

Fluorogene Substrate und Inhibitoren zur Detektion von DP IV- Aktivität auf Immunzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Dipl.-Biochem. Susan Lorey
geb. am 30. März 1972 in Ilmenau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Neubert
2. Prof. Dr. Siegfried Ansorge
3. PD Dr. Ulrich Rothe

Halle (Saale), den 28.09.1999

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Synthese der DP IV-Substrate und Inhibitoren	5
2.1	Fluorogene Substrate	5
2.1.1	bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110 und Dipeptidamido-rhodamin 110	5
2.1.2	Rhodamin-Anker-Substrate	9
2.2	Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Inhibitoren	12
3	Theoretischer Teil und Ergebnisse	14
3.1	Dipeptidylpeptidase IV	14
3.1.1	Charakterisierung	14
3.1.2	Substratspezifität	16
3.1.3	Inhibitoren	16
3.1.4	Biologische Bedeutung	18
3.2	Rhodamine und Rhodaminderivate	24
3.2.1	Fluoreszenz	24
3.2.2	Charakterisierung	25
3.2.3	Anwendungsbereiche	29
3.2.4	Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Rhodamin 110 und Rhodamin 110-Derivaten	31
3.2.5	Konzentrations- und pH-Abhängigkeit des Rhodamin 110	35
3.2.6	Rhodamin 110 in zellulären Systemen	37
3.2.7	Hydrophobizität und Stabilität von (Xaa-Pro) ₂ -Rhodamin 110-Verbindungen	38
3.3	Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchungen	41
3.3.1	Rhodamin 110-Derivate als Substrate isolierter DP IV	41
3.3.1.1	Dipeptidamido-rhodamine und bis-(Dipeptidamido)-rhodamine	41
3.3.1.2	Verbindungen des Typs Xaa-Pro-R110-Y	46
3.3.2	Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von (Gly-Pro) ₂ -R110	47
3.3.3	N ^ε -Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Lys-2-cyano-pyrrolidide als Inhibitoren isolierter DP IV	48
3.4	Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen	50
3.4.1	Allgemeine Bemerkungen	50
3.4.2	bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Derivate als Substrate zellulärer DP IV	51
3.4.2.1	Substrathydrolyse durch Zellen, Zellysat und isolierte DP IV	51

3.4.2.2	Spezifität der Hydrolyse der bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen durch DP IV intakter Zellen und des Zellsats	54
3.4.2.3	Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse der Substrate (Xaa-Pro) ₂ -R110 durch zelluläre DP IV	55
3.4.2.4	Beurteilung der (Xaa-Pro) ₂ -R110-Verbindungen hinsichtlich ihrer Eignung zur Differenzierung zellulärer DP IV-Aktivität	56
3.4.3	Verbindungen des Typs Xaa-Pro-R110-Y als Substrate zellulärer DP IV	58
3.4.3.1	Substrathydrolyse durch zelluläre DP IV	59
3.4.3.2	Spezifität der Substrathydrolyse durch zelluläre DP IV	61
3.4.3.3	Untersuchung der Eignung der Ankersubstrate zur Bindung an Zelloberflächen	61
3.4.3.4	Differenzierung der DP IV-Aktivität auf Zelloberflächen mittels Durchflußzytometrie	64
3.4.3.5	Substrathydrolyse von an Zelloberflächen gebundenen Substraten durch zelluläre DP IV	66
3.4.3.6	Differenzierung der Enzymaktivität auf Zelloberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie	69
3.4.3.7	Bedeutung des zellulären Thiolstatus für die Verankerung der Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y an Zellen	72
3.4.4	N ^ε -Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Lys-2-cyano-pyrrolidide als Inhibitoren zellulärer DP IV	74
3.4.4.1	Allgemeine Bemerkungen	74
3.4.4.2	Hemmung zellulärer DP IV-Aktivität	75
3.4.4.3	Anwendung N ^ε -Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierter Lys-2-cyano-pyrrolidide zur Differenzierung DP IV-exprimierender Zellen	76
4	Zusammenfassung	78
5	Experimenteller Teil	81
5.1	Synthese	81
5.1.1	Allgemeine Bemerkungen	81
5.1.2	Allgemeine Synthesevorschriften	82
5.1.3	Synthese der Rhodamin 110-Derivate	83
5.1.3.1	Synthese der N,N'-bis-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110-Verbindungen	83
5.1.3.2	Synthese der N-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110-Verbindungen	85
5.1.3.3	Synthese der Gly-Pro-R110-Y-Verbindungen	85
5.1.4	Synthese der N ^ε -Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidide	88
5.2	Enzymkinetische Methoden	90
5.2.1	Allgemeine Bemerkungen	90

5.2.2	Bestimmung der aktiven Zentren der DP IV	90
5.2.3	Bestimmung der kinetischen Konstanten der enzymkatalysierten Substrathydrolyse durch DP IV	90
5.2.4	Untersuchung der reversiblen kompetitiven Inhibierung der DP IV	91
5.2.5	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Rhodamin 110-Derivate	92
5.2.6	Untersuchung des nichtenzymatischen Zerfalls der Rhodamin 110-Derivate	93
5.2.7	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der bis-(Dipeptidamido)-rhodamine	94
5.3	Zellbiologische Methoden	95
5.3.1	Allgemeine Bemerkungen	95
5.3.2	Methoden zu Zellisolation, Zellaufschluß und Zellkultivierung	95
5.3.3	Spektralphotometrische Bestimmung zellulärer DP IV-Aktivität	97
5.3.4	Untersuchung zellulärer Enzymaktivität mittels Fluoreszenzplattenleser	97
5.3.5	Untersuchung zellulärer Enzymaktivität mittels Durchflußzytometrie	99
5.3.6	Fluoreszenzmikroskopische Differenzierung von DP IV-Aktivität auf CHO-Zellen	100
5.3.7	Untersuchung des Thiolstatus separierter MNZ	100
5.3.8	Untersuchungen zu Hemmeigenschaften kompetitiver reversibler Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierter Inhibitoren zellulärer DP IV	101
	Literaturverzeichnis	102

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abu	α -Aminobuttersäure
ADA	Adenosindesaminase
APN	Aminopeptidase N
APP	Aminopeptidase P
AS	Aminosäure
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl-
BSA	Bovine Serum Albumine
c	Konzentration
CAIBE	Chlorameisensäureisobutylester
CD	Cluster of Differentiation
Cha	L-Cyclohexylalanin
CMTMR	5(6)-(((4-Chlormethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamin
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
DC	Dünnschichtchromatographie
DFP	Diisopropylfluorophosphat
Dhp	L-Dehydroprolin
DMF	Dimethylformamid
DMSO, DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid, deuteriertes Dimethylsulfoxid
DP II	Dipeptidylpeptidase II
DP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTAF	5-(4,6-Dichlortriazin-2-yl)-aminofluorescein
E, ΔE	Extinktion, Extinktionsänderung
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid·Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
ϵ	Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]
F	relative Fluoreszenzintensität
FCS	Fetal Calf Serum
FL1, 2, 3	Fluoreszenz 1, 2 oder 3; bezeichnet die am Durchflußzytometer verwendbaren Fluoreszenzfilter
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl-
F _p	Schmelzpunkt [$^{\circ}C$]
GIP	Glucose-Dependent-Insulinotropic-Polypeptide
GLP	Glucagon-Like-Peptide
GRF	Growth-Hormone-Releasing-Factor
h	Stunde

HATU	[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium·Hexafluorophosphat
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
Hyp	L-Hydroxyprolin
I, [I]	Inhibitor, Inhibitorkonzentration
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon γ
k	Zerfallskonstante
K	Kelvin
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante enzymatischer Reaktionen [s^{-1}]
K_i	Inhibierungskonstante, Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes [M]
K_m	Michaelis-Menten-Konstante [M]
Konzentr.	Konzentration [g/100 ml]
Laufm.	Laufmittel
Lösungsm.	Lösungsmittel
λ , λ_{Ex} , λ_{Em} , λ_{Exsp} , λ_{Emsp}	Wellenlänge, Excitationswellenlänge, Emissionswellenlänge, Wellenlänge des Excitationsspalt, Wellenlänge des Emissionsspalt [nm]
M	Molarität [mol/l]
MCA	7-Amino-4-methyl-cumarin
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht [g/mol]
MHz	Megahertz
min	Minuten
mittl.Fl.-Int.	mittlere Fluoreszenzintensität
MNZ	mononukleäre Zellen
MPLC	Middle Pressure Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
NEM	N-Ethylmorpholin
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
ns	Nanosekunde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC5	R-Phycoerythrin-Cyanin 5
PEth	Petrolether

PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplex
PHA	Phytohämagglutinin
Pip	L-Pipecolinsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNA	p-Nitroanilin
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PWM	Pokeweed Mitogen
PyBrop	Bromo-tris(pyrrolidino)-phosphonium-Hexafluorophosphat
Rantes	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
R110	Rhodamin 110
R123	Rhodamin 123
R590	Rhodamin 590
R6G	Rhodamin 6G
RB	Rhodamin B
R3B	Rhodamin 3B
Rf	Retention Factor
rh DP IV	rekombinante humane DP IV
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RP	Reversed Phase
s	Sekunde
S, [S]	Substrat, Substratkonzentration
SDF-1 α	Stromal-Cell-Derived Factor 1 α
SES	Komplex aus 2 Substratmolekülen und einem Enzymmolekül
Summenf.	Summenformel
t	Zeit
t _{1/2}	Halbwertszeit
TBTU	2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Tetrafluoroborat
TCR	T-Cell-Receptor
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TR	Texas Red
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit [M·s ⁻¹]
Xaa	beliebige Aminosäure
Y	Ankergruppierung bestehend aus funktioneller Gruppe, die an einen Spacer variierender Kettenlänge gebunden ist
z.T.	zum Teil

Als fluorogene Inhibitoren werden im folgenden N^ε-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markiertes Lys-2-cyano-pyrrolidid bezeichnet. Die biotinylierte Verbindung fluoresziert **nicht**, wird aber durch Reaktion mit DTAF-Streptavidin in einen fluoreszierenden Biotin-Streptavidin-Komplex überführt, dessen Fluoreszenzemission nach Anregung bei 488 nm bei einer Wellenlänge von 525 nm detektiert werden kann (siehe auch **5.3.8**).

Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Antikörper

CD3-PC5	Dianova-Immunotech (Marseille)
CD19-PC5	Dianova-Immunotech (Marseille)
CD26-PE	Becton Dickinson (San Jose)
Goat-anti-Mouse IgG Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
IgG ₁ -PE-Cy5	Dianova-Immunotech (Marseille)
Mouse IgG-PE	Becton Dickinson (San Jose)
Rat-anti-Mouse IgG ₁ -PerCP	Becton Dickinson (San Jose)
Sheep-anti-Mouse IgG-TR	ICN Biomedical GmbH (Eschwege)

Zellkultur-Reagenzien

G-MEM-S	PAA Laboratories GmbH (Linz)
FCS	Life Technologies mbH (Karlsruhe)
IDEM	PAA Laboratories GmbH (Linz)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies mbH (Karlsruhe)
RPMI 1640	Life Technologies mbH (Karlsruhe) und PAA Laboratories GmbH (Linz)
Trypsin/EDTA	Life Technologies mbH (Karlsruhe)

Sonstige Reagenzien

7-Amino-4-methyl-cumarin (MCA)	Aldrich Chem. Co. (Steinheim)
(+)-Biotin	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
4(5)-Carboxyfluorescein	Fluka Chemie AG (Buchs)
Cell Tracker Orange CMTMR	Molecular Probes (Eugene)
Gly-Pro-MCA-Tos	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
Rhodamin 110-HCl	Synthon AcMaRi Chemie GmbH & Co. KG (Wolfen)

Puffer

PBS-Puffer	8.0 g NaCl, 2.0 g KCl, 14.4 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 2.0 g KH ₂ PO ₄ (Volumen 1 l, pH 7.2)
Puffer 1	PBS und 10.0% FCS
Puffer 2	PBS und 0.5% BSA und 0.2% EDTA

Alle für die chemische Synthese und für die enzymatischen Messungen eingesetzten Reagenzien und Lösungsmittel entstammen kommerziellen Quellen (Merck, Sigma, Fluka).

1 Einleitung und Problemstellung

Von den 20 Aminosäuren, die das Reservoir der Proteinbiosynthese des Organismus bilden, nimmt die Iminosäure Prolin eine Sonderstellung ein. Aufgrund der Rezyklisierung der aliphatischen Seitenkette zur C^α-Aminogruppe wird eine Struktur ausgeprägt, die einerseits durch ihre starre Konformation und andererseits durch das verstärkte Auftreten von *cis*-Isomeren bezüglich der Xaa-Pro-Bindung charakterisiert ist [YARON und NAIDER, 1993]. Darüber hinaus fungiert der Prolinstickstoff nicht als Donor für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken.

Prolylreste innerhalb von Aminosäuresequenzen sind für die Ausprägung struktureller Variabilität und erhöhter Hydrolysestabilität von Proteinen und Peptiden von Bedeutung [WILLIAMS und DEBER, 1991]. Prolinreiche Regionen wurden aber auch als essentielle Struktur- und Funktionselemente hinsichtlich Protein-Protein- und Protein-Ligand-Interaktionen beschrieben [WILLIAMSON, 1994]. Darüber hinaus enthalten die Aminosäuresequenzen zahlreicher biologisch aktiver Peptidhormone und Neuropeptide wie β -Casomorphine, Zytokine oder Substanz P einen oder mehrere Prolylreste, die für deren biologische Wirksamkeit essentiell sind [MENTLEIN, 1988].

Der Prozessierung prolinhaltiger Peptide, als wesentlichem Regulationsmechanismus ihrer physiologischen Aktivität [MENTLEIN, 1988], kommt daher eine besondere Bedeutung zu. Die Mehrheit der, in einer Vielzahl auftretenden, proteolytischen Enzyme ist jedoch nicht in der Lage, Peptidbindungen, an denen C- oder N-terminal ein Pro beteiligt ist, zu hydrolysieren. Diese für den Organismus signifikante Funktion wird daher von einigen wenigen auf den Prolylrest hochspezialisierten Proteasen, den prolinspezifischen Proteasen (Abb. 1), übernommen [YARON und NAIDER, 1993; VANHOOF et al., 1995; CUNNINGHAM und O'CONNOR, 1997].

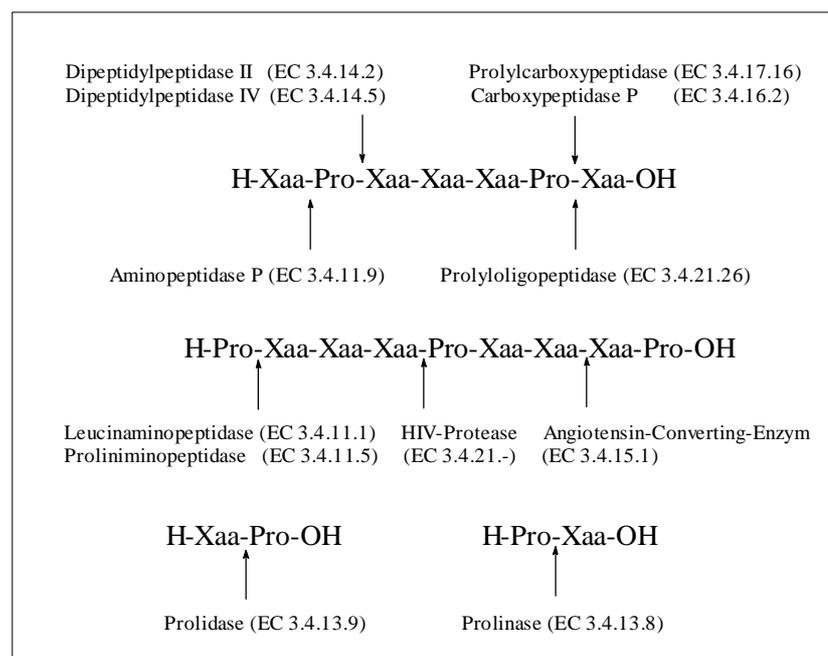


Abb. 1 Substratspezifität prolinspezifischer Proteasen [nach YARON und NAIDER, 1993]

Die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehende membrangebundene Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26, EC 3.4.14.5), als prolinspezifische Peptidase, ist aufgrund ihrer Multifunktionalität im Säugerorganismus (3.1.4) und ihrer nahezu ubiquitären Verbreitung (3.1.1) von großer Bedeutung. Die Erarbeitung eines Systems zum hochsensitiven Nachweis und zur spezifischen Differenzierung von DP IV-Aktivität auf Zelloberflächen erscheint daher relevant.

Die Charakterisierung enzymatischer Aktivitäten ist an geeignete Enzymsubstrate gebunden. Die eingesetzten Proteasesubstrate bestehen aus einer für das Enzym spezifischen Erkennungsregion und aus einer chromogenen oder fluorogenen Gruppe, die nach enzymatischer Hydrolyse freigesetzt wird und aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften leicht nachgewiesen werden kann.

