropeptide und Zytokine weisen prolinreiche Regionen in ihren Sequenzen auf (Mentlein, 1988; Vanhoof et al., 1995), die sie vor unspezifischer Proteolyse schützen. Die Regulation ihrer Aktivität wird durch prolinspezifischen Proteasen ermöglicht.

Für viele dieser biologisch aktiven Peptide konnte gezeigt werden, daß sie von der DP IV als Substrate akzeptiert werden. Die Abspaltung eines N-terminalen Dipeptids verhindert dabei häufig die Bindung an spezifische Rezeptoren und eröffnet damit die Möglichkeit in den Ablauf von biologischen Kaskaden regulatorisch einzugreifen. *In vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zeigten, daß die DP IV das N-terminale Tyr-Pro-Dipeptid des Neuropeptids Y (Mentlein et al., 1993a) und des

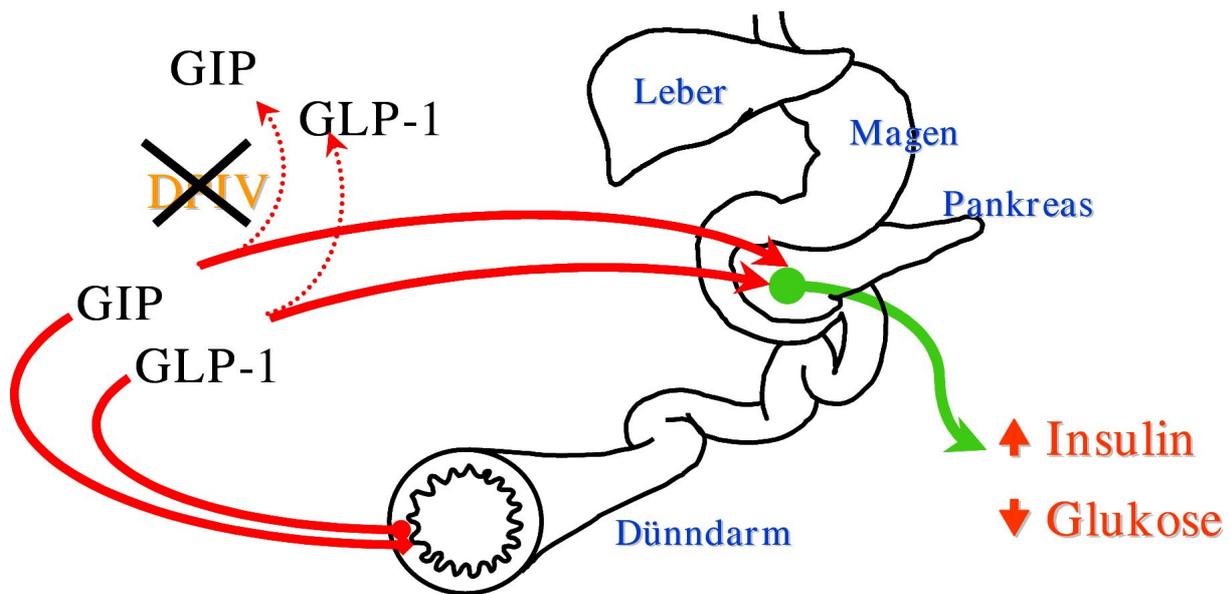


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Einflusses von Inhibitoren auf die DP IV-modulierte Inkretin-Wirkung. (Demuth, 2004)

gastrointestinalen Peptids YY (Medeiros & Turner, 1994) abzuspalten vermag. Erst durch die schrittweise Hydrolyse der Substanz P durch die DP IV wird das Neuropeptid der anschließenden vollständigen Hydrolyse durch Aminopeptidase N (APN) zugänglich gemacht (Ahmad et al., 1992; Russell et al., 1996). N-terminale Teilsequenzen verschiedener Zytokine werden von der DP IV hydrolysiert, obgleich die nativen Zytokine keine Substrate darstellen (Berger et al., 1987; Hoffmann et al., 1993). Inwieweit die Kettenlänge der Peptide dabei eine Rolle spielt, ist fraglich, da die Hydrolyse des nativen Chemokins RANTES mit 68 AS-Resten durch die DP IV nachgewiesen werden konnte (Oravec et al., 1997; Proost et al., 1998a). Die Prozessierung gastrointestinaler Peptide wie Enterostatin (Val-Pro-Asp-Pro-Arg, Bouras et al., 1995), Glucagon-Like-Peptide-1(7-36) (GLP₇₋₃₆, Mentlein et al., 1993b; Pauly et al., 1996) und Glucose-Dependent-Insulinotropic-Polypeptide (GIP₁₋₄₂, Kieffer et al., 1995; Pauly et al., 1996) konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Die Inkretine GIP₁₋₄₂ und GLP-1₇₋₃₆ sind zwei Hormone, die in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Blut die Insulinausschüttung an den β -Zellen des Pankreas stimulieren (Abb. 8). Beide Hormone sind aufgrund ihrer N-terminale Xaa-Ala-Sequenz Substrate der DP IV. Daneben konnte die Inaktivierung des β -Casomorphin-5 (Hartrodt et al., 1982), des humanen Somatoliberins (GRF₁₋₄₄,

Bongers et al., 1992) und des Growth-Hormone-Releasing-Factor aus Rind (Martin et al., 1993) sowie des GRF₁₋₂₉ (Bai & Chang, 1995) durch die DP IV nachgewiesen werden.

Die DP IV-katalysierte Hydrolyse eines Gly-Pro-Dipeptids vom N-Terminus der α -Kette des monomeren Fibrins führt zur Hemmung der Fibrinpolymerisierung und damit zur Verhinderung der Blutgerinnung (Mentlein & Heymann, 1982).

Die hohe Konzentration der DP IV in den proximalen Tubuli der Niere sowie auf den Epithelzellen des Dünndarms ist durch die Beteiligung des Enzyms am Abbau von prolinhaltigen Stoffwechselprodukten begründet (Tiruppathi et al., 1990).

Vermittlung von Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen

Durch die Assoziation mit der Adenosindeaminase (ADA) an der Zelloberfläche von T-Zellen wird die DP IV/CD26 auch als ADA-Bindeprotein (ADAbp) bezeichnet (Kameoka et al., 1993; Tanaka et al., 1993, De Meester et al., 1994). Die Bindung verursacht keine Beeinträchtigung der enzymatische Aktivität beider Proteine (De Meester et al., 1994; Blanco et al., 1996). Die Funktion der ADA in den T-Zell-Aktivierungs- und Proliferationsprozessen ist noch nicht geklärt. Von größerer Bedeutung soll die Aufhebung der Hemmung der T-Zell-Aktivierung durch Adenosin über seine ADA-vermittelte Desaminierung sein (Franco et al., 1998; Dong et al., 1996). ADA-Mangelkrankungen verursachen schwere Beeinträchtigungen im humanen Immunsystems durch Störung des Purinstoffwechsels.

Eine wichtige Voraussetzung für die Generierung von Zell-Matrix-Adhäsionsprozessen ist die von der enzymatischen Aktivität der DP IV unabhängige Wechselwirkung von DP IV aus Rattenleber und Maus-Fibroblasten mit Kollagen (Hanski et al., 1988) und Fibronectin (Piazza et al., 1989). Für Kollagen und Fibronectin konnten zwei separate Bindungsstellen in der Cystein-reichen Region der DP IV nachgewiesen werden (De Meester et al., 1999). Bei der Tumormetastasierung soll die DP IV der Lungenendothelzellrezeptor für metastasierende Brustkrebszellen in der Ratte sein (Cheng et al., 1998). Ligand ist dabei das Tumorzelloberflächen-assoziierte Fibronectin.

Rolle in der Immunantwort

Die Rolle der DP IV in der Immunantwort ist bis heute nicht umfassend geklärt, scheint aber eine Kombination ihrer Exopeptidaseaktivität und ihrer Eigenschaft als Rezeptor oder Ligand für verschieden Moleküle zu sein. Das ermöglicht es der DP IV/CD26 als kostimulatorisches Oberflächenmolekül zu fungieren, die T-Zell-Aktivität zu beeinflussen und die Chemotaxis zu modulieren (Lambeir et al., 2003).

DP IV/CD26 wurde als Oberflächenprotein einer Subpopulation von CD4-positiven T-Lymphozyten beschrieben (Mentlein et al., 1984). Daneben wurde DP IV/CD26 auch auf einer Subpopulation CD8-positiver Zellen gefunden (Munoz et al., 1992). Nach mitogener Stimulation wird eine um ein Vielfaches erhöhte Expression der lymphozytären DP IV/CD26 beobachtet, was auf die Bedeutung des Enzyms als T-Zell-Aktivierungsmarker hinweist (Schon & Ansorge, 1990). Darüber hinaus wurde die Expression von DP IV/CD26 auf aktivierten B-Lymphozyten und NK-Zellen nachgewiesen (Buhling et al., 1994, Buhling et al., 1995; Yamabe et al., 1997).

Neben ihrer Funktion als Aktivierungsmarker wurde ihre kostimulatorische Aktivität in T-Zell-Aktivierungs- und Proliferationsprozessen diskutiert. *In vivo* und *in vitro* konnte gezeigt werden, daß DP IV-spezifische Inhibitoren (Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide Schon et al., 1991; Reinhold et al., 1993; Reinhold et al., 1997a; N,O-Diacylhydroxylamine Schon et al., 1985; Peptidylboronsäuren Kubota et al., 1992) starke immunsuppressive Wirkungen hervorrufen.

Der genaue Mechanismus der kostimulatorischen Aktivität von DP IV/CD26 ist nicht bekannt. In Zusammenhang damit steht die beschriebene Assoziation von DP IV/CD26 mit CD45 (Torimoto et al., 1991), einer membranverankerten Protein-Tyrosin-Phosphatase. Die mit der anti-CD26-induzierten Kostimulation verbundene Phosphorylierung der CD3 ζ -Kette bei gleichzeitiger Erhöhung der CD4-assoziierten p56^{lck}-Protein-Tyrosin-Kinase(PTK)-Aktivität, weist auf eine Beteiligung von CD45 innerhalb dieser Prozesse hin. Daneben konnte die anti-CD26-induzierte Phosphorylierung einer Vielzahl zellulärer Proteine, nach Kreuzvernetzung von DP IV/CD26 mit CD3, gezeigt werden (Munoz et al., 1992; Hegen et al., 1997).

Die Bedeutung der enzymatischen Aktivität für die Rolle der DP IV/CD26 als Kostimulator von T-Zell-Aktivierungsprozessen wird kontrovers diskutiert. Einerseits weist die durch Punktmutation des Serylrestes im aktiven Zentrum bzw. die durch vollständige Inhibierung der DP IV-Aktivität mit DFP erreichte Hemmung der anti-CD26-vermittelten T-Zell-Aktivierung auf die Notwendigkeit der Enzymaktivität für die CD26-induzierte T-Zell-Proliferation hin (Tanaka et al., 1993; Tanaka et al., 1994). Andererseits wird eine von der DP IV-Aktivität unabhängige Übertragung von Signalen nach anti-CD26-vermittelter T-Zell-Aktivierung diskutiert (Hegen et al., 1993).

Involvierung in die HIV-Infektion

Eine mögliche Beteiligung der DP IV am Eintritt des HI-Virus in T-Zellen als Kofaktor von CD4 wurde vorgeschlagen (Callebaut et al., 1993). Nachfolgende Studien haben die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 als die eigentlichen Korezeptoren für HIV-1 identifiziert (Feng et al., 1996; Alkhatib et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Choe et al., 1996; Oberlin et al., 1996). CCL5/RANTES inhibiert die R5 HIV-1 Infektion durch Bindung an den CCR5-Rezeptor (Cocchi et al., 1995). Die DP IV-katalysierte Hydrolyse von RANTES verstärkt dessen Affinität zum CCR5-Rezeptor und verbessert dadurch seine anti-HIV-1 Eigenschaften (Proost et al., 1998b; Schols et al., 1998). Möglicherweise ist die DP IV auch für die immunsuppressive Wirkung des HIV-1-Proteins Tat verantwortlich, welches für die Transaktivierung und Replikation der viralen Gene notwendig ist. Es konnte gezeigt werden, daß Tat an CD26 bindet und die DP IV-Aktivität und die antigenstimulierte Lymphozytenproliferation hemmt (Wrenger et al., 1997; Gutheil et al., 1994). Die Inhibition der DP IV durch Tat ist abhängig von der Sialysierung der DP IV und der Salzkonzentration (Smith et al., 1998).

Das HIV-1 Hüllprotein gp120 bindet über seine C3-Region an DP IV/CD26 auf Lymphozyten und inhibiert dabei die Assoziation mit ADA (Valenzuela et al., 1997b). Die Interaktion zwischen DP IV und gp120 erfordert keine DP IV-Aktivität, aber sie ist CD4 oder CXCR4-abhängig (Herrera et al., 2001, Blanco et al., 2000b). Da die C3-Region von gp120 nicht oberflächenexponiert

ist, könnte die Interaktion mit CD4 oder CXCR4 die verborgene Region demaskieren und dadurch die Bindung von DP IV/CD26 ermöglichen (Lambeir et al., 2003).

1.3. Kristallographie

Da eine Darstellung der Theorie der Röntgenkristallographie den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde, sei auf Lehrbücher und Artikel (Blundell & Johnson, 1976; Giacovazzo et al., 1992; Drenth, 1994; Messerschmidt & Huber, 2000) verwiesen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ALDRICH, BIOMOL, DIFCO, FLUKA, MERCK, ROTH, SERVA und SIGMA bezogen und waren mindestens vom Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.a.). Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen AMICON, EPPENDORF, MILLIPORE, QIAGEN, STRATAGENE und BIO RAD bezogen.

Benutzte Geräte und Materialien: FPLC LCC-500 (PHARMACIA), Kolbenhubpipetten (EPPENDORF), UV-VIS-Spektrophotometer Lambda 17 (PERKIN ELMER), Ultrazentrifuge L7-55 mit Rotor Ti-45 (BECKMAN), Ultrazentrifuge XL-I (BECKMAN), Tischzentrifugen, Zentrifuge Avanti mit Rotor JA20 (BECKMAN), Zentrifugen J2-21 und J2-21M mit Rotoren JA10 und JA20 sowie J-6M/E mit Rotor JS4.2 (BECKMAN), Amicon-Rührzelleneinheit (AMICON), Ultrafiltrationsmembranen YM30 (AMICON), Centriprep 30 Mikrokonzentratoren (AMICON), Centricon 30 Mikrokonzentratoren (AMICON), Ultrafree 30 Mikrokonzentratoren (MILLIPORE), Partikelfilter Millex HA 22 m (MILLIPORE), Mar345 Image Plate System (MARRESEARCH), MarCCD Detector (MARRESEARCH), Röntgengenerator RTP300 (RIGAKU).

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine wurden vor der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, um eine höhere Konzentration zu erreichen oder um Kalium-Ionen zu entfernen, da diese mit Dodecylsulfat einen Niederschlag bilden, der die Gelelektrophorese stört. Eine Probe der Proteinlösung wurde mit 12 % (w/v) TCA versetzt, die Proteine 10 min bei 4 °C gefällt und anschließend sedimentiert (17000 g, RT, 5 min). Das Sediment wurde danach in 10-15 µl Proteinprobenpuffer (siehe 2.2.2) resuspendiert. Wenn die Farbe des Bromphenolblau von blau nach gelb umschlug, wurde die Lösung mit 2 M Tris-HCl pH 8,8 in 1-µl-Schritten neutralisiert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die Probe 5 min bei 95 °C inkubiert.

2.2.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In dieser Arbeit wurde die Variante nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Je 10 ml Gellösung werden kurz vor dem Gießen der Gele 20 µl TEMED und 10 µl einer Ammoniumperoxodisulfatlösung (10 % (w/v) APS in H₂O) zugegeben. Die Proteinproben wurden 1:1 mit Proteinprobenpuffer gemischt, 5 min bei 95 °C inkubiert, um alle Proteine restlos zu denaturieren, und danach auf das Gel aufgetragen. Der Gel-Lauf wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA und max. 250 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt.

2.2.3. Färben von Proteingelen

Zur qualitativen Identifizierung wurden die Proteinen nach der Elektrophorese (SDS-PAGE, siehe 2.2.2) mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Dazu wurde das Gel mit der Färbelösung bedeckt, in der Mikrowelle kurz auf ca. 60 °C erhitzt und danach 20 min auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrunds mit Wasser oder

einem Gemisch aus Methanol/Essigsäure/Wasser auf einem Schüttler inkubiert. Gegebenenfalls wurde die Färbung ein bis zweimal wiederholt.

2.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde über die Extinktion bestimmt. Mit dem UV-VIS Spektrometer Lambda 17 von PERKIN ELMER, wurde die Extinktion bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration berechnet.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Analytische Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation wurde in einer BECKMAN XL-I Ultrazentrifuge mit einem Ti60 Rotor durchgeführt. Das Protein wurde auf eine Konzentration von 0,3 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM NaCl eingestellt und bei 10000 Upm und 4 °C 48 Stunden lang zentrifugiert. Die Auswertung erfolgte durch die mit dem Gerät gelieferte Origin-Software.

2.3.2. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden mit einem JASCO J-715 Spektropolarimeter aufgenommen. Bei Fern-UV-Spektren betrug die Proteinkonzentration 0,23 mg/ml in 40 mM Na-Phosphat pH 7,2. Die Spektren wurden in einer Quarzküvette mit 0,1 cm Durchmesser aufgenommen. Thermoübergänge wurden bei einer Heizgeschwindigkeit von 10 °C/h bei einer Wellenlänge von 220 nm aufgezeichnet.

2.4. Reinigung von DP IV

Die DP IV aus Schweinenierenkortex wurde von unserem Kooperationspartner Probiobrug in Halle gereinigt und uns zur Kristallisation und Strukturaufklärung zur Verfügung gestellt.

Die DP IV wurde nach bekannten Protokollen (Fischer et al., 1983; Demuth & Heins, 1995) aus dem Kortex der Niere von Schweinen aufgereinigt. Die Reinigung beinhaltet Gewebshomo-

genisierung, Membranautolyse, differentielle Zentrifugation, Ammoniumsulfat-Fällung, Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie (siehe Abb. 9, Tab. 1).

Gewebshomogenisierung: Von Schweinenieren wird annähernd 2 kg Kortex entfernt und in kleine Stücke geschnitten. Man wäscht das Material mit 0.9 % NaCl Lösung über Nacht bei 4 °C zur Entfernung des Blutes. Der gewaschene Kortex wird mit einem Ultraturrax homogenisiert. Während der Homogenisierung wird die gleiche Menge einer 0.02 M Sucrose-lösung mit 0.2 % Triton X 100 zugegeben.

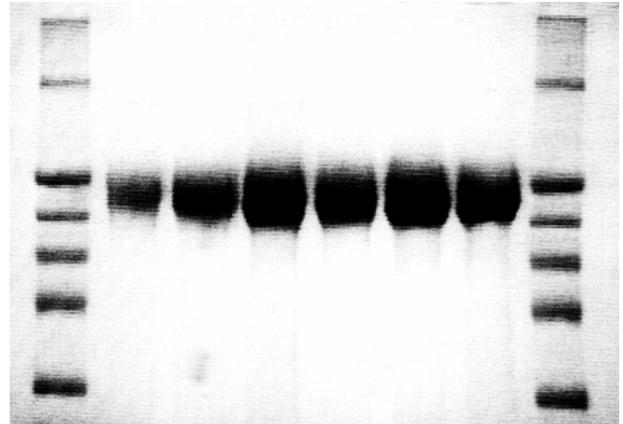


Abbildung 9: 7.5 % SDS-PAGE. Qualitätskontrolle mehrerer Chargen aufgereinigter DP IV aus dem Kortex der Niere von Schweinen. Das Gel zeigt in jeder Spur eine einzelne Bande bei 116 kDa.

Membranautolyse: Die anschließende 18-stündige Autolyse bei 30 °C setzt die DP IV aus der Membran frei. Unlösliche Partikel werden durch Zentrifugieren bei 15900 g für 30 min entfernt.

Differentielle Zentrifugation und Ammoniumsulfat-Fällung: Die folgende fraktionierte Präzipitation wurde mit dem festen Material durchgeführt. Nach der ersten Fällung und Zentrifugation (60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung, 3 h, RT; 39200 g, 30 min) verbleibt die DP IV Aktivität im Überstand. Mit der zweiten Fällung (85 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung, über Nacht, 4 °C; 39200 g, 30 min) präzipitiert man das Protein. Das Pellet wird in einer minimalen Menge Puffer (25 mM Phosphat, pH 6.8) wieder aufgenommen und dreimal gegen 2 l des gleichen Puffers über Nacht dialysiert. Nach weiterem Zentrifugieren (39200 g, 30 min) wird die Lösung auf 45 ml mit einer Amicon Ultrafiltrationszelle (Ausschluß 100 kDa) konzentriert und wieder zentrifugiert (44000 g).

Präparative Gelfiltration: 15 ml der DP IV-Lösung werden auf eine Sepharose 6B-Säule (PHARMACIA, 100 cm x 2.6 cm) geladen und anschließend mit Phosphatpuffer bei pH 6.8 eluiert.

Anionenaustausch-Chromatographie: Die vereinigten Fraktionen von drei Läufen werden in 25 mM Phosphatpuffer bei pH 6.8 an eine DEAE-Sepacel-Säule (PHARMACIA, 17 cm x 2.5 cm) gebunden und mit einem Salzgradienten von 39 mM bis 150 mM NaCl in 5 Säulenvolumen eluiert.

Anionenaustausch-Chromatographie (HR): Die DP IV-enhaltenden Fraktionen werden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit 25 mM Bis-Trispuffer bei pH 6.8 auf eine Uno Q-Säule (BioRAD, 6 ml) geladen und mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 60 mM eluiert.

Das so gereinigte, natürlich glykosylierte Protein wurde abschließend mit dem Rotoforen-System (BioRAD) präparativ isoelektrisch fokussiert. Eine Reinigung aus 2 kg Kortex ergibt ~60 mg eines ca. 280-fach angereicherten Proteins mit einer spezifischen Aktivität von > 42 Units/mg. Die Aktivität wurde wie bei Demuth und Heins (Demuth & Heins, 1995) beschrieben bestimmt. Durch N-terminale Sequenzierung wurde gezeigt, daß diese DP IV-Ectodomäne mit dem Ser39 beginnt und somit keine Transmembransequenz mehr besitzt.

2.5. Sequenzierung porciner DP IV cDNA

Die cDNA der DP IV aus Schweineniere wurde von unserem Kooperationspartner Probiodrug in Halle sequenziert und uns zur Strukturbestimmung zur Verfügung gestellt.

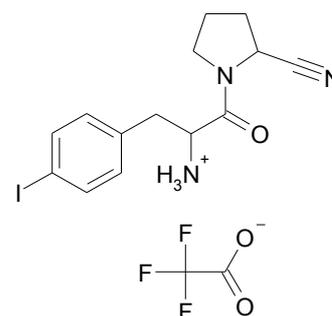
Zur Ermittlung der Sequenz von porciner DP IV wurde Gesamt-RNA aus Schweineniere extrahiert und sequenziert (siehe Tab. 2; submitiert zu GenBank, Accession Number: AY198323) (Bär *et al.*, Manuskript in Bearbeitung).

2.6. Inhibitor-Synthese

Die Inhibitoren wurden von unserem Kooperationspartner Probiodrug in Halle synthetisiert und uns zur Kristallisation mit der DP IV zur Verfügung gestellt.

2.6.1. *p*-Iodo-Phe-Pyr-CN

Der kovalent bindende DP IV Inhibitor *p*-Iodo-Phe-Pyr-CN • TFA wurde nach bekannten chemischen Protokollen (Ashworth *et al.*, 1996a) synthetisiert. Die Synthese startete mit den Edukten Boc-*p*-



Iodo-Phe-OH und H-Pro-NH₂ • HCl. Das fertige Produkt 1-(2-(S)-cyanopyrrolidin-1-yl)-3-(4-iodophenyl)-1-oxopropan-2-aminium-trifluoroacetat wurde als weißer Festkörper erhalten. Die Struktur wurde mittels ¹H-NMR, ¹³C-NMR und ESI-MS bestätigt. Die chemische Reinheit wurde durch HPLC über RP-18 Material mit einem Wasser/ACN-Gradienten überprüft. Die Inhibierungskonstanten wurden wie bei Steinmetzer und Mitarbeitern (Steinmetzer et al., 1993) beschrieben bestimmt.

Formel C₁₆H₁₇F₃IN₃O₃

Mol. Gew. 483.23 g/mol

Schmp. 138-140°C (unkorrigiert)

ESI-MS berechnet 369.0, gefunden (M+H) = 370.0

¹H-NMR (D₂O), δ (ppm): 1.55-1.61 (m, 1H), 1.7-1.82 (m, 1H), 1.91-2.19 (m, 2H), 2.49-2.62 (m, 1H), 2.89-3.09 (m, 1H), 3.19-3.21 (m, 1H), 3.21-3.34 (m, 1H), 4.31-4.39 (m, 1H), 4.61-4.69 (m, 4H), 6.91-7.00 (m, 2H), 7.60-7.71 (m, 2H).

¹³C-NMR (D₂O), δ (ppm): 167.832, 131.656, 118.055, 93.173, 65.934, 52.250, 47.061, 46.428, 36.322, 29154, 24.063.

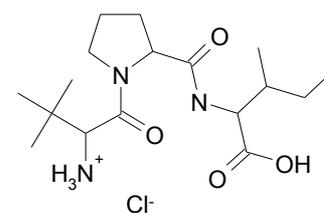
K_i 25 nM, für die kompetitive Inhibierung der DP IV. Der Inhibitor bildet eine kovalente, wenn auch reversible Bindung mit dem aktiven Ser630 aus.

HPLC 98.6 %

Löslichkeit Wasser, Puffer

2.6.2. tBuGly-Pro-Ile

Der kovalent bindende DP IV Inhibitor tBuGly-Pro-Ile • HCl wurde nach bekannten chemischen Protokollen synthetisiert. Das fertige Produkt tert-Butylglycyl-L-prolyl-L-isoleucin-hydrochlorid wurde als



weißer Festkörper erhalten. Die Struktur wurde mittels ¹H-NMR, ¹³C-NMR und ESI-MS bestätigt.

Die chemische Reinheit wurde durch HPLC über RP-18 Material mit einem Wasser/ACN-Gradienten überprüft. Die Inhibierungskonstanten wurden wie bei Steinmetzer und Mitarbeitern (Steinmetzer et al., 1993) beschrieben bestimmt.

Formel $C_{17}H_{32}ClN_3O_4$

Mol. Gew. 377,90 g/mol

ESI-MS 342.3 (M+H)

HPLC 96.2 %

Löslichkeit Wasser, Puffer

2.6.3. SC3/2

Der kovalent bindende DP IV Inhibitor SC3/2 wurde nach bekannten chemischen Protokollen synthetisiert. Das fertige Produkt 7-Benzyl-1,3-dimethyl-8-piperazin-1-yl-3,7-dihydro-purin-2,6-dion-trifluoroacetat

wurde als weißer Festkörper erhalten. Die Struktur wurde mittels 1H -NMR, ^{13}C -NMR und ESI-MS bestätigt. Die chemische Reinheit wurde

durch HPLC über RP-18 Material mit einem Wasser/ACN-Gradienten überprüft. Die Inhibierungskonstanten wurden wie bei Steinmetzer und Mitarbeitern (Steinmetzer et al., 1993) beschrieben bestimmt.