Substrate mit chromogenen Gruppen wie dem p-Nitroanilid [NAGATSU et al., 1976], dem p-Phenylazoanilid [BARTH et al., 1974; KATO et al., 1979], dem 3,5-Dibromo-4-hydroxy-anilid [SHIBUYA-SARUTA et al., 1995] sowie dem als Fluorophor und Chromophor eingesetzten 4-Methoxy-2-naphtylamid [SCHARPE et al., 1988] oder dem 1- bzw. 2-Naphtylamid [GOSSRAU, 1985] aber auch Substrate mit fluorogenen Gruppen wie dem 7-Amino-4-methylcumarin [KOJIMA et al., 1979a] und dessen Derivate [LOJDA, 1996] oder dem 6-Aminochinolin [BRYNES et al., 1981] eignen sich für *in vitro*-Bestimmungen von Enzymaktivitäten.

Für sensitive Untersuchungen enzymatischer Aktivitäten auf Zelloberflächen kommen chromogene Substrate aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Nachweisempfindlichkeit nicht in Frage. Hinzu kommt, daß die für diese Zwecke ideale Meßtechnik der Durchflußzytometrie [WATSON, 1987] auf die Detektion von Fluoreszenzstreulicht beschränkt ist.

Eine wesentliche Bedingung für die Anwendung der Durchflußzytometrie ist eine möglichst stabile Fluoreszenzmarkierung der Zelle, was Penetrations- oder Verankerungseigenschaften des nach der Substrathydrolyse freigesetzten Fluorophors in die oder an der Zelle voraussetzt. Diese Anforderungen erfüllen mit Einschränkungen jedoch nur sehr wenige fluorogene Gruppen. Darüber hinaus enthalten zahlreiche der in der Literatur erwähnten Enzymsubstrate Fluorophore, die im UV-Bereich des Lichtes (340-390 nm) angeregt werden (intramolekulare Quenchsubstrate [YARON et al., 1979], 4-Methoxy-2-naphtylamid [SCHARPE et al., 1988], 6-Aminonaphtalensulfonamid [KNIGHT, 1993; BUTENAS et al., 1997], 7-Amino-4-methylcumarin [GALLAGHER et al., 1997], 7-Amino-4-methyl-2-chinolinon [NOULA et al., 1997]. Damit ist eine hohe zelluläre Autofluoreszenz verbunden [DAVIDSON und HILCHENBACH, 1990], die durch die in Zellen vorkommenden und ebenfalls im UV-Bereich des Lichtes angeregten Coenzyme NADH, NADPH, FAD und Pyridoxalphosphat [MULLINS, 1994] hervorgerufen wird. Hinzu kommt, daß die meisten in der klinischen Diagnostik eingesetzten Durchflußzytometer mit einem Argon-Laser (Wellenlängenbereiche um 488 nm und 514 nm) ausgerüstet sind, wodurch der Einsatz von im UV-Bereich des Lichtes angeregten Fluorophoren limitiert ist.

Um das schnelle Abdiffundieren des β -Naphtylamins von der Zelle zu verhindern und gleichzeitig eine bathochrome Verschiebung der Emissionswellenlänge zu

erreichen, entwickelten DOLBEARE und SMITH [1977] einen Assay, bei dem durch Reaktion des nach enzymatischer Hydrolyse freigesetzten aromatischenamins (Chromogen) mit Nitrosalicylaldehyd ein in der Zelle stabiles Addukt mit einem Emissionsmaximum um 530 nm entsteht. Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch in dem sehr schnellen Auskristallisieren des Addukts, was Zellschädigungen, verbunden mit einer hohen Hintergrundfluoreszenz des Mediums, zur Folge hat.

Enzymsubstrate mit fluorophoren Gruppen, die im sichtbaren Bereich des Lichtes angeregt werden, wie das 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (475 nm, [LANCET und PECH, 1977]) oder das in biologischen Systemen bereits eingesetzte Kresylviolett (575 nm, [VAN NOORDEN et al., 1997]) sind durch schlechte Quantenausbeuten charakterisiert (0.24 und 0.40, [ISAK und EYRING, 1992]).

Allein das Rhodamin 110-Molekül (R110, Abb. 2, **3.2**) scheint alle Anforderungen zu erfüllen. Das Excitationsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 494 nm (Quantenausbeute = 0.91). Es besitzt zwei primäre Aminogruppen, über die mittels einfacher peptidchemischer Synthesemethoden, Proteasesubstrat- und Verankerungs-Strukturen eingeführt werden können. Es penetriert nach ASSFALG-MACHLEIDT et al. [1992] schnell in intakte Zellen, wo es eine stabile Fluoreszenz gewährleisten soll. Weitere vielversprechende Arbeiten von LEYTUS et al. [1983a, 1983b, 1984], ROTHE et al. [1992], und ULBRICHT et al. [1995] charakterisieren R110-Substrate als sensitive Substrate lysosomaler und anderer Proteasen, die unter Nutzung der Durchflußzytometrie gute Einsatzmöglichkeiten eröffnen.

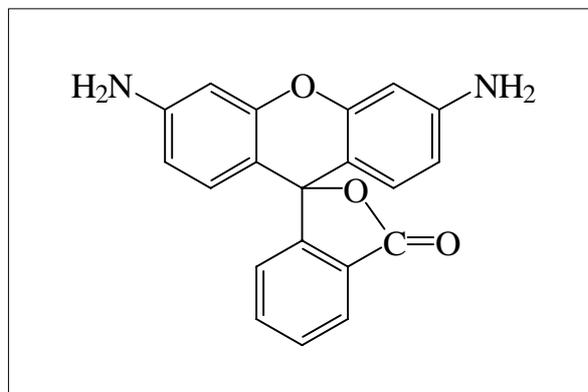


Abb. 2 Darstellung des Rhodamin 110

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, nachweissensitive DP IV-Substrate auf der Basis des R110 zu synthetisieren und sowohl analytisch als auch enzymkinetisch zu charakterisieren. Zunächst waren ausgehend von den Arbeiten um LEYTUS et al. [1983a, 1983b, 1984] Substrate der Struktur Xaa-Pro-R110 und (Xaa-Pro)₂-R110 mit Xaa als proteinogener Aminosäure variierender Hydrophobizität vorgesehen. Von Interesse war dabei, inwiefern sich die Größe des R110-Moleküls auf die kinetischen Konstanten der enzymatischen Hydrolyse durch isolierte DP IV im Vergleich zu den kinetischen Konstanten der Hydrolyse der Dipeptid-p-Nitroanilide auswirkt.

Auf zellulärer Ebene sollte die Eignung der Verbindungen für die Bestimmung der DP IV-Aktivität von Immunzellen mittels Durchflußzytometrie untersucht werden. Eine mögliche Lokalisation der zellulären DP IV anhand der enzymkatalysiert freigesetzten Fluoreszenz der Hydrolyseprodukte unter Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie wurde angestrebt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welchen Einfluß unterschiedlich hydrophobe Aminosäuren Xaa auf die Substrathydrolyse durch zelluläre DP IV haben. Von besonderem Interesse war die Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse dieser Verbindungen im Vergleich zur Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse bekannter Dipeptid-p-Nitroanilide.

Für die gezielte Bestimmung membranständiger DP IV-Aktivität war die Synthese von Substraten der Struktur Xaa-Pro-R110-Y (Xaa = Gly oder Ala und Y = funktionelle Ankergruppe) vorgesehen, mit deren Hilfe eine kovalente Fixierung der Substrate bzw. des nach enzymkatalysierter Hydrolyse freigesetzten Rhodaminfarbstoffes an der Zelle erreicht werden sollte. Dabei waren als Reste Y Ankergruppen vorgesehen, die sich sowohl in ihrer Reaktivität unterscheiden als auch eine im Sinne eines Spacereffektes variierende Kettenlänge aufweisen. Auf diesem Wege sollte die enzymatische Quantifizierung zellulärer DP IV und eine gezielte Differenzierung DP IV-reicher und DP IV-armer Immunzellen ermöglicht werden.

Die Bestimmung der Enzymaktivität eines membrangebundenen Zelloberflächenenzym würde für die Synthese von Substraten anderer membranlokalisierter Enzyme wie z.B. APN Ansatzpunkte liefern. Ausgehend von den bekannten Strukturen (Xaa-Pro)₂-R110 bzw. Xaa-Pro-R110-Y könnten durch Variation des für das Enzym spezifischen Substrateils Xaa-Pro, diese Verbindungen anderen Enzymen zugänglich gemacht werden. Darüber hinaus wäre die Differenzierung zellulärer DP IV-Aktivität in Hinsicht der DP IV als Tumormarker oder der funktionellen Bedeutung der DP IV bei Autoimmunerkrankungen (3.1.4) innerhalb eines sensitiven Nachweissystems von klinischer Relevanz.

Neben R110-Substraten sollten als Weiterführung der Arbeiten von HERMANN [1995] markierte DP IV-Inhibitoren des Typs Lys-2-cyano-pyrrolidid synthetisiert werden. Als Markermoleküle waren Biotin und 4(5)-Carboxyfluorescein vorgesehen, die an der ε-Aminogruppe des Lysins eingeführt werden sollten. Neben einer enzymkinetischen Charakterisierung dieser Inhibitoren sollte deren hemmende Wirkung auf die Hydrolyse von Dipeptid-p-Nitroaniliden durch zelluläre DP IV untersucht werden. Darüber hinaus war eine zelluläre Enzymlokalisierung mit Hilfe dieser Verbindungen unter Nutzung der Fluoreszenzmikroskopie vorgesehen.

2 Synthese der DP IV-Substrate und Inhibitoren

Wir entschieden uns, ausgehend von den Arbeiten um LEYTUS et al. [1983a, 1983b, 1984], mono- und bis-Dipeptid-substituierte Rhodamin 110-Verbindungen (Xaa-Pro-R110 und (Xaa-Pro)₂-R110) zu synthetisieren, die sich in ihrer Hydrophobizität voneinander unterscheiden sollten. Das Ziel bestand in der Charakterisierung der Hydrolyse dieser Substrate sowohl durch isolierte DP IV als auch durch zelluläre DP IV von Immunzellen. Diese Verbindungen erwiesen sich jedoch zur Bestimmung der zellulären DP IV-Aktivität als nicht optimal einsetzbar. Besonders problematisch gestaltete sich die Diffusion des nach enzymatischer Hydrolyse freigesetzten R110 bzw. Xaa-Pro-R110 in das umgebende Milieu. Die daraus resultierende Hintergrundfluoreszenz verhinderte eine qualitative und quantitative Bestimmung der zellulären DP IV-Aktivität. Es wurden daher Rhodamin-Anker-Substrate des Typs Xaa-Pro-R110-Y synthetisiert. Der Rest Y stellt eine reaktive Ankergruppierung dar, die eine kovalente Fixierung des Fluorophors auf der Zelloberfläche ermöglichen sollte. Als Ankergruppe wurden sowohl aromatische als auch aliphatische Halogenalkylreste aber auch n-Alkylmaleinimidreste eingesetzt, die sich einerseits in der Reaktivität der Ankergruppe unterscheiden und andererseits eine im Sinne eines Spacereffektes variierende Kettenlänge aufweisen.

2.1 Fluorogene Substrate

2.1.1 bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110 und Dipeptidamido-rhodamin 110

bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110

Die Synthese der bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen erfolgte in zwei Stufen nach Abb. 3, zunächst durch Umsetzung des N-geschützten (Boc-) Prolins mit Rhodamin 110 unter Erhalt von (Boc-Pro)₂-R110. Nach acidolytischer Schutzgruppenabspaltung wurde (Pro)₂-R110 mit der jeweiligen N-geschützten (Boc-) Aminosäure zu dem gewünschten bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110 umgesetzt.

Für beide Kupplungsschritte wurde die Mischanhydridtechnik eingesetzt. Die Aktivierung der reaktionsträgen Carboxylgruppe der N-geschützten Aminosäure über ein gemischtes Anhydrid wurde unter Verwendung von Chlorkohlensäureisobutylester [VAUGHAN, 1951; TILAK, 1970; VAN ZON und BEYERMAN, 1973] erreicht.

Der erste Reaktionsschritt, die Synthese von (Boc-Pro)₂-R110, erfolgte mit einer Ausbeute von nur 36%, sicherlich bedingt durch die geringe Nukleophilie der Aminogruppen des Rhodamin 110. Für den zweiten Kupplungsschritt konnte besonders für die Umsetzungen von Boc-Xaa-OH (Xaa = Abu, Lys und Ser) mit (Pro)₂-R110, die nach YAJIMA et al. [1969a] beschriebene falsche Aufspaltung des gemischten Anhydrids unter Bildung des Urethans nachgewiesen werden. Demnach ist in Übereinstimmung mit YAJIMA et al. [1969b] neben der

Nukleophilie der Aminokomponente auch deren sterische Zugänglichkeit für den Angriff am Carbonylkohlenstoff der N-geschützten Aminosäure von Bedeutung.

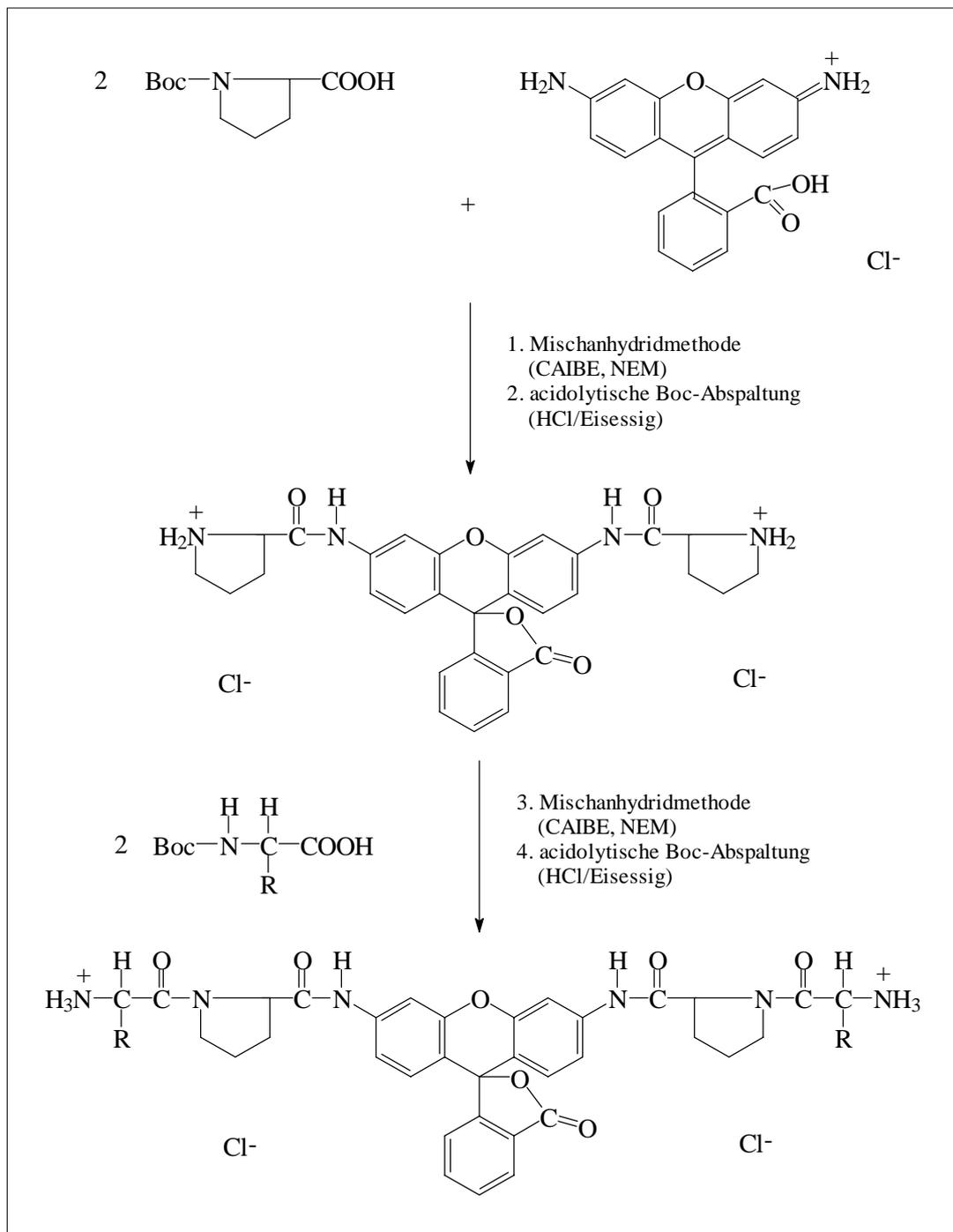


Abb. 3 Syntheschema der bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen

Die erhaltenen bis-(Dipeptidamido)-rhodamine wurden nach acidolytischer Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels HPLC gereinigt (5.1.3.1). Die analytischen Daten der Verbindungen sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

NMR-Untersuchungen zeigen für alle R110-Derivate im Protonenspektrum zwei Datensätze, die auf die Existenz einer Hauptkonformation im langsamen Gleichgewicht mit einer

Nebenkonformation hinweisen. Die Auswertung der zweidimensionalen ROESY-Spektren zeigt chemischen Austausch zwischen beiden Datensätzen. Für alle Rhodamin 110-Verbindungen wurde das *trans*-Isomer (bezüglich der Xaa-Pro-Bindung) als Hauptkonformer aufgrund der im ROESY-Spektrum auftretenden charakteristischen NOE's zwischen den Xaa-C^αH- und den Pro-C^δ_Aδ_BH₂-Protonen charakterisiert. Die relativen Populationen beider Konformere wurden durch Integration der jeweils gut aufgelösten Pro-C^αH-Signale im eindimensionalen Protonenspektrum bestimmt [MRESTANI-KLAUS et al., 1996, 1998].

Die entstandenen Verbindungen weisen *cis*-Gehalte der Xaa-Pro-Bindung zwischen 6.5% und 12% auf (Tab A5.1, Anhang). Während der Ausgangsstoff R110-HCl fluoreszierend und rot gefärbt ist, sind alle Reaktionsprodukte nichtfluoreszierend und farblos, was auf den Bruch des konjugierten π-Elektronensystems des Xanthengerüsts unter Ausbildung einer laktoiden Struktur zurückzuführen ist (3.2.4).

Tab. 1 Analytische Daten der bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen

Verbindung	Ausbeute [%] Summenf. F _p [°C]	MS [M+H] ⁺ MG [g/mol]	[α] _D ²⁰ [°] Konzentr. [g/100ml] Lösungsm.	DC Rf/ System	HPLC t _R [min] Laufm./Zeit	pKa- Werte [pH]
(Gly-Pro) ₂ - R110	62.6 C ₃₄ H ₃₄ O ₇ N ₆ 190-194	639 638.25	n.b.	0.31/D 0.35/E 0.35/F	23 30-50% A/ 60 min	8.14±0.03
(Ala-Pro) ₂ - R110	59.2 C ₃₆ H ₃₈ O ₇ N ₆ 181-184	667 666.28	n.b.	0.33/D 0.41/E 0.43/F	54 30-100% A/ 120 min	8.14±0.05
(Abu-Pro) ₂ - R110	42.1 C ₃₈ H ₄₂ O ₇ N ₆ 169-172	695 694.31	-107.22 c = 0.91 Wasser	0.37/D 0.39/E 0.41/F	31 0-100% A/ 60 min	7.98±0.07
(Leu-Pro) ₂ - R110	71.7 C ₄₂ H ₅₀ O ₇ N ₆ 162-165	751 750.37	-76.92 c = 0.78 Wasser	0.41/D 0.52/E 0.54/F	35 0-100% A/ 60 min	7.42±0.10
(Ser-Pro) ₂ - R110	54.9 C ₃₆ H ₃₈ O ₉ N ₆ 159-162	699 698.27	-94.83 c = 1.16 Wasser	0.29/D 0.32/E 0.37/F	28 0-100% A/ 60 min	7.15±0.03
(Lys-Pro) ₂ - R110	49.3 C ₄₂ H ₅₂ O ₇ N ₈ 155-157	781 780.40	-47.39 c = 0.59 Wasser	0.06/D 0.15/E 0.26/F	26 0-100% A/ 60 min	n.b.
(Cha-Pro) ₂ - R110-2HCl	C ₄₈ H ₅₈ O ₇ N ₆ Cl ₂ 197-201	829 900.37	n.b.	0.48/D 0.61/E 0.62/F	37 20-90% A/ 60 min	8.32±0.09
(Phe-Pro) ₂ - R110-2TFA	C ₅₂ H ₄₈ O ₁₁ N ₆ F ₆ 174-178	819 1046.33	n.b.	0.68/D 0.62/E 0.63/F	31 20-90% A/ 60 min	n.b.

Dipeptidamido-rhodamin 110

Die monosubstituierten Dipeptidamido-rhodamin 110-Verbindungen wurden durch Umsetzung von Boc-Xaa-Pro-OH mit R110-HCl und nachfolgende acidolytische Boc-Schutzgruppenabspaltung nach dem allgemeinen Reaktionsschema in Abb. 4 erhalten.

Die Synthesen erfolgten nach der Carbodiimidmethode. Die von SHEENAN und HESS [1955] eingeführte Methode der Aktivierung der Carboxykomponente mittels N,N' -Dicyclohexylcarbodiimid gehört zu den Standardmethoden der Peptidsynthese. Problematisch gestaltet sich jedoch die vollständige Entfernung des hier anfallenden Cyclohexylharnstoffs. Daher wurde zur Kupplungsreaktion das wasserlösliche 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC, [SHEENAN et al., 1961; SHEENAN und PRESTON, 1965]) eingesetzt, das mit der Boc-geschützten Aminosäure intermediär ein Acylureid bildet. Nach Umsetzung mit der Aminokomponente (R110-HCl) konnte das gebildete wasserlösliche Harnstoffderivat durch einfache Waschprozesse entfernt werden.

Die niedrigen Ausbeuten dieser Synthesen von ca. 30% (**5.1.3.2**) sind sicherlich wiederum auf die geringe Nukleophilie der Aminogruppen des Rhodamin 110 sowie sterische Effekte zurückzuführen. Der Einsatz der Mischanhydridmethode lieferte noch schlechtere Ausbeuten. Das besondere Problem der Synthesen bestand darin, daß nur eine der zwei Aminogruppen des R110 reagieren sollte.

Die monosubstituierten Dipeptidamido-rhodamine wurden nach acidolytischer Entfernung der Boc-Schutzgruppe erhalten. Die analytischen Daten sind in Tab. 2 aufgeführt.

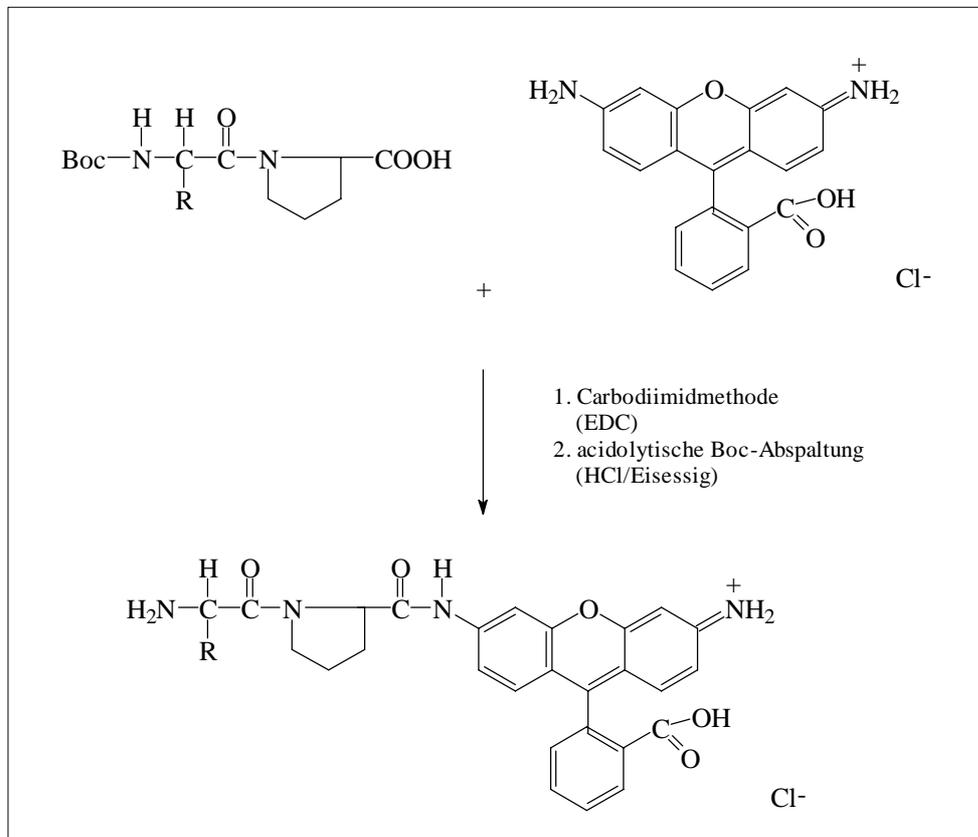


Abb. 4 Syntheschema der Dipeptidamido-rhodamin 110-Verbindungen

Die Verbindungen sind wie der Ausgangsstoff R110-HCl fluoreszierend und stark orange gefärbt, was auf die Ausprägung eines konjugierten π -Elektronensystems zurückzuführen ist. Trotzdem sind aufgrund der Acylierung einer Aminogruppe deutliche Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften zu beobachten (3.2.4).

Anhand der ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnten vier Datensätze, die auf die Bildung von Diastereoisomeren (bezüglich des C_9 als Asymmetriezentrum) zurückzuführen sind, charakterisiert werden. Die *cis*- und *trans*-Isomeren liegen demnach sowohl in einer S- als auch in einer R-Konfiguration vor, die innerhalb beider Konformere in einem Verhältnis von 1:1 auftreten, was anhand der Verdoppelung der Rhodamin 110-NH-*trans*- und *cis*-Signale (R/S- C_9) nachgewiesen werden konnte [MRESTANI-KLAUS et al., 1996].

Tab. 2 Analytische Daten der Dipeptidamido-rhodamin 110-Verbindungen

Verbindung	Ausbeute [%] Summenformel F_p [°C]	MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ MG [g/mol]	DC Rf/System	HPLC t_R [min] Laufm./Zeit
Gly-Pro-R110-HCl	84.6 $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}_4\text{Cl}$ 203-207	485 520.15	0.40/D 0.46/E 0.37/F	25 und 27 0-100% A/60 min
Ala-Pro-R110-TFA	81.2 $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{O}_7\text{N}_4\text{F}_3$ 208-212	499 612.18	0.42/D 0.45/E 0.56/F	32 und 34 0-70% A/60 min
Phe-Pro-R110-HCl	$\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{N}_4\text{Cl}$ 197-200	575 610.20	0.51/D 0.64/E 0.63/F	32 und 33 0-100% A/60 min

2.1.2 Rhodamin-Anker-Substrate

Die Synthese der N-(Glycyl-prolin)-N'-(halogenalkylcarbonyl)-rhodamin 110-Verbindungen (Gly-Pro-R110-Y) erfolgte durch Umsetzung von Boc-Gly-Pro-R110 (2.1.1 und 5.1.3.2) mit dem jeweiligen Halogenalkylcarbonsäurechlorid. Der starke Elektronenzug des im Säurechlorid vorliegenden -I-Substituenten Cl resultiert in einer erhöhten Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs, wodurch der Angriff des freien Elektronenpaares des R110-Stickstoffs begünstigt ist. Nach Zugabe einer Hilfsbase ist die Reaktion nach kurzer Zeit beendet.

N-Glycyl-prolin-N'-maleinimidoalkyl-rhodamin 110-Verbindungen wurden durch Umsetzung von Boc-Gly-Pro-R110 mit 4-Maleinimidobuttersäure bzw. 6-Maleinimidocaprinsäure nach der Carbodiimidmethode erhalten.

Die Synthese der Verbindungen gestaltete sich schwierig. Die Säurechlorid- und die Carbodiimidmethode boten die einzigen Synthesemöglichkeiten, mit denen sich akzeptable Ausbeuten erreichen ließen (5.1.3.3). Der Einsatz anderer Aktivierungsreagenzien wie HATU, TBTU, PyBrop oder EEDQ [BELLEAU und MALEK, 1968] zeigte nur geringe oder keine Umsetzungen. Nach der Mischanhydridmethode konnte zwar die vollständige Umsetzung von

Boc-Gly-Pro-R110 beobachtet werden, allerdings war das gewünschte Produkt zu 50% durch das oben erwähnte Urethan infolge der falschen Aufspaltung des gemischten Anhydrides verunreinigt. Beide Boc-geschützten Verbindungen waren in ihrer Polarität sehr ähnlich, so daß eine Trennung mittels MPLC nicht möglich war.

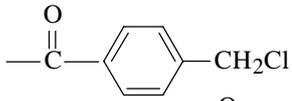
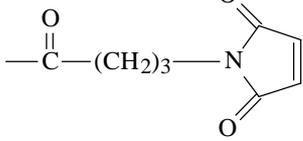
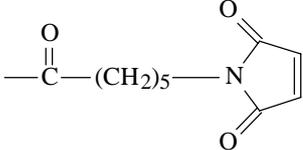
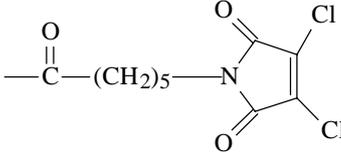
Es ist anzunehmen, daß aufgrund des vergleichsweise großen Raumbedarfs des Rhodamin 110 hohe sterische Ansprüche an die Kupplungsreaktion gestellt werden.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte acidolytisch mit HCl/Eisessig. Die N-terminal freien Verbindungen wurden mittels HPLC gereinigt.

Die Verbindungen sind farblos und nicht fluoreszierend (3.2.4). Die analytischen Daten sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Die synthetisierten R110-Derivate des Typs Gly-Pro-R110-Y (Tab. 3) unterscheiden sich in ihrem Rest Y sowohl hinsichtlich der Reaktivität als auch der Kettenlänge. Ala-Pro-R110-Y₉-HCl wurde von Dr. J. Faust, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt.

Tab. 3 Synthetisierte Verbindungen des Typs Xaa-Pro-R110-Y (Xaa = Gly, Ala)

Gly-Pro-R110-Y (Y ₁ bis Y ₈)	Y ₁ : -CO-CH ₃ Y ₂ : -CO-CH ₂ Cl Y ₃ : -CO-(CH ₂) ₃ Cl Y ₄ : -CO-(CH ₂) ₄ Cl Y ₅ : -CO-(CH ₂) ₄ Br Y ₆ :  Y ₇ :  Y ₈ : 
Ala-Pro-R110-Y (Y ₉)	Y ₉ : 

(Gly-Pro-R110 mit Y = Y₃, Y₅, Y₇ und Y₈ liegen als Trifluoracetate vor, Ala-Pro-R110-Y₉ liegt als Hydrochlorid vor, Tab. 4)

Die ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen der Struktur Gly-Pro-R110-Y (Y = Y₁ bis Y₆) weisen auf die Existenz von *cis/trans*-Konformeren hinsichtlich der Xaa-Pro-Bindung in Analogie zu den bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen hin. Daneben konnten in Analogie zu

den Dipeptidamido-rhodamin 110-Strukturen zusätzlich R/S-Diastereoisomere (C₉ als Asymmetriezentrum, Abb. 7) anhand der Verdoppelung der Pro-R110(NH, *trans*)-Signale nachgewiesen werden. Da die Pro-R110(NH, *cis*)-Signale von den jeweiligen R110(NH, *trans*)-Y-Signalen überlagert werden, konnte keine Aussage über deren R/S-Verhältnisse getroffen werden. Die R110(NH)-Y-Bindung liegt in der *trans*-Konformation vor. Eine Verdoppelung dieser Signale, die auf eine R/S-Konfiguration hinweist, konnte nicht gefunden werden. Die relativen Populationen der *cis/trans*-Konformere wurden durch Integration der jeweils gut aufgelösten Pro-C^αH-Signale im eindimensionalen Protonenspektrum bestimmt [MRESTANI-KLAUS, unveröffentlichte Ergebnisse]. Die entstandenen Verbindungen weisen *cis*-Gehalte der Xaa-Pro-Bindung zwischen 13.5% und 19% auf. Die Verhältnisse der Populationen der R/S-Konfigurationen des *trans*-Konformeren wurden durch Integration der entsprechenden Pro-R110(NH, *trans*)-Signale ermittelt (Tab. A5.2, Anhang).