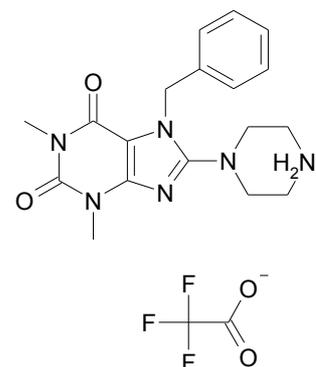
Formel $C_{20}H_{23}F_3N_6O_4$

Mol. Gew. 468.44 g/mol

K_i 0.7 nM (kompetitiv)

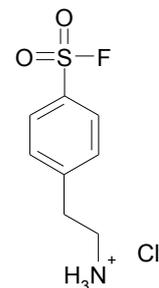
HPLC 99.0 %

Löslichkeit Dichlormethan, Wasser, Methanol, DMSO



2.6.4. AEBSF

Der DP IV Inhibitor AEBSF ist von ICN (Lot.-No. 1879C).



2.7. Aktivitätsbestimmung der DP IV

Die Aktivität der DP IV wurde mit 400 μ l des chromogenen Substrats Glycyl-prolyl-4-nitroanilid in 40 mM HEPES Puffer ($I = 0.125$; KCl justiert) bestimmt. Die Freisetzung von 4-Nitroanilid wurde bei 30 °C spektrophotometrisch bei 390 nm überwacht. Eine Einheit der DP IV-Aktivität ist definiert als die Freisetzung von 1 μ M 4-Nitroanilid pro Minute unter diesen Bedingungen.

2.8. Kristallisation und Kristalltransformation

Zur Kristallisation der DP IV, der Schweratomderivate und der Ligand-Komplexe wurde die Methode der Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen angewandt. Die Kristallisationsexperimente wurden in Cryschem Plates™ (HAMPTON RESEARCH, USA) bei 18 °C durchgeführt. Alle Kristallisationslösungen wurden durch Ultrafiltration und/oder Zentrifugation von Schwebstoffen befreit. Das Reservoirvolumen betrug 500 μ l. Triklone Kristalle der Dimension 0.20 x 0.10 x 0.05 mm wurden innerhalb von wenigen Tagen bis mehreren Wochen durch Mischen von gleichen Volumina der Proteinlösung bei einer Konzentration von 20 mg/ml in 5 mM Tris pH 7.6 mit der

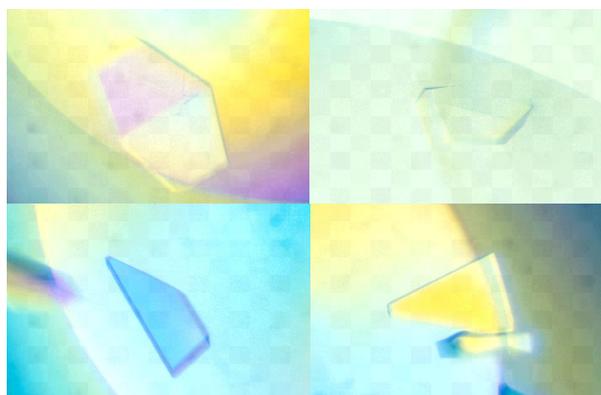


Abbildung 10: Triklone Kristalle der DP IV aus *Sus scrofa* der Dimension 0.20 x 0.10 x 0.05 mm. Aufnahmen von einem Mikroskop mit Polarisationsfilter.

Reservoirlösung (20-22% PEG2000, 0.1 M Ammoniumsulfat, 0.1 M Tris/HCl pH 8.0) erhalten (Abb. 10).

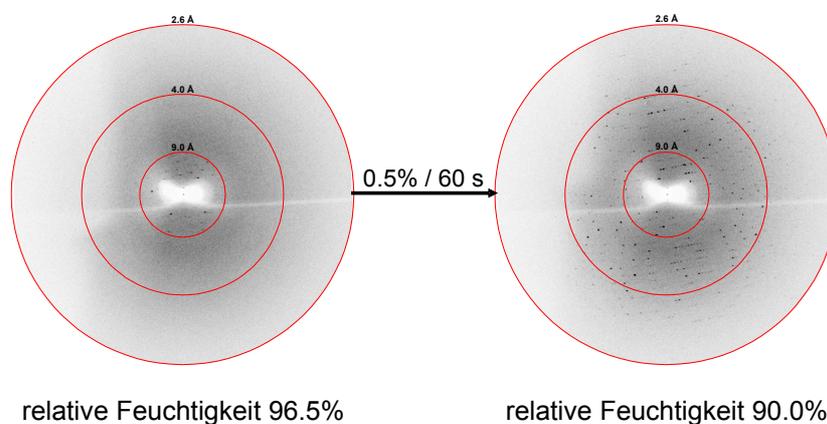


Abbildung 11: Diffraktionsbilder aufgenommen bei Raumtemperatur auf der hauseigenen Drehanode mit einem Mar180 Image Plate System (MARRESEARCH, Hamburg) vor und nach der Transformation mit dem Free-Mounting-System (PROTEROS BIOSTRUCTURES, Martinsried). Dramatische Verbesserung des Diffraktionsmusters und der Auflösung trikliner Kristalle der DP IV aus *Sus scrofa*.

Die Kristallisationstropfen wurden zum Schutz der Kristalle mit Perfluoropolyetheröl überschichtet. Anschließend wurden die Kristalle mit einem CryoLoop™ (HAMPTON RESEARCH, USA) durch den Öltropfen hindurch gehoben und auf das Free-Mounting-System (PROTEROS BIOSTRUCTURES, Martinsried) transferiert, wo die relative Feuchtigkeit von 96.5 % auf 90.0 % mit einem Gradienten von 0.5 % in 60 s verringert wurde. Dadurch konnte das Diffraktionsmuster und die Auflösung der Kristalle dramatisch von etwa 10 Å bis auf 3 Å verbessert werden (siehe Abb. 11). Bei einer optimalen relativen Feuchtigkeit von 90.0 % wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff (100 K) schockgefroren (Kiefersauer et al., 2000).

Die Schweratomderivate wurden durch Tränken der nativen Kristalle mit einer Lösung der Schweratomverbindung vor der Kristalltransformation hergestellt.

Für die Liganden-Komplex-Studien wurde der Ligand im 10-fach molaren Überschuß mit der DP IV zur Kokristallisation angesetzt.

2.9. Datensammlung und Auswertung

Zur Datensammlung wurden die gefrorenen Kristalle unter einem Stickstoffstrom (100 K) entweder mit Kupfer-K α -Strahlung ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) der hauseigenen Drehanode mit einem *Mar345 Image Plate System* (MARRESEARCH, Hamburg) [BuGPI], oder mit Synchrotronstrahlung am DESY (Deutsches Elektronensynchrotron, HASYLAB) an der *Beamline* BW6 (Wiggler-Beamline mit variabler Wellenlänge) mit einem *MarCCD Detector* (MARRESEARCH, Hamburg) [h_01, i_01, Hg, SC3/2, AEBSF] vermessen. Von einzelnen Kristallen konnten jeweils vollständige Datensätze aufgenommen werden. Die Statistik zur Datensammlung ist in Tabelle 3 aufgelistet.

Die Diffraktionsbilder wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) indiziert, integriert und aufeinander skaliert. Die Datenreduktion erfolgte mit den Programmen TRUNCATE und CAD der CCP4-Programmsammlung (Collaborative Computational Project No. 4, 1994). Die Statistik zur Datenauswertung ist in den Tabellen 4 und 5 aufgelistet.

2.10. Strukturlösung

Die Struktur der DP IV aus *Sus scrofa* wurde mit der Methode der „Multiplen Anomalen Dispersion“ (MAD) an einem Quecksilber-Derivat mit anschließender Mittelung unter Ausnützung der nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS, Abb. 12) gelöst (Tab. 6).

Aus dem dreidimensionalen, anomalen Patterson-Raum wurde rechtwinklig zur molekularen Dimerachse (siehe Abb. , Programm GLRF Tong & Rossmann, 1990) eine lokale Harker-Ebene mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) ausgeschnitten, entlang der orthogonalen, lokalen zweizähligen Achse gemittelt, und anschließend, zur automatischen Erkennung von lokalen Schweratomdupletts in das Programm RSPS (Knight, 2000) eingegeben. Dadurch konnte eine 50 bis 100-fache Verstärkung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erreicht werden. Die relative Position der zwei symmetrieverwanten Hg-Dupletts wurde durch translationale Suche mit dem Programm RSPS (Knight,

2000) ermittelt. Konstruktionsbedingt folgen die resultierenden Lagen der lokalen Symmetrie und bestimmen die translationalen NCS-Parameter. Nach Verfeinerung der Schweratomlagen, *Phasieren* mit dem Programm MLPHARE (Collaborative Computational Project No. 4, 1994) und *Solvent Flipping* mit dem Programm SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996), konnten die Phasen durch NCS-Mittlung mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) bis zu einer Auflösung von 2.0 Å erweitert werden, wodurch eine interpretierbare Elektronendichte entstand (Tabelle 6).

Die Struktur der DP IV-Ligand-Komplexe wurde aus dem Modell der freien Protease und den gemessenen Strukturfaktoren der Komplexe durch Anwendung einiger *Rigid Body Refinement* Zyklen mit dem Programm CNS (Brünger et al., 1998) gelöst.

2.11. Modellbau und Verfeinerung

Atomare Modelle wurden mit einer *Octane Workstation* (SILICON GRAPHICS, USA) oder einer dafür eigens aufgebauten *Linux Grafic Workstation* und dem Programm MAIN (Turk, 1992) in die Elektronendichte eingepasst.

Die Struktur der katalytischen Domäne der Prolyloligopeptidase (POP) wurde als Vorgabe für den Modellbau und die Zuweisung der Sequenz in die Elektronendichte plaziert.

Die kristallographische Verfeinerung wurde in mehreren Zyklen, bestehend aus Modellbausritten mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) und nachfolgender Gradientminimierung mit dem Programm CNS (Brünger et al., 1998) und den Zielparametern von *Engh* und *Huber* (Engh & Huber, 1991), durchgeführt.

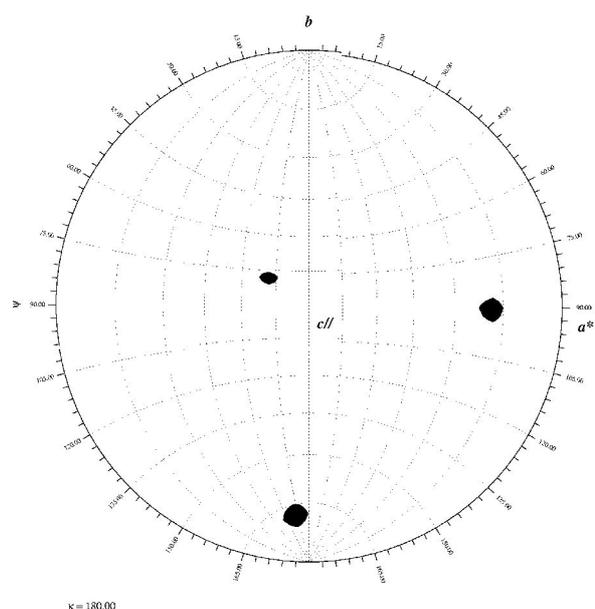


Abbildung 12: Nichtkristallographische 2-2-2 Symmetrie der triklinen Kristalle von DP IV aus *Sus scrofa*. Der Plot wurde mit dem Programm GLRF (Tong & Rossmann, 1990) generiert.

Die Inhibitoren und Substratanaloga wurden mit dem Programm SYBYL (Tripos, Inc.) erstellt und mit MAIN in die Elektronendichte plaziert. Die Komplexe wurden mit CNS (Brünger et al., 1998) verfeinert bis Konvergenz erreicht wurde.

Die Hauptkette der vier DP IV-Monomere ist durch die Elektronendichte vom Ser39 bis zum Pro766 definiert. Nur an den Seitenketten des flexiblen *Loops* zwischen Blatt I und Blatt II von Glu97 bis Tyr100 fehlt eindeutige Dichte. Die finalen R-Faktoren der Verfeinerung haben Werte von 20 bis 21 % (*working set*) und 24 bis 27 % (*test set*) unter Verwendung von konservativen Parametern. Die Statistik der Verfeinerung ist in den Tabellen 4 und 5 aufgelistet.

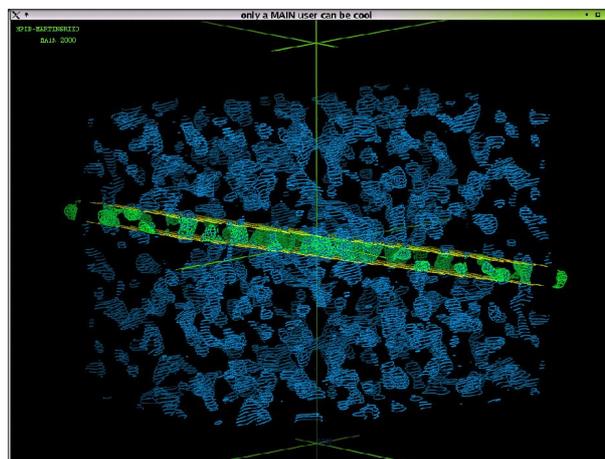


Abbildung 13: Lokale Harker-Ebene rechtwinklig zur molekularen Dimerachse im dreidimensionalen Patterson-Raum. Abbildung wurde mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) erstellt.

2.12. Analyse des Modells

Nach der Verfeinerung wurde die Qualität der Modelle mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) kontrolliert. Falls in den ausgegebenen Statistiken und Grafiken für eine bestimmte Aminosäure ungewöhnliche ϕ/ψ -Winkel, Torsionswinkel der Seitenkette oder sonstige geometrische Auffälligkeiten auftraten, so wurden diese noch einmal überprüft. Überlagerungen mit anderen Proteinen wurden mit dem Programm TOP (Collaborative Computational Project No. 4, 1994) durchgeführt.

2.13. Graphische Darstellung

Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen PILEUP (Wisconsin Package, Genetics Computer Group, USA), CLUSTALX (Thompson et al., 1997) oder SYBYL (TRIPOS, Inc.) erzeugt, z.T. manuell an die Strukturdaten angepasst und mit dem Programm ALSRIPT (Barton, 1993) dargestellt.

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme PYMOL (DeLano, 2002), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1999), RASTER3D (Merritt & Bacon, 1997), ViewerLite (<http://www.accelrys.com>) und DeepView – The Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org>) verwendet. Oberflächen wurden mit GRASP (Nicholls et al., 1991) erzeugt und dargestellt.

Zur Nachbearbeitung von Bildern wurde die Programme PHOTOSHOP (ADOBE SYSTEMS, USA) und COREL-DRAW (COREL, Kanada) verwendet.

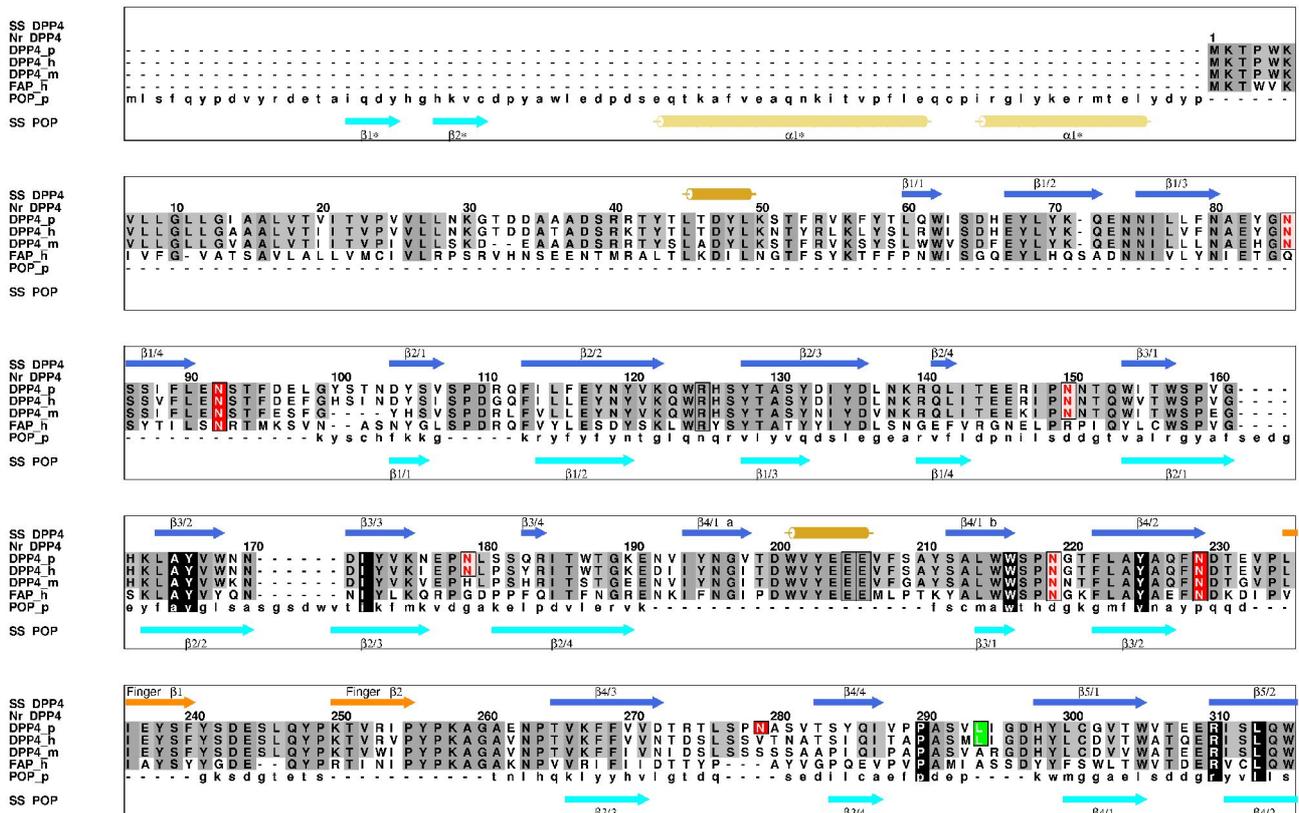
2.14. PDB Zugangscodes

Die Koordinaten der Struktur des nativen Proteins und die des *p*-Iodo-Phe-Pyr-CN-DP IV-Komplexes wurden in der Protein-Datenbank (PDB, <http://www.rcsb.org>) unter den Zugangscodes 1ORV und 1ORW deponiert.

3. Ergebnisse

3.1. Sequenz der DP IV aus *Sus scrofa*

Die Aminosäuresequenzen der DP IV aus Schwein, Mensch und anderen Säugern sind stark konserviert. Ihr Vergleich weist keine Insertionen oder Deletionen auf (Abb. 14). In der katalytischen Domäne sind die Sequenzen von Schwein und Mensch zu 92 % identisch, im vollständigen Enzym noch zu 88 %. Bemerkenswert ist der Austausch des Ser339 der porcinen Sequenz durch ein Cystein in der humanen Sequenz, welches zu einer zusätzliche Disulfidbrücke (Cys328-Cys339) in der humanen DP IV führt. Im Vergleich zur humanen Sequenz ist die potentielle Glykosylierungsstelle



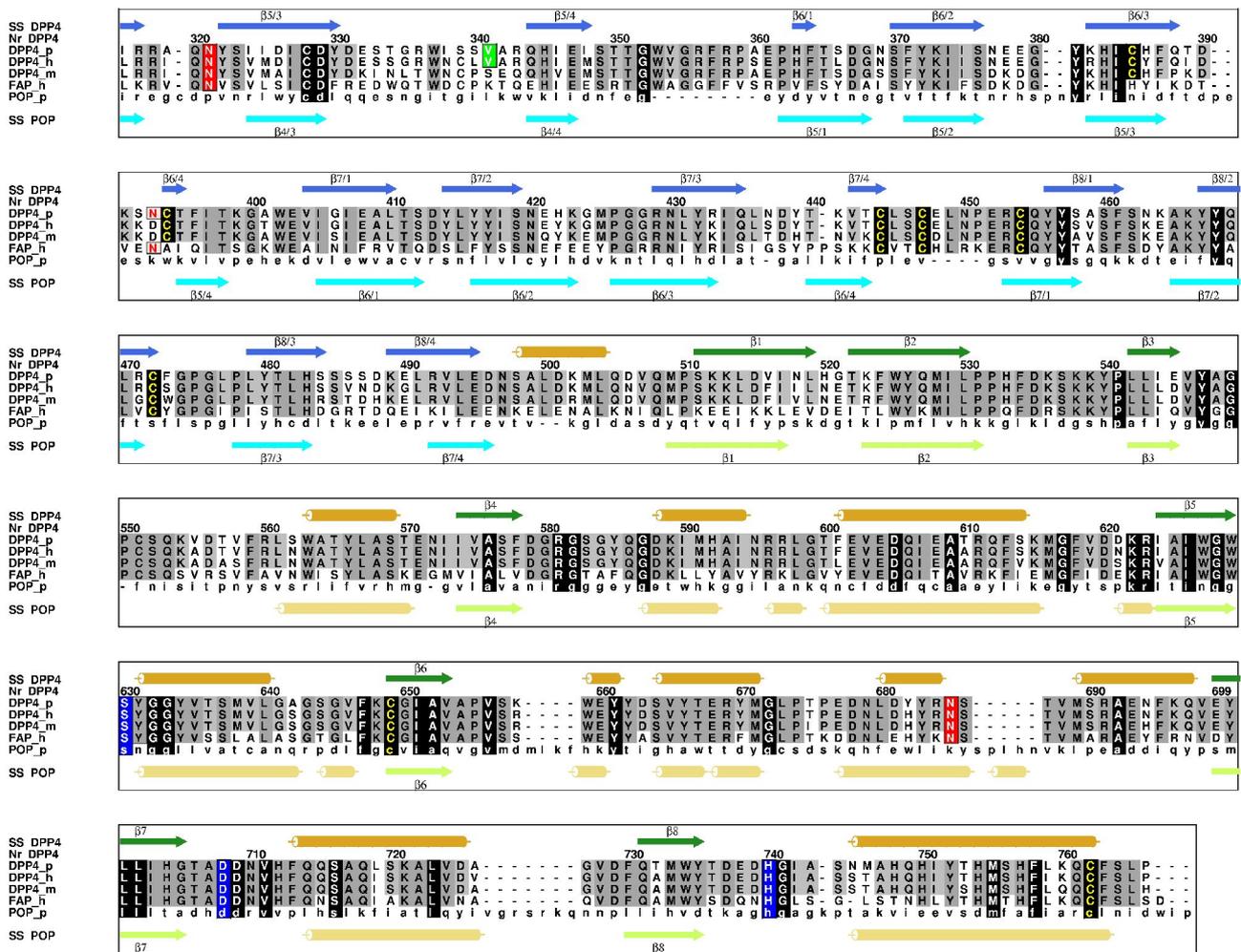


Abbildung 14: Sequenzvergleich der neu bestimmten Sequenz von DP IV aus Schwein (DPP4_p) mit den DP IV-Sequenzen aus Mensch (DPP4_h) und Maus (DPP4_m) sowie mit den Sequenzen der verwandten Proteine Fibroblast Activation Protein- α (FAP_h) und Prolyloligopeptidase (POP_p). Der Vergleich erklärt das Fehlen der Dimerisierung von POP und korreliert das Fehlen der ADA-Bindung bei Nagetieren mit der Glykosylierungsstelle Asn-279 (281).

am Asn520 durch einen Asn-His Austausch verloren gegangen. Auf der anderen Seite gibt es eine zusätzliche potentielle Glykolyierungsstelle am Asn179, welche sich nicht in der humanen Sequenz findet. Interessanterweise ist die Glykolyierungsstelle am Asn279 in der humanen Sequenz um zwei Aminosäuren zum Asn281 verschoben.

3.2. Gesamtstruktur und Aufbau der Untereinheiten

Das Monomer umfasst eine N-terminale β -Propeller Domäne (Arg54-Asn497) gefolgt durch die katalytische Domäne Gln508-Pro766. Die Gesamtstruktur bildet ein Dimer von Dimeren in der

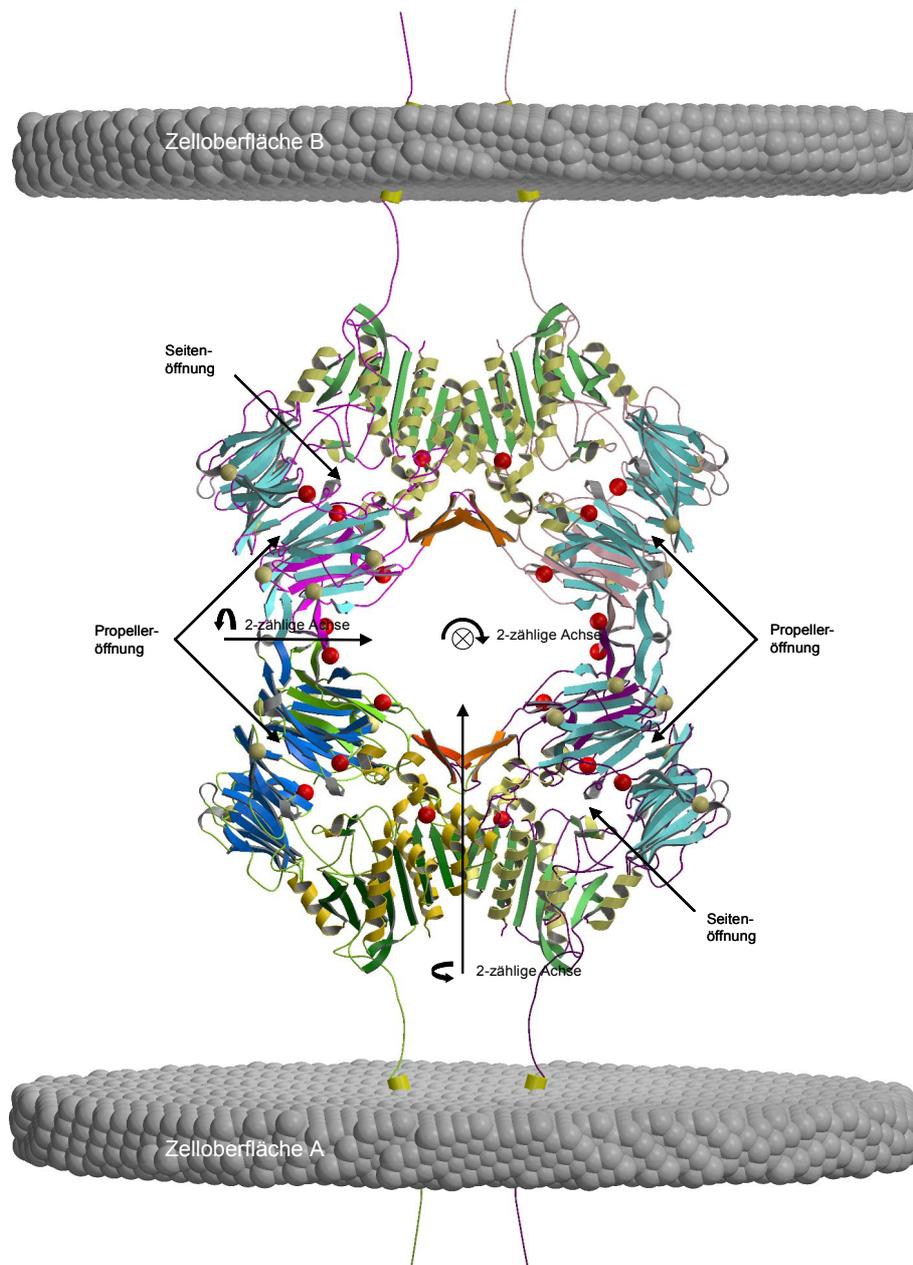


Abbildung 15: Lösliches DP IV bildet eine 2-2-2 symmetrische Anordnung als Dimer von Dimeren. Die Blickrichtung ist entlang einer zweizähligen Achse. Potentielle Glykosylierungsstellen sind als graue Kugeln eingezeichnet. Rote Kugeln markieren in der Kristallstruktur gefundene Glykosylierungsstellen. Die Transmembranhelices und ihre Orientierung zur Membran sind modelliert um zu illustrieren, wie die Tetramerisierung von DP IV Zell-Zell Kontakte vermitteln kann.

kristallographischen Einheitszelle, welches einer nicht-kristallographischen 2-2-2 Symmetrie mit allen Achsen senkrecht auf einander stehend folgt (Abb. 15). Das Propellerblatt IV ist sowohl an der Dimer- als auch an der Tetramerinteraktion beteiligt (Abb. 18).