Tab. 4 Analytische Daten der Xaa-Pro-R110-Y-Verbindungen

Verbindung	Ausbeute [%] Summenf. F _p [°C]	MS [M+H] ⁺ MG [g/mol]	[α] _D ²⁰ [°] Konzentr. [g/100ml] Lösungsm.	DC Rf/ System	HPLC t _R [min] Laufm./Zeit
Gly-Pro-R110-Y ₁	60.6 C ₂₉ H ₂₆ O ₆ N ₄ 201-205	527 526.19	n.b.	0.47/D 0.51/E 0.53/F	38 0-70% A/ 60 min
Gly-Pro-R110-Y ₂	66.5 C ₂₉ H ₂₅ O ₆ N ₄ Cl 166 (Zers.)	561 560.15	-59.69 c = 0.86 Methanol	0.47/D 0.59/E 0.56/F	39 0-75% A/ 60 min
Gly-Pro-R110-Y ₃ -TFA	80.5 C ₃₃ H ₃₀ O ₈ N ₄ ClF ₃ 159 (Zers.)	589 702.17	-83.90 c = 0.89 Methanol	0.49/D 0.57/E 0.58/F	42 0-75% A/ 60 min
Gly-Pro-R110-Y ₄	57.0 C ₃₂ H ₃₁ O ₆ N ₄ Cl 155 (Zers.)	603 602.19	-68.82 c = 0.62 Methanol	0.50/D 0.56/E 0.58/F	45 0-75% A/ 60 min
Gly-Pro-R110-Y ₅ -TFA	82.6 C ₃₄ H ₃₂ O ₈ N ₄ BrF ₃ 163 (Zers.)	647 760.14	-65.20 C = 1.37 Methanol	0.53/D 0.57/E 0.61/F	47 0-75% A/ 60 min
Gly-Pro-R110-Y ₆	69.3 C ₃₅ H ₂₉ O ₆ N ₄ Cl amorph	637 636.18	-60.11 c = 0.61 Methanol	0.49/D 0.53/E 0.61/F	40 0-100% A/ 60 min
Gly-Pro-R110-Y ₇ -TFA	80.6 C ₃₇ H ₃₂ O ₁₀ N ₅ F ₃ 173 (Zers.)	651 763.21	-54.40 c = 0.87 Methanol	0.48/D 0.50/E	44 0-70% A/ 60 min
Gly-Pro-R110-Y ₈ -TFA	83.1 C ₃₉ H ₃₆ O ₁₀ N ₅ F ₃ 177 (Zers.)	679 791.24	-32.89 c = 0.75 Methanol	0.49/D 0.53/E	48 0-70% A/ 60 min
Ala-Pro-R110-Y ₉ -HCl	C ₃₈ H ₃₆ O ₈ N ₅ Cl ₃ 195 (Zers.)	795.16	-63.01 c = 0.84 Methanol	0.62/D 0.31/E 0.46/F	54 0-70% A/ 60 min

2.2 Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Inhibitoren

Zur zellulären DP IV-Lokalisation wurden neben Fluoreszenzsubstraten auch Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Inhibitoren synthetisiert. Aminoacyl-2-cyano-pyrrolidide, die mit K_i -Werten zwischen 10^{-7} M und 10^{-8} M gute kompetitive Inhibitoren der DP IV sind (3.1.3), stellten die Basisstrukturen für die Synthesen dar.

Die Darstellung der Lys-2-cyano-pyrrolidide (Abb. 5) wurde in Analogie zu LI et al. [1995] durchgeführt. Der selektive Schutz der α - und ϵ -Aminogruppe des Lysins war eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Syntheseverlauf. Wir entschieden uns für die Schutzgruppenkombination Fmoc- (α) und Boc- (ϵ) aufgrund der selektiven basischen bzw. sauren Abspaltung der jeweiligen Schutzgruppe.

Zunächst erfolgte die Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)-OH mit Prolinamid nach der bereits beschriebenen Carbodiimidmethode (2.1.1). Auch hier wurde das wasserlösliche EDC [SHEENAN et al., 1961] eingesetzt. Die Reaktion erfolgte unter Zusatz von HOBt, um die von mehreren Autoren beschriebene Razemisierung der Carboxykomponente zu verhindern [WEYGAND et al., 1966; KÖNIG UND GEIGER, 1970]. Es wird davon ausgegangen, daß das zunächst gebildete Acylureid mit dem zugesetzten HOBt in sehr schneller Reaktion zum entsprechenden Aktivester umgesetzt wird, dessen Aminolyse ohne Razemisierung abläuft.

Die sich anschließende Dehydratisierung des Fmoc-Lys(Boc)-Prolinamids unter Ausbildung von Fmoc-Lys(Boc)-2-cyano-pyrrolidid erfolgte in Gegenwart von Trifluoressigsäureanhydrid. Die Reaktion ist eine typische Eliminierungsreaktion bei der das freie Elektronenpaar des Amidsauerstoffs mit einem stark elektrophilen Carbonylkohlenstoff des Anhydrids wechselwirkt.

Nach acidolytischer Boc-Schutzgruppenabspaltung wurden die Marker-Moleküle (Biotin und 4(5)-Carboxyfluorescein) nach der bereits beschriebenen Mischanhydridmethode (2.1.1) mittels CAIBE und NEM an der ϵ -Aminogruppe des Lysins eingeführt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde anschließend mit Morpholin entfernt.

Tab. 5 Analytische Daten der N^ϵ -Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidide

Verbindung	Ausbeute [%] Summenf. F_p [°C]	MS [M+H] ⁺ MG [g/mol]	$[\alpha]_D^{20}$ [°] Konzentr. [g/100ml] Lösungsm.	DC Rf/ System	HPLC t_R [min] Laufm./Zeit
Lys-(4(5)- carboxyfluoresceinyl)- 2-cyano-pyrrolidid	71.5 $C_{32}H_{30}O_7N_4$ 218 (Zers.)	583 582.21	n.b.	0.60/D 0.40/E 0.61/F	32 0-70% A/ 60 min
Lys-(biotinyl)-2- cyano-pyrrolidid	69.4 $C_{21}H_{34}O_3N_6S$ 62-64	451 450.24	+45.79 $c = 0.99$ Methanol	0.28/D 0.25/F	20 0-70% A/ 60 min

Die synthetisierten Verbindungen Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid und Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid wurden mittels HPLC gereinigt. Die analytischen Daten der Verbindungen sind in Tab. 5, die NMR-Daten sind in Tab. A5.3 (Anhang) aufgeführt.

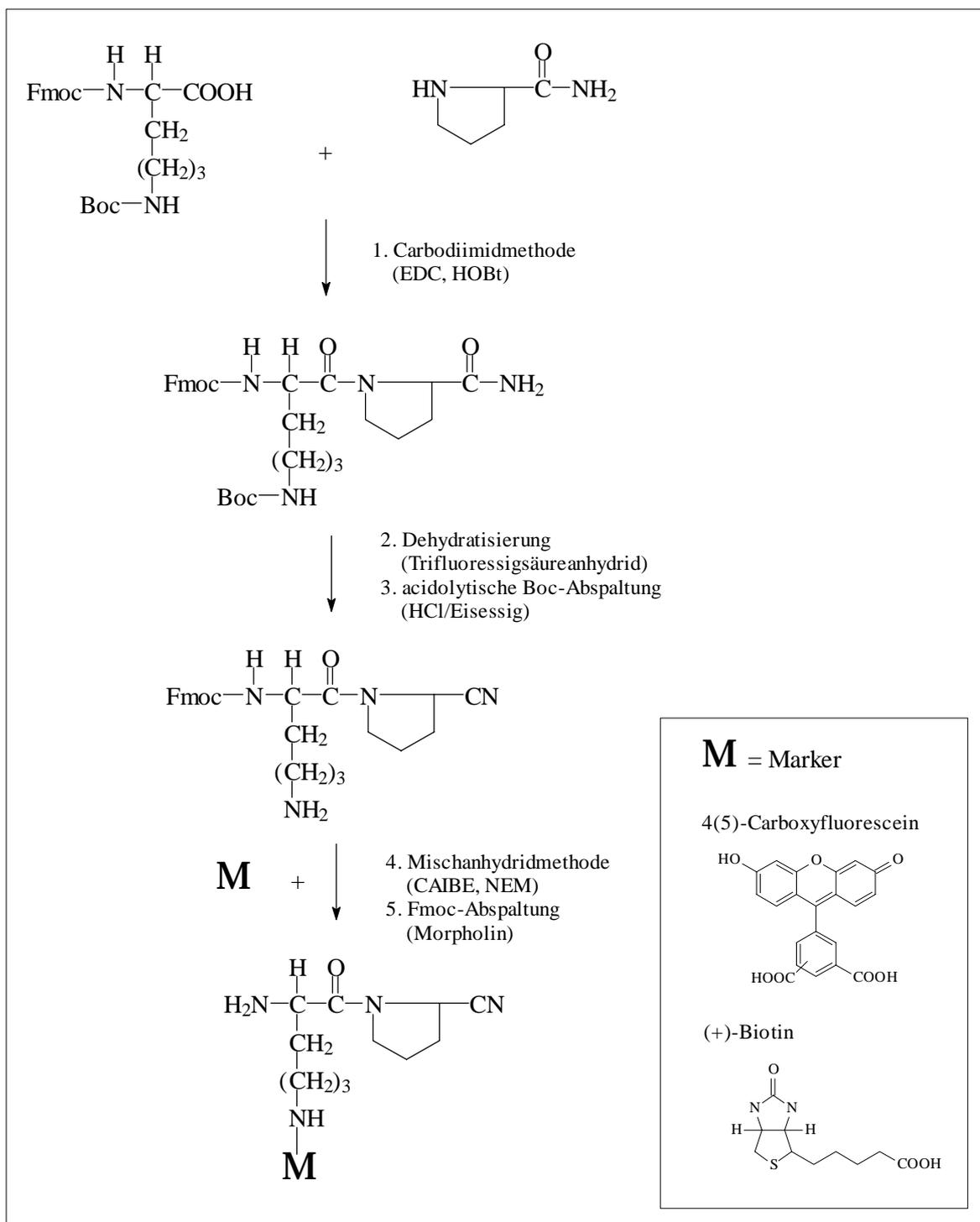


Abb. 5 Syntheschema der N ϵ -Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidide

3 Theoretischer Teil und Ergebnisse

3.1 Dipeptidyl Peptidase IV

3.1.1 Charakterisierung

Die DP IV wurde erstmalig von HOPSU-HAVU und GLENNER [1966] in Rattenleber gefunden. Weitere Arbeiten beschrieben deren Lokalisation in Pilzen (*Saccharomyces cerevisiae* [BORDALLO et al., 1984]; *Aspergillus fumigatus* [BEAUVAIS et al., 1997]), in Bakterien (*Flavobacterium meningosepticum* [YOSHIMOTO und TSURU, 1982]; Milchsäurebakterien [CASEY und MEYER, 1985; TSAKALIDOU et al., 1998]), im Gift der Honigbiene [KREIL et al., 1980] und in Pflanzen [STANO et al., 1994; STANO et al., 1997]. Im Säugerorganismus ist die DP IV weit verbreitet [VANHOOF et al., 1992], kommt jedoch in besonders hohen Konzentrationen in Niere [KENNY et al., 1976], Plazenta [PÜSCHEL et al., 1982], Leber [IKEHARA et al., 1994] und Dünndarm [DARMOUL et al., 1994] vor. Die Lokalisation der DP IV auf T-Lymphozyten wurde zuerst von LOJDA [1977] beschrieben.

Nach Klonierung und Sequenzierung der für die DP IV kodierenden DNA-Bereiche von Ratte [OGATA et al., 1989], Maus [MARGUET et al., 1992], Mensch [DARMOUL et al., 1992; MISUMI et al., 1992; TANAKA et al., 1992], *Flavobacterium meningosepticum* [KABASHIMA et al., 1995], *Xanthomonas maltophila* [KABASHIMA et al., 1996] und *Xenopus laevis* [VLASAK et al., 1997] konnten zwischen pro- und eukaryotischer DNA Sequenzhomologien von ca. 30% nachgewiesen werden [KABASHIMA et al., 1996; KIYAMA et al., 1998]. DNA-Vergleiche innerhalb der Eukaryoten zeigen weitaus größere Homologien (ca. 85% Ratte und Mensch [MISUMI et al., 1992], ca. 89% Maus und Mensch [DARMOUL et al., 1992]).

Innerhalb stark konservierter Regionen im C-terminalen Bereich wurde durch gezielte Punktmutationen die katalytische Triade (Ser, Asp, His) identifiziert [OGATA et al., 1992; DAVID et al., 1993]. Um den katalytisch aktiven Serylrest konnte die typische Konsensus-Sequenz Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly von Serinproteasen, Esterasen und Lipasen nachgewiesen werden [BRENNER, 1988; POLGAR, 1992]. Die Anordnung der die katalytische Triade bildenden Aminosäurereste sowie der Katalysemechanismus [BRANDT et al., 1996] unterscheiden die DP IV von den klassischen Serinproteasenfamilien der Subtilisine (S8; Asp, His, Ser) und Chymotrypsine (S1; His, Asp, Ser), [RAWLINGS und BARRETT, 1993]. Die Zuordnung der DP IV zu einer neuen Familie der Serinproteasen, der Prolyloligopeptidase-Familie, erscheint daher relevant [RAWLINGS et al., 1992; POLGAR und SZABO, 1992].

Das Molekulargewicht der DP IV wurde in Abhängigkeit der Spezies, des Gewebes und des zellulären Differenzierungsstatus mit 110 bis 150 kDa [WOLF et al., 1978; IKEHARA et al., 1994; KÄHNE et al., 1996] beschrieben. Diese Heterogenität ist möglicherweise auf unterschiedliche Glykosylierungsgrade zurückzuführen.

Das native Enzym besteht aus zwei katalytisch voneinander unabhängigen identischen Untereinheiten, die durch nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind [WOLF et al., 1978]. Funktionell untergliedert sich die extrazelluläre Aminosäuresequenz jeder

Untereinheit (739 AS, Ratte, [OGATA et al., 1989]) in drei Domänen [MARGUET et al., 1992; FLEISCHER, 1994]: eine C-terminale Domäne, die das aktive Zentrum einschließt, eine Cysteinreiche Region und eine Glykosylierungsdomäne, die fünf von acht Glykosylierungsorten (Ratte) aufweist [OGATA et al., 1989].

Die N-terminale hochkonservierte Aminosäureregion, bestehend aus sechs zytosolischen Aminosäureresten und einer Sequenz von 22 Aminosäuren als transmembrane Domäne, ist essentiell für die Verankerung der DP IV in Membranen [OGATA et al., 1989; HONG und DOYLE, 1990].

Der Gesamtkohlenhydratanteil beträgt 10% bis 27% [ERICKSON und KIM, 1983; BARTLES et al., 1985], wobei die Verknüpfung der Zucker mit der Proteinstruktur N-glykosidisch erfolgt [BARTLES et al., 1985; YAMASHITA et al., 1988]. Durch gezielte Punktmutationen potentieller Glykosylierungsorte konnte die Relevanz domänspezifischer Glykosylierungen für die biologische Stabilität und Proteinfaltung aber auch für die enzymatische Aktivität und die Zielsteuerung der DP IV innerhalb der Zelle nachgewiesen werden [FAN et al., 1997].

Neben der DP IV wurden weitere Enzyme mit DP IV-Aktivität isoliert und charakterisiert. Dazu gehört eine lösliche DP IV, die sich hinsichtlich ihre Substrathydrolyse nicht von dem membrangebundenen Enzym unterscheidet, jedoch ein wesentlich höheres Molekulargewicht aufweist (175 kDa) und keinen ADA-Rezeptor darstellt (vgl. **3.1.4**, [DUKE-COHAN et al., 1995]). Das entsprechende membranständige Pendant zu dieser löslichen Form wurde von DUKE-COHAN et al. [1996] als DPPT-L auf aktivierten T-Zellen beschrieben. JACOTOT et al. [1996a] und BLANCO et al. [1998] charakterisierten eine Dipeptidyl-Peptidase-IV- β mit DP IV-Aktivität, die jedoch ein wesentlich geringeres Molekulargewicht aufweist (82 kDa) und kein ADA-Rezeptor ist. I100, ein aus dem Ileum der Ratte isoliertes Protein mit Gly-Prohydrolysierender Aktivität, 20.5%iger Sequenzhomologie zur Rattenleber-DP IV und Genlokalisierung auf Chromosom 11, wurde von SHNEIDER et al. [1997] beschrieben. Das Glykoprotein 100 (gp100) aus den Gallengängen der Ratte ist mit DP IV identisch [HONG und DOYLE, 1988]. Die in der Literatur erwähnten T-Zelloberflächenproteine 1F7, Tp103, Ta₁ [MORIMOTO et al., 1989; HEGEN et al., 1990] und CD26 sind identisch mit DP IV [VON BONIN et al., 1998]. Das Thymozytenaktivierungsmolekül der Maus (THAM) wurde als mit CD26 identisch beschrieben [VIVIER et al., 1991; BRISTOL et al., 1992].

CHICH et al. [1995] gelang die Kristallisation von PepX aus *Lactococcus lactis*. Erste Ergebnisse zeigen, daß das Enzym auch in kristalliner Form enzymatisch aktiv ist. Die Vergleichbarkeit der Konformation der aktiven Zentren von DP IV und PepX ist allerdings in Frage zu stellen, da sich PepX in seiner Konsensussequenz um den katalytisch aktiven Serylrest (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Xaa-Gly) von DP IV (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) unterscheidet.

3.1.2 Substratspezifität

Die DP IV spaltet Xaa-Pro-Dipeptide vom N-Terminus von Oligo- und Polypeptiden. In der P₁-Position¹ akzeptiert die DP IV neben Pro auch Ala, Pip, Hyp ($k_{\text{cat}}/K_m = 10^3$ bis $10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) und Dhp [HEINS et al., 1988] sowie in ihrer Ringgröße variierende prolinanaloge Reste ($k_{\text{cat}}/K_m = 10^5$ bis $10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, [RAHFELD et al., 1991a]). Nach BONGERS et al. [1992] toleriert DP IV aus humaner Plazenta zusätzlich Ser, Val, Gly ($k_{\text{cat}}/K_m = 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), Leu ($k_{\text{cat}}/K_m = 40 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) und Abu in P₁-Position, wobei der beste k_{cat}/K_m -Wert für P₁ = Abu ($10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) beschrieben wurde. Darüber hinaus hydrolysiert DP IV aus Schweineniere auch synthetische Derivate des Growth-Hormone-Releasing-Factor (Somatoliberin) aus Rind mit Thr in P₁-Stellung [MARTIN et al., 1993]. Nach SCHUTKOWSKI [1993] werden ebenfalls Dipeptid-p-Nitroanilide mit Gly und Ala sowie deren N-alkylierte Derivate in P₁-Position gespalten. Wenn Prolin in P₁-Position steht, ist die L-Konfiguration des Aminosäurerestes in P₁- und P₂-Position von essentieller Bedeutung für die enzymatische Hydrolyse [HEINS et al., 1984, 1988]. Substrate mit Alanin in P₁-Position werden dagegen auch dann noch akzeptiert, wenn die Aminosäure in P₂-Stellung in D-Konfiguration vorliegt [HEINS et al., 1988].

In P₁-Position werden alle Aminosäurereste, mit Ausnahme des Prolylrestes, toleriert [KENNY et al., 1976], was nach BRANDT et al. [1995] auf den Verlust einer H-Brücke vom Stickstoff der Aminosäure in P₁-Position zum Carbonylsauerstoff der P₂-Aminosäure zurückzuführen ist. In P₂-Position akzeptiert DP IV alle proteinogenen Aminosäuren mit einer deutlichen Bevorzugung von Aminoacylresten mit einer hydrophoben oder verzweigten Seitenkette [HEINS et al., 1988]. Substrate, mit in P₂-Position phosphorylierten Aminosäureresten [KASPARI et al., 1996] oder Peptide, die eine Thioxoaminoacylprolyl-Bindung enthalten [SCHUTKOWSKI et al., 1994], werden im Vergleich zu den entsprechenden nichtphosphorylierten bzw. eine Amid-Bindung enthaltenden Peptiden um bis zu drei Größenordnungen schlechter durch DP IV hydrolysiert.

Neben einem protonierten N-Terminus [HEINS et al., 1988], der nach BRANDT et al. [1995] möglicherweise für die Ausbildung einer Salzbrücke zu einem Asparaginylnrest des aktiven Zentrums entscheidend ist, ist die *trans*-Konformation der Xaa-Pro-Peptidbindung von essentieller Bedeutung für die Substrathydrolyse [FISCHER et al., 1983a]. Darüber hinaus bewirkt eine Vergrößerung des Abstandes der N-terminalen Aminogruppe von der Carbonylgruppe in P₂-Stellung eine deutliche Verschlechterung der enzymatischen Hydrolyse [HEINS et al., 1988]. Als bisher größtes natives DP IV-Substrat wurde das Chemokin Rantes (68 Aminosäurereste) beschrieben [ORAVECZ et al., 1997; PROOST et al., 1998a].

3.1.3 Inhibitoren

Die Entwicklung spezifischer DP IV-Inhibitoren führte zu zahlreichen Verbindungstypen, die sich in ihrem Inhibierungsmechanismus deutlich unterscheiden.

¹Zur Beschreibung der Substratspezifität wird die Nomenklatur von SCHECHTER und BERGER [1967] verwendet. Hiernach werden Aminosäurereste N-terminal vor der zu hydrolysierenden Peptidbindung mit P_x (x = Anzahl der Aminosäuren in Entfernung von der zu spaltenden Bindung) und nach der zu spaltenden Bindung (in Richtung C-Terminus) mit P_x bezeichnet.

Diisopropylfluorophosphat (DFP) als irreversibler jedoch nicht-selektiver Serinproteaseinhibitor zeigt im Konzentrationsbereich von 10^{-5} M noch gute Hemmeigenschaften bezüglich der Substrathydrolyse durch DP IV [BARTH et al., 1974; KENNY et al., 1976]. Diethyl-p-nitrophenylphosphat hemmt die DP IV jedoch um den Faktor 100 schlechter während Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) kein Inhibitor der DP IV ist [KENNY et al., 1976].

Die Hemmung der DP IV durch ihre Hydrolyseprodukte (Xaa-Pro- und Xaa-Ala-Dipeptide) erfolgt kompetitiv mit K_i -Werten zwischen 10^{-5} M und 10^{-3} M [YARON und NAIDER, 1993; BORN et al., 1994]. Ebenfalls kompetitiv wird DP IV durch Oligopeptide (Tetraprolin, $K_i = 6 \cdot 10^{-4}$ M, [HARADA et al., 1982; HOFFMANN et al., 1995]) gehemmt. 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 (IPI: $k_{cat}/K_m = 3.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, VPL: $k_{cat}/K_m = 1.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Sehr effektive kompetitive Inhibitoren mit K_i -Werten im mikromolaren Bereich sind die von RAHFELD [1989] und BORN et al. [1994] beschriebenen produktanalogen Aminosäurepyrrolidide. Eine Weiterentwicklung dieser Verbindungen stellen die von BORN et al. [1994], LI et al. [1995] und ASHWORTH et al. [1996a, 1996b] beschriebenen Aminosäurethiazolidide, Aminosäure-2-cyano-pyrrolidide und Aminosäure-4-cyanothiazolidide dar, deren Hemmkonstanten um bis zu vier Größenordnungen besser sind. Mit Ausnahme des letztgenannten werden alle Verbindungstypen in biologischen Systemen eingesetzt [SCHÖN et al., 1991; JIANG et al. 1997; REINHOLD et al., 1994, 1998b].

Die für eine Reihe anderer Serin- und Cysteinproteasen (Subtilisin [Demuth et al., 1989a; STEINMETZ et al., 1994], Elastase [FISCHER et al., 1983b]) als gute Suizid-Inhibitoren bekannten N-Peptidyl-O-acylhydroxylamine wurden nach struktureller Anpassung an die Substratanforderungen der DP IV hinsichtlich ihrer Hemmeigenschaften untersucht. Als problematisch erwies sich die geringe Stabilität der Verbindungen und deren fast vollständige enzymatische Hydrolyse [DEMUTH et al., 1989b, 1993]. Die Inaktivierung der DP IV-Aktivität ist moderat ($k_{inact}/K_i = 10^1$ bis $10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, [DEMUTH et al., 1989c]).

Substratanaloge Chlormethylketone [DEMUTH, 1989] als irreversible und Peptidylammoniummethylketone [STEINMETZER et al., 1993] als Slow-Binding-Inhibitoren, weisen K_i -Werte im mikromolaren Bereich auf, sind jedoch sehr instabil.

Peptidylboronsäuren [COUTTS et al., 1996; PARGELLIS et al., 1997] hemmen als übergangszustandsanaloge Verbindungen entsprechend eines Slow-Tight-Binding-Mechanismus [GUTHEIL und BACHOVCHIN, 1993] mit K_i -Werten im pikomolaren Bereich und sind die bisher potentesten Inhibitoren der DP IV [PARGELLIS et al., 1997]. Die unter physiologischen Bedingungen beobachtete Zyklisierung [SNOW et al., 1994; SUDMEIER et al., 1994; PARGELLIS et al., 1997] führt jedoch zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Trotzdem finden die Verbindungen in biologischen Systemen Anwendung [BRISTOL et al., 1995; JEANFAVRE et al., 1996].

Aminoacylphosphonoprolindiphenylester als irreversible Inhibitoren der DP IV zeichnen sich durch eine hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen aus [BODUSZEK et al., 1994]. Da die Geschwindigkeit der Inaktivierung des Enzyms sehr gering ist, die Hemmung jedoch als

stabil beschrieben wurde [LAMBEIR et al., 1996], finden diese Inhibitoren in biologischen Systemen Anwendung [DE MEESTER et al., 1997].

Thioxoaminosäure-pyrrolidide und -thiazolidide wurden von STÖCKEL [1997] als kompetitive DP IV-Inhibitoren mit K_i -Werten im mikromolaren Bereich beschrieben. Mit Ausnahme des Val-thiazolidids sind alle Verbindungen mit einer Thioxoamidbindung schlechtere Inhibitoren als das entsprechende Derivat mit einer Amidbindung.

Als natürlicher Inhibitor der DP IV wurde das HIV1-Tat-Protein (Transaktivator-Protein, 86 AS-Reste, [GUTHEIL et al., 1994]) beschrieben. Die von *Aspergillus oryzae* A 374 produzierten peptidischen Verbindungen TMC-2A, -2B und -2C (bestehend aus L-Tryptophan, Mono- oder Dihydroxy-L-Leucin und substituiertem Isochinolin) hemmen die DP IV-Aktivität unkompetitiv [ASAI et al., 1997; NONAKA et al., 1997].

Ein von NGUYEN et al. [1998] vorgestellter zyklischer Suizid-Inhibitor ist durch eine gute Inhibierungskonstante (10^{-8} M) und eine hohe Stabilität charakterisiert.

3.1.4 Biologische Bedeutung

Die DP IV ist an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt, woraus sich die enorme Bedeutung des Enzyms ableiten läßt. Die Multifunktionalität der DP IV im Säugerorganismus ist dabei nicht nur ein Resultat der enzymatischen Aktivität.

Innerhalb der Sequenzen zahlreicher Peptidhormone, Neuropeptide und Zytokine treten prolinreiche Regionen auf [MENTLEIN, 1988; VANHOOF et al., 1995], die einerseits vor dem unspezifischen Abbau durch proteolytische Enzyme schützen und andererseits prolinspezifischen Proteasen als Substrate dienen.

Eine Funktion der DP IV besteht in der **Prozessierung prolinhaltiger biologisch aktiver Peptide** und der damit verbundenen Regulation ihrer physiologischen Wirkung. *In vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zeigten, daß DP IV das N-terminale Tyr-Pro-Dipeptid des Neuropeptids Y [MENTLEIN et al., 1993a] und des gastrointestinalen Peptids YY [MEDEIROS und TURNER, 1994] abzuspalten vermag, wodurch deren spezifische Rezeptorbindung verloren geht. Gleichermaßen hydrolysiert die DP IV das Neuropeptid Substanz P unter schrittweiser Freisetzung des N-terminalen Arg-Pro und Lys-Pro, wodurch die Verbindung der vollständigen Hydrolyse durch APN zugänglich gemacht wird [AHMAD et al., 1992; RUSSEL et al., 1996]. BERGER et al. [1987] und HOFFMANN et al. [1993] konnten zeigen, daß N-terminale Teilsequenzen verschiedener Zytokine von DP IV hydrolysiert werden, während intakte native Zytokine keine Substrate darstellen. Inwieweit hier die Kettenlänge der Peptide (Hydrolyse bis zu maximal 24 AS-Resten nachgewiesen) eine Rolle spielt, ist fraglich, da ORAVECZ et al. [1997] und PROOST et al. [1998a] die Hydrolyse des nativen Chemokins Rantes (68 AS-Reste) durch DP IV nachweisen konnten. Die Beteiligung der DP IV an der 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)) wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Daneben konnte die Inaktivierung des β -Casomorphin-5 [HARDRODT 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 und CHANG, 1995] nachgewiesen werden.

In vivo wird von einer konzertierten Substrathydrolyse prolinhaltiger Sequenzen, an denen neben DP IV auch andere Proteasen wie APN oder APP beteiligt sind, ausgegangen [AHMAD et al., 1992; BOURAS et al., 1995; GILMARTIN, 1995].

Die Freisetzung des Giftes der Honigbiene, Mellitin, erfolgt nach DP IV-katalysierter Hydrolyse von elf Xaa-Pro- bzw. Xaa-Ala-Dipeptiden aus dessen Vorstufe Promellitin [KREIL et al., 1980]. MENTLEIN und HEYMANN [1982] konnten die Hemmung der Fibrinpolymerisierung und damit der Blutgerinnung durch die DP IV-katalysierte Hydrolyse eines Gly-Pro-Dipeptides vom N-Terminus der α -Kette des monomeren Fibrins nachweisen.

Die Bedeutung der DP IV als Enzym der Bürstensaummembran von Niere und Dünndarm ist in der **Involvierung des Enzyms in Abbauprozesse von im Stoffwechsel anfallenden prolinhaltigen Polypeptiden** zu sehen [TIRUPPATHI et al., 1990]. Die Resorption der Spaltprodukte erfolgt durch Transportmechanismen des protonenabhängigen Peptidtransporters PEPT 2 [BRANDSCH et al., 1995].

Als von der enzymatischen Aktivität unabhängig, wurde die Rolle der **DP IV/CD26 als Assoziationsmolekül bzw. Vermittler von Zell-Matrix-Adhäsionsprozessen** beschrieben.

Der Nachweis, daß lymphozytäre DP IV/CD26 auf der Zelloberfläche mit Adenosindesaminase (ADA) assoziiert und damit identisch mit dem bis dahin beschriebenen ADA-Bindeprotein ist, gelang KAMEOKA et al. [1993] und DE MEESTER et al. [1994]. Die enzymatische Aktivität von DP IV/CD26 und ADA bleibt von deren spezifischer Bindung, die nach DONG et al. [1997] in der Position 340-343 der Aminosäuresequenz der DP IV zu vermuten ist, unbeeinflusst [DE MEESTER et al., 1994; BLANCO et al., 1996]. Trotz des von IWAKI-EGAWA et al. [1997] beschriebenen Befundes, daß DP IV/CD26 aus Ratte kein ADA bindet, wird eine immunregulatorische Bedeutung der DP IV/CD26-ADA-Assoziation im humanen Organismus angenommen. Nach DONG et al. [1996, 1997] ist hierbei jedoch weniger eine direkte Involvierung in T-Zell-Aktivierungs- und Proliferationsprozesse zu vermuten. Die Aufhebung der auf die T-Zell-Aktivierung hemmenden Wirkung des Adenosins durch dessen ADA-vermittelte Desaminierung [FRANCO et al., 1998] scheint von weitaus größerer Bedeutung zu sein [DONG et al., 1996, 1997]. ADA-Mangelkrankungen, die mit schweren, durch Störungen im Purinstoffwechsel hervorgerufenen, immunologischen Abnormitäten einhergehen, machen die Bedeutung der ADA für den humanen Organismus deutlich.

Die Wechselwirkung von DP IV aus Rattenleber und Maus-Fibroblasten mit Kollagen [BAUVOIS, 1988; HANSKI et al., 1988] und Fibronectin [PIAZZA et al., 1989] als wichtige Voraussetzung für die Generierung von Zell-Matrix-Adhäsionsprozessen, ist von der enzymatischen Aktivität der DP IV unabhängig [HANSKI et al., 1988]. Der Kollagenbindungsort liegt innerhalb der Cystein-reichen Region der DP IV-Aminosäuresequenz [LÖSTER et al., 1995]. MATTERN et al. [1998] konnten zeigen,

daß lymphozytäre DP IV/CD26 nicht in Adhäsionsprozesse von Lymphozyten an Endothelzellen oder Fibroblasten involviert ist.

Obwohl die **Rolle der DP IV im Immunsystem** bis heute nicht vollständig geklärt ist, sprechen mehrere Untersuchungsergebnisse für eine große Bedeutung des Enzyms [MARGUET et al., 1993].

DP IV/CD26 wurde als Oberflächenprotein einer Subpopulation von T-Lymphozyten beschrieben, die CD4-positiv sind [MENTLEIN et al., 1984], den Rezeptor für das Fc-Fragment von IgM (Fc μ R) tragen [FELLER und PARWARESCH, 1981] und IFN- γ sowie IL-2 aber nur wenig IL-4 bzw. IL-5 produzieren und damit funktionell zu TH₁-Zellen gehören [WILLHEIM et al., 1997]. Daneben wurde DP IV/CD26 auch auf einer Subpopulation CD8-positiver Zellen beschrieben [MUNOZ et al., 1992]. Nach mitogener Stimulation beobachteten SCHÖN und ANSORGE [1990] eine um das Vielfache erhöhte Expression der lymphozytären DP IV/CD26, was auf die Bedeutung des Enzyms als T-Zell-Aktivierungsmarker hinweist. Darüber hinaus konnten BÜHLING et al. [1994, 1995] und YAMABE et al. [1997] die Expression von DP IV/CD26 auf aktivierten B-Lymphozyten und NK-Zellen nachweisen.