Der wesentlich ausgedehntere Dimerkontakt wird hauptsächlich durch Reste der katalytischen Domäne vermittelt, mit einer Kontaktregion von 2270 Å² gegenüber 2 x 570 Å² des Dimer-zu-Tetramerkontakts. Die Dimerkontaktfläche ist durch hydrophobe Interaktionen dominiert, in deren Zentrum die aromatischen Seitenketten von Trp734 und Phe713 beider Monomere miteinander packen (siehe Abb. 16). Die hydrophoben Kontakte werden durch solvensvermittelte, polare Interaktionen wie Lys721 mit Asp243, Glu244 und Asp737 komplementiert. Bemerkenswerterweise be-

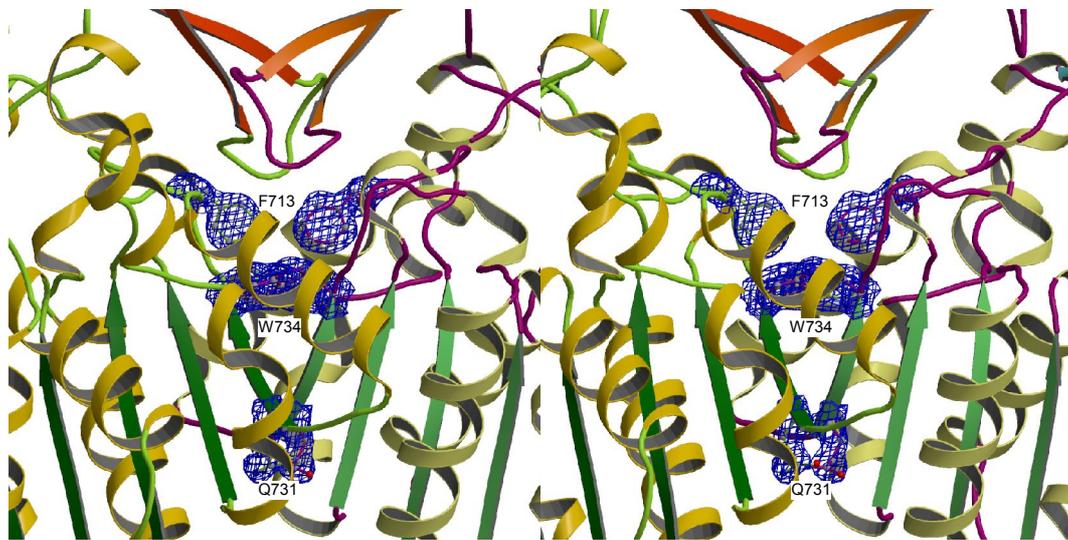


Abbildung 16: Blick senkrecht zur zweizähligen Achse auf die Dimerkontaktfläche. Sie wird aus drei C-terminalen Sekundärstrukturelementen von F713-C762 der katalytischen Domäne (gelb und grün) gebildet und durch das fingerartig zwischen Strang 2 und 3 des Propellerblatts IV hervorgehenden Insertionsmotiv (orange) stabilisiert. Zentrale, aromatische Packung durch hydrophobe Seitenketten von Trp734 und Phe713 (dargestellt als Kugel-Stäbchen-Modell in blauem Dichtenetz) beider Monomere. (Stereoabbildung)

dingt der Kontakt zwischen Gln731(Oε1)-Gln731(Nε2) einen subtilen (atomaren) Bruch der exakten zweizähligen Symmetrie innerhalb des Dimers. Die für die Dimerisierung kritischen Reste sind zwischen allen Spezies streng konserviert.

Die Tetramerkontaktfläche ist durch hydrophile Reste gekennzeichnet. Im Zentrum bilden die Stränge Asn279-Gln286 jedes DP IV-Dimers ein antiparalleles β-Faltblatt, welches das Propellerblatt IV zu einem achtblättrigen, antiparallelen Blatt erweitert (Abb. 17). Die äußeren Stränge von Blatt V tragen zusätzlich zur Bildung der tetrameren Struktur bei. Die Reste, die zum Tetramerkontakt beitragen sind ähnlich in verschiedenen Spezies, wenn auch gerade bei Nagern vari-

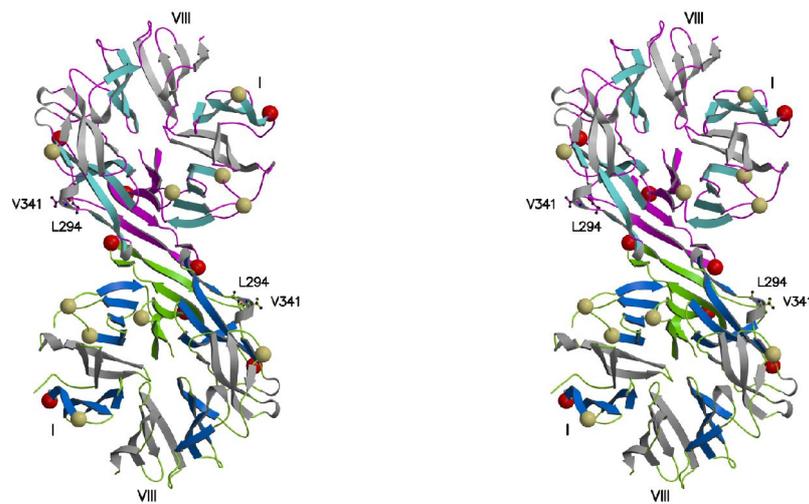


Abbildung 17: Blick entlang der zweizähligen Achse auf die Tetramerkontaktregion. Die Propellerblätter IV (grün und Pink) jeder Untereinheit bilden paarweise miteinander achtblättrige, antiparallele β -Faltblätter. Die markierten Aminosäuren Leu294 und Val341 sind an der ADA-Bindung beteiligt. (Stereoabbildung)

abler (Abb. 14). Viel wichtiger aber ist, daß es keine Insertionen oder Deletionen in den äußeren Stängen von Propellerblatt IV gibt. Bezeichnenderweise befindet sich Asn279 an der Tetramerkontaktfläche und ist glykosyliert (Abb. 15, 17).

3.2.1. Der β -Propeller

Die N-terminale β -Propeller Domäne ist aus acht Blättern mit je vier antiparallelen Strängen aufgebaut. Das erste und das letzte Blatt eines regulären β -Propellers sind entweder kovalent durch Disulfidbrücken (vierblättrige β -Propeller) oder durch Strangaustausch zwischen dem ersten und dem letzten Blatt (fünf- bis achtblättrige β -Propeller) miteinander verknüpft.

In der Literatur wurden bisher drei Ausnahmen zu dieser „geschlossenen Propeller Topologie“ Regel beschrieben: Der siebenblättrige Propeller der POP (Fülöp et al., 1998), die sechs- und siebenblättrigen Propeller der Tricornprotease (Brandstetter et al., 2001) und der fünfblättrige Propeller der α -L-Arabinase 43A (Nurizzo et al., 2002). Der β 8-Propeller der DP IV ist ebenfalls irregulär mit einer „offenen Velcro“-Topologie, da kein Segment C-terminal von Blatt VIII mit dem Ersten Propellerblatt interagiert. Interessanterweise stabilisiert die N-terminale Erweiterung von Blatt I (Phe53-Tyr58) die Propellerstruktur durch Interaktion mit der direkten C-terminalen Erweite-

Strang 1 und 2 von Blatt IV (Asn219). Interessanterweise ist von diesen fünf potentiellen Glykosylierungsstellen nur Asn279, welches in die Tetramerisierung involviert ist, posttranslational modifiziert. Weitere glykosylierte Reste findet man auf Blatt I (Asn92 am Ende von Strang 4), Blatt IV (Asn229 nahe dem Tetramerisierungsmotiv) und Blatt V (Asn321 auf der Strang 2 und 3 verbindenden Schleife), (Abb. 15 und 18). Asn150 auf dem letzten Strang von Blatt II ist in diesen Kristallen nicht modifiziert.

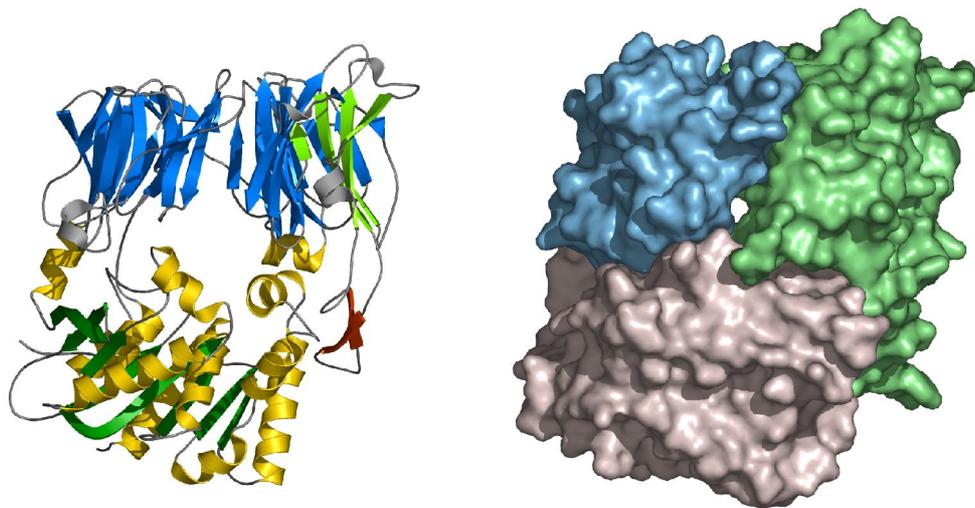


Abbildung 19: DP IV-Monomer zum Vergleich als „Ribbon“ und in Oberflächendarstellung. Die Oberfläche ist nach dem Drei-Domänen-Modell eingefärbt: stark glykosylierte Domäne (grün), cysteinreiche Domäne (blau), katalytische Domäne (grau).

Die Gestalt des DP IV- β 8-Propellers ist asymmetrisch. Die Blätter VI, VII, VIII und I bzw. II, III, IV und V bilden kompaktere Subdomänen (Abb. 15 und 18), konsistent mit dem Drei-Domänen-Modell der DP IV (Lambeir et al., 1997) (Abb. 191). Der ellipsoide Tunnel durch den Propeller ist kontinuierlich offen. An der solvensexponierten Öffnung mißt sein Durchmesser 9 Å von Blatt IV zu VIII und 15 Å von Blatt II zu VI. Zur katalytischen Domäne hin weitet sich der Tunnel bis auf einen Durchmesser von 15 Å und 25 Å. Durch seine Größe läßt der Tunnel gestreckte Peptide oder Haarnadelschleifen aber keine gefalteten α -Helices hindurch. Interessanterweise ist ein Sulfatanion an eine Oxyaniontasche gebunden, welche durch die Amidstickstoffe von Glu361 und Ile407 und das N ϵ 2 von His363 gebildet wird.

3.2.2. Die katalytische Domäne

Die katalytische Domäne erstreckt sich von Gln509 bis Pro766. Sie zeigt die typische Faltung einer α/β -Hydrolase mit einem zentralen 8-strängigen β -Blatt zwischen mehreren α -Helices (Abb. 15, 18). Das β -Blatt ist um mehr als 90° in sich verwunden, in Übereinstimmung mit Beobachtungen an verwandten α/β -Hydrolasen (Medrano et al., 1998; Ito et al., 2000; Goettig et al., 2002).

Innerhalb der katalytischen Domäne verbindet eine einzelne Disulfidbrücke zwischen Cys649 und Cys762 die C-terminale Helix Met746-Ser764 mit dem β -Blatt und stabilisiert so die tertiäre Struktur. Helix Met746-Ser764 zusammen mit Helix Gln714-Asp725 und Strang Asp729-Thr736 vom C-terminalen Ende, bilden das zentrale Dimerisierungsmotiv, welches durch Propellerblatt IV stabilisiert wird (Abb. 16). Das β -Blatt wird von 11 α -Helices flankiert. Das katalytische Ser630 ist von umgebenden Sekundärstrukturelementen eingefasst. Es gehört sowohl zum vorausgehenden Strang 4 (Arg623-Trp629) als auch zur darauf folgenden Helix Tyr631-Ala642. Das erzeugt eine gespannte Konformation der Aminosäurehauptkette mit Diederwinkeln $(\varphi, \psi) = (61.4, -115.7)$, welche mutmaßlich Energie für die Katalyse zur Verfügung stellt (Goettig et al., 2002).

3.3. Das Aktive Zentrum und die Substraterkennung

Die sequentielle, dreidimensionale Anordnung der katalytische Reste Ser630, His740 und Asp708 entspricht der von verwandten α/β -Hydrolasen (Medrano et al., 1998; Fülöp & Jones, 1999; Goettig et al., 2002). Die Oxyaniontasche wird durch das Amid von Tyr631 und das Hydroxyl- O_η von Tyr547 gebildet und ist von einem Wassermolekül in der uninhibierten Struktur besetzt. Zur Ermittlung des exakten Mechanismus der Substraterkennung wurde die DP IV mit dem dipeptidischen Cyanopyrrolidid *p*-Iodo-phenyl-cyano-pyrrolydid (i_01), dem Tripeptid tert-Butylglycyl-L-prolyl-L-isoleucin (tBuGPI), dem Piperazinderivat 7-Benzyl-1,3-dimethyl-8-piperazin-1-yl-3,7-dihydro-purin-2,6-dion (SC3/2) und dem Sulfonylfluorid 4-(2-Aminoethyl)-benzen-sulphonyl-fluorid (AEB-

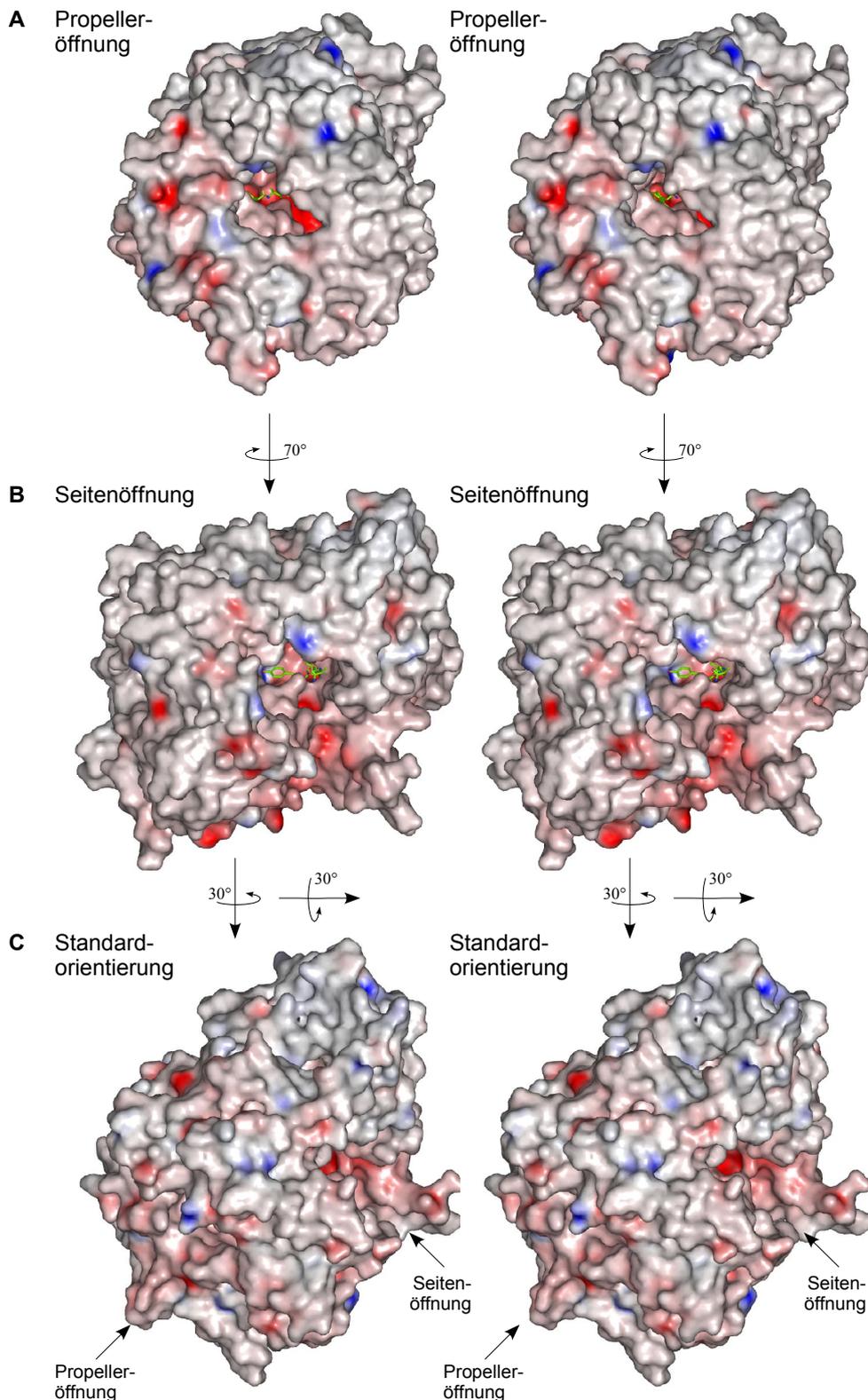


Abbildung 20: Oberflächendarstellung eines DP IV Monomers mit einem an das aktive Zentrum gebundenen tetrapeptidischen Substratanalog (Kugel-Stäbchen-Modell: Tetrapeptid (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). Die Oberfläche zeigt das elektrostatische Potential von rot (-50 e/kT) nach blau (50 e/kT). A) Blick in die innere Höhle durch den β -Propeller. B) Blick durch die Seitenöffnung nach einer 70° -Rotation um die Y-Achse im Vergleich zu (A). C) Blick auf die Oberfläche eines Monomers in Standardorientierung nach je einer 30° -Rotation um die X- und Y-Achse im Vergleich zu (B). (Stereoabbildung)

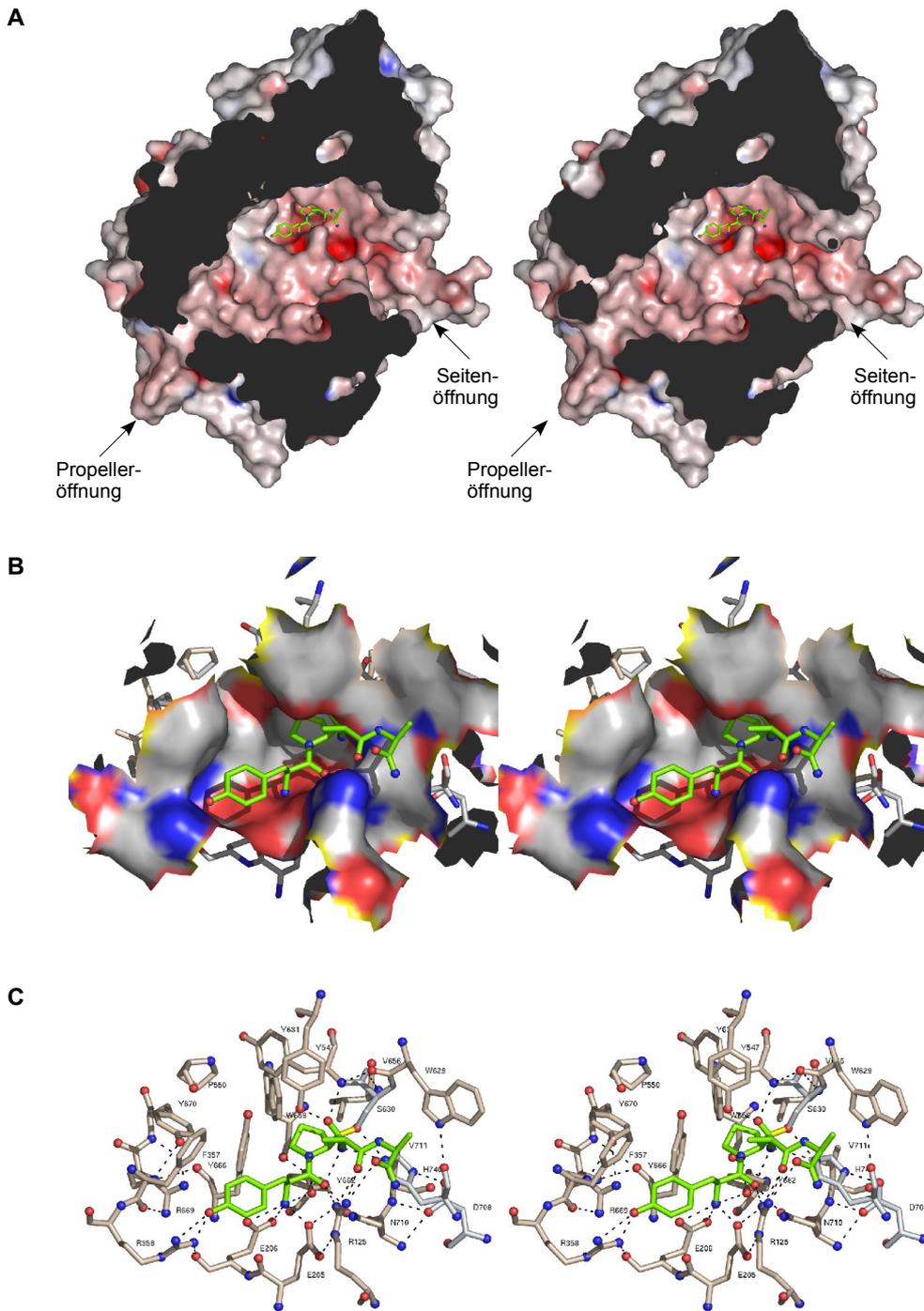


Abbildung 21: Substraterkennung der DP IV am Modell eines tetrapeptidischen Substratanalog (Kugel-Stäbchen-Modell: Tetrapeptid (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung mit elektrostatischem Potential des DP IV-Monomers in Standardorientierung. Schnitt durch die Oberfläche des Monomers zur Enthüllung des Innenraums und des innen liegenden aktiven Zentrums mit Blick auf das hinein modellierte Substrat. B) Zoom in das aktive Zentrum. Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung (Einfärbung nach Atomtyp) verdeckt. C) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste in (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige), mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. (Stereoabbildung)

SF) kokristallisiert und deren Kristallstrukturen bestimmt (Abb. 21). Die Komplexe kristallisieren unter denselben Bedingungen wie das freie Enzym in triklinen Kristallen mit nahezu identischen Zellkonstanten, vier Monomeren pro asymmetrischer Einheit, angeordnet als Dimer von Dimeren mit lokaler 2-2-2 Symmetrie.

In Abbildung 21 und 20 ist ein Monomer als geschlossene Oberfläche bzw. zur Enthüllung des aktiven Zentrums aufgeschnitten, in Standardorientierung dargestellt. Standardorientierung bedeutet, daß ein ungefaltetes peptidisches Substrat durch das aktive Zentrum von links nach rechts entsprechend dem Verlauf der Peptidkette vom N- zum C-Terminus laufen würde. Die Kluft des aktiven Zentrums ist überall negativ geladen (Abb. 21A) und erklärt dadurch die allgemeine Präferenz der DP IV für alkalische Substrate (Mentlein, 1999).