Neben der Funktion als Aktivierungsmarker wurde die kostimulatorische Aktivität von DP IV/CD26 in T-Zell-Aktivierungs- und Proliferationsprozessen diskutiert. So konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, daß DP IV-spezifische Inhibitoren (Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide [SCHÖN et al., 1991; REINHOLD et al., 1993, 1997a], N,O-Diacylhydroxylamine [SCHÖN et al., 1985], Peptidylboronsäuren [KUBOTA et al., 1992]) starke immunsuppressive Wirkungen hervorrufen, die einerseits auf eine Hemmung der DNA-Synthese sowie der Produktion verschiedener Zytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 und IFN- γ) aber auch auf eine verringerte Antikörperproduktion aufgrund gehemmter B-Zell-Differenzierung zurückzuführen sind. Andererseits konnten REINHOLD et al. [1997] eine verstärkte Sekretion des immunsuppressiven TGF- β nachweisen.

Neben DP IV-spezifischen Inhibitoren können monoklonale anti-DP IV/CD26-Antikörper sowohl stimulatorisch als auch inhibitorisch auf die T-Zell-Aktivierung wirken. So zeigt die Bindung des monoklonalen Antikörpers 1F7 an DP IV/CD26 in Gegenwart submitogener anti-CD3-Mengen eine kostimulierende Wirkung auf Aktivierungs- und Proliferationsprozesse CD4-positiver Lymphozyten, die mit einer verstärkten IL-2-Produktion sowie mit einer erhöhten intrazellulären Kalziummobilisierung einhergehen [DANG et al., 1990a, 1990b]. Andererseits ist 1F7 in der Lage, die Antigen-induzierte T-Zell-Proliferation und die PWM-stimulierte IgG-Synthese von B-Lymphozyten zu hemmen [Morimoto et al., 1989]. Obwohl anti-CD26-Antikörper unterschiedliche, z.T. überlappende, Epitope von DP IV/CD26 erkennen, bleibt die enzymatische Aktivität von der Antikörperbindung unbeeinflusst [DE MEESTER et al., 1992, 1993]. HOFFMANN et al. [1995] beschrieben jedoch zwei anti-CD26-Antikörper, die ebenfalls die DP IV-Aktivität inhibieren (**3.4.1**).

Die durch DP IV/CD26 vermittelte Kostimulation der T-Zell-Aktivierung ist Gegenstand der von mehreren Autoren diskutierten T-Zell-Aktivierungsprozesse, die in Zusammenhang mit dem TCR(T-Zell-Rezeptor)/CD3-Komplex stehen [DANG et al., 1990a, 1990b, 1991]. Wie die

Signaltransduktion von DP IV/CD26 zu TCR/CD3 erfolgt, ist bislang unklar. Da DP IV nur über eine sehr kurze zytoplasmatische Aminosäuresequenz (3.1.1) verfügt, ist die Involvierung anderer membranständiger oder zytoplasmatischer Proteine in CD26-vermittelte Signaltransduktionsprozesse wahrscheinlich.

In Zusammenhang damit steht die von TORIMOTO et al. [1991] beschriebene Koassoziation von DP IV/CD26 mit CD45, 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 konnten MUNOZ et al. [1992] und HEGEN et al. [1997] die anti-CD26-induzierte Phosphorylierung einer Vielzahl zellulärer Proteine, nach Kreuzvernetzung von DP IV/CD26 mit CD3, nachweisen. GAETANIELLO et al. [1998] beschrieben anti-CD26-induzierte Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen von Proteinen einer Leberkarzinom-Zelllinie in Abwesenheit eines TCR/CD3-Komplexes.

Eine wichtige Rolle scheint die ζ -Kette des TCR/CD3-Komplexes zu spielen. So konnten MITTRÜCKER et al. [1995] und VON BONIN et al. [1997] zeigen, daß entsprechende zelluläre Mutanten in Ermangelung der ζ -Kette nicht in der Lage sind, anti-CD26-induzierte Signaltransduktionsprozesse zu durchlaufen.

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 gezielte Punktmutationen des Serylrestes im aktiven Zentrum sowie die durch vollständige Inhibierung der DP IV-Aktivität mittels 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, 1994]. HEGEN et al. [1993] hingegen diskutierten eine von der DP IV-Aktivität unabhängige Übertragung von Signalen nach CB.1(= anti-CD26)-vermittelter T-Zell-Aktivierung.

Für einen **Zusammenhang zwischen DP IV und der HIV-Infektion** gibt es mehrere Befunde. CALLEBAUT et al. [1993] postulierten eine Beteiligung von DP IV/CD26 als Kofaktor von CD4 am Eintritt des HIV-Virus in CD4-positive Zellen, was jedoch von mehreren Autoren nicht nachvollzogen werden konnte [BRODER et al., 1994; LAZARO et al., 1994; MORIMOTO et al., 1994]. GUTHEIL et al. [1994] konnten zeigen, daß das HIV1-Tat(Transaktivator)-Protein mit hoher Affinität an DP IV bindet, wobei die Bindungsstelle in der Region des Ta₁-Epitopes der DP IV-Aminosäuresequenz liegt. Darüber hinaus ist Tat ein Inhibitor der DP IV ($K_i = 20$ bis 1300 pM, [GUTHEIL et al., 1994]). Die mögliche Relevanz der N-terminalen Xaa-Xaa-Pro-Sequenz für die Enzyminhibierung wurde von WRENGER et al. [1996, 1997] beschrieben. Dieser Befund und die immunsuppressive Wirkung des Tat-Proteins [VISCIDI et al., 1989], die mit der durch synthetische DP IV-Inhibitoren vermittelten Wirkung vergleichbar ist [SUBRAMANYAM et al., 1993; REINHOLD et al., 1996], weisen auf einen Zusammenhang zwischen DP IV-Tat-Interaktion und der Hemmung von T-Zell-Aktivierungsprozessen hin.

Eine Involvierung von DP IV/CD26 in HIV-vermittelte Apoptose-Prozesse wird diskutiert [MORIMOTO et al., 1994; JACOTOT et al., 1996b].

Die Chemokine Rantes und SDF1- α wurden als Inhibitoren der HIV-Infektion beschrieben [ORAVECZ et al., 1997; PROOST et al., 1998b; OHTSUKI et al., 1998]. Die regulatorische Bedeutung der DP IV beruht auf der enzymkatalysierten Hydrolyse des N-terminalen Dipeptides dieser Chemokine.

Mehrere Autoren diskutieren die **Bedeutung von DP IV/CD26 in Zusammenhang mit der Ausbildung verschiedener Krankheiten.**

Mit zahlreichen Tumorerkrankungen geht eine veränderte DP IV/CD26-Expression einher. So konnten KOJIMA et al. [1979b, 1987] zeigen, daß sowohl die Serum-DP IV-Aktivität von Leberkarzinom-Patienten als auch die Enzymaktivität im Karzinomgewebe selbst stark erhöht ist. STECCA et al. [1997] gelang eine Differenzierung von Phänotypen verschiedener Leberkarzinome, die sich in ihrer DP IV-Aktivität und -Lokalisation z.T. deutlich unterscheiden. Im Falle des Schilddrüsenkarzinoms wurde eine geringere Enzymaktivität im Serum [MOGI et al., 1986] aber eine in jedem Fall hohe CD26-mRNA-Expression sowie eine ebenso stark erhöhte DP IV-Aktivität im Karzinomgewebe gefunden. Nach TANAKA et al. [1995] kommt DP IV eine Bedeutung als Tumormarker zu.

JOHNSON et al. [1993] konnten erstmalig *in vitro* zeigen, daß DP IV/CD26 eine wichtige Rolle innerhalb metastatischer Prozesse spielt. Die durch DP IV/CD26 vermittelte Zell-Zell-Adhäsion geht möglicherweise auf die erhöhte Fibronectin-Bindung metastatischer Zellen im Vergleich zu nichtmetastatischen Zellen zurück [JOHNSON et al., 1993]. Ähnliche Ergebnisse erzielten CHENG et al. [1998], die zeigen konnten, daß DP IV des Lungenendothels als Rezeptor für Brustkrebszellen in Ratten dient.

FAP- α (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein- α), das in besonders hohen Konzentrationen auf Fibroblasten epithelialer Karzinome vorkommt, ist häufig mit CD26 assoziiert und besitzt eine ca. 60%ige Sequenzhomologie zu humaner DP IV [SCANLAN et al., 1994; CHEN, 1996]. Darüber hinaus konnten NIEDERMEYER et al. [1998] zeigen, daß FAP in Analogie zu DP IV das typische DP IV-Substrat Ala-Pro-7-amido-4-trifluormethyl-cumarin unter Freisetzung des Chromophors hydrolysiert. Daneben verfügt FAP über eine mit DP IV übereinstimmende katalytische Triade (His, Asp und Ser).

Aufgrund der zumeist veränderten DP IV-Aktivität in Serum, Plasma und Milz [HAGIHARA et al., 1987] wird ein Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und CD26-Expression diskutiert. So konnten TANAKA et al. [1997, 1998] nachweisen, daß DP IV-spezifische Inhibitoren suppressive Wirkungen auf induzierte rheumatoide Arthritis zeigen. REINHOLD et al. [1998a] beschrieben eine Bedeutung der DP IV bei Multipler Sklerose.

MAES et al. [1997] wiesen eine deutliche Verringerung der Serum-DP IV-Aktivität bei Patienten mit schwerer Depression nach.

KOROM et al. [1997] stellten erstmals in einem *in vivo*-Experiment einen Zusammenhang zwischen CD26-Expression und der Entwicklung einer akuten Organabstoßung nach Transplantationen her.

Eine physiologische Rarität stellt ein DP IV-negativer Stamm einer japanischen **Fischer-Ratte** (CRJ) dar. Gly⁶³³ ist hier aufgrund einer „missense“-Mutation durch Arg ersetzt, woraus der

vollständige Abbau des mutierten Proteins im Endoplasmatischen Retikulum resultiert [TSUJI et al., 1992]. IWAKI-EGAWA [1995] zeigten, daß in diesen Individuen PHA-stimulierte T-Zell-Aktivierungs- und Proliferationsprozesse auch ohne die kostimulatorische Wirkung von DP IV/CD26 möglich sind. Ungewöhnliche Krankheiten dieser Tiere sind nicht bekannt. Lediglich die Häufung prolinhaltiger Peptide im Urin und die Unfähigkeit, prolinhaltige Peptide wie GIP oder GLP-1 [PEDERSON et al., 1996] zu hydrolysieren, unterscheiden Mutanten von gesunden Tieren.

Eine deutsche Fischer-Ratte, die eine 95-kDa enzymatisch inaktive DP IV exprimiert, wurde von COBURN et al. [1994] beschrieben. Auch diese Tiere generieren eine mit gesunden Tieren identische Mitogen-induzierte Immunantwort.

Eine Endopeptidase-Aktivität der DP IV hinsichtlich der Hydrolyse von denaturiertem Kollagen wurde von BERMPOHL et al. [1998] beschrieben.

Die Kristallisation und Strukturaufklärung von Prolyl oligopeptidase gelang kürzlich FÜLÖP et al. [1998].

3.2 Rhodamine und Rhodaminderivate

3.2.1 Fluoreszenz

Der Grundzustand S_0 von Rhodaminen trägt Singulett-Charakter. Durch optische Anregung kann ein Übergang in höhere Singulett-Niveaus (S_1 , S_2 , S_3 ,...) induziert werden (Absorption). Beim Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des angeregten Singulett-Zustandes S_1 in ein Niveau des Singulett-Grundzustandes S_0 wird Energie in Form der Fluoreszenz emittiert. Die neben der Fluoreszenzemission beschriebene innere Umwandlung bezeichnet einen Vorgang, bei dem die Anregungsenergie ohne eine Fluoreszenz zu induzieren, in Form thermischer Energie an die Umgebung abgegeben wird. Der Elektronenanregungszustand relaxiert dabei zunächst unter Energieübertragung der Elektronenenergie in Kernschwingungsenergie in den Elektronengrundzustand. Als „intersystem crossing“ oder Interkombinationsübergang bezeichnet man den durch Spinumkehr generierten quantenmechanisch verbotenen Übergang eines Singulett-Zustandes in einen langlebigeren Triplett-Zustand T geringerer Energie (Gesamtübersicht siehe Abb.6).

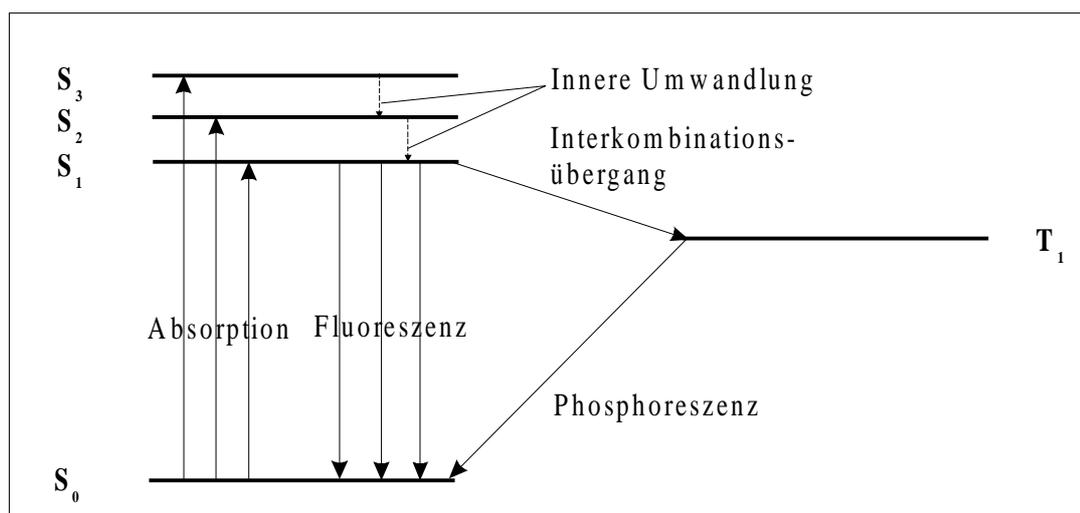


Abb. 6 Jablonski-Diagramm der an einem photochemischen Prozeß beteiligten Molekülenergieniveaus [nach MOORE, 1990]

Die Lebensdauer τ des S_1 Zustandes, als Maß für die Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verweilt bevor die Fluoreszenzemission erfolgt, wurde von THIEL [1997] für verschiedene Rhodamine in einem Bereich zwischen 4 ns und 8 ns bestimmt. Die Quantenausbeute Φ einiger Rhodamine, die sich aus der Anzahl emittierter und absorbierter Photonen berechnet, ist größer als 0.9 (Tab.6). Die Extinktionskoeffizienten liegen in einem Bereich um $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Tab. 6).

Eine hohe Quantenausbeute in Kombination mit einem hohen Extinktionskoeffizienten stellen die Hauptvoraussetzung für eine hohe Fluoreszenzintensität eines Fluorophors dar.

3.2.2 Charakterisierung

Die meisten Rhodaminverbindungen bestehen aus einem planaren und damit starren Xanthengrundgerüst, das in den Positionen C₃ und C₆ je eine Aminogruppe und in Position C₉ eine Substitution durch eine Benzoessäurestruktur aufweist (Abb. 7, [DREXHAGE, 1990]). Röntgenstrukturanalysen von an der Benzoessäurestruktur veresterten Rhodaminen zufolge konnte nachgewiesen werden, daß der Benzoessäurering nahezu rechtwinklig zum Xanthengerüst angeordnet ist [ABRAMS et al., 1986].

Alkylierungen am Xanthengerüst (R₄) bzw. an den beiden primären Aminogruppen (R₁, R₂, Abb.7) sind für die Vielfalt der strukturell verschiedenen Rhodaminverbindungen verantwortlich (Tab. 6). Darüber hinaus wurden Erweiterungen des Xanthenringsystems (Bsp.: Texas Rot, Sulforhodamin 101) aber auch die Einführung reaktiver Gruppen am Aromaten der Benzoessäurestruktur (Sulfonylchlorid-, Maleinimid-, Haloacetamid-Derivate) beschrieben [LEFEVRE et al., 1996]. Aufgrund der verschiedenen Substitutionen am Xanthengerüst absorbieren Rhodamine in einem Bereich von 485-700 nm (Tab. 6, [DREXHAGE, 1990]). Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer und der Quantenausbeute sowie Verschiebungen der Excitations- und Emissionswellenlänge wurden in Abhängigkeit des Lösungsmittels (Polarität und Viskosität) und der Temperatur beschrieben [TREDWELL, 1980; ARBELOA und ROHATGI-MUKHERJEE, 1986a, 1986b]. Einen Überblick über die in der Literatur am häufigsten erwähnten Rhodamin-Verbindungen liefert Tab. 6.