3.3.1. Kristallstruktur des *p*-Iodo-Phe-pyr-CN -DP IV-Komplexes

Das Nukleophil des aktiven Zentrums, der Hydroxylrest von Ser630, ist kovalent mit dem abzuspaltenen Carbonyl-Kohlenstoff des Inhibitors verbunden, welches zu einem stabilen Carbaminsäureaddukt führt. Der Pyrrolidinring sitzt in einer hydrophoben Tasche, die aus den Seitenketten von Tyr666, Tyr662, Val711, Val656 und Trp659 gebildet wird. Während diese Umgebung fast perfekt für die Iminosäure Prolin als P₁-Rest paßt, ist das Hydroxyl-O_H von Tyr662 korrekt positioniert um mit dem normalen Amidstickstoffatom einer Aminosäure in P₁ zu interagieren. Der Inhibitor erfaßt eindeutig die S₂-Bindestelle. Das P₂-Carbonyl-Sauerstoffatom wird in einer elektrostatischen Falle gefangen, die aus den Seitenketten von Arg125 und Asn710 gebildet wird (Abb. 22). Glu205 und Glu206 und zu einem geringeren Anteil das Carbonyl-Sauerstoffatom von Glu205 interagieren mit dem freien Aminoterminus des P₂-Rests, wodurch sie die Dipeptidylaminopeptidaseaktivität des Enzyms bestimmen. Es ist der β -Propeller, der essentielle Bindungskomponenten zur P₂-Erkennung bereit stellt, nämlich Arg125, welches auf einer Haarnadelschleife zwischen Strang 2 und 3 von Blatt II positioniert ist und Glu205-Glu206, die auf einer kurzen, helikalen Insertion innerhalb von Strang 1 des Blatts IV liegen. Es ist ausreichend Platz ist vorhanden um voluminöse Seitenketten

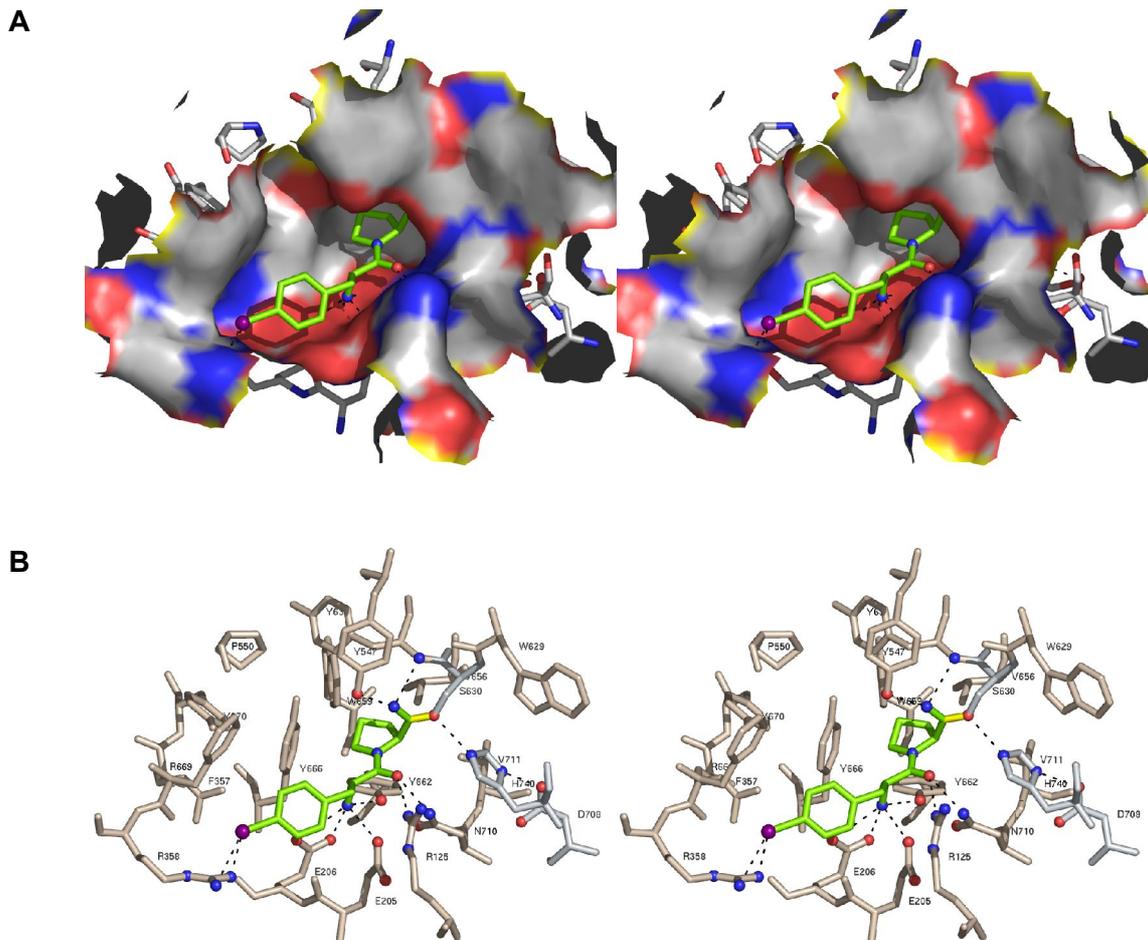


Abbildung 22: Substraterkennung der DP IV am Beispiel des Dipeptidanalogs *p*-Iodo-Phe-pyr-CN (Kugel-Stäbchen-Modell: *p*-Iodo-Phe-pyr-CN (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der DP IV (Einfärbung nach Atomtyp). Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung verdeckt. B) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste im (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige) mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. (Stereoabbildung)

wie Tyr oder Trp in der P₂-Position unterzubringen (Abb. 21). Der P₂-Rest des Inhibitors ist am Phenylring iodiert und über eine Ionenbindung mit Arg358 verbunden (Abb. 22).

3.3.2. Kristallstruktur des tBuGPI-DP IV-Komplexes

In dieser Struktur ist das Tripeptid bis auf seine C-terminale Carboxylatgruppe durch angemessene Elektronendichte definiert. Das tBuGPI-Peptid bindet in gekrümmter Konformation in die Kluft des aktiven Zentrums an eine Anzahl von Seitenketten des Enzyms, woraus eine dichte Packung des aktiven Zentrums resultiert. Die Elektronendichte, ebenso wie die Verfeinerung, zeigen in allen vier Molekülen der asymmetrischen Einheit eindeutig eine kovalente Bindung zwischen dem Ser630-O_γ und dem P₁-Pro Carbonyl-Kohlenstoff, sowie eine tetraedrische Konformation dieses „ortho-Koh-

lensäurediesteramid“-Kohlenstoffs. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Thoma und Mitarbeitern (Thoma et al., 2003), aber im Gegensatz zu den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen der Gruppe von Hiramatsu (Hiramatsu et al., 2004) zu ihren Strukturen des Diprotin A-DP IV-Komplexes, ist das tBuGPI-Tripeptid in einem tetraedrischen Übergangszustand (Abb. 23) gefangen. Zur Addition an die P₁-Carbonylgruppe dreht sich die Seitenkette des Ser630 nur geringfügig von einem

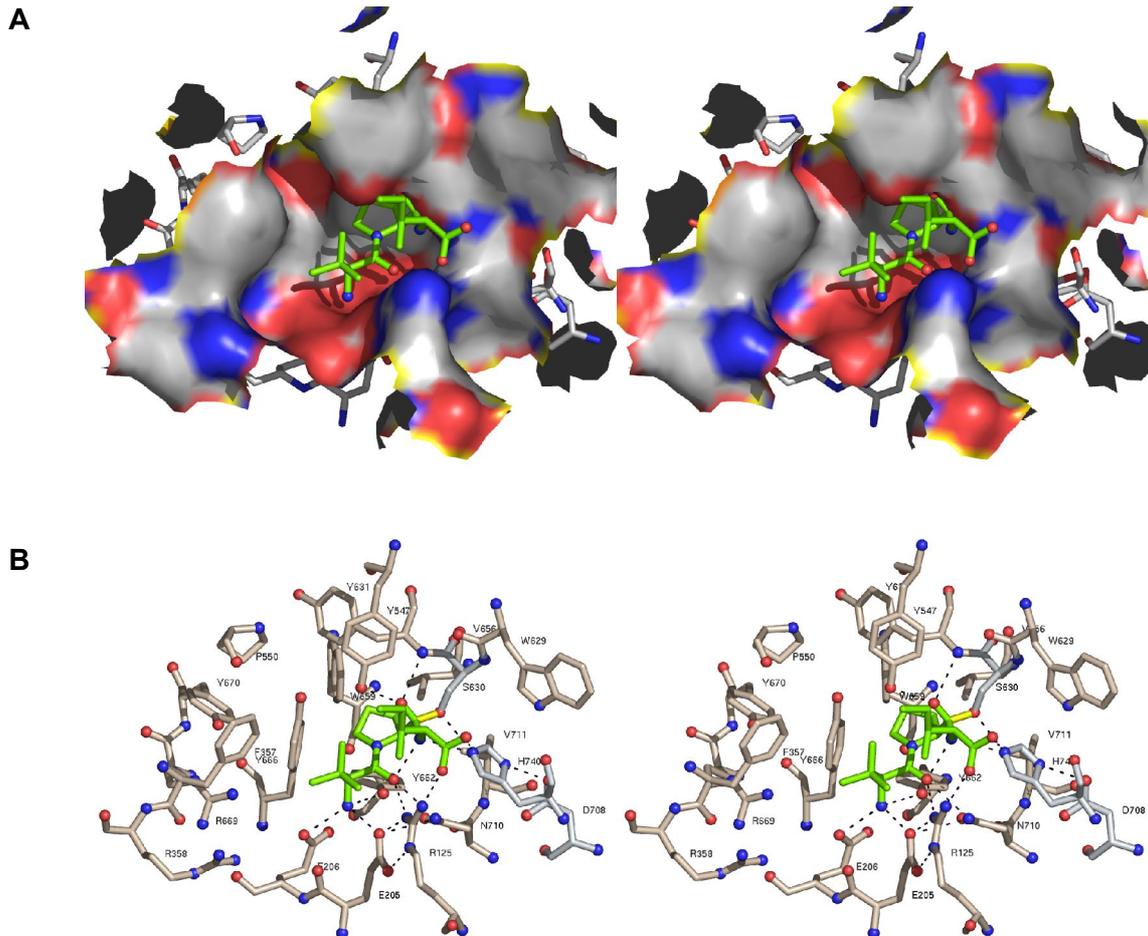


Abbildung 23: Substraterkennung der DP IV am Beispiel des Tripeptids tBuGPI (Kugel-Stäbchen-Modell: tBuGPI (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der DP IV (Einfärbung nach Atomtyp). Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung verdeckt. B) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste im (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige), mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. (Stereoabbildung)

χ_1 -Winkel von -157° in der freien DP IV auf -148° , so daß die Wasserstoffbrücke zum His740-N δ_2 in Bezug auf Länge und Orbitalüberlappung nahezu unverändert bleibt. Der negativ geladene P₁-Sauerstoff erstreckt sich in die Oxyaniontasche, von wo er günstige Wasserstoffbrückenbindungen vom Tyr547-O η (2.9 Å) und vom Hauptketten-Amid-Stickstoff des Tyr631 (3.2 Å) (Abb. 23) erhält.

Im Gegensatz zu dem Befund bei Aertgeerts und Mitarbeitern (Aertgeerts et al., 2004) verursacht die Substratbindung keine wesentliche Änderung der Konformation von Ser630 und His740.

Die α -Ammoniumgruppe des P₂-Glycins sitzt in der S₂-Kationtasche, die von den Seitenketten von Glu205, Glu206 und Tyr662 gebildet wird, und ist fixiert durch günstige Wasserstoffbrücken zu deren Carboxylat-Sauerstoffen und zum O η von Tyr662. Die tert-Butyl-Gruppe ist sowohl von hydrophoben als auch von polaren Wänden flankiert und streckt sich weg vom aktiven Zentrum in die innere Höhle der DP IV (Abb. 23). Die P₂-Carbonylgruppe erhält Wasserstoffbrückenbindungen von der Carboxamidgruppe des Asn710 (3.0 Å), von der Guanidylgruppe des Arg125 (3.4 Å) von der einen Seite und vom P₁'-Ile-Amid-Stickstoff (2.7 Å) von der anderen Seite. Der pentazyklische P₁-Pro-Ring steckt in der gleichen Orientierung, wie schon in der Struktur des *p*-Iodo-Phe-pyr-CN beobachtet, in der ziemlich hydrophoben S₁-Tasche, welche auch γ C-substituierte Proline (Hydroxyproline) aber keine größeren β C-verzweigten P₁-Seitenketten (Abb. 23) aufnehmen kann. Da die Phenolgruppe des Tyr666 eine Seitenwand der S₁-Tasche bildet, sollte Serin in P₁ trotzdem akzeptiert werden. Für beide Carboxylat-Sauerstoffe des C-terminalen P₁'-Isoleucin fehlt angemessene Dichte, was auf eine zitternde Bewegung des Carboxylats zwischen dem gut definierten Imidazolring des His740 und der Guanidylgruppe des Arg125 hindeutet. Die P₁'-Isopentyl-Seitenkette streckt sich weg vom aktiven Zentrum in die große innere Höhle, flankiert von polaren Seitenwänden, die die Aufnahme von größeren, polaren P₁'-Seitenketten erlauben würden. Prolin-Seitenketten in P₁' würden mit der P₂-Carbonylgruppe des gebundenen Peptids zusammenstoßen, wodurch sich die Inaktivität der DP IV gegenüber Prolin in P₁' erklärt. Die distale Carboxylatgruppe der in DP IV-Substraten häufiger anzutreffenden P₁'-Glu-Reste würde nahe heran, aber nicht in direkten Kontakt mit der ϵ -Ammoniumgruppe des inneren Oberflächen-Restes Lys554 kommen. Thoma und seinen Mitarbeiter fanden in ihrer Struktur der humanen DP IV im Komplex mit Ile-Pro-Ile (Diprotin A) (Thoma et al., 2003) eine ähnliche Konformation des Tripeptids mit einer nur durch geringe Dichte definierten C-terminalen Carboxylatgruppe.

3.3.3. Kristallstruktur des SC3/2-DP IV-Komplexes

Der hervorragend in der Elektronendichte definierte, kleine, organische Inhibitor SC3/2 bindet nicht-kovalent in die Spalte des aktiven Zentrums (Abb. 24). Die zentrale 1,3-Dimethyl-3,7-dihydro-purin-2,6-dion-Gruppe steckt im aktiven Zentrum und präsentiert seine 6-Carbonylgruppe dem

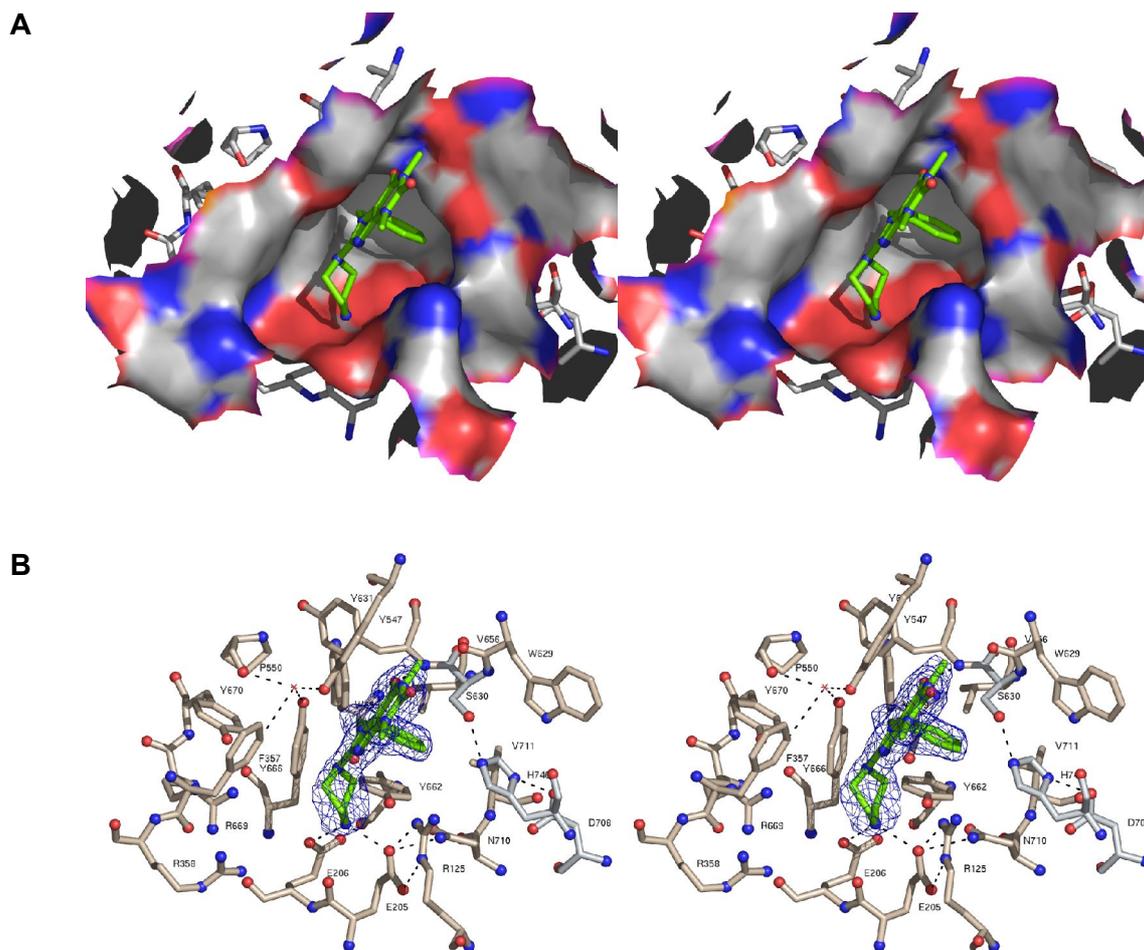


Abbildung 24: Substraterkennung der DP IV am Beispiel des Piperazinderivats SC3/2 (Kugel-Stäbchen-Modell: SC3/2 (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der DP IV (Einfärbung nach Atomtyp). Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung verdeckt. B) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste im (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige) mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. Die $2 F_{obs} - F_{calc}$ Electronendichte umhüllt nur den Inhibitor (blaues Netz, kontouriert mit 1σ). (Stereoabbildung)

Tyr631-Amid-Stickstoff der Proteinase. Die Bindung des Inhibitors verursacht eine konformationelle Änderung der Geometrie am aktiven Zentrum. Die Seitenkette des Ser630 wird aus seiner nativen Position (Änderung des χ_1 -Winkels auf -57°) herausgeschoben, kann aber immer noch eine günstige Wasserstoffbrückenbindung mit dem His740-N ϵ 2 (2.7 Å) ausbilden. Der Phenolring des

Tyr547 wird um annähernd 70° gegen die Ser552-Seitenkette gedreht, so daß beide Ringsysteme perfekt und in kurzen Van-der-Waals-Abständen aufeinander packen. Das Tyr547-O η -Atom ist jetzt so plaziert, daß es eine Wasserstoffbrücke zum aromatischen π -Elektronensystem des Purinrings ausbilden kann. Der in Position 8 am Purinfünfring gebundene Piperazinring steckt so zwischen den Seitenketten von Arg125 und Tyr666, daß sein distaler, sekundärer Stickstoff den Carboxylat-Sauerstoffen von Glu205 (2.7 Å) und Glu206 (3.0 Å) Wasserstoffbrückenbindungen anbieten kann, und gleichzeitig die Glu205-Carbonylgruppe wegschiebt. Aus der Elektronendichte geht eindeutig hervor, daß der Piperazinring eine energetisch weniger günstige Twistkonformation annimmt. Der am Puringerüst in Position 7 sitzende Benzylring steckt in der hydrophoben S₁-Tasche und füllt sie perfekt ohne sichtbare Veränderung gegenüber der nativen Struktur aus. Die günstigen energetischen Interaktionen der Piperazin-, der Purin- und besonders der Benzylgruppe liefern offensichtlich die Energie für die Verschiebung des Ser630 O γ und die Rotation des Tyr547-Phenolrings aus ihrer normalen Lage.

3.3.4. Kristallstruktur des AEBSF-DP IV-Komplexes

Der Sulfonylfluorid-Inhibitor AEBSF ist erstaunlicherweise kovalent über eine Sulfonylesterbindung nicht an das katalytische Ser630, sondern an das O η der Phenolgruppe des Tyr547 gebunden, welches bei der Katalyse von peptidischen Substraten wesentlicher Bestandteil der Oxyaniontasche ist (Abb. 25). Die zentrale Benzylgruppe ist zwischen der Arg125-Seitenkette und der Phe357-Phenylgruppe eingeschoben, mit orthogonaler Orientierung zu letzterer. In der kleinen, versteckten Höhle dahinter, ist ein Wassermolekül (293) über günstige Wasserstoffbrücken mit dem Tyr547 O η -Esteratom, dem Tyr666 O η , dem Pro550-O und dem π -Elektronensystem der positiv polarisierten Kante der Phenylgruppe von Phe357 fixiert. Die freie Aminogruppe des *p*-Aminoethyl-Substituenten wird in der S₂-Kationtasche fixiert und bildet Wasserstoffbrücken zu den Carboxylaten von Glu205 und Glu206, und zum Tyr662-O η , wie die α -Ammoniumgruppe des P₂-Rests eines peptidischen Substrats. Ähnlich wie im SC3/2-Komplex wird die Phenolgruppe des Tyr547 aus ihrer normalen Posi-

tion herausgedreht und gegen die Seitenkette des Ser552 gedrückt, um die Ausbildung des Sulfonyl-esters und die Insertion der Aminoethyl-Benzylgruppe zwischen die S₂-Kationtasche zu erlauben.

Der Platz zwischen der Phenylgruppe des Inhibitors, der Phenolgruppe des Tyr547 und der S₁-Tasche ist anscheinend leer, sollte aber mit einigen Wassermolekülen gefüllt sein, die nicht an

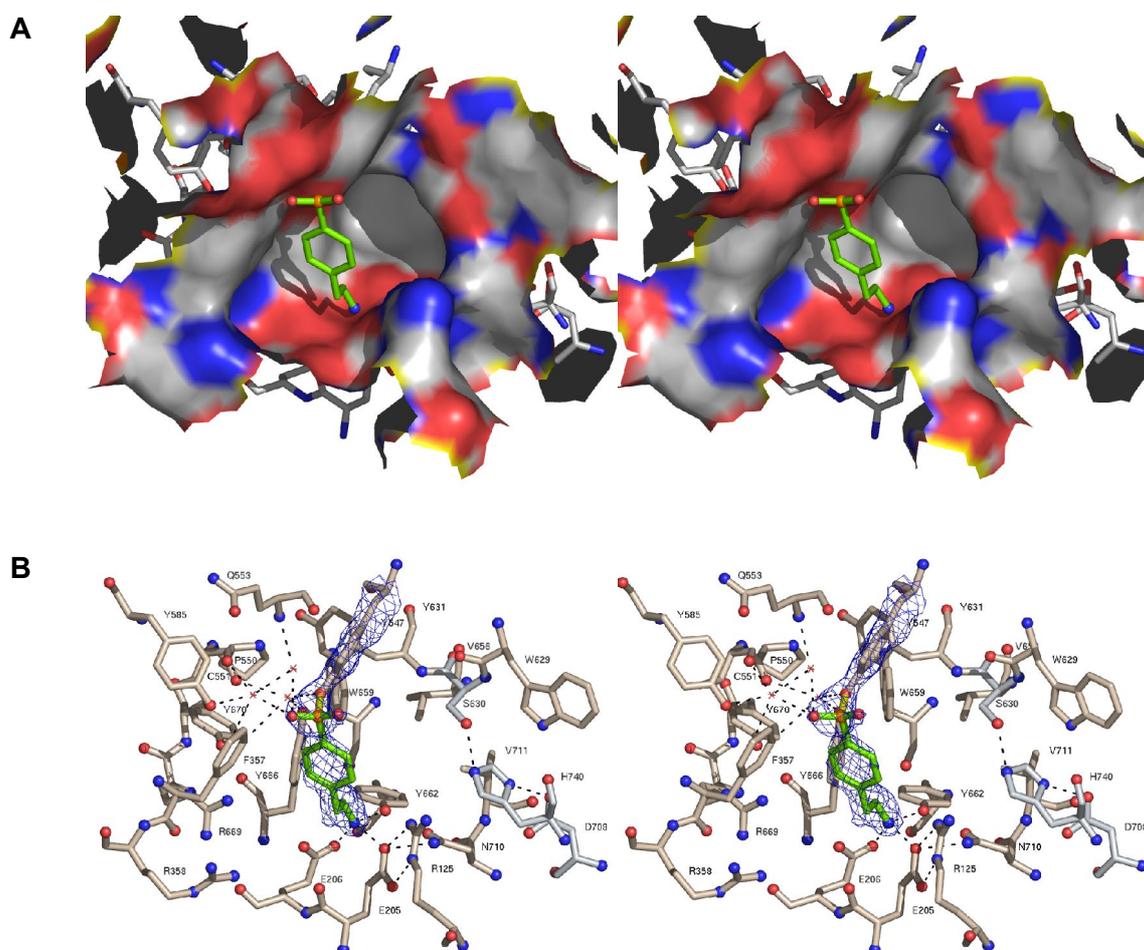


Abbildung 25: Substraterkennung der DP IV am Beispiel des Sulfonylfluorids AEBSF (Kugel-Stäbchen-Modell: AEBSF (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der DP IV (Einfärbung nach Atomtyp). Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung verdeckt. B) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste im (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige) mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. Die $2 F_{obs} - F_{calc}$ Electronendichte umhüllt den Inhibitor und die Phenolgruppe des Tyr547 (blaues Netz, kontouriert mit 1σ). (Stereoabbildung)

der hydrophoben Oberfläche fixiert sind. Dieses Wassernetzwerk hat offensichtlich einen Einfluß auf die Position des Ser630-O_γ. Wie schon im SC3/2-Komplex beobachtet ist es aus seiner nativen Lage verschoben ($\chi_1 = -55^\circ$), kann aber immer noch eine günstige Wasserstoffbrückenbindung mit dem His740-N ϵ 2 (2.7 Å) ausbilden. Die Konformationsenergie dieser Änderung scheint durch die

günstigen energetischen Interaktionen der distalen Ammoniumgruppe mit der S₂-Kationtasche, die dichte Packung der Phenylgruppe gegen die rückseitige Wand und die günstige Interaktion der Sulphonylgruppe mit ihrem polaren Umfeld aufgebracht zu werden, neben der Bereitschaft des Tyr547-Phenolrings zu weichen.

3.4. Zugang und Austritt des Substrates vom Aktiven Zentrum

Die β -Propeller Domäne deckt das aktive Zentrum ab und beschränkt dadurch den Zugang für Substrate. Es gibt zwei Möglichkeiten in das aktive Zentrum zu gelangen. Einer führt durch den Tunnel des β -Propellers, der andere durch eine Seitenöffnung. Die Seitenöffnung ist ebenso oval wie der Propellertunnel und mißt 15 Å und 22 Å. Sie wird durch die Anordnung von Blatt I und II generiert (Abb. 15). Die Distanz von der Proteinoberfläche zum aktiven Zentrum beträgt 20 Å durch die Seitenöffnung und 37 Å durch den Propellertunnel. Von ihren Ausmaßen her könnte die Seitenöffnung helikalen Substraten Zugang zum aktiven Zentrum verschaffen. Nach der Substratspaltung verlassen zwei Produkte das aktive Zentrum. Zweifellos können sich die Zugangs- und Abgangswege unterscheiden.

4. Diskussion

4.1. Oligomerisierung von membrangebundenem und löslichem DP IV

Tetramerisierung an der Zelloberfläche ist aus geometrischen Gründen mit einem membrangebunden und einem löslichen DP IV-Dimer oder mit Dimeren auf der Oberfläche von zwei unterschiedlichen Zellen verbunden, wie in Abb. 15 gezeigt. DP IV könnte als Zell-Zell Kommunikationssmolekül fungieren. Somit könnte DP IV in die Vermittlung solcher Zell-Zell Kontakte durch Tetramerisierung von zwei DP IV Dimeren an der Oberfläche von miteinander wechselwirkenden Zellen involviert sein, und die Zugabe von löslichem DP IV sollte solche Zell-Zell Interaktionen verhindern. Das findet man tatsächlich, wenn man lösliches DP IV zu einem Zell-Adhäsions-Modell hinzufügt (Cheng et al., 1998; Abdel-Ghany et al., 1998), in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Zell-Zell-Kontakt-Modell aus Abb. 15. Alternativ können sich, wie in den untersuchten Kristallen, lösliche Dimere zusammenlagern um ein Homotetramer zu bilden. Das Tetramer umschließt eine große Höhle und könnte erklären, warum die Form der DP IV mit hohem Molekulargewicht sich wie ein Hexamer bei der Gelfiltrationschromatografie verhält (Lambeir et al., 1997). Glykosylierung von Asn279 könnte die fehlende regulatorische Verknüpfung liefern, welche zur Kontrolle der Zusammenlagerung vorgeschlagen wurde (Lambeir et al., 1997).

Dimerisierung wird über drei C-terminale Sekundärstrukturelemente der katalytischen Domäne und einem fingerartigen Insertionsmotiv zwischen Strang 2 und 3 von Propellerblatt IV vermittelt. Eine N-terminale Verlängerung von 60 Aminosäuren in POP verdeckt die Dimerkontaktregion der DP IV und erklärt dadurch, warum POP nicht dimerisiert (Abb. A). Konsequenterweise

sollten N-terminal verkürzte Isoformen von POP dimerisieren. Genauso sollte es möglich sein, eine monomere DP IV Variante durch Addition eines entsprechenden Scheindimerisationsmotivs an DP IV zu konstruieren. Zusätzlich ist bekannt, daß DP IV-Heterodimere mit dem Fibroblast Activation Protein α (FAP α , Separase) bildet (Scanlan et al., 1994). FAP α teilt die essentiellen Elemente des Dimerisationsmotivs einschließlich der Erweiterung von Strang 2 und 3 in Propellerblatt IV mit DP IV (Abb. 14). Folglich sollten FAP α /FAP β -Heterodimere und FAP α -Homodimere den FAP β (DP IV)-Homodimeren ähneln.

4.2. Funktionelle Rolle der Oligomerisierung

Aus der Kristallstruktur wird deutlich, daß die Dimerisierung der DP IV nicht zur Vervollständigung des aktiven Zentrums notwendig ist, wie z.B. im Fall des Tricorns (Brandstetter et al., 2001). Stattdessen werden Dimerisierung und Tetramerisierung Interaktionen mit anderen Komponenten, wie die Bindung von proteolytischen Substraten oder die Anlagerung der Adenosindeaminase (ADA) eingeschlossen, beeinflussen und möglicherweise Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Überdies ist es wahrscheinlich, daß die Dimerisierung der DP IV die Rezeptor-Ligand-Affinität durch bivalente Interaktion steigert. Ein Effekt, der kritisch für die Signaltransduktion in die Zelle sein kann.

4.3. Substratpräferenz und katalytischer Mechanismus

In die hydrophobe S₁-Tasche passen Prolin und andere kleine, ungeladene Reste wie Alanin oder Serin. Durch die Wasserstoffbrücke des Tyr662-Hydroxyl-O η -Atoms mit dem P₁-Amidstickstoff wird das Substrat optimal für die Katalyse präsentiert. Die richtige Orientierung des Prolins in der P₁-Position wird durch seine Seitenketteninteraktion mit der Oxyaniontasche erreicht.

Die Hauptkette des P₂-Rests interagiert mit Glu205-Glu206, welche eine Zwillings- und eine einfache Salzbrücke mit dem freien Aminoterminus des P₂-Rests ausbilden. Arg125 und das N δ 2 von Asn710 stabilisieren und aktivieren das P₂-Carbonyl-Sauerstoffatom. In POP sind diese beiden

Reste strukturell und funktionell durch Arg643 substituiert. Eine dem Glu-Motiv äquivalente Binde-
stelle für den Aminoterminus fehlt jedoch ganz. Durch gezielte Punktmutationen wurde gezeigt, daß
das Glu-Motiv essentiell für die enzymatische Aktivität ist (Abbott et al., 1999a). Dieses duale
Erkennungsmotiv ähnelt auf bemerkenswerte Weise einem funktionell äquivalenten Motiv von Tri-
corn und seinem assoziierten Faktor F1. In F1 dienen die Carboxylatgruppen von Glu213 und
Glu245 als Andockstelle für den freien Aminoterminus (Goettig et al., 2002), während in der Car-
boxydipeptidase Tricorn ein Arg131-Arg132 Motiv den Carboxyterminus des Substrats bindet
(Brandstetter et al., 2001).

Als postprolin spaltendes Enzym muß die DP IV zusätzlichen Anforderungen für eine ef-
fiziente Katalyse entsprechen. Prolin beinhaltende Peptid können cis- und trans-Peptidbindungs-
konformationen einnehmen. Wie in der Inhibitorstruktur gezeigt, und im Einklang mit früheren
Beobachtungen (Fischer et al., 1983), kann nur ein Peptide in der trans-Konformation produktiv an
das aktive Zentrum binden. Wie erwartet, verstärkt das Einfrieren der trans-Konformation eines N-
Alanyl-prolyl-O-acyl-hydroxamins durch Substitution der P₂-P₁-Peptidbindung mit einer Fluoro-
olefingruppe die irreversible Bindung des DP IV-Inhibitors (Lin et al., 1998; Zhao et al., 2003; De-
muth et al., 1988). Im Gegensatz dazu werden nicht fluoroolefinierte N-Aminoacyl-prolyl-O-acyl-
hydroxamine von der DP IV zu mehr als 99.9 % gespalten, während sie andere Proteinase sehr
stark inhibieren (Brömme & Demuth, 1994; Demuth et al., 1988).

Diese unerwarteten Ergebnisse legen einen konformationellen Zweischritt-Mechanismus für
die Substrathydrolyse nahe. Dabei bindet das Substrat zuerst in trans-Konformation an das aktive
Zentrum. Erst die anschließende trans/cis-Isomerisierung ermöglicht die proteolytische Spaltung des
Substrats (Demuth & Heins, 1995). Solche Konformationsänderungen können Dank der volumi-
nösen Geometrie des aktiven Zentrums der DP IV ohne sterische Konflikte ablaufen (Abb. 21).
Durch Stabilisierung der negativen Ladung am Carbonyl-Sauerstoff des P₂-Rests reduziert die P₂-
Oxyanionfalle (Arg125) die Valenz der partiellen C=N-Doppelbindung und senkt damit die Ak-
tivierungsenergie für den Übergang von der trans in die cis-Konformation.

Das Aktive Zentrum hat in der P₂-Position Platz für sperrige Seitenketten wie Tryptophan oder Tyrosin. Tatsächlich zeigten Substrate oder Inhibitoren mit modifizierten langen oder sperrigen Seitenketten der P₂-Aminosäure sogar eine stärkere Bindung (Demuth & Heins, 1995). Substrate mit sauren Resten in der P₂-Position werden nur mäßig umgesetzt. Möglicherweise ist dies durch die attraktive Interaktion mit dem Arg125 verursacht, welche die für eine effiziente Katalyse nötige Oxyanionfalle zerstört, oder durch Abstoßung mit Glu131-Glu132. Entsprechend reduziert die Phosphorylierung der P₂-Aminosäureseitenkette, wie in Ser-Pro- und Thr-Pro-p-Nitroaniliden, die katalytische Effizienz des Enzyms um bis zu 99.5 % (Demuth & Heins, 1995; Kaspari et al., 1996).

4.4. Strukturelle Basis der Substratspezifität

Die α/β -Hydrolasen unterscheiden sich von anderen Proteinasen einerseits durch ihre umgekehrte Händigkeit im Hinblick auf die Oxyaniontasche und die katalytischen Serin und Histidin-Reste (Ollis et al., 1992), andererseits durch die ausschließliche Fixierung des Substrats über Seitenketten-Seitenketten Interaktionen. Die drei Reste des Substrats von P₂ bis P₁' schmiegen sich an eine gekrümmte, verhältnismäßig rigide Oberfläche aus Enzymseitenketten, welche eine relativ hydrophobe S₁-Tasche und eher polare S₂ und S₁'-Taschen ausbilden. Während sich die Seitenketten der P₂ und P₁'-Reste von der Enzymoberfläche weg in den Innenraum strecken, steckt die P₁-Seitenkette in einer Mulde im Enzym, die durch ihre Gestalt die Bindung auf L-Prolin, L-Hydroxyprolin, L-Alanin und L-Serin einschränkt. Seitenketten von D-Aminosäuren in P₁ würden mit der Enzymoberfläche kollidieren oder die Geometrie der drei N-terminalen Reste so verändern, daß das Peptid nicht mehr als Substrat erkannt werden kann und folglich die zu spaltende Bindung nicht richtig präsentiert wird. In Übereinstimmung mit der Präferenz für Prolin und Alanin in P₁ ist das Fehlen einer nukleophilen Gruppe in der S₁-Tasche, welche zur Aktivierung der zu spaltenden Bindung eine P₁-Aminogruppe erkennen würde (Fülöp et al., 1998). Aufgrund der gekrümmten Enzymoberfläche können nur Peptide mit der P₂-P₁-Peptidbindung in trans-Konfiguration von der Peptidase erkannt werden (Abb. 23). Nur die Phenolgruppe des Tyr547 zeigt in das aktive Zentrum, ohne mit

benachbarten Seitenketten in Kontakt zu treten. Ihr distales Hydroxyl-Orn ist wesentlicher Bestandteil der Oxyaniontasche mit der physiologischen Aufgabe den Carbonyl-Sauerstoff eines gebundenen Substrats zu polarisieren.

4.5. Rigidität und Flexibilität des aktiven Zentrums

Da die phenolische Seitenkette des Tyr547 der flexibelste Teil der verhältnismäßig starren Oberfläche des aktiven Zentrums ist, verwundert es nicht, daß sie von SC3/2 und AEBSF verschoben wurde um Platz für die Inhibitoren zu schaffen. Der SC3/2 Inhibitor zeigt eine dichte Packung in der Spalte des aktiven Zentrums. Seine Phenylgruppe füllt die hydrophobe S₁-Tasche, der Purinring packt mit der verschobenen Phenolgruppe des Tyr547, und der Piperazinring bindet mit weiteren günstigen Interaktionen in die S₂-Kationtasche. Die hohe Affinität von SC3/2 zum aktiven Zentrum der DP IV offenbart sich auf den ersten Blick aus der Struktur.

Im Gegensatz dazu enthüllt sich das Potential des AEBSF Inhibitors erst nach eingehender Betrachtung. Er bindet in ungewöhnlicher Weise an das aktive Zentrum ohne die hydrophobe S₁-Tasche zu besetzen. In dieser Tasche finden ein paar ungeordnete Wassermoleküle Platz, welche die Orientierung der Ser630-Seitenkette beeinflussen und ihre Rotation erzwingen. Obwohl man über AEBSF weiß, daß es viele Proteine kovalent über ihre Tyrosinreste modifiziert (John Stults, Genentech, Inc., <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.details?DMID=235&AvgMass=all&Margin=0>), erklärt sich seine Reaktivität im Fall der DP IV mit Sicherheit aus der Mobilität des Tyr547, welche über die vorteilhafte Präsentation der Sulfonylgruppe durch Fixierung der Aminoethylfunktion in der S₂-Kationtasche zusätzlich begünstigt wird. Um Inhibitoren in die DP IV Struktur zu modellieren, wird man die Flexibilität der Tyr547 und Ser630 Seitenketten berücksichtigen müssen. Während verschiedene kleine, organische Inhibitoren zur effektiven Bindung ans aktive Zentrum dessen Flexibilität ausnützen, profitieren peptidischen Substrate von der Rigidität seiner Oberfläche und bilden bei produktiver Bindung eine kompakte, dichte Packung mit dem Enzym aus. Bei letzteren Komplexen wird die phenolische Gruppe des Tyr547 zur Vervollständigung der Oxyanionta-

sche zwischen den Seitenketten von Enzym und Substrat eingeklemmt, um über eine Polarisierung des P₁-Carbonyl-Sauerstoffs den tetraedrischen Übergangszustand der Katalyse zu stabilisieren. Das P₂-P₁'-Segment des Substrats wird zusätzlich über die starke elektrostatische Interaktion mit der S₂-Kationtasche und durch die Wasserstoffbrückenbindungen der P₂ und P₁'-Carbonylgruppen fixiert. Die starke Bindung der N-terminalen α -Ammoniumgruppe an das aus dem dualen Glu205-Glu206-Motiv gebildeten Bindungsmotiv unterstreicht die absolute Notwendigkeit eines unsubstituierten aber protonierten N-Terminus für die Spaltung des Substrats (Heins et al., 1988; Brandt et al., 1996). Die Bedeutung dieser zwei Glu-Seitenketten für Docking-Experimente wird durch die beiden nicht-peptidischen Inhibitoren SC3/2 und AEBSF demonstriert.

4.6. Stabilität des tetraedrischen Übergangszustands

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Gruppen um Aertgeerts (Aertgeerts et al., 2004) und Thoma (Thoma et al., 2003) könnte das gebundene Tripeptid tBuGPI den Übergangszustand eines längeren peptidischen Substrats während der Katalyse widerspiegeln. Leider sind bis jetzt alle Versuche, die Bindung eines C-terminal elongierten peptidischen Substratanalogs, wie z.B. Decapeptide von N-terminalen GIP-Resten mit D-Ala in der vorletzten Position oder einer Pseudopeptidbindung zwischen der Position zwei und drei, zu beobachten, gescheitert. Das könnte die fehlende Bereitschaft, irgend etwas anderes als mittelgroße Seitenketten von L-P₁-Resten zu akzeptieren, und den metastabilen Übergangszustand während der Katalyse widerspiegeln. Auf der anderen Seite ist die Stabilität des decapeptidischen Komplexes bei Aertgeerts *et al.* (Aertgeerts et al., 2004) nicht verständlich. Aus *Modeling*-Studien, sowie in Übereinstimmung mit dem bei Aertgeerts und Mitarbeitern (Aertgeerts et al., 2004) gezeigten Modell, ist klar ersichtlich, daß die DP IV über keine weiteren Bindestellen über S₁' hinaus verfügt.

Die Kristallstruktur des tBuGPI-DP IV-Komplexes zeigt ohne Zweifel eine kovalente Interaktion des Tripeptids mit der Protease in allen vier Monomeren, wie auch bei Thoma und Mitarbeitern (Thoma et al., 2003) für ihren Diprotin A-Komplex mit rekombinanter, humaner DP IV. Im

Gegensatz dazu finden Hiramatsu und Mitarbeiter (Hiramatsu et al., 2004) in ihrer kürzlich erschienenen Veröffentlichung zu eben diesem Diprotin A-Komplex keine kovalente Interaktion, wenn auch bei einem höheren pH-Wert. Die Stabilität von jedem dieser tripeptidischen Komplexe ist erstaunlich vor dem Hintergrund einer früheren Veröffentlichung von Rahfeld und Mitarbeitern (Rahfeld et al., 1991b), in der sie Diprotin A (Ile-Pro-Ile) und Diprotin B (Val-Pro-Leu) als gute Substrate nachweisen, was die Inhibitoreigenschaften der beiden Tripeptide vorgeblich in Konkurrenz zu noch besseren Substraten erscheinen läßt.

Was könnte die strukturelle Basis für die Stabilität des tBuGPI-DP IV-Komplexes sein? Die enge, hydrophobe Interaktion des Tripeptids mit den korrespondierenden Taschen des aktiven Zentrums und das dichte Salz- und Wasserstoffbrücken-Netzwerk zwingen das Peptid in eine ungewöhnliche Konformation. Die P_1' -Amid-N-H-Gruppe bildet daraufhin eine günstige intramolekulare Wasserstoffbrücke zum P_2 -Carbonyl-Sauerstoff aus. Der optimale nukleophile Angriff auf das P_1 -Carbonyl eines Substrats, die Bildung und der Zusammenbruch des tetraedrischen Übergangszustands setzen jeweils die antiperiplanare Orientierung des Orbitals des freien Elektronenpaares am P_1' -Stickstoff voraus. Solch eine Orbital-Reorientierung könnte durch die intramolekulare Wasserstoffbrücke und die gleichzeitige Präsentation des P_1' -Amid-Stickstoffs für den Protonentransfer vom His740-N ϵ 2 gehindert sein. Betrachtet man die beobachtete Konformation des Tripeptids als Modell für die Substratbindung, würden beide Effekte auch die normale Katalyse beeinflussen. Der augenscheinlichste Unterschied des Tripeptids zu längeren Peptiden ist die Platzierung der C-terminalen P_1' -Carboxylatgruppe in die direkte Nachbarschaft zur mutmaßlich protonierten His740-Imidazoliumgruppe. Zweifellos wird die negativ geladene P_1' -Carboxylatgruppe das Imidazoliumkation stabilisieren und dadurch den Transfer des Protons auf die Abgangsgruppe verhindern. Folglich würde die Peptidbindung nicht gespalten, die P_1' -Aminosäure könnte den Komplex nicht verlassen und der metastabile, tetraedrische Übergangszustand wird eingefroren.

4.7. Vergleich der β -Propeller Architekturen

Der Tunnel durch den achtblättrigen β -Propeller weitet sich trichterartig von der Oberfläche zum aktiven Zentrum der DP IV. Eine ähnliche konische Weitung des Propellertunnels zum aktiven Zentrum hin wurde für den β 7-Propeller des Tricorns und der POP beobachtet (Fülöp et al., 1998; Brandstetter et al., 2001). Der β 6-Propeller von Tricorns besitzt auch eine konische Form, weitet sich aber zum Solvens hin. Da dieser β 6-Propeller zum Abtransport der Protolyseprodukte zu weiterverarbeitenden Protease Faktoren dient (Brandstetter et al., 2002; Kim et al., 2002), bestätigt diese scheinbare Ausnahme, die Regel der Tunnelerweiterung hin zum aktiven Zentrum.

4.8. Substrateintritt und Produktaustritt vom aktiven Zentrum

DP IV wird als vollständig aktives Enzym expremiert. Das Fehlen eines Zymogen-Enzym-Aktivierungsschritts und endogener DP IV-Inhibitoren verlagert die Regulation der Aktivität auf die Genexpression, Proteinsynthese und Substratselektion. Entsprechend den Proteasen mit ver-

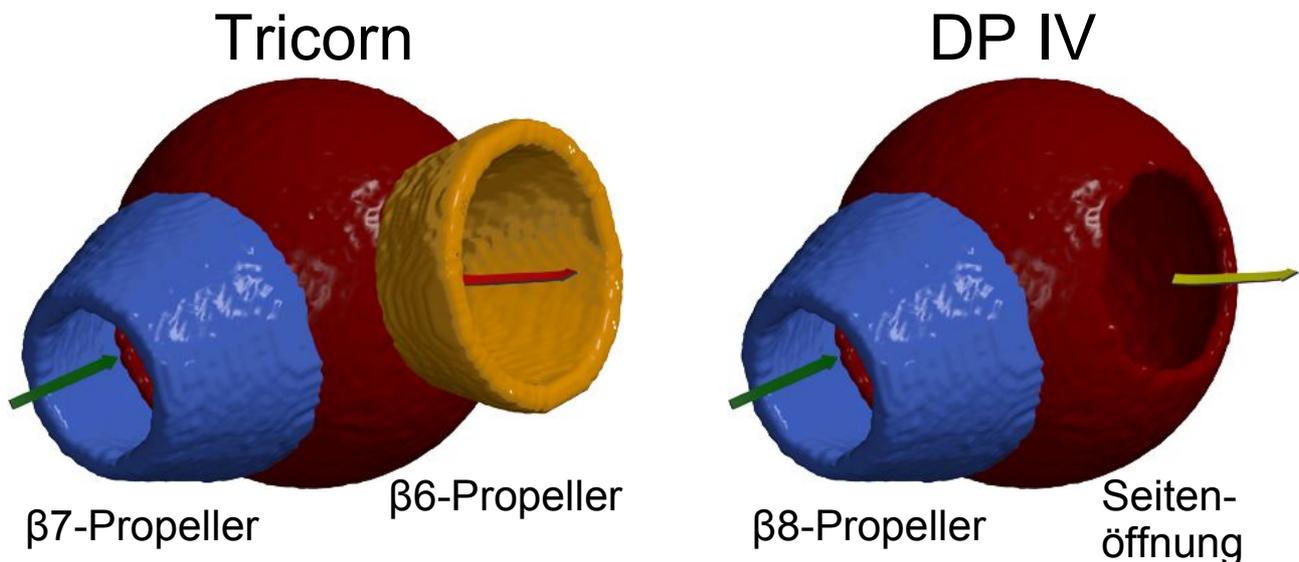


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Substratzugangs- und Produktabgangswege bei Tricorn und DP IV nach Überlagerung der katalytischen Hauptelemente der beiden Strukturen.

borgenen aktiven Zentren, wie der POP, dem Proteasom oder Tricorn, dient die Kontrolle des Substratzugangs hier hauptsächlich als regulatorisches Element der Enzymaktivität. Zwei Öffnungen

ermöglichen den Zugang zum aktiven Zentrum. Der kürzere Weg durch die Seitenöffnung scheint der einfachere und kinetisch favorisierte Zu- und Abgang vom aktiven Zentrum zu sein. Funktionell betrachtet kann das „Seitenöffnungs“-Modell die hohe Substratselektivität nicht erklären, da sogar gefaltete Peptide das aktive Zentrum durch die Seitenöffnung erreichen könnten. Das Modell ignoriert die starke Präferenz von POP ($\beta 7$) und Tricorn ($\beta 7$ und $\beta 6$), bei denen alle drei topologisch offenen β -Propeller Substrate hin zum und Produkte weg vom aktiven Zentrum leiten. Die Situation der DP IV ist der Tricornprotease am ähnlichsten, bei der ein sieben- und ein sechsblättriger β -Propeller separate Ein- und Ausgänge zum aktiven Zentrum darstellen. Die Tricornprotease ist eine Serinprotease mit niedriger aber signifikanter struktureller Homologie zur Familie der α/β -Hydrolasen. Durch Überlagerung der katalytischen Hauptelemente, einschließlich des Serins und Histidins im aktiven Zentrum, der dem aktiven Serin folgenden, hoch konservierten Helix (Ser630-Ala642 bzw. Ser965-Leu977) und des fünfsträngigen, parallelen β -Faltblatts von Tricorn auf die äquivalenten Stränge des achtsträngigen DP IV-Faltblatts, werden die strukturellen Ähnlichkeiten der beiden Proteasen noch deutlicher. Beide zentralen β -Faltblätter haben identische Polarität. Die beiden Tricornpropeller lassen sich auf die zwei DP IV-Öffnungen überlagern: Der Tricorn- $\beta 7$ -Propeller auf den DP IV- $\beta 8$ -Propeller und der Tricorn- $\beta 6$ -Propeller auf die Seitenöffnung (Abb. 26). Diese Ähnlichkeit deutet darauf hin, daß der $\beta 8$ -Propeller als Substrateingang und die Seitenöffnung als Produktausgang des aktiven Zentrums der DP IV dienen könnte. Das vom Tricorn abgeleitete Modell kann die hohe Substratselektivität der DP IV erklären, welche kritisch für die Aktivierung und Inaktivierung von regulatorischen Peptiden ist. Der Zugang durch den β -Propellertunnel erfordert die Entfaltung des Substrats, die der DP IV ein chemisches *finger printing* ermöglichen würde. Wenn der Aminoterminus des Peptids das aktive Zentrum erreicht hat, könnte es durch die Interaktion seines C-Terminus mit dem β -Propeller fixiert werden. Diese Interaktion würde zur korrekten Positionierung des Substrats für die Spaltung beitragen. Nach dem nukleophilen Angriff bildet sich das Acyl-Enzym-Intermediat, worauf die Produkte direkt durch die Seitenöffnung entlassen würden. Das würde erklären, warum der Abbau von Glukagon durch DP IV nicht prozessiv ist sondern se-

quentiell in zwei unabhängigen Schritten statt findet (Glukagon 3-29, Glukagon 5-29) (Pospisilik et al., 2001).

4.9. Vergleich mit der Prolyloligopeptidase

Die hydrolytische Aktivität der DP IV ist im Gegensatz zur POP nicht auf oligopeptidische Substrate beschränkt. DP IV kann größere Proteine wie Trypsinogen (Nausch et al., 1990) umsetzen, wenn auch nicht in physiologisch relevantem Maßstab. Die simple Erklärung dafür ist die im Vergleich zur POP größere Propelleröffnung, eine relativ große Seitenöffnung, welche auch kompakteren Substraten erlauben würde, ihren N-Terminus zur Prozessierung durch das aktive Zentrum durchzuführen (Abb. 27A). Nach Ergebnissen von Nausch und Mitarbeitern (Nausch et al., 1990) kann die DP IV das N-terminale Dipeptid Arg1-Pro2 vom nativen, stark quervernetzten, 58 Reste großen Trypsin Inhibitor Aprotinin (Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor, BPTI, Trasylol®) abspalten, wenn auch nicht sehr effizient. Docking-Experimente zeigen, daß der Hauptteil des kompakten Proteins aufgrund seiner Cys5-Cys55 Disulfidbrücke in den Innenraum der Protease durch die Seitenöffnung gelangen muß, um seinen N-Terminus dem aktiven Zentrum in geeigneter Weise zu präsentieren (Abb. 27B). Solch ein Eintritt wäre nur möglich, wenn sich die Seitenöffnung etwas vergrößern kann. Eine Aufweitung ist durch Propellerexpansion oder eine Separation der Propeller-Domäne und der katalytischen Domäne denkbar. Die Propellerexpansion könnte durch Separation von Blatt I und VIII und/oder durch Aufbiegen der Halbschale bestehend aus den Blättern VI, VII, VIII und I erfolgen. Die Analyse der Struktur der DP IV zeigt, daß eine derartige Flexibilität durch die Dimer- oder Tetramerbildung nicht behindert wäre.