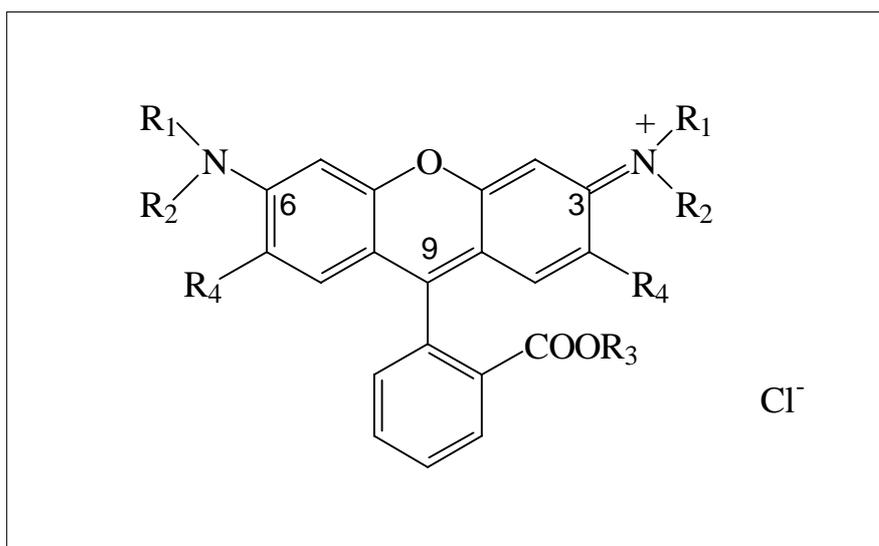
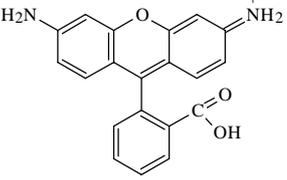
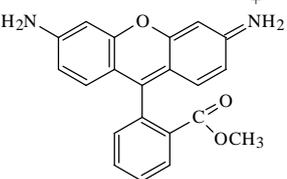
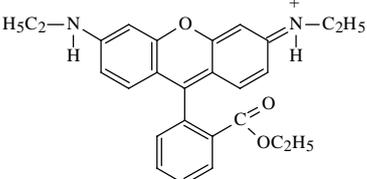
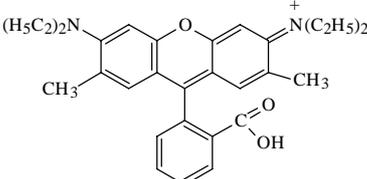
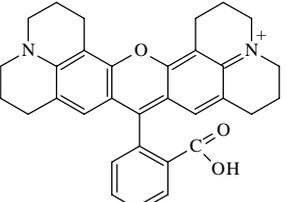
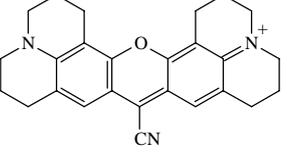


Abb. 7 Allgemeine Struktur der meisten Rhodamin-Verbindungen

Tab. 6 Darstellung der in der Literatur am häufigsten erwähnten Rhodaminverbindungen

Struktur	Bezeichnung	$\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$ [nm]	Φ	Derivate
	Rhodamin 110 (R110)	495/523 ¹ (Hepes, pH 7.5, 15% EtOH)	0.91 ¹	N,N- substituierte Verbindungen als Protease- substrate
	Rhodamin 123 (R123)	498/528 ² (Wasser) 503/527 ² (n-Oktanol)	0.87 ² 0.86 ²	
	Rhodamin 6G (R6G)	526/554 ³ (Wasser) 530/553 ⁸ (EtOH)	0.99 ⁸	
	Rhodamin B (RB)	557/580 ⁴ (Wasser, sauer) 553/575 ⁴ (EtOH, sauer)	0.24 ⁴ 0.51 ⁴ 0.67 ⁸	Oktadecyl- rhodamin B, Rhodamin 3B, Lissamin- Rhodamin B
	Rhodamin 101 (R101)	577 ⁵ (EtOH, sauer) 565 ⁵ (EtOH, basisch)	> 0.9 ⁷ 1.0 ⁸	Sulpho- rhodamin 101
	Rhodamin 800 (R800)	691/695 ⁶ (EtOH) 687/692 ⁶ (Wasser)		Rhodamin 700 (anstelle -CN hier -CF ₃)

¹ [LEYTUS et al., 1983a], ² [PAL et al., 1996], ³ [MIALOCQ et al., 1991], ⁴ [ARBELOA und ROHATGI-MUKHERJEE, 1986a, 1986b], ⁵ [THIEL, 1997], ⁶ [SAKANOUÉ et al., 1997], ⁷ [DREXHAGE, 1990], ⁸ [BEAUMONT et al., 1993]

Die Fluoreszenz der Rhodamine wird nach FÖRSTER [1982] und DREXHAGE [1990] wesentlich durch das Auftreten eines konjugierten π -Elektronensystems sowie die planare Xanthenstruktur als Resultat der Einführung einer O-Brücke verursacht.

Die Bindungs- und Ladungsdelokalisierung der Rhodamine beschränkt sich nach DREXHAGE [1990] hauptsächlich auf zwei spiegelbildsymmetrische Resonanzstrukturen 1 und 3 (Abb. 8). ARBELOA et al. [1991] diskutieren für Rhodamine mit einer nicht veresterten Benzoesäurestruktur zusätzlich eine durch intramolekulare elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Xanthengerüst und Carboxylfunktion der Benzoylstruktur hervorgerufene Stabilisierung der Mesomeriestruktur 2 (Abb. 8).

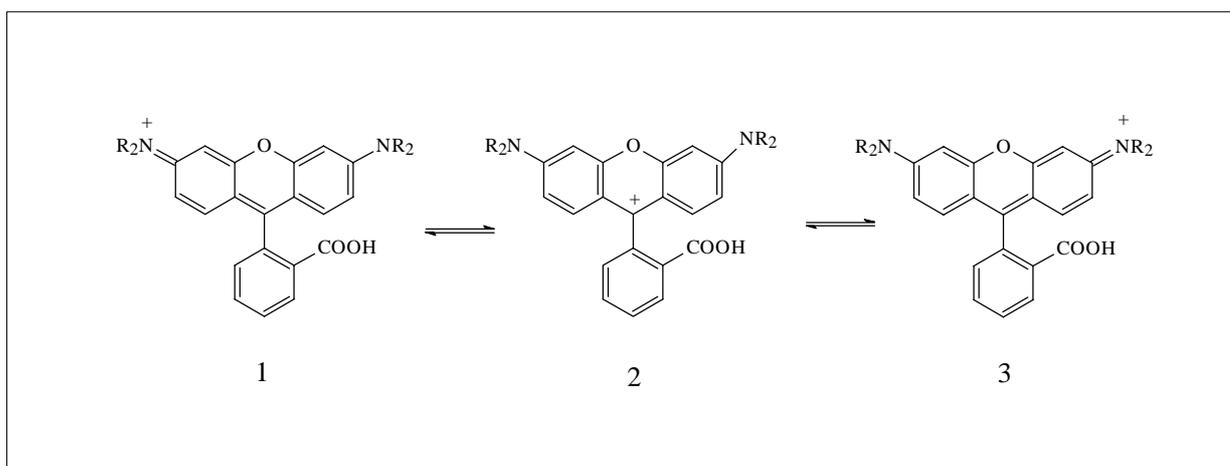


Abb. 8

Resonanzstrukturen des Rhodamin 110

In polar protischen Lösungsmitteln liegen Rhodaminverbindungen, deren Carboxylgruppe nicht verestert ist, im Gleichgewicht mit einer zwitterionischen Form vor (Abb. 9). Diese zeigt ein um 3 nm hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum. Die Lage des Gleichgewichtes ist pH-abhängig. In apolar aprotischen Lösungsmitteln ist aufgrund der Instabilität des Zwitterions eine laktoide Struktur ausgeprägt, die, bedingt durch die Unterbrechung des konjugierten π -Elektronensystems, farblos und nicht fluoreszierend ist (Abb. 9, [DREXHAGE, 1990]). Im Gegensatz zu DREXHAGE [1990], der die Rolle der Lösungsmittelpolarität für die Ausbildung der zwitterionischen Struktur in den Mittelpunkt stellt, diskutieren ARBELOA und ROHATGI-MUKHERJEE [1986a] die Solvatisierung der Carboxyl-Gruppe als wesentlichen Stabilisierungsfaktor des Zwitterions. Der aprotische und nicht der unpolare Charakter eines Lösungsmittels ist damit für die Ausprägung der laktoiden Struktur verantwortlich.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz muß bei der Anwendung von Fluorophoren stets berücksichtigt werden. Mehrere Ursachen der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzlöschung werden diskutiert.

Ein wichtiges Merkmal vieler Xanthenfarbstoffe ist deren konzentrationsabhängige Aggregation, die mit einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums und einer deutlichen Fluoreszenzabnahme verbunden ist. Der Fluoreszenzverlust resultiert einerseits daraus, daß die Aggregate selbst nicht fluoreszieren, andererseits wird die Übertragung von

Emissionslicht auf nichtfluoreszierende Dimere, die in diesem Fall als Quencher wirken, diskutiert. Die Aggregationsprozesse werden bereits bei einer Konzentration von 10^{-5} M beobachtet [ARBELOA und OJEDA, 1982; KELKAR et al., 1990; GHOMASHCHI et al., 1991] und sind darüber hinaus pH-, Lösungsmittel- und Temperatur-abhängig [FÖRSTER, 1982; XU und NECKERS, 1987]. Neben der Dimerisierung der Fluorophore, konnten GHOMASHCHI et al. [1991] auch Trimerisierungen sowie die Ausbildung von Tetrameren des R6G ab einer Konzentration von 10^{-4} M nachweisen. Im Falle der R6G- und RB-Dimere wurde nach NMR-spektroskopischen Untersuchungen die Ausprägung von H-Typ Aggregaten [PACKARD et al., 1996; PACKARD et al., 1997a] mit einer sandwichartigen Aneinanderlagerung der Xanthenstrukturen aus deren Ebene die Benzoesäureringe herausragen, beschrieben [ILICH et al., 1996]. Die Ausbildung von H-Brücken innerhalb dieser Aggregate konnte nicht nachgewiesen werden [KUPRIYANOVA, 1995].

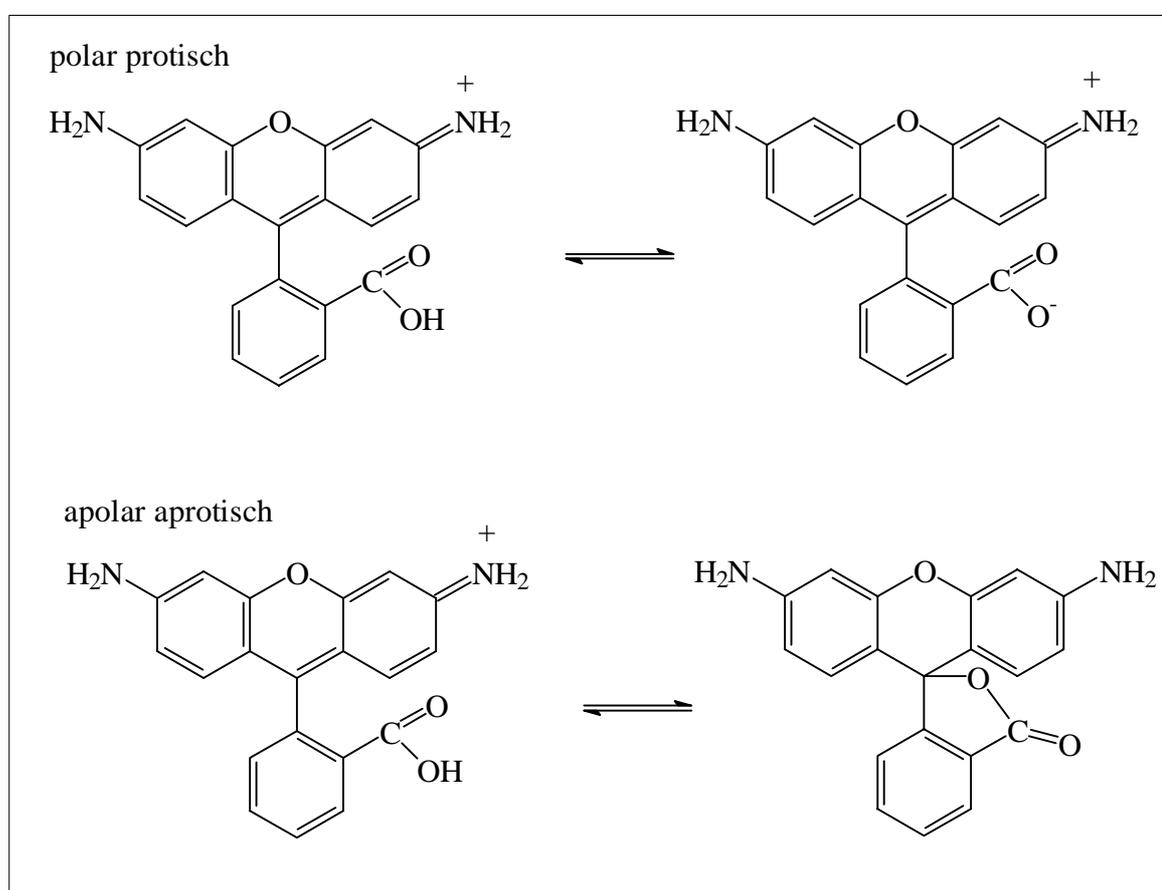


Abb. 9 *Einfluß des Lösungsmittels auf die Struktur des Rhodamin 110 (R110)*

Neben der Bildung nichtfluoreszierender Dimere, wird die ebenfalls konzentrationsabhängige Bildung angeregter Eximere diskutiert, die durch Assoziation eines angeregten und eines Monomers im Grundzustand entstehen [DREXHAGE, 1990]. Eximere emittieren Fluoreszenzlicht, dessen Wellenlängenbereich im Vergleich zur Fluoreszenzemission des Monomers bathochrom verschoben ist und zerfallen nach Emission wieder in Grundzustandsmonomere. Im Absorptionsspektrum sind Eximere somit nicht erkennbar.

Eine konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenz wird nach Reabsorption emittierten Lichtes beobachtet. Voraussetzung dafür ist die teilweise Überlappung von Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluorophors.

Neben der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzlöschung werden statische und dynamische Löschprozesse diskutiert, die aus der Ausbildung nichtfluoreszierender Komplexe aus Fluorophor und Löschermolekül bzw. aus der Kollision des Fluorophors mit Löschermolekülen resultieren. Alle Formen der Fluoreszenzlöschung sind nicht im Einzelnen sondern in ihrer Gesamtheit zu betrachten und können sich durchaus überlagern.

Der von FÖRSTER [1982] untersuchte und nach ihm benannte Resonanz-Energie-Transfer der von einem Fluorophor emittierten Energie auf ein Akzeptormolekül erfolgt über Abstände von bis zu 10 nm. Für die Wechselwirkung von Rhodaminen mit Rhodaminen wurden Förster-Distanzen im Bereich von 5 nm beschrieben [WU und BRAND, 1994]. Auch hier wird eine teilweise Überlappung des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors vorausgesetzt. Dennoch unterscheidet sich der Förster-Transfer von Reabsorptionsprozessen, da die Energieübertragung bereits erfolgt ist, bevor Fluoreszenzlicht emittiert wird.

Eine weitere Eigenschaft vieler Xanthenderivate ist deren Photostabilität.

Unter „Photobleaching“ versteht man die nach Einwirkung von Excitationslicht photoinduzierte chemische Destruktion eines Fluorophors und den damit verbundenen Verlust der Fluoreszenzfähigkeit. Die Art der Übertragung der Anregungsenergie kann vielfältig sein, resultiert jedoch stets in der Ausbildung langlebiger semioxidierter und semireduzierter Radikalstrukturen [BEAUMONT et al., 1997; BECKER et al., 1998], die dem Excitations-Emissions-Kreislauf nicht mehr zur Verfügung stehen [SONG et al., 1995, 1996]. Die Beteiligung von molekularem Sauerstoff an diesen Prozessen wurde nachgewiesen [SONG et al., 1996]. BEAUMONT et al. [1997] diskutierten für Rhodamine die bevorzugte Bildung semireduzierter Radikale.

Insgesamt handelt es sich beim „Photobleaching“ um dynamische Prozesse der Fluoreszenzlöschung die durch Fluorophorkonzentration, Energie des Excitationslichtes und Lösungsmittel bzw. umgebendes Milieu beeinflusst werden [MIALOCQ et al., 1991; BENSON et al., 1995].