Eine ähnliche Flexibilität wurde kürzlich für die topologisch verwandte POP mit Hilfe von künstlich eingeführten Disulfidbrücken gezeigt. Die zusätzlichen Bindungen verknüpften die Propellerblätter I und VII entfernt zur oder nahe der katalytischen Domäne, oder verbanden beide Domänen miteinander (Fülöp et al., 2000; Szeltner et al., 2004; Juhász et al., 2005). Die Autoren konnten in ihren Studien zeigen, daß die Disulfidbrücken einerseits die Protease stabilisierten,

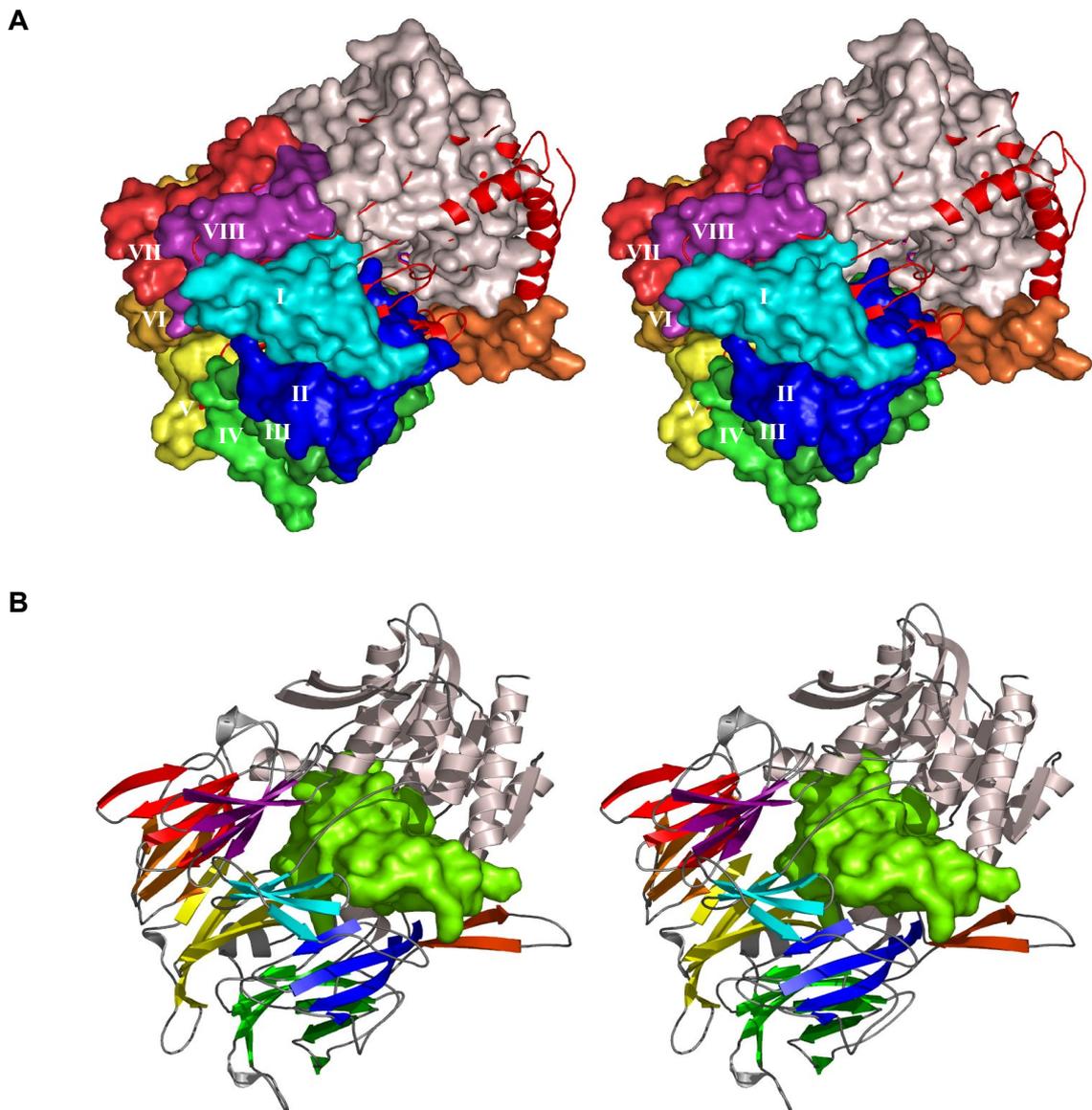


Abbildung 27: Vergleich der DP IV mit POP und Docking von Aprotinin (BPTI) an DP IV. A) Überlagerung eines DP IV-Monomers mit POP. Das DP IV-Monomer ist durch seine Oberfläche dargestellt (β -Propeller Domäne: Blatt I (cyan), Blatt II (marine), Blatt III (dunkelgrün), Blatt IV (hellgrün), Blatt V (gelb), Blatt VI (orange), Blatt VII (rot), Blatt VIII (violett), katalytische Domäne (grau)), während das POP Molekül nur dort wo es die DP IV durch seine Größe verdeckt als rote Ribbon-Darstellung zu sehen ist, z.B. an der Seitenöffnung der DP IV. B) Docking des starren, 58 Reste großen Inhibitors Aprotinin an das aktive Zentrum der DP IV. Das DP IV-Monomer ist als Ribbons dargestellt (Farbgebung wie in A), während der Inhibitor als Oberfläche (grün) gezeigt ist. (Stereoabbildung, Standardorientierung nach W. Bode)

andererseits einen großen Aktivitätsverlust durch die ausschließliche Substratbindung über den engen siebenblättrigen β -Propellertunnel verursachten. Auch wenn der achtblättrige Propeller der DP IV weniger eng ist, sollten oligopeptidische Substrate das aktive Zentrum doch über den Seiteneingang erreichen können. Die hydrolytische Aktivität gegenüber größeren, kompakten Proteinen

demonstriert eine gleichfalls bemerkenswerte Flexibilität der DP IV. Zur endgültige Klärung der funktionellen Rollen der beiden Öffnungen sind weitere Experimente erforderlich.

4.10. Interaktion mit anderen Komponenten

An der Oberfläche von T-Zellen fungiert die DP IV als Rezeptor zur Bindung der Adenosindeaminase (ADA) und schützt dadurch die Zelle vor der durch Adenosin vermittelten Inhibition der Proliferation (De Meester et al., 1996). Interessanterweise bindet DP IV aus Maus und Ratte ADA nicht (Dinjens et al., 1989; Iwaki-Egawa et al., 1997). Durch Punktmutationen wurden Leu294 und Val341 als zwei ADA-Bindestellen identifiziert (Abbott et al., 1999b). Leu294 und Val341 befinden sich auf den äußeren Strängen der Propellerblätter IV und V der Tetramerkontaktfläche. Dadurch wird die Tetramerisierung wahrscheinlich mit der ADA-Bindung konkurrieren (Abb. 17), genauso wie die Glykosylierung von Asn279 (Asn281 in der humanen Sequenz) die ADA-Bindung beeinflussen könnte. Dies läßt den Schluß zu, daß die Tetramerisierung der DP IV und die Glykosylierung von Asn279 den Hauptkontrollmechanismus der ADA-Bindung darstellen. Interessanterweise fehlt diese Glykosylierungsstelle in der DP IV-Sequenz aus Maus und Ratte und korreliert mit deren Unfähigkeit, ADA zu binden (Abbott et al., 1999b).

4.11. DP IV als pharmakologisches Zielprotein

Die Aktivität der DP IV zeigt eine stark Korrelation mit vielen Krankheiten wie Diabetes, Fettleibigkeit und Tumorentwicklung (Pederson et al., 1998b; Pospisilik et al., 2002; Cheng et al., 2002; Kajiyama et al., 2002; Ho et al., 2001). Das macht sie zu einem der Hauptziele pharmazeutischer Forschung. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Inhibitorstrukturen identifizieren wichtige Erkennungselemente aus dem aktiven Zentrum der DP IV und repräsentieren einen exzellenten Startpunkt für rationelles Design von spezifischen Inhibitoren. Verbindungen wie die Cyanopyrrolidone blockieren das Enzym kovalent. Die Beteiligung der DP IV in zahlreichen physiologischen

Prozessen stellt hohe Anforderungen an jedes DP IV-Arzneimittel-Entwicklungsprogramm, um ungewollte Nebeneffekte zu vermeiden. Idealerweise wird man eher versuchen, ein einzelnes DP IV-Substrat regulieren als die gesamte Aktivität. Eine Lösung des Problems stellen nicht auf das aktive Zentrum gerichtete Inhibierungsstrategien dar. Das an die Oxyaniontasche im β -Propellertunnel gebundene Sulfation (Abb. 21) könnte ein vielversprechender Startpunkt für die Entwicklung von neuartigen Inhibitoren sein, die den Durchgang des Substrats durch den β -Propellertunnel blockieren.

A. Anhang

A.1. Biochemische Daten

Tabelle 1: Reinigung der DP IV aus Schweineniere.

Präparationsschritt	Volumen [ml]	Protein [mg]	Aktivität [U/ml]	gesamt Aktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsgrad
Homogenisierung und Autolyse	1435	66040	7.6	10906	0.17	100.00	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung (60%) Überstand	1700	18700	6.1	6958	0.37	63.80	2.19
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung (85%) Pellet	77	7132	64	4928	0.69	45.19	4.06
Sepharose 6B	138	836.9	29	4002	4.78	47.81	31.88
DEAE-Sephacel	276	65.4	9.1	2511.6	38.40	30.01	256.02
UNO-Q	192	58.3	11.45	2431.2	41.70	29.05	278.01

Tabelle 2: Sequenz der DP IV aus *Sus scrofa*.

0	MKTPWKVLLG	LLGIAALVTV	ITVPVLLNK	GTDDAAADSR	RTYTLTDYLK	STFRVKFYTL
60	QWISDHEYLY	KQENNILLFN	AEYGNSSIFL	ENSTFDELGY	STNDYSVSPD	RQFILFEYNY
120	VKQWRHSYTA	SYDIYDLNKR	QLITEERIPN	NTQWITWSPV	GHKLAYVWNN	DIYVKNEPNL
180	SSQRITWTGK	ENVIYNGVTD	WVYEEEVFSA	YSALWWSPNG	TFLAYAQFND	TEVPLIEYSF
240	YSDESLQYPK	TVRIYPKAG	AENPTVKFFV	VDTRTLSPNA	SVTSYQIVPP	ASVLIGDHYL
300	CGVTWVTEER	ISLQWIRRAQ	NYSIIDICDY	DESTGRWISS	VARQHIEIST	TGWVGRFRPA
360	EPHFTSDGNS	FYKIISNEEG	YKHICHFQTD	KSNCTFITKG	AWEVIGIEAL	TSDYLYYISN
420	EHKGMPPGGRN	LYRIQLNDYT	KVTCLSCELN	PERCQYYSAS	FSNKAKYYQL	RCFGPGLPLY
480	TLHSSSSDKE	LRVLEDNSAL	DKMLQDVQMP	SKKLDVINLH	GTKFWYQMIL	PPHFDKSKKY
540	PLLIEVYAGP	CSQKVDTVFR	LSWATYLAST	ENIIVASFDG	RGSGYQGDKI	MHAINRRLGT
600	FEVEDQIEAT	RQFSKMGFVD	DKRIAIWGS	YGGYVTSMVL	GAGSGVFKCG	IAVAPVSKWE
660	YYDSVYTERY	MGLPTPEDNL	DYYRNSTVMS	RAENFKQVEY	LLIHGTADDN	VHFQQAQLS
720	KALVDAGVDF	QTMWYTDEDH	GIASNMAHQH	IYTHMSHFLK	QCFSLP	

A.2. Kristallographische Daten

Tabelle 3: Datensammlung der nativen DP IV, des Schweratomderivates und der Ligand-Komplexe.

Datensammlung

Kristall	h_01	i_01	Hg (pk)	Hg (ip)	Hg (rm)	SC3/2	AEBSF	tBuGPI
Weite [°/Bild]	0.5	0.5	0.75	0.75	1.0	0.5	0.5	1
Dosis (Zeit [s])	2000	2000	500	500	500	2000	2000	(1500)
Anzahl der Bilder	360	720	540	540	360	360	360	200
Phi [°]	180	360	405	405	360	180	180	200
Distanz [mm]	115	145	180	180	180	160	130	200
Wellenlänge [Å]	1.05	1.4	1.0050	1.0092	0.95	1.05	1.05	1.54
Schlitz H [mm]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-
Schlitz V [mm]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-
max. Auflösung [Å]	1.8	2.8	2.5	2.5	2.4	2.25	1.93	2.3
Zeit [h]	~ 3	~ 6	~ 6	~ 6	~ 6	~ 3	~ 3	~ 83

Tabelle 4: Datenauswertung und Verfeinerung der nativen DP IV (h_01) und des Ligand-Komplexes *p*-Iodo-phenyl-cyano-pyrrolidid (i_01).**Datenauswertung**

Kristall	h_01	i_01
Kristallbedingung	20-22% PEG2000 0.1 M AS 0.1 M Tris/HCl pH 8.0	20-22% PEG2000 0.1 M AS 0.1 M Tris/HCl pH 8.0
Raumgruppe	P1	P1
Moleküle in der ASU	4	4
Zellkonstanten		
a, b, c [Å]	61.98, 118.07, 133.51	61.97, 117.65, 133.32
α , β , γ [°]	112.79, 94.97, 91.18	112.69, 94.96, 91.10
man. Auflösung	1.8	2.8
Gemessene Reflexe	617050	287421
Unabhängige Reflexe	322283	157559
R_{sym} ^(a) [%]	5.2 (35.2)	5.7 (16.2)
Vollständigkeit ^(a) [%]	96.1 (94.2)	96.4 (92.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	12.4	12.2
Multiplizität	1.8	1.8

Verfeinerung

Verwendete Reflexe [%]	309996 (96.2)	157559 (96.4)
<i>Working Set</i> [%]	294550 (91.4)	149754 (91.6)
<i>Test Set</i> [%]	15446 (4.8)	7805 (4.8)
Auflösungsbereich [Å]	20.0 - 1.8	30.0 - 2.8
R_{working} [%]	21.7	18.7
R_{free} [%]	25.2	24.7
RMS Standard Abweichungen		
Bindungslänge [Å]	0.009	0.008
Bindungswinkel [°]	1.5	1.5
Gemittelter B-Faktor [Å ²]	55.4	33.6
<i>Ramachandran Plot</i>		
<i>Most favoured regions</i> [%]	87.3	83.1
<i>Additional allowed regions</i> [%]	12.0	15.6
<i>Generously allowed regions</i> [%]	0.3	0.9
<i>Disallowed regions</i> ^(b) [%]	0.3	0.4
Nicht-Wasserstoff Proteinatome	23864	23864
Nicht-Wasserstoff Inhibitoratome	-	76
Lösungsmittelmoleküle	1468	818

Tabelle 5: Datenauswertung und Verfeinerung der Ligand-Komplexe SC3/2, AEBSF und tBuGPI.**Datenauswertung**

Kristall	SC3/2	AEBSF	tBuGPI
Kristallbedingung	20-22% PEG2000 0.1 M AS 0.1 M Tris/HCl pH 8.0	20-22% PEG2000 0.1 M AS 0.1 M Tris/HCl pH 8.0	20-22% PEG2000 0.1 M AS 0.1 M Tris/HCl pH 8.0
Raumgruppe	P1	P1	P1
Moleküle in der ASU	4	4	4
Zellkonstanten			
a, b, c [Å]	63.11, 118.96, 133.76	62.35, 118.68, 133.68	62.30, 118.50, 133.53
α , β , γ [°]	112.79, 95.73, 90.63	112.76, 95.16, 90.95	112.67, 94.94, 91.02
max. Auflösung	2.1	2.0	2.7
Gemessene Reflexe	411647	463697	284948
Unabhängige Reflexe	212238	247685	144454
R_{sym} ^(a) [%]	5.3 (34.7)	3.5 (33.8)	7.8 (26.4)
Vollständigkeit ^(a) [%]	97.9 (96.5)	96.8 (94.9)	96.3 (94.6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.4	14.8	9.9
Multiplizität	1.9	1.8	1.8

Verfeinerung

Verwendete Reflexe [%]	200628 (97.9)	247604 (96.7)	87138 (95.9)
<i>Working Set</i> [%]	190635 (93.0)	235261 (91.9)	82731 (91.0)
<i>Test Set</i> [%]	9993 (4.9)	12343 (4.8)	4407 (4.8)
Auflösungsbereich [Å]	40.0 - 2.1	40.0 - 2.0	20.0 - 2.7
R_{working} [%]	20.7	21.1	20.1
R_{free} [%]	24.1	23.6	26.8
RMS Standard Abweichungen			
Bindungslänge [Å]	0.006	0.006	0.007
Bindungswinkel [°]	1.3	1.3	1.4
Gemittelter B-Faktor [Å ²]	48.4	54.8	27.7
<i>Ramachandran Plot</i>			
<i>Most favoured regions</i> [%]	87.3	87.1	87.1
<i>Additional allowed regions</i> [%]	11.9	12.3	12.3
<i>Generously allowed regions</i> [%]	0.5	0.4	0.4
<i>Disallowed regions</i> ^(b) [%]	0.2	0.2	0.2
Nicht-Wasserstoff Proteinatome	23864	23864	23864
Nicht-Wasserstoff Inhibitoratome	208	48	96
Lösungsmittelmoleküle	1646	1496	841

Tabelle 6: Datenauswertung und Phasierungsstatistik des Quecksiber-Derivates.**Datenauswertung**

Kristall	Hg (<i>peak</i>)	Hg (<i>inflection point</i>)	Hg (<i>remote</i>)
Kristallbedingung	20-22% PEG2000 0.1 M AS 0.1 M Tris/HCl pH 8.0	20-22% PEG2000 0.1 M AS 0.1 M Tris/HCl pH 8.0	20-22% PEG2000 0.1 M AS 0.1 M Tris/HCl pH 8.0
Raumgruppe	P1	P1	P1
Moleküle in der ASU	4	4	4
Zellkonstanten			
a, b, c [Å]	62.12, 118.79, 134.17	62.09, 118.73, 134.11	62.02, 118.60, 133.99
α , β , γ [°]	112.90, 94.72, 91.18	112.91, 94.72, 91.16	112.93, 94.73, 91.17
max. Auflösung	2.5	2.5	2.4
Gemessene Reflexe	542280	540918	568673
Unabhängige Reflexe	245588	245175	290594
R_{sym} ^(a) [%]	4.1 (17.4)	4.0 (15.8)	4.1 (18.1)
Vollständigkeit ^(a) [%]	98.6 (97.9)	98.6 (97.9)	98.4 (96.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	16.4	17.2	14.5
Multiplizität	2.2	2.2	1.9

Phasierungsstatistik

Wellenlänge [Å]	1.0050	1.0092	0.9500
Auflösungsbereich [Å]	45.0 – 2.5	45.0 – 2.5	45.0 – 2.4
R_{iso} ^(a) [%]	18.1 (28.4)	18.0 (27.3)	20.3 (29.8)
R_{Cullis} (iso / ano) bei 3.5 Å	0.67 / 0.69	0.68 / 0.74	0.54 / 0.64
<i>Phasing Power</i> bei 3.5 Å	2.14	1.97	2.13
Anzahl der Schweratomlagen	4	4	4

^(a) Werte in Klammern beziehen sich auf die äußerste Auflösungschale.

^(b) Das katalytische Ser630 gehört sowohl zum vorausgehenden Strang wie auch zur darauf folgenden Helix. Das erzeugt eine gespannte Konformation der Aminosäurehauptkette, wodurch es in der “disallowed region” des Ramachandranplots zu liegen kommt.

A.3. Kristallographische Begriffe

Auflösung	Abstand d_{\min} der Gitterebenen in einem gegebenen Kristall gemäß der Braggschen Gleichung $d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{\max}}$, wobei θ_{\max} den Beugungswinkel darstellt, bei dem das Diffraktionsbild verschwindet.
Datensatz	Ergebnis der Auswertung einer Serie von Diffraktionsbildern, welches die gemessenen Reflexe in Form von numerischen Werten der Strukturfaktoramplituden ($ F_{hkl} $) darstellt.
Derivat-Datensatz	Datensatz von einem Proteinkristall, der durch die Reaktion mit einer Schwermetallverbindung eine lokale Änderung der Elektronendichteverteilung aufweist.
Differenz-Fourier	Fouriersummation, bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden: die resultierende Elektronendichtekarte gibt die molekularen Unterschiede wieder, welche die Differenzen in den Strukturfaktoramplituden erzeugen.
Differenz-Patterson	Pattersonfunktion bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden.
F_{calc}	Strukturfaktoren, die aus den Koordinaten eines Modells berechnet wurden, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $ F_{\text{calc}} $ (kürzer F_c) und den Phasenwinkeln α_{calc} zusammensetzen.
F_{obs}	experimentelle Strukturfaktoren, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $ F_{\text{obs}} $ (kürzer F_o) und falls experimentell bestimmt, den Phasenwinkeln α_{calc} zusammensetzen.

Figure of Merit (FOM) Maß für die Qualität der experimentell ermittelten Phasenwinkel als Kosinus des mittleren Phasenfehlers: für einen Strukturfaktor F_{hkl} ergibt sich die *Figure of Merit* (FOM) zu:

$$m = \int_{\alpha} (P_{hkl}(\alpha) \exp(i \alpha) d\alpha) ; \text{ wobei } 0 \geq m \geq 1 .$$

P_{hkl} wird während der Phasierung berechnet und gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass für F_{hkl} der Phasenwinkel beträgt.

Freier R-Faktor siehe R_{free}

Multiplizität Mittelwert des Verhältnisses aus Anzahl der gemessenen Reflexe und der kristallographisch unabhängigen Reflexe.

Nativer Datensatz Datensatz von einem unveränderten Proteinkristall, d.h. nicht mit einer Schwermetallverbindung behandelt.

R-Faktoren R-Faktoren werden in der Kristallographie dazu verwendet, um die Übereinstimmung von zwei Messwerten oder der Messwerte mit dem Modell zu beschreiben.

R, bzw. R_{cryst} Beschreibung der Qualität einer verfeinerten Kristallstruktur als Funktion der Übereinstimmung von $|F_{\text{calc}}|$ und $|F_{\text{obs}}|$,

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|} , \text{ wobei } k \text{ einen Skalierfaktor dar-}$$

stellt, um die gemessenen und die berechneten Strukturfaktoramplituden auf eine einheitlich Skala zu bringen.

R_{free}

R_{free} wird analog zu R_{cryst} mit einem bestimmten Anteil der Reflexe (*test set*) berechnet, die nicht bei der Verfeinerung berücksichtigt wurden. Dies soll eine Überanpassung des Modells verhindern.

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \in T} \| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \|}{\sum_{hkl \in T} |F_{\text{obs}}|}, \text{ wobei } hkl \in T \text{ alle Reflexe}$$

des *test set* bezeichnet.

 R_{sym}

Beschreibung der Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung von symmetrieverwandten Reflexen;

$$R_{\text{sym}}(I) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}, \text{ für } n \text{ unabhängige Reflexe}$$

und i Beobachtungen eines gegebenen Reflexes.

 R_{deri} , bzw. R_{iso}

Dieser R-Faktor wird zur Beurteilung der Qualität eines isomorphen Derivats herangezogen;

$$R_{\text{iso}} = \frac{\sum_{hkl} \| |F_{\text{deri}}(hkl)| - |F_{\text{nati}}(hkl)| \|}{\sum_{hkl} |F_{\text{nati}}|}, \text{ } F_{\text{deri}} \text{ und } F_{\text{nati}} \text{ bezeichnen}$$

die Strukturfaktoren des Derivats und des nativen Datensatzes.

 $R_{\text{Cullis}}(\text{iso})$

$$R_{\text{Cullis}}(\text{iso}) = \frac{\sum_{hkl} \| |F_{\text{PH} \pm F_{\text{P}}}| - F_{\text{H}}(\text{calc}) \|}{\sum_{hkl} |F_{\text{PH} \pm F_{\text{P}}|}, \text{ für zentrische}$$

Reflexe. F_{P} , F_{PH} und F_{H} beinhalten ihr Vorzeichen: $F_{\text{PH}} + F_{\text{P}}$, wenn die Vorzeichen verschieden sind, $F_{\text{PH}} - F_{\text{P}}$, wenn die Vorzeichen gleich sind.

$R_{\text{Cullis}}(\text{ano})$

$$R_{\text{Cullis}}(\text{ano}) = \frac{\sum_{hkl} \left| \Delta F_{\text{PH}}^{\pm}(\text{obs}) - F_{\text{PH}}^{\pm}(\text{calc}) \right|}{\sum_{hkl} \left| \Delta F_{\text{PH}}^{\pm}(\text{obs}) \right|}, \quad \text{mit}$$

$\Delta F_{\text{PH}}^{\pm}(\text{obs})$ als Differenz der Strukturfaktoramplituden aus Bi-

jvoet-Paaren und $\Delta F_{\text{PH}}^{\pm}(\text{calc}) = 2 \frac{f''}{\Delta f} |F_{\text{H}}| \sin(\alpha_{\text{PH}} - \alpha_{\text{H}})$.

Rigid Body Refinement

Bezeichnung für die Verfeinerung von ganzen Molekülen (oder Molekülteilen) als starre Körper.

r.m.s, bzw. RMS

Quadratisches Mittel („*root mean square*“), das in der Regel zur Angabe von Abweichungen verwendet wird, im Gegensatz zum Geometrischen Mittelwert werden hohe Differenzen stärker gewichtet:

$$\text{RMS-Abweichung} = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_n (\chi_n - \bar{\chi})^2}, \quad \text{mit } n: \text{Anzahl der Messwerte, } \chi_n: n\text{-ter Messwert, } \bar{\chi}: \text{Mittelwert oder Standardwert.}$$

Simulated Annealing

Verfeinerungsalgorithmus in XPLOR und CNS bei dem im Rahmen einer Moleküldynamikrechnung die Temperatur des Systems virtuell erhöht und schrittweise wieder gesenkt wird, um so den Konvergenzradius der Verfeinerung zu verbessern.

Solvensbereich

Zusammenhängender Bereich in Proteinkristallen, der mit Lösungsmittel gefüllt ist.

Solvensgehalt

Anteil des Solvensbereich am Gesamtvolumen.

<i>Test Set</i>	Teil der Strukturfaktoren eines Datensatzes, der nur zur Berechnung von R_{free} benutzt und nicht zur Verfeinerung herangezogen wird (in der Regel ca. 5-10% der gemessenen Strukturfaktoramplituden).
Vollständigkeit	Prozentualer Anteil der gemessenen unabhängigen Reflexe im Vergleich zu den theoretisch möglichen Strukturfaktoren.
<i>Working Set</i>	Strukturfaktoren, die nicht zum <i>test set</i> gehören und zur Verfeinerung benutzt werden (90-95% der gemessenen Strukturfaktoramplituden)
Zahl d. Reflexe	Anzahl der unabhängigen Reflexe, bzw. Strukturfaktoramplituden, die nicht über eine kristallographische Symmetrie verwandt sind.

A.4. Nomenklatur der Aminosäuren

<i>Name</i>	<i>Dreibuchstabencode</i>	<i>Einbuchstabencode</i>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
beliebige Aminosäure	Xaa	X

A.5. Liste der Verwendeten Abkürzungen

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent
AA	<u>A</u> mino <u>A</u> cid (Aminosäure)
Å	Ångström (1 Å=10 ⁻¹⁰ m)
Abb.	Abbildung
Abu	α - <u>A</u> mino <u>b</u> uttersäure
ADA	<u>A</u> denosin <u>d</u> esaminase
APN	Amino <u>p</u> eptidase N
AS	<u>A</u> minosäure
ASU	<u>A</u> symmetric <u>U</u> nit (Asymmetrische Einheit)
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
Da	Dalton
dH ₂ O	H ₂ O dest. (destilliertes Wasser)
ddH ₂ O	H ₂ O bidest. (zweifach destilliertes Wasser)
DESY	<u>D</u> eutsches <u>E</u> lektronensynchrotron
DFP	<u>D</u> iisopropylfluorophosphat
Dhp	L- <u>D</u> ehydroprolin
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DP IV	<u>D</u> ipeptidyl <u>p</u> eptidase IV
e	Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]
EDTA	<u>E</u> thylend <u>d</u> iamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EC	<u>E</u> nzyme <u>C</u> lassification
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	<u>F</u> lavin <u>a</u> denin <u>d</u> inukleotid
FMN	<u>F</u> lavin <u>m</u> ononukleotid
FPLC	<u>F</u> ast <u>P</u> rotein <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
g	Erdbeschleunigung
GIP	<u>G</u> lucose- <u>D</u> ependent- <u>I</u> nsulintropic- <u>P</u> olypeptide
GLP	<u>G</u> lucagon- <u>L</u> ike- <u>P</u> eptide
GRF	<u>G</u> rowth- <u>H</u> ormone- <u>R</u> eleasing- <u>F</u> actor
h	Stunde
HASYLAB	<u>H</u> amburger <u>S</u> ynchrotron- <u>S</u> trahlungslabor
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus
I, [I]	Inhibitor, Inhibitorkonzentration

IEC	<i>Ion Exchange Chromatography</i> (Ionenaustauschchromatographie)
Kap.	Kapitel
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante enzymatischer Reaktionen [s^{-1}]
K_i	Inhibierungskonstante, Dissoziationskonstante des Enzym- Inhibitor-Komplexes [M]
K_m	Michaelis-Menten-Konstante [M]
λ	Wellenlänge
LM	<u>L</u> ösungsmittel
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
m	Multipllett
M	Molarität [mol/l]
MAD	<i>Multiple Anomalous Diffraction</i>
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
min	Minuten
MR	<i>Molecular Replacement</i>
Mw	Molekulargewicht
NCS	<i>Non Crystallographic Symmetry</i> (Nicht-Kristallographische Symmetrie)
OD_x	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte bei der Wellenlänge x [nm]
p.A.	zur Analyse
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
Pip	L-Pipecolinsäure
PMSF	<u>P</u> henylmethansulfonylfluorid
POP	<u>P</u> rolyl <u>o</u> ligopeptidase
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RMS	<i>Root-Mean-Square</i> (quadratisch)
RPM	<i>Revolutions per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s	<u>s</u> econd
SBK	<u>S</u> ubstrat <u>b</u> indeklammer
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecylsulfat
t	<u>t</u> ime
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	<u>V</u> olt
VIS	Visible (sichtbar)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spaltstellen verschiedener Peptidasen.....	4
Abbildung 2: Nomenklatur von Substratbindetaschen und Substratresten nach Schechter und Berger	4
Abbildung 3: Mechanismus der Peptidbindungsspaltung bei Serinproteinasen. (a) Bildung des Acyl- Enzym-Intermediats. (b) Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediats. (Entnommen aus Branden & Tooze, 1999).....	7
Abbildung 4: Faltung von α -Chymotrypsin (Entnommen aus Branden & Tooze, 1999).....	8
Abbildung 5: Das Fünf-Domänenmodell der DP IV (Entnommen aus Mentlein, 1999).....	10
Abbildung 6: Substratspezifität der DP IV. (Entnommen aus Mentlein, 1999).....	12
Abbildung 7: Beispiele von Vertretern der drei Substanzklassen von in der Humanerprobung be- findlichen DP IV Inhibitoren. (nach Demuth, 2004).....	14
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Einflusses von Inhibitoren auf die DP IV-modulierte Inkretin-Wirkung. (Demuth, 2004).....	16
Abbildung 9: 7.5 % SDS-PAGE. Qualitätskontrolle mehrerer Chargen aufgereinigter DP IV aus dem Kortex der Niere von Schweinen. Das Gel zeigt in jeder Spur eine einzelne Bande bei 116 kDa.....	24
Abbildung 10: Triklone Kristalle der DP IV aus <i>Sus scrofa</i> der Dimension 0.20 x 0.10 x 0.05 mm. Aufnahmen von einem Mikroskop mit Polarisationsfilter.....	28
Abbildung 11: Diffraktionsbilder aufgenommen bei Raumtemperatur auf der hauseigenen Drehan- ode mit einem Mar180 Image Plate System (MarResearch, Hamburg) vor und nach der Transformation mit dem Free-Mounting-System (Proteros biostructures, Martinsried). Dramatische Verbesserung des Diffraktionmusters und der Auflösung trikliner Kristalle der DP IV aus <i>Sus scrofa</i>	29
Abbildung 12: Nichtkristallographische 2-2-2 Symmetrie der triklinen Kristalle von DP IV aus <i>Sus</i> <i>scrofa</i> . Der Plot wurde mit dem Programm (GLRF Tong & Rossmann), 1990 generiert....	31
Abbildung 13: Lokale Harker-Ebene rechtwinklig zur molekularen Dimerachse im dreidimensiona- len Patterson-Raum. Abbildung wurde mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) erstellt..	32

- Abbildung 14: Sequenzvergleich der neu bestimmten Sequenz von DP IV aus Schwein (DPP4_p) mit den DP IV-Sequenzen aus Mensch (DPP4_h) und Maus (DPP4_m) sowie mit den Sequenzen der verwandten Proteine Fibroblast Activation Protein- α (FAP_h) und Prolyloloigopeptidase (POP_p). Der Vergleich erklärt das Fehlen der Dimerisierung von POP und korreliert das Fehlen der ADA-Bindung bei Nagetieren mit der Glykosylierungsstelle Asn-279 (281).....35
- Abbildung 15: Lösliches DP IV bildet eine 2-2-2 symmetrische Anordnung als Dimer von Dimeren. Die Blickrichtung ist entlang einer zweizähligen Achse. Potentielle Glykosylierungsstellen sind als graue Kugeln eingezeichnet. Rote Kugeln markieren in der Kristallstruktur gefundene Glykosylierungsstellen. Die Transmembranhelices und ihre Orientierung zur Membran sind modelliert um zu illustrieren, wie die Tetramerisierung von DP IV Zell-Zell Kontakte vermitteln kann.....36
- Abbildung 16: Blick senkrecht zur zweizähligen Achse auf die Dimerkonzaktfläche. Sie wird aus drei C-terminalen Sekundärstrukturelementen von F713-C762 der katalytischen Domäne (gelb und grün) gebildet und durch das fingerartig zwischen Strang 2 und 3 des Propellerblatts IV hervorgehenden Insertionsmotivs (orange) stabilisiert. Zentrale, aromatische Packung durch hydrophobe Seitenketten von Trp734 und Phe713 (dargestellt als Kugel-Stäbchen-Modell in blauem Dichtenetz) beider Monomere. (Stereoabbildung).....37
- Abbildung 17: Blick entlang der zweizähligen Achse auf die Tetramerkontaktregion. Die Propellerblätter IV (grün und Pink) jeder Untereinheit bilden paarweise miteinander achtblättrige, antiparallele β -Faltblätter. Die markierten Aminosäuren Leu294 und Val341 sind an der ADA-Bindung beteiligt. (Stereoabbildung).....38
- Abbildung 18: Topologiediagramm zur Erläuterung der Domänenstruktur der DP IV. Blatt IV des Propellers ist in beides involviert, den Dimerkontakt (IV A-IV B: L235-P255, zusammen mit den gestrichelt hervorgehobenen drei Sekundärstrukturelementen F713-C762) und die Tetramerisierung der DP IV (IV A-IV C und IV B-IV C, nicht gezeigt).....39
- Abbildung 19: DP IV-Monomer zum Vergleich als „Ribbon“ und in Oberflächendarstellung. Die Oberfläche ist nach dem Drei-Domänen-Modell eingefärbt: stark glykosylierte Domäne (grün), cysteinreiche Domäne (blau), katalytische Domäne (grau).....40
- Abbildung 20: Oberflächendarstellung eines DP IV Monomers mit einem an das aktive Zentrum gebundenen tetrapeptidischen Substratanalog (Kugel-Stäbchen-Modell: Tetrapeptid (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). Die Oberfläche zeigt das elektrostatische Potential von rot (-50 e/kT) nach blau (50 e/kT). A) Blick in die innere Höhle durch den β -Propeller. B) Blick durch die Seitenöffnung nach einer 70°-Rotation um die Y-Achse im Vergleich zu (A). C) Blick auf die Oberfläche eines Monomers in Standardorientierung nach je einer 30°-Rotation um die X- und Y-Achse im Vergleich zu (B). (Stereoabb.).....42
- Abbildung 21: Substraterkennung der DP IV am Modell eines tetrapeptidischen Substratanalog (Kugel-Stäbchen-Modell: Tetrapeptid (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung mit elektrostatischem Potential des DP IV-Monomers in Standardorientierung. Schnitt durch die Oberfläche des Monomers zur Enthüllung des Innenraums und des innen liegenden aktiven Zentrums mit Blick auf das hinein modellierte Substrat. B) Zoom in das aktive Zentrum. Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung (Einfärbung nach Atomtyp) verdeckt. C) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste in (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige), mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. (Stereoabbildung).....43

- Abbildung 22: Substraterkennung der DP IV am Beispiel des Dipeptidanalogs p-Iodo-Phe-pyr-CN (Kugel-Stäbchen-Modell: p-Iodo-Phe-pyr-CN (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der DP IV (Einfärbung nach Atomtyp). Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung verdeckt. B) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste im (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige) mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. (Stereoabbildung)...45
- Abbildung 23: Substraterkennung der DP IV am Beispiel des Tripeptids tBuGPI (Kugel-Stäbchen-Modell: tBuGPI (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der DP IV (Einfärbung nach Atomtyp). Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung verdeckt. B) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste im (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige), mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. (Stereoabbildung).....46
- Abbildung 24: Substraterkennung der DP IV am Beispiel des Piperazinderivats SC3/2 (Kugel-Stäbchen-Modell: SC3/2 (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der DP IV (Einfärbung nach Atomtyp). Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung verdeckt. B) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste im (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige) mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. Die 2 Fobs - Fcalc Electronendichte umhüllt nur den Inhibitor (blaues Netz, kontouriert mit 1σ). (Stereoabbildung).....48
- Abbildung 25: Substraterkennung der DP IV am Beispiel des Sulfonylfluorids AEBSF (Kugel-Stäbchen-Modell: AEBSF (grün), Sauerstoffatome (rot), Stickstoffatome (blau)). A) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der DP IV (Einfärbung nach Atomtyp). Die Enzymreste sind durch die Oberflächendarstellung verdeckt. B) Kugel-Stäbchen-Modell der DP IV-Reste im (hellblau) und um das aktive Zentrum (beige) mit intermolekularen Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien. Die 2 Fobs - Fcalc Electronendichte umhüllt den Inhibitor und die Phenolgruppe des Tyr547 (blaues Netz, kontouriert mit 1σ). (Stereoabbildung).....50
- Abbildung 26: Schematische Darstellung der Substratzugangs- und Produktabgangswege bei Tri-corn und DP IV nach Überlagerung der katalytischen Hauptelemente der beiden Strukturen.....59
- Abbildung 27: Vergleich der DP IV mit POP und Docking von Aprotinin (BPTI) an DP IV. A) Überlagerung eines DP IV-Monomers mit POP. Das DP IV-Monomer ist durch seine Oberfläche dargestellt (β -Propeller Domäne: Blatt I (cyan), Blatt II (marine), Blatt III (dunkelgrün), Blatt IV (hellgrün), Blatt V (gelb), Blatt VI (orange), Blatt VII (rot), Blatt VIII (violett), katalytische Domäne (grau)), während das POP Molekül nur dort wo es die DP IV durch seine Größe verdeckt als rote Ribbon-Darstellung zu sehen ist, z.B. an der Seitenöffnung der DP IV. B) Docking des starren, 58 Reste großen Inhibitors Aprotinin an das aktive Zentrum der DP IV. Das DP IV-Monomer ist als Ribbons dargestellt (Farbgebung wie in A), während der Inhibitor als Oberfläche (grün) gezeigt ist. (Stereoabbildung, Standardorientierung nach W. Bode).....62

Literaturverzeichnis

- Abbott, C A; McCaughan, G W & 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**(3): 278-84.
- Abbott, C A; McCaughan, G W; Levy, M T; Church, W B & 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**(3): 798-810.
- Abdel-Ghany, M; Cheng, H; Levine, R A & Pauli, B U (1998) "Truncated dipeptidyl peptidase IV is a potent anti-adhesion and anti-metastasis peptide for rat breast cancer cells" *Invasion Metastasis* **18**(1): 35-43.
- Abrahams, J P & Leslie, A G W (1996) "Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F(1) ATPase" *Acta Cryst D* **52**(Pt 1): 30-42.
- Aertgeerts, K; Ye, S; Tennant, M G; Kraus, M L; Rogers, J; Sang, B C; Skene, R J; Webb, D R & Prasad, G S (2004) "Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation" *Protein Sci* **13**(2): 412-21.
- Ahmad, S; Wang, L & Ward, P E (1992) "Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo" *J Pharmacol Exp Ther* **260**(3): 1257-61.
- Alkhatib, G; Combadiere, C; Broder, C C; Feng, Y; Kennedy, P E; Murphy, P M & Berger, E A (1996) "CCR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1" *Science* **272**(5270): 1955-8.
- Angelides, K J & Fink, A L (1979) "Mechanism of thiol protease catalysis: detection and stabilization of a tetrahedral intermediate in papain catalysis" *Biochemistry* **18**(11): 2363-9.
- Ashworth, D M; Atrash, B; Baker, G R; Baxter, A J; Jenkins, P D; Jones, D M & Szelke, M (1996) "4-Cyanothiazolidides as very potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV" *Bioorg Med Chem Lett* **6**(10): 2745-8.
- Ashworth, D M; Atrash, B; Baker, G R; Baxter, A J; Jenkins, P D; Jones, D M & Szelke, M (1996) "2-Cyanopyrrolidides as potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV" *Bioorg Med Chem Lett* **6**(10): 1163-6.

- Augustyns, K; Bal, G; Thonus, G; Belyaev, A; Zhang, X M; Bollaert, W; Lambeir, A M; Durinx, C; Goossens, F & Haemers, A (1999) "The unique properties of dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV / CD26) and the therapeutic potential of DPP IV inhibitors" *Curr Med Chem* **6**(4): 311-27.
- Bai, J P & Chang, L L (1995) "The involvement of dipeptidyl peptidase IV in brush-border degradation of GRF(1-29)NH₂ by intestinal mucosal cells" *J Pharm Pharmacol* **47**(8): 698-701.
- Barrett, A J; Rawlings, N D & Woessner, J F (1998) in *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (Academic Press; London, UK).
- Barth, A; Schulz, H & Neubert, K (1974) "Studies on the purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase IV" *Acta Biol Med Ger* **32**(2-3): 157-74.
- Bartles, J R; Braiterman, L T & Hubbard, A L (1985) "Biochemical characterization of domain-specific glycoproteins of the rat hepatocyte plasma membrane" *J Biol Chem* **260**(23): 12792-802.
- Barton, G (1993) "An efficient algorithm to locate all locally optimal alignments between two sequences allowing for gaps." *Comput Appl Biosci* **9**: 729-34.
- Beauvais, A; Monod, M; Wyniger, J; Debeaupuis, J P; Grouzmann, E; Brakch, N; Svab, J; Hovanessian, A G & Latge, J P (1997) "Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans" *Infect Immun* **65**(8): 3042-7.
- Bella, A M, Jr.; Erickson, R H & Kim, Y S (1982) "Rat intestinal brush border membrane dipeptidyl-aminopeptidase IV: kinetic properties and substrate specificities of the purified enzyme" *Arch Biochem Biophys* **218**(1): 156-62.
- Berger, E; Fischer, G; Neubert, K & Barth, A (1987) "Stepwise degradation of the hexapeptide Met-Ala-Ser-Pro-Phe-Ala by dipeptidyl peptidase IV" *Biomed Biochim Acta* **46**(10): 671-6.
- Blanco, J; Marie, I; Callebaut, C; Jacotot, E; Krust, B & Hovanessian, A G (1996) "Specific binding of adenosine deaminase but not HIV-1 transactivator protein Tat to human CD26" *Exp Cell Res* **225**(1): 102-11.
- Blanco, J; Valenzuela, A; Herrera, C; Lluís, C; Hovanessian, A G & Franco, R (2000) "The HIV-1 gp120 inhibits the binding of adenosine deaminase to CD26 by a mechanism modulated by CD4 and CXCR4 expression" *FEBS Lett* **477**(1-2): 123-8.
- Blow, D M (1968) "Chymotrypsin: tertiary structure and enzymic activity" *Biochem J* **110**(2): 2.
- Blundell, T L & Johnson, L N (1976) in *Protein Crystallography*, (Academic Press; London, UK).
- Bode, W; Grams, F; Reinemer, P; Gomis-Ruth, F X; Baumann, U; McKay, D B & Stocker, W (1996) "The metzincin-superfamily of zinc-peptidases" *Adv Exp Med Biol* **389**: 1-11.
- Boduszek, B; Oleksyszyn, J; Kam, C M; Selzler, J; Smith, R E & Powers, J C (1994) "Dipeptide phosphonates as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV" *J Med Chem* **37**(23): 3969-76.

- Bongers, J; Lambros, T; Ahmad, M & Heimer, E P (1992) "Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs" *Biochim Biophys Acta* **1122** (2): 147-53.
- Bordallo, C; Schwencke, J & Suarez Rendueles, M (1984) "Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*" *FEBS Lett* **173**(1): 199-203.
- Born, I; Faust, J; Heins, J; Barth, A & Neubert, K (1994) "Potent Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV" *Eur J Cell Biol Supp* **40**: S23.
- Bouras, M; Huneau, J F; Luengo, C; Erlanson-Albertsson, C & Tome, D (1995) "Metabolism of enterostatin in rat intestine, brain membranes, and serum: differential involvement of proline-specific peptidases" *Peptides* **16**(3): 399-405.
- Branden, C I & Tooze, J (1999) in *Introduction to Protein Structure*, 2nd edition, (Garland Publishing, Inc.; New York, NY).
- Brandstetter, H; Kim, J S; Groll, M & Huber, R (2001) "Crystal structure of the tricorn protease reveals a protein disassembly line" *Nature* **414**(6862): 466-9.
- Brandstetter, H; Kim, J S; Groll, M; Goettig, P & Huber, R (2002) "Structural basis for the processive protein degradation by tricorn protease" *Biol Chem* **383**(7-8): 1157-65.
- Brandt, W; Ludwig, O; Thondorf, I & Barth, A (1996) "A new mechanism in serine proteases catalysis exhibited by dipeptidyl peptidase IV (DP IV)--Results of PM3 semiempirical thermodynamic studies supported by experimental results" *Eur J Biochem* **236**(1): 109-14.
- Brenner, S (1988) "The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines" *Nature* **334** (6182): 528-30.
- Bristol, L A; Bachovchin, W & Takacs, L (1995) "Inhibition of CD26 enzyme activity with pro-boropro stimulates rat granulocyte/macrophage colony formation and thymocyte proliferation in vitro" *Blood* **85**(12): 3602-9.
- Brömme, D & Demuth, H U (1994) "N,O-diacyl hydroxamates as selective and irreversible inhibitors of cysteine proteinases" *Methods Enzymol* **244**: 671-85.
- Brünger, A T; Adams, P D; Clore, G M; DeLano, W L; Gros, P; Grosse-Kunstleve, R W; Jiang, J S; Kuszewski, J; Nilges, M; Pannu, N S; Read, R J; Rice, L M; Simonson, T & Warren, G L (1998) "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination" *Acta Cryst D* **54**(Pt 5): 905-21.
- Buhling, F; Junker, U; Reinhold, D; Neubert, K; Jager, L & Ansorge, S (1995) "Functional role of CD26 on human B lymphocytes" *Immunol Lett* **45**(1-2): 47-51.
- Buhling, F; Kunz, D; Reinhold, D; Ulmer, A J; Ernst, M; Flad, H D & Ansorge, S (1994) "Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells" *Nat Immun* **13**(5): 270-9.
- Callebaut, C; Krust, B; Jacotot, E & Hovanessian, A G (1993) "T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells" *Science* **262**(5142): 2045-50.

- Casey, M G & Meyer, J (1985) "Presence of X-prolyl-dipeptidyl-peptidase in lactic acid bacteria" *J Dairy Sci* **68**(12): 3212-15.
- Cheng, H C; Abdel-Ghany, M; Elble, R C & 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**(37): 24207-15.
- Cheng, J D; Dunbrack, R L, Jr.; Valianou, M; Rogatko, A; Alpaugh, R K & Weiner, L M (2002) "Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model" *Cancer Res* **62**(16): 4767-72.
- Chikuma, T; Hama, T; Nagatsu, T; Kumegawa, M & Kato, T (1990) "Purification and properties of dipeptidyl peptidase IV from human urine" *Biol Chem Hoppe Seyler* **371**(4): 325-30.
- Choe, H; Farzan, M; Sun, Y; Sullivan, N; Rollins, B; Ponath, P D; Wu, L; Mackay, C R; LaRosa, G; Newman, W; Gerard, N; Gerard, C & Sodroski, J (1996) "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates" *Cell* **85**(7): 1135-48.
- Cocchi, F; DeVico, A L; Garzino-Demo, A et al. (1995) "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells" *Science* **270**: 1811-15.
- Collaborative Computational Project, No. 4 (1994) "The CCP4 suite: programs for protein crystallography" *Acta Cryst D* **50**(Pt 5): 760-3.
- Coutts, S J; Kelly, T A; Snow, R J; Kennedy, C A; Barton, R W; Adams, J; Krolkowski, D A; Freeman, D M; Campbell, S J; Ksiazek, J F & Bachovchin, W W (1996) "Structure-activity relationships of boronic acid inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. 1. Variation of the P2 position of Xaa-boroPro dipeptides" *J Med Chem* **39**(10): 2087-94.
- Darmoul, D; Lacasa, M; Baricault, L; Marguet, D; Sapin, C; Trotot, P; Barbat, A & 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**(7): 4824-33.
- David, F; Bernard, A M; Pierres, M & Marguet, D (1993) "Identification of serine 624, aspartic acid 702, and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl-peptidase IV (CD26). A member of a novel family of nonclassical serine hydrolases" *J Biol Chem* **268**(23): 17247-52.
- De Meester, I; Belyaev, A; Lambeir, A M; De Meyer, G R; Van Osselaer, N; Haemers, A & Scharpe, S (1997) "In vivo inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by pro-prodiphenyl-phosphonate (Prodipine)" *Biochem Pharmacol* **54**(1): 173-9.
- De Meester, I; Korom, S; Van Damme, J & Scharpé, S (1999) "CD26, let it cut or cut it down" *Immunol Today* **20**(8): 367-75.
- De Meester, I; Vanham, G; Kestens, L; Vanhoof, G; Bosmans, E; Gigase, P & Scharpe, S (1994) "Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26" *Eur J Immunol* **24**(3): 566-70.

- De Meester, I; Vanhoof, G; Lambeir, A M & Scharpé, S (1996) "Use of immobilized adenosine deaminase (EC 3.5.4.4) for the rapid purification of native human CD26/dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5)" *J Immunol Methods* **189**(1): 99-105.
- DeLano, W L (2002) "The PyMOL Molecular Graphics System" DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA (<http://www.pymol.org>).
- Demuth, H U (1988) "Studien zur Entwicklung und zum Funktionsmechanismus irreversibler Inhibitoren von Serinproteasen unter besonderer Berücksichtigung postprolin spaltender Enzyme" *Habilitation* (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg).
- Demuth, H U (2004) "Typ 2 Diabetes - Therapie mittels DP IV-Inhibitoren" in *Glucagon-like peptide-1 - Therapiepotehtial bei Diabetes mellitus*, ed. Gallwitz, B, pp. 76-91.
- Demuth, H U & Heins, J (1995) "On the Catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV" in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in Metabolism and the Immune Response*, ed. Fleischer, B (R.G. Landes Company; Austin, TX), pp. 1-35.
- Demuth, H U; Baumgrass, R; Schaper, C; Fischer, G & Barth, A (1988) "Dipeptidylpeptidase IV--inactivation with N-peptidyl-O-royl hydroxylamines" *J Enzyme Inhib* **2**(2): 129-42.
- Deng, H; Liu, R; Ellmeier, W; Choe, S; Unutmaz, D; Burkhart, M; Di Marzio, P; Marmon, S; Sutton, R E; Hill, C M; Davis, C B; Peiper, S C; Schall, T J; Littman, D R & Landau, N R (1996) "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1" *Nature* **381** (6584): 661-6.
- Dinjens, W N M; Ten Kate, J; Wijnen, J T; Van der Linden, E P M; Beek, C J; Lenders, M H; Meera Khan, P & Bosman, F T (1989) "Distribution of adenosine deaminase-complexing protein in murine tissues" *J Biol Chem* **264**(32): 19215-20.
- Dodson, G & Wlodawer, A (1998) "Catalytic triads and their relatives" *Trends Biochem Sci* **23**(9): 347-52.
- Dong, R P; Kameoka, J; Hegen, M; Tanaka, T; Xu, Y; Schlossman, S F & Morimoto, C (1996) "Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response" *J Immunol* **156**(4): 1349-55.
- Dragic, T; Litwin, V; Allaway, G P; Martin, S R; Huang, Y; Nagashima, K A; Cayanan, C; Maddon, P J; Koup, R A; Moore, J P & Paxton, W A (1996) "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5" *Nature* **381**(6584): 667-73.
- Drenth, J (1994) in *Principles of Protein X-ray Crystallography*, 2nd edition, ed. Cantor, C R (Springer Verlag; New York, NY).
- Duke-Cohan, J S; Morimoto, C; Rucker, J A & Schlossman, S F (1995) "A novel form of dipeptidylpeptidase IV found in human serum. Isolation, characterization, and comparison with T lymphocyte membrane dipeptidylpeptidase IV (CD26)" *J Biol Chem* **270**(23): 14107-14.
- Duke-Cohan, J S; Morimoto, C; Rucker, J A & Schlossman, S F (1996) "Serum high molecular weight dipeptidyl peptidase IV (CD26) is similar to a novel antigen DPPT-L released from activated T cells" *J Immunol* **156**(5): 1714-21.

- Durinx, C; Lambeir, A M; Bosmans, E; Falmagne, J B; Berghmans, R; Haemers, A; Scharpé, S & De Meester, 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**(17): 5608-13.
- Engh, R A & Huber, R (1991) "Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein-Structure Refinement" *Acta Cryst A* **47**: 392-400.
- Erickson, R H & Kim, Y S (1983) "Interaction of purified brush-border membrane aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV with lectin-sepharose derivatives" *Biochim Biophys Acta* **743**(1): 37-42.
- Esnouf, R M (1999) "Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps" *Acta Cryst D* **55**(Pt 4): 938-40.
- Fan, H; Meng, W; Kilian, C; Grams, S & 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**(1): 243-51.
- Fassina, G; Ferrari, N; Brigati, C; Benelli, R; Santi, L; Noonan, D M & Albin, A (2000) "Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities" *Clin Exp Metastasis* **18**(2): 111-20.
- Feng, Y; Broder, C C; Kennedy, P E & Berger, E A (1996) "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor" *Science* **272**(5263): 872-7.
- Fischer, G; Heins, J & Barth, A (1983) "The conformation around the peptide bond between the P1- and P2-positions is important for catalytic activity of some proline-specific proteases" *Biochim Biophys Acta* **742**(3): 452-62.
- Franco, R; Valenzuela, A; Lluís, C & Blanco, J (1998) "Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes" *Immunol Rev* **161**: 27-42.
- Fülöp, V & Jones, D T (1999) "Beta propellers: structural rigidity and functional diversity" *Curr Opin Struct Biol* **9**(6): 715-21.
- Fülöp, V; Böcskei, Z & Polgár, L (1998) "Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis" *Cell* **94**(2): 161-70.
- Fülöp, V; Szeltner, Z & Polgár, L (2000) "Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism" *EMBO Rep* **1**(3): 277-81.
- Giacovazzo, C; Monaco, H L; Viterbo, D; Scordari, F; Gilli, G; Zanotti, G & Catti, M (1992) in *Fundamentals of Crystallography*, (Oxford University Press; Oxford, UK).
- Glickman, M H & Ciechanover, A (2002) "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction [Review]" *Physiol Rev* **82**(2): 373-428.
- Goettig, P; Groll, M; Kim, J S; Huber, R & Brandstetter, H (2002) "Structures of the tricorn-interacting aminopeptidase F1 with different ligands explain its catalytic mechanism" *EMBO J* **21**(20): 5343-52.

- Gutheil, W G & Bachovchin, W W (1993) "Separation of L-Pro-DL-boroPro into its component diastereomers and kinetic analysis of their inhibition of dipeptidyl peptidase IV. A new method for the analysis of slow, tight-binding inhibition" *Biochemistry* **32**(34): 8723-31.
- Gutheil, W G; Subramanyam, M; Flentke, G R; Sanford, D G; Munoz, E; Huber, B T & 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**(14): 6594-8.
- Hanski, C; Huhle, T; Gossrau, R & Reutter, W (1988) "Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro" *Exp Cell Res* **178**(1): 64-72.
- Harada, M; Fukasawa, K M; Fukasawa, K & Nagatsu, T (1982) "Inhibitory action of proline-containing peptides on Xaa-Pro-dipeptidylaminopeptidase" *Biochim Biophys Acta* **705**(2): 288-90.
- Hartrodt, B; Neubert, K; Fischer, G; Schulz, H & Barth, A (1982) "[Synthesis and enzymatic degradation of beta-casomorphin-5 (author's transl)]" *Pharmazie* **37**(3): 165-9.
- Hegen, M; Kameoka, J; Dong, R P; Schlossman, S F & Morimoto, C (1997) "Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase" *Immunology* **90**(2): 257-64.
- Hegen, M; Mittrucker, H W; Hug, R; Demuth, H U; Neubert, K; Barth, A & Fleischer, B (1993) "Enzymatic activity of CD26 (dipeptidylpeptidase IV) is not required for its signalling function in T cells" *Immunobiology* **189**(5): 483-93.
- Hegen, M; Niedobitek, G; Klein, C E; Stein, H & Fleischer, B (1990) "The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity" *J Immunol* **144**(8): 2908-14.
- Heins, J; Welker, P; Schonlein, C; Born, I; Hartrodt, B; Neubert, K; Tsuru, D & 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**(2): 161-9.
- Herrera, C; Morimoto, C; Blanco, J; Mallol, J; Arenzana, F; Lluís, C & Franco, R (2001) "Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes" *J Biol Chem* **276**(22): 19532-9.
- Hino, M; Nagatsu, T; Kakumu, S; Okuyama, S; Yoshii, Y & Nagatsu, I (1975) "Glycylprolyl beta-naphthylamidase activity in human serum" *Clin Chim Acta* **62**(1): 5-11.
- Hiramatsu, H; Yamamoto, A; Kyono, K; Higashiyama, Y; Fukushima, C; Shima, H; Sugiyama, S; Inaka, K & Shimizu, R (2004) "The crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) complex with diprotin A" *Biol Chem* **385**(6): 561-4.
- Ho, L; Aytac, U; Stephens, L C; Ohnuma, K; Mills, G B; McKee, K S; Neumann, C; LaPushin, R; Cabanillas, F; Abbuzzese, J L; Morimoto, C & Dang, N H (2001) "In vitro and in vivo antitumor effect of the anti-CD26 monoclonal antibody 1F7 on human CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma Karpas 299" *Clin Cancer Res* **7**(7): 2031-40.

- Hoffmann, T; Faust, J; Neubert, K & Ansorge, S (1993) "Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences" *FEBS Lett* **336**(1): 61-4.
- Hoffmann, T; Reinhold, D; Kahne, T; Faust, J; Neubert, K; Frank, R & Ansorge, S (1995) "Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) by anti-DP IV antibodies and non-substrate X-X-Pro- oligopeptides ascertained by capillary electrophoresis" *J Chromatogr A* **716**(1-2): 355-62.
- Hong, W J & Doyle, D (1990) "Molecular dissection of the NH₂-terminal signal/anchor sequence of rat dipeptidyl peptidase IV" *J Cell Biol* **111**(2): 323-8.
- Hooper, N M (1994) "Families of zinc metalloproteases" *FEBS Lett* **354**(1): 1-6.
- Hopsu-Havu, V K & Glenner, G G (1966) "A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide" *Histochemie* **7**(3): 197-201.
- Hubbard, S J (1998) "The structural aspects of limited proteolysis of native proteins" *Biochim Biophys Acta* **1382**(2): 191-206.
- Ikehara, Y; Ogata, S & Misumi, Y (1994) "Dipeptidyl-peptidase IV from rat liver" *Methods Enzymol* **244**: 215-27.
- Ito, K; Inoue, T; Kabashima, T; Kanada, N; Huang, H S; Ma, X; Azmi, N; Azab, E & Yoshimoto, T (2000) "Substrate recognition mechanism of prolyl aminopeptidase from *Serratia marcescens*" *J Biochem (Tokyo)* **128**(4): 673-8.
- Iwaki-Egawa, S; Watanabe, Y & Fujimoto, Y (1997) "CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase-binding protein in rat cells" *Cell Immunol* **178**(2): 180-6.
- Jeanfavre, D D; Woska, J R, Jr.; Pargellis, C A; Kennedy, C A; Prendergast, J; Stearns, C; Reilly, P L; Barton, R W & Bormann, B J (1996) "Effect of deoxycofomycin and Val-boroPro on the associated catalytic activities of lymphocyte CD26 and ecto-adenosine deaminase" *Biochem Pharmacol* **52**(11): 1757-65.
- Jiang, J D; Wilk, S; Li, J; Zhang, H & Bekesi, J G (1997) "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection in a T-cell line (CEM) by new dipeptidyl-peptidase IV (CD26) inhibitors" *Res Virol* **148**(4): 255-66.
- Johnson, L L; Dyer, R & Hupe, D J (1998) "Matrix metalloproteinases" *Curr Opin Chem Biol* **2**(4): 466-71.
- Juhász, T; Szeltner, Z; Fülöp, V & Polgár, L (2005) "Unclosed beta-propellers display stable structures: implications for substrate access to the active site of prolyl oligopeptidase" *J Mol Biol* **346**(3): 907-17.
- Kabashima, T; Ito, K & Yoshimoto, T (1996) "Dipeptidyl peptidase IV from *Xanthomonas maltophilia*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme" *J Biochem (Tokyo)* **120**(6): 1111-7.
- Kahne, T; Kroning, H; Thiel, U; Ulmer, A J; Flad, H D & Ansorge, S (1996) "Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation" *Cell Immunol* **170**(1): 63-70.

- Kajiyama, H; Kikkawa, F; Suzuki, T; Shibata, K; Ino, K & Mizutani, S (2002) "Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma" *Cancer Res* **62**(10): 2753-7.
- Kameoka, J; Tanaka, T; Nojima, Y; Schlossman, S F & Morimoto, C (1993) "Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26" *Science* **261**(5120): 466-9.
- Kaspari, A; Diefenthal, T; Grosche, G; Schierhorn, A & Demuth, H U (1996) "Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease the cleavage by proline-specific peptidases" *Biochim Biophys Acta* **1293**(1): 147-53.
- Kenny, A J; Booth, A G; George, S G; Ingram, J; Kershaw, D; Wood, E J & Young, A R (1976) "Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase" *Biochem J* **157**(1): 169-82.
- Kiefersauer, R; Than, M E; Dobbek, H; Gremer, L; Melero, M; Strobl, S; Dias, J M; Soulimane, T & Huber, R (2000) "A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes" *J Appl Crystallogr* **33**: 1223-1230.
- Kieffer, T J; McIntosh, C H & 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**(8): 3585-96.
- Kim, J S; Groll, M; Musiol, H J; Behrendt, R; Kaiser, M; Moroder, L; Huber, R & Brandstetter, H (2002) "Navigation inside a protease: substrate selection and product exit in the tricorn protease from *Thermoplasma acidophilum*" *J Mol Biol* **324**(5): 1041-50.
- Knight, S D (2000) "RSPS version 4.0: a semi-interactive vector-search program for solving heavy-atom derivatives" *Acta Cryst D* **56**(Pt 1): 42-7.
- Kraulis, P J (1991) "MOLSCRIPT: A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures." *J Appl Crystallogr* **24**: 946-950.
- Kraut, J (1977) "Serine proteases: structure and mechanism of catalysis" *Annu Rev Biochem* **46**: 331-58.
- Kreil, G; Haiml, L & 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**(1): 49-58.
- Kubota, T; Flentke, G R; Bachovchin, W W & Stollar, B D (1992) "Involvement of dipeptidyl peptidase IV in an in vivo immune response" *Clin Exp Immunol* **89**(2): 192-7.
- Kullertz, G; Fischer, G & Barth, A (1978) "[Catalytic mechanism of dipeptidyl-peptidase IV]" *Acta Biol Med Ger* **37**(4): 559-67.
- Laemmli, U K (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lambeir, A M; Borloo, M; De Meester, I; Belyaev, A; Augustyns, K; Hendriks, D; Scharpe, S & Haemers, A (1996) "Dipeptide-derived diphenyl phosphonate esters: mechanism-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV" *Biochim Biophys Acta* **1290**(1): 76-82.

- Lambeir, A M; Diaz Pereira, J F; Chacon, P; Vermeulen, G; Heremans, K; Devreese, B; Van Beeumen, J; De Meester, I & 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" *Biochim Biophys Acta* **1340**(2): 215-26.
- Lambeir, A M; Durinx, C; Scharpe, S & De Meester, I (2003) "Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV" *Crit Rev Clin Lab Sci* **40**(3): 209-94.
- Laskowski, R A; MacArthur, M W; Moss, D S & Thornton, J M (1993) "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures" *J App Cryst* **26**: 283-291.
- Li, J; Wilk, E & Wilk, S (1995) "Aminoacylpyrrolidine-2-nitriles: potent and stable inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV (CD 26)" *Arch Biochem Biophys* **323**(1): 148-54.
- Lin, J; Toscano, P J & Welch, J T (1998) "Inhibition of dipeptidyl peptidase IV by fluoroolefin-containing N-peptidyl-O-hydroxylamine peptidomimetics" *Proc Natl Acad Sci USA* **95** (24): 14020-4.
- Marguet, D; Bernard, A M; Vivier, I; Darmoul, D; Naquet, P & 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**(4): 2200-8.
- Martin, R A; Cleary, D L; Guido, D M; Zurcher-Neely, H A & 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**(3): 252-60.
- Matthews, B W; Sigler, P B; Henderson, R & Blow, D M (1967) "Three-dimensional structure of tosylalpha-chymotrypsin" *Nature* **214**(89): 652-6.
- McCawley, L J & Matrisian, L M (2001) "Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!" *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 534-40.
- Medeiros, M D & Turner, A J (1994) "Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11" *Endocrinology* **134** (5): 2088-94.
- Medrano, F J; Alonso, J; García, J L; Romero, A; Bode, W & Gomis-Rüth, F X (1998) "Structure of proline iminopeptidase from *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a prototype for the prolyl oligopeptidase family" *EMBO J* **17**(1): 1-9.
- Mentlein, R (1988) "Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides" *FEBS Lett* **234**(2): 251-6.
- Mentlein, R (1999) "Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides" *Regul Pept* **85**(1): 9-24.
- Mentlein, R & Heymann, E (1982) "Dipeptidyl peptidase IV inhibits the polymerization of fibrin monomers" *Arch Biochem Biophys* **217**(2): 748-50.
- Mentlein, R; Dahms, P; Grandt, D & Kruger, R (1993) "Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV" *Regul Pept* **49**(2): 133-44.

- Mentlein, R; Gallwitz, B & 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**(3): 829-35.
- Mentlein, R; Heymann, E; Scholz, W; Feller, A C & Flad, H D (1984) "Dipeptidyl peptidase IV as a new surface marker for a subpopulation of human T-lymphocytes" *Cell Immunol* **89**(1): 11-19.
- Merritt, E A & Bacon, D J (1997) "Raster3D: Photorealistic molecular graphics" *Methods Enzymol* **277**: 505-24.
- Messerschmidt, A & Huber, R (2000) "Encyclopedia of Analytical Chemistry" in *X-ray crystallography of Biological Macromolecules*, ed. Meyers, R (Wiley; Chichester, UK), pp. 6061-107.
- Misumi, Y; Hayashi, Y; Arakawa, F & Ikehara, Y (1992) "Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface" *Biochim Biophys Acta* **1131**(3): 333-6.
- Morimoto, C; Torimoto, Y; Levinson, G; Rudd, C E; Schrieber, M; Dang, N H; Letvin, N L & Schlossman, S F (1989) "1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells" *J Immunol* **143**(11): 3430-9.
- Munoz, E; Blazquez, M V; Madueno, J A; Rubio, G & Pena, J (1992) "CD26 induces T-cell proliferation by tyrosine protein phosphorylation" *Immunology* **77**(1): 43-50.
- Nausch, I; Mentlein, R & Heymann, E (1990) "The degradation of bioactive peptides and proteins by dipeptidyl peptidase IV from human placenta" *Biol Chem Hoppe Seyler* **371**(11): 1113-18.
- Nicholls, A; Sharp, K A & Honig, B (1991) "Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons" *Proteins* **11**(4): 281-96.
- Nurizzo, D; Turkenburg, J P; Charnock, S J; Roberts, S M; Dodson, E J; McKie, V A; Taylor, E J; Gilbert, H J & Davies, G J (2002) "Cellvibrio japonicus alpha-L-arabinanase 43A has a novel five-blade beta-propeller fold" *Nat Struct Biol* **9**(9): 665-8.
- Oberlin, E; Amara, A; Bachelier, F; Bessia, C; Virelizier, J L; Arenzana-Seisdedos, F; Schwartz, O; Heard, J M; Clark-Lewis, I; Legler, D F; Loetscher, M; Baggiolini, M & Moser, B (1996) "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1" *Nature* **382**(6594): 833-5.
- Ogata, S; Misumi, Y; Tsuji, E; Takami, N; Oda, K & Ikehara, Y (1992) "Identification of the active site residues in dipeptidyl peptidase IV by affinity labeling and site-directed mutagenesis" *Biochemistry* **31**(9): 2582-7.
- Ollis, D L; Cheah, E; Cygler, M; Dijkstra, B; Frolow, F; Franken, S M; Harel, M; Remington, S J; Silman, I; Schrag, J & et al. (1992) "The alpha/beta hydrolase fold" *Protein Eng* **5**(3): 197-211.

- Oravec, T; Pall, M; Roderiquez, G; Gorrell, M D; Ditto, M; Nguyen, N Y; Boykins, R; Unsworth, E & Norcross, M A (1997) "Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage" *J Exp Med* **186**(11): 1865-72.
- Otwinowski, Z & Minor, W (1997) "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode" *Methods Enzymol* **276**: 307-26.
- Pargellis, C A; Campbell, S J; Pav, S; Graham, E T & Pitner, T P (1997) "Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (CD26) by peptide boronic acid dipeptides" *J Enzyme Inhib* **11**(3): 151-69.
- Pauly, R P; Rosche, F; Wermann, M; McIntosh, C H; Pederson, R A & 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**(38): 23222-9.
- Pederson, R A; White, H A; Schlenzig, D; Pauly, R P; McIntosh, C H & Demuth, H U (1998) "Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide" *Diabetes* **47**(8): 1253-8.
- Piazza, G A; Callanan, H M; Mowery, J & Hixson, D C (1989) "Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix" *Biochem J* **262**(1): 327-34.
- Pillay, C S; Elliott, E & Dennison, C (2002) "Endolysosomal proteolysis and its regulation [Review]" *Biochem J* **363**(Part 3): 417-29.
- Polgar, L (1974) "Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis" *FEBS Lett* **47**(1): 15-18.
- Polgar, L (1987) "The mechanism of action of aspartic proteases involves 'push-pull' catalysis" *FEBS Lett* **219**(1): 1-4.
- Polgár, L (1992) "Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family" *FEBS Lett* **311**(3): 281-4.
- Pospisilik, J A; Hinke, S A; Pederson, R A; Hoffmann, T; Rosche, F; Schlenzig, D; Glund, K; Heiser, U; McIntosh, C H & Demuth, H (2001) "Metabolism of glucagon by dipeptidyl peptidase IV (CD26)" *Regul Pept* **96**(3): 133-41.
- Pospisilik, J A; Stafford, S G; Demuth, H U; McIntosh, C H & Pederson, R A (2002) "Long-term treatment with dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in the VDF Zucker rat: a euglycemic-hyperinsulinemic clamp study" *Diabetes* **51**(9): 2677-83.
- Primakoff, P & Myles, D G (2000) "The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity" *Trends Genet* **16**(2): 83-7.
- Proost, P; De Meester, I; Schols, D; Struyf, S; Lambeir, A M; Wuyts, A; Opdenakker, G; De Clercq, E; Scharpe, S & Van Damme, J (1998) "Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection" *J Biol Chem* **273**(13): 7222-7.

- Proost, P; Struyf, S; Schols, D; Durinx, C; Wuyts, A; Lenaerts, J P; De Clercq, E; De Meester, I & Van Damme, J (1998) "Processing by CD26/dipeptidyl-peptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell-derived factor-1alpha" *FEBS Lett* **432** (1-2): 73-6.
- Püschel, G; Mentlein, R & Heymann, E (1982) "Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta" *Eur J Biochem* **126**(2): 359-65.
- Rahfeld, J; Schierhorn, M; Hartrodt, B; Neubert, K & Heins, J (1991) "Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV?" *Biochim Biophys Acta* **1076**(2): 314-16.
- Rahfeld, J; Schutkowski, M; Faust, J; Neubert, K; Barth, A & Heins, J (1991) "Extended investigation of the substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney" *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**(5): 313-18.
- Rawlings, N D & Barrett, A J (1994) "Families of cysteine peptidases" *Methods Enzymol* **244**: 461-86.
- Rawlings, N D & Barrett, A J (1995) "Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism" *Methods Enzymol* **248**: 105-20.
- Rawlings, N D; Polgár, L & Barrett, A J (1991) "A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase" *Biochem J* **279** (Pt 3): 907-8.
- Rawlings, N D; Tolle, D P & Barrett, A J (2004) "MEROPS: the peptidase database" *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D160-4.
- Reinhold, D; Bank, U; Buhling, F; Kahne, T; Kunt, D; Faust, J; Neubert, K & Ansorge, S (1994) "Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) specifically suppress proliferation and modulate cytokine production of strongly CD26 expressing U937 cells" *Immunobiology* **192**(1-2): 121-36.
- Reinhold, D; Bank, U; Buhling, F; Lendeckel, U; Faust, J; Neubert, K & Ansorge, S (1997) "Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells" *Immunology* **91**(3): 354-60.
- Reinhold, D; Bank, U; Buhling, F; Neubert, K; Mattern, T; Ulmer, A J; Flad, H D & Ansorge, S (1993) "Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human lymphocytes. Synthetic inhibitors of and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress the proliferation of pokeweed mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells, and IL-2 and IL-6 production" *Immunobiology* **188**(4-5): 403-14.
- Reinhold, D; Vetter, R W; Mnich, K; Buhling, F; Lendeckel, U; Born, I; Faust, J; Neubert, K; Gollnick, H & Ansorge, S (1998) "Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) is involved in regulation of DNA synthesis in human keratinocytes" *FEBS Lett* **428**(1-2): 100-4.
- Reutter, W; Baum, O; Löster, K; Fan, H; Bork, J P; Bernt, K; Hanski, C & Tauber, R (1995) "Functional aspects of the three extracellular domains of dipeptidyl peptidase IV: Characterisation of glycosylation events, of the collagen-binding site and of endopeptidase activity" in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in Metabolism and the Immune Response*, ed. Fleischer, B. (R.G. Landes Company; Austin, TX), pp. 55-78.

- Robertus, J D; Kraut, J; Alden, R A & Birktoft, J J (1972) "Subtilisin, a stereochemical mechanism involving transition-state stabilization" *Biochemistry* **11**(23): 4293-303.
- Russell, J S; Chi, H; Lantry, L E; Stephens, R E & Ward, P E (1996) "Substance P and neurokinin A metabolism by cultured human skeletal muscle myocytes and fibroblasts" *Peptides* **17** (8): 1397-403.
- Scanlan, M J; Raj, B K M; Calvo, B; Garin-Chesa, P; Sanz-Moncasi, M P; Healey, J H; Old, L J & Rettig, W J (1994) "Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers" *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(12): 5657-61.
- Schechter, I & Berger, A (1967) "On the size of the active site in proteases. I. Papain" *Biochem Biophys Res Commun* **27**(2): 157-62.
- Schols, D; Proost, P; Struyf, S; Wuyts, A; De Meester, I; Scharpé, S; Van Damme, J & De Clercq, E (1998) "CD26-processed RANTES(3-68), but not intact RANTES, has potent anti-HIV-1 activity" *Antiviral Res* **39**(3): 175-87.
- Schon, E & Ansorge, S (1990) "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system. Cytofluorometric evidence for induction of the enzyme on activated T lymphocytes" *Biol Chem Hoppe Seyler* **371**(8): 699-705.
- Schon, E; Born, I; Demuth, H U; Faust, J; Neubert, K; Steinmetzer, T; Barth, A & Ansorge, S (1991) "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system. Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes" *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**(5): 305-11.
- Schon, E; Mansfeld, H W; Demuth, H U; Barth, A & Ansorge, S (1985) "The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes" *Biomed Biochim Acta* **44**(2): K9-15.
- Schutkowski, M; Neubert, K & Fischer, G (1994) "Influence on proline-specific enzymes of a substrate containing the thioxoaminoacyl-prolyl peptide bond" *Eur J Biochem* **221**(1): 455-61.
- Shibuya-Saruta, H; Kasahara, Y & Hashimoto, Y (1996) "Human serum dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and its unique properties" *J Clin Lab Anal* **10**(6): 435-40.
- Smith, R E; Talhouk, J W; Brown, E E & 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**(10): 851-68.
- Snow, R J; Bachovchin, W W; Barton, R W; Campbell, S J; Coutts, S J; Freeman, D M; Gutheil, W G; Kelly, T A; Kennedy, C A; Krolkowski, D A; Leonard, S F; Pargellis, C A; Tong, L & Adams, J (1994) "Studies on Proline Boronic Acid Dipeptide Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase-IV - Identification of a Cyclic Species Containing a B-N Bond" *Journal of the American Chemical Society* **116**(24): 10860-9.
- Stano, J; Kovacs, P; Nemeč, P & Neubert, K (1994) "Dipeptidyl Peptidase IV in gerkin seedlings *Cucumis sativus* L.cv." *Palava Biologia* **49**: 905-10.

- Stano, J; Kovacs, P; Psenak, M; Gajdos, J; Erdelsky, K; Kakoniov A, D & Neubert, K (1997) "Distribution of Dipeptidyl Peptidase IV in organs and cultures of poppy plants *Papaver somniferum* L. cv." *Amarin Pharmazie* **52**: 319-21.
- Steinmetzer, T; Silberring, J; Mrestani-Klaus, C; Fittkau, S; Barth, A & Demuth, H U (1993) "Peptidyl ammonium methyl ketones as substrate analog inhibitors of proline-specific peptidases" *J Enzyme Inhib* **7**(2): 77-85.
- Stöcker, W & Bode, W (1995) "Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins" *Curr Opin Struct Biol* **5**(3): 383-90.
- Sudmeier, J L; Gunther, U L; Gutheil, W G; Coutts, S J; Snow, R J; Barton, R W & Bachovchin, W W (1994) "Solution structures of active and inactive forms of the DP IV (CD26) inhibitor Pro-boroPro determined by NMR spectroscopy" *Biochemistry* **33**(41): 12427-38.
- Szeltner, Z; Rea, D; Juhász, T; Renner, V; Fülöp, V & Polgár, L (2004) "Concerted structural changes in the peptidase and the propeller domains of prolyl oligopeptidase are required for substrate binding" *J Mol Biol* **340**(3): 627-37.
- Tanaka, T; Duke-Cohan, J S; Kameoka, J; Yaron, A; Lee, I; Schlossman, S F & Morimoto, C (1994) "Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV" *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 3082-6.
- Tanaka, T; Kameoka, J; Yaron, A; Schlossman, S F & Morimoto, C (1993) "The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity" *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(10): 4586-90.
- Tang, J; James, M N; Hsu, I N; Jenkins, J A & Blundell, T L (1978) "Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases" *Nature* **271**(5646): 618-21.
- Thoma, R; Löffler, B; Stihle, M; Huber, W; Ruf, A & Hennig, M (2003) "Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV" *Structure (Camb)* **11**(8): 947-59.
- Thompson, J D; Gibson, T J; Plewniak, F; Jeanmougin, F & Higgins, D G (1997) "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools" *Nucleic Acid Res* **24**: 4876-82.
- Tiruppathi, C; Miyamoto, Y; Ganapathy, V; Roesel, R A; Whitford, G M & 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**(3): 1476-83.
- Tong, L A & Rossmann, M G (1990) "The locked rotation function" *Acta Cryst A* **46**(Pt 10): 783-92.
- Torimoto, Y; Dang, N H; Vivier, E; Tanaka, T; Schlossman, S F & Morimoto, C (1991) "Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes" *J Immunol* **147**(8): 2514-7.

- Tsakalidou, E; Zoidou, E; Pot, B; Wassill, L; Ludwig, W; Devriese, L A; Kalantzopoulos, G; Schleifer, K H & Kersters, K (1998) "Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov" *Int J Syst Bacteriol* **48** (Pt 2): 519-27.
- Turk, D (1992) "Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen" *Dissertation* (Technische Universität München, Germany).
- Umezawa, H; Aoyagi, T; Ogawa, K; Naganawa, H; Hamada, M & Takeuchi, T (1984) "Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria" *J Antibiot (Tokyo)* **37**(4): 422-5.
- Valenzuela, A; Blanco, J; Callebaut, C; Jacotot, E; Lluís, C; Hovanessian, A G & Franco, R (1997) "Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles" *J Immunol* **158**(8): 3721-9.
- Vanhoof, G; Goossens, F; De Meester, I; Hendriks, D & Scharpe, S (1995) "Proline motifs in peptides and their biological processing" *Faseb J* **9**(9): 736-44.
- von Bonin, A; Huhn, J & Fleischer, B (1998) "Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway" *Immunol Rev* **161**: 43-53.
- Wolf, B; Fischer, G & Barth, A (1978) "Kinetics of dipeptidyl-peptidase IV" *Acta Biol Med Ger* **37** (3): 409-20.
- Wolfsberg, T G; Primakoff, P; Myles, D G & White, J M (1995) "ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions" *J Cell Biol* **131**(2): 275-8.
- Wrenger, S; Faust, J; Mrestani-Klaus, C; Fengler, A; Stockel-Maschek, A; Lorey, S; Kahne, T; Brandt, W; Neubert, K; Ansorge, S & Reinhold, D (2000) "Down-regulation of T cell activation following inhibition of dipeptidyl peptidase IV/CD26 by the N-terminal part of the thromboxane A2 receptor" *J Biol Chem* **275**(29): 22180-6.
- Wrenger, S; Hoffmann, T; Faust, J; Mrestani-Klaus, C; Brandt, W; Neubert, K; Kraft, M; Olek, S; Frank, R; Ansorge, S & Reinhold, D (1997) "The N-terminal structure of HIV-1 Tat is required for suppression of CD26-dependent T cell growth" *J Biol Chem* **272**(48): 30283-8.
- Yamabe, T; Takakura, K; Sugie, K; Kitaoka, Y; Takeda, S; Okubo, Y; Teshigawara, K; Yodoi, J & Hori, T (1997) "Induction of the 2B9 antigen/dipeptidyl peptidase IV/CD26 on human natural killer cells by IL-2, IL-12 or IL-15" *Immunology* **91**(1): 151-8.
- Yamashita, K; Tachibana, Y; Matsuda, Y; Katunuma, N; Kochibe, N & Kobata, A (1988) "Comparative studies of the sugar chains of aminopeptidase N and dipeptidylpeptidase IV purified from rat kidney brush-border membrane" *Biochemistry* **27**(15): 5565-73.
- Yaron, A & Naider, F (1993) "Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins" *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**(1): 31-81.
- Yoshimoto, T & Tsuru, D (1982) "Proline-specific dipeptidyl aminopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*" *J Biochem (Tokyo)* **91**(6): 1899-906.

Zhao, K; Lim, D S; Funaki, T & Welch, J T (2003) "Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) by 2-(2-amino-1-fluoro-propylidene)-cyclopentanecarbonitrile, a fluoroolefin containing peptidomimetic" *Bioorg Med Chem* **11**(2): 207-15.