3.2.3 Anwendungsbereiche

Das am häufigsten in der Literatur erwähnte Rhodamin ist das Rhodamin 123 (R123), das als spezifischer Mitochondrienfarbstoff (4000-facher Konzentrationsgradient über die Mitochondrienmembran) charakterisiert wurde [EMAUS et al., 1986]. Ähnliche Befunde wurden für Rhodamin 6G (R6G) und Rhodamin 800 (R800, 8000-facher Konzentrationsgradient) beschrieben [YAGINUMA et al., 1973; SAKANOUÉ et al., 1997]. Darüber hinaus ist R123 ein

Inhibitor der F_0F_1 -ATPase mit einem K_i -Wert von $126 \mu\text{M}$ [MODICA-NAPOLITANO et al., 1984; EMAUS et al., 1986].

Die meisten gegen Chemotherapeutika resistenten Zellen zeigen Kreuzresistenzen mit einer Anzahl anderer, strukturell und funktionell unterschiedlicher, hydrophober Agenzien. Die Bedeutung des R123 besteht in der vereinfachten und sensitiven Identifizierung dieser Multi-Drug-Resistant(MDR)-Zellen, die sich phänotypisch nicht von normalen Zellen unterscheiden [MILLOT et al., 1994].

1982 und 1983 gelang es BERNAL et al. in *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen eine Antitumoraktivität des R123 nachzuweisen, die mit dauerhaften Akkumulation des Fluorophors in Tumorzellen in Zusammenhang steht.

Kontrovers diskutiert wurde die Rolle des R123 als mögliches Antitumoragenz für photochemotherapeutische Zwecke [SHEA et al., 1989; MORLIERE et al., 1990].

R123 wurde als geeignet für den Nachweis von T-Zell-Aktivierungsprozessen beschrieben [DARZYNKIEWICZ et al., 1981; FERLINI et al., 1995].

Sulforhodamin 101 wird aufgrund seiner ionischen Wechselwirkungen mit Proteinen zu Quantifizierungszwecken des Gesamtproteingehaltes von Zellen herangezogen [ENGELHARD, 1997]. Rhodamin B wurde als für die Anfärbung lysosomaler Organellen geeignetes Fluorophor beschrieben [VON STEYERN et al., 1996].

Eine weitere Bedeutung der Rhodamine besteht in deren Einsatz innerhalb von Membranmodellen, woraus man sich Rückschlüsse auf Fusionsprozesse biologischer Membranen (Virus-Wirt, Fusion von Plasmamembranvesikeln) erhofft [KLAPPE et al., 1986].

Dimerisierungsbedingte Quencheffekte werden beim Einsatz bifluorophorer Enzymsubstrate, die beidseitig der für das Enzym spezifischen Spaltstelle fluoreszenzmarkiert sind, zum sensitiven Nachweis des nach der Hydrolyse freigesetzten Fluorophors ausgenutzt [PACKARD et al., 1997b].

Um Informationen über die Struktur und Dynamik von Makromolekülen zu erhalten, finden Resonanz-Energie-Transfer-Untersuchungen zwischen geeigneten Donor-Akzeptor-Paaren Anwendung [WU und BRAND, 1994]. Innerhalb dieser Methodik kommen auch Rhodamine zum Einsatz [YOUNG et al., 1994; HA et al., 1996; HUNG et al., 1998].

Rhodamine finden als aktives Medium im Farbstofflaser seit mehr als 25 Jahren Anwendung [DREXHAGE, 1990].

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Rhodamine besteht in der Ausnutzung ihrer Fluoreszenzpolarisation [Förster, 1982]. Die Beeinflussung der Fluoreszenzpolarisation durch Temperatur, Viskosität der Umgebung [FÖRSTER, 1982; KLEIN et al., 1984] und Molekülvolumen wird für gezielte Untersuchungen von Interaktionen in biologischen

Systemen [AJTAI und BURGHARDT, 1995; CORRIE et al., 1998]) sowie für Untersuchungen hinsichtlich Molekülflexibilität, -größe oder -gestalt herangezogen.

3.2.4 Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Rhodamin 110 und Rhodamin 110-Derivaten

Rhodamin 110

Das Rhodamin 110 (R110, Tab. 6, Abb. 1) besteht aus einem Xanthen Grundgerüst, das in C₉-Position durch eine Benzoesäurestruktur substituiert ist. Die beiden Aminogruppen in C₃- und C₆-Position des Xanthengerüsts sind nicht alkyliert.

R110 besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 494 nm (Abb. 10) und einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{494\text{nm}}$ von $63\,345\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (5.2.5).

Das Emissionsmaximum des R110 liegt bei einer Wellenlänge von 522 nm (Abb. 10). Nach LEYTUS et al. [1983a] beträgt die Quantenausbeute des R110 in einem Hepes-Puffer/Ethanol-Gemisch (85:15, v/v) 0.91. Der hohe Extinktionskoeffizient und die hohe Quantenausbeute charakterisieren R110 als besonders nachweisempfindliches Fluorophor. Die Nachweisgrenze des R110 liegt unter definierten Bedingungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 490\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Exsp, Em sp}} = 15\text{ nm}$) bei einer Konzentration von ca. $5\cdot 10^{-11}\text{ M}$. R110 ist damit ca. 100fach sensitiver als 7-Amino-4-methylcumarin (Nachweisgrenze: $5\cdot 10^{-9}\text{ M}$, $\lambda_{\text{Ex}} = 390\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 440\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Exsp, Em sp}} = 15\text{ nm}$).

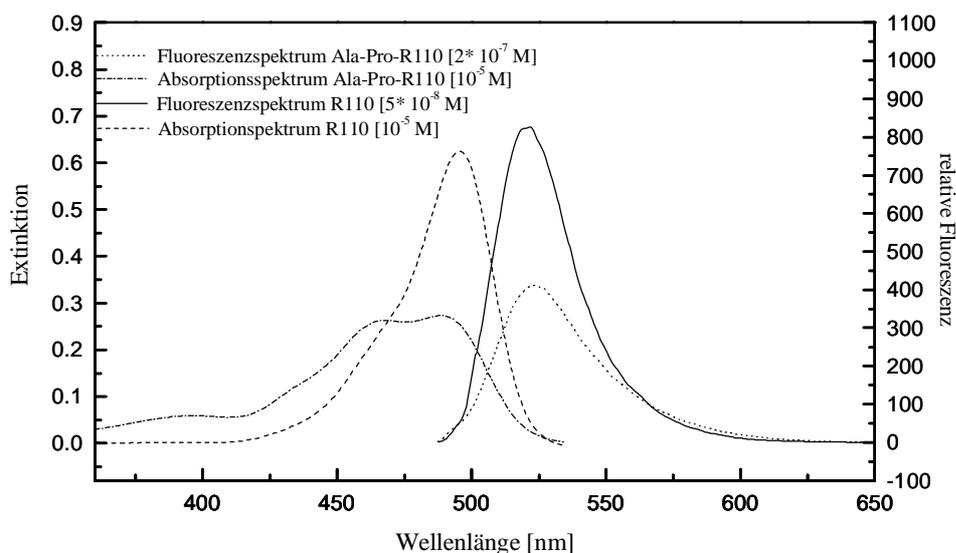


Abb. 10 Absorptions- und Emissionsspektren des R110 und des Ala-Pro-R110

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, $I = 0.125$, $\text{pH} = 7.6$, 30°C ; Fluoreszenzmessungen: $\lambda_{\text{Ex}} = 480\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Exsp, Em sp}} = 5\text{ nm}$)

Monosubstituiertes R110

Die monosubstituierten R110-Verbindungen (Xaa-Pro-R110 mit Xaa = Gly, Ala, Phe und R110-Y mit Y = Y₁ bis Y₉) zeigen im Vergleich zum R110 veränderte spektroskopische Eigenschaften. Neben einem Absorptionsmaximum bei 494 nm tritt zusätzlich ein zweites Absorptionsmaximum mit nahezu gleicher Intensität bei 467 nm auf (Abb. 10). Die Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{494\text{nm}}$ der monosubstituierten Verbindungen liegen in einem Bereich um $30\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**5.2.5**). Eine Ausnahme bildet R110-Y₆ mit einem Extinktionskoeffizienten von $9686\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Eine mögliche Ursache für die reduzierten Absorptionseigenschaften ist in der verringerten Konjugation des π -Elektronensystems als Resultat des elektronenziehenden Effektes des Restes Y₆ (Chlormethylbenzoyl-Rest) zu sehen.

Die Fluoreszenzspektren unterscheiden sich ebenfalls vom Emissionsspektrum des R110. So zeigt die Emissionsbande bei 522 nm eine deutlich verringerte Fluoreszenzintensität (Abb. 10). Im Vergleich zu den Absorptionsspektren ist anhand der Fluoreszenzspektren keine deutliche Unterscheidung zwischen monosubstituiertem R110 und R110 möglich.

Die Fluoreszenzintensität der monosubstituierten R110-Verbindungen entspricht in Analogie zu LEYTUS et al. [1983a] ca. 1/10 der Fluoreszenzintensität des R110. Auch hier bildet R110-Y₆ mit einer Fluoreszenzintensität die 1/20 der Fluoreszenzintensität des R110 entspricht eine Ausnahme ($\lambda_{\text{Ex}} = 490\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Exp., Emsp}} = 5\text{ nm}$; Konzentrationen $5\cdot 10^{-7}\text{ M}$).

Bissubstituiertes R110

Die symmetrisch und unsymmetrisch bis-substituierten Rhodamine ((Xaa-Pro)₂-R110 mit Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser, Lys, Cha und Phe, Tab. 1 und Xaa-Pro-R110-Y mit Xaa = Gly, Ala und Y = Y₁ bis Y₉, Tab. 3 und Tab. 4) zeigen innerhalb des für uns relevanten Spektralbereiches (400-600 nm) keine Absorptions- und keine Emissionsmaxima. Die Reste, die kovalent über eine Säureamidbindung mit dem Rhodamin 110 verknüpft sind, tragen ausgehend von der Carbonylgruppe elektronenziehenden Charakter. Damit steht das freie Elektronenpaar des Amidstickstoffs nicht mehr für die Konjugation mit dem aromatischen π -Elektronensystem zur Verfügung. Die Verringerung der π -Elektronendichte der Xanthen-Amid-Bindung resultiert in der Ausbildung einer laktoiden Struktur, deren Hauptabsorptionsbanden in einem Bereich um 250 nm liegen (nicht gezeigt).

Eine ähnliche intramolekulare Fluoreszenzlöschung beobachteten LAMBERTS und NECKERS [1984] nach der Acetylierung von Bengalrosa. GUILBAUT und KRAMER [1963] beschrieben ein auf der Basis der intramolekularen Fluoreszenzlöschung des Fluoresceins basierendes Lipase-Substrat.

Enzymatische Hydrolyse der monosubstituierten und bissubstituierten R110-Derivate

Die DP IV-katalysierte Hydrolyse der monosubstituierten R110-Verbindungen Xaa-Pro-R110 zeigt eine zeitabhängige Zunahme der Absorption bei 494 nm bei gleichzeitiger bathochromer Verschiebung des Absorptionsmaximums bei 467 nm. Nach vollständiger Substrathydrolyse entspricht das Spektrum dem Absorptionsspektrum des R110 (Abb. 11A).

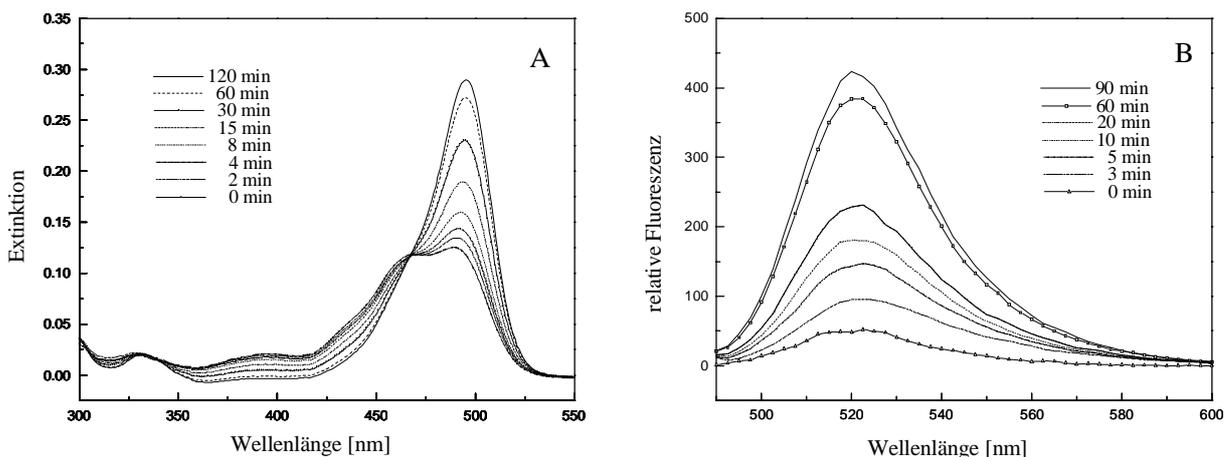


Abb. 11 Spektren der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Ala-Pro-R110

A Absorptionsspektrum Ala-Pro-R110: $5 \cdot 10^{-6}$ M

B Fluoreszenzspektrum Ala-Pro-R110: $2.5 \cdot 10^{-8}$ M

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, $I = 0.125$, $pH = 7.6$, $30^\circ C$; Fluoreszenzmessungen: $\lambda_{Ex} = 480$ nm, $\lambda_{Exp, Emsp} = 5$ nm; DP IV aus Schweineniere für Absorptionmessung: $3.42 \cdot 10^{-10}$ M, für Fluoreszenzmessung: $1.37 \cdot 10^{-9}$ M)

Ähnlich verläuft die enzymatische Hydrolyse der bissubstituierten R110-Verbindungen (Xaa-Pro)₂-R110, zunächst über die Bildung der monosubstituierten Form mit Absorptionsmaxima bei 467 nm und 494 nm, die im weiteren Verlauf vollständig zum R110 hydrolysiert wird, erkennbar an einer Zunahme des Absorptionsmaximums bei 494 nm und einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums bei 467 nm (Abb. 12A).

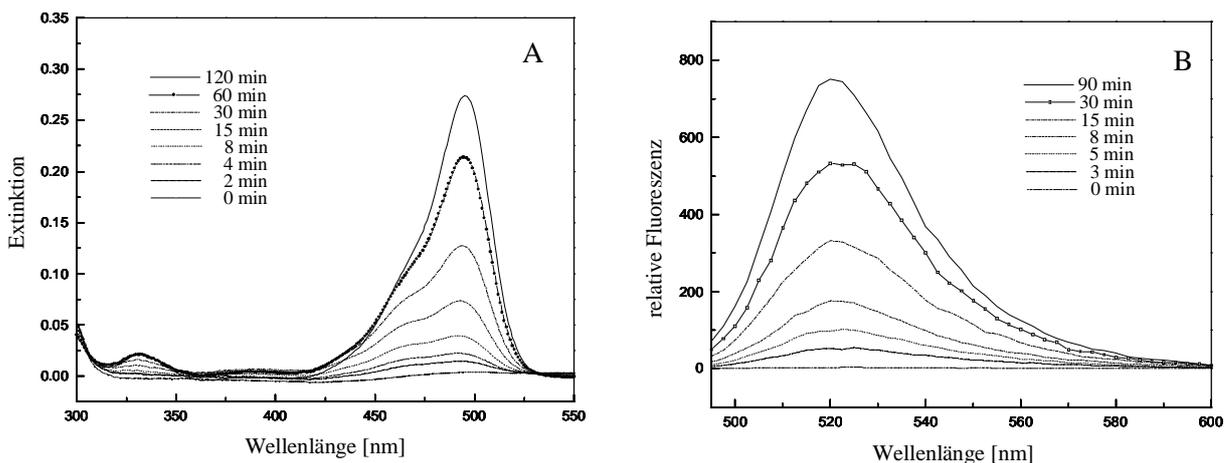


Abb. 12 Spektren der DP IV-katalysierten Hydrolyse von (Ala-Pro)₂-R110

A Absorptionsspektrum (Ala-Pro)₂-R110: $5 \cdot 10^{-6}$ M

B Fluoreszenzspektrum (Ala-Pro)₂-R110: 10^{-6} M

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, $I = 0.125$, $pH = 7.6$, $30^\circ C$; Fluoreszenzmessungen: $\lambda_{Ex} = 480$ nm, $\lambda_{Exp, Emsp} = 2.5$ nm; DP IV aus Schweineniere, für Absorptionmessung: $6.85 \cdot 10^{-10}$ M, für Fluoreszenzmessung: $2.06 \cdot 10^{-9}$ M)

Durch die Wahl einer geeigneten Enzymkonzentration im Ansatz kann die gezielte Freisetzung von monosubstituierter Verbindung zu Beginn der enzymatischen Reaktion beeinflusst werden [LEYTUS et al., 1983a]. Auf diese Weise können die Substrate hinsichtlich der Hydrolyse von $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ in Xaa-Pro-R110 enzymkinetisch untersucht werden.

Die enzymatische Hydrolyse der bissubstituierten R110-Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y ist beendet, wenn die gesamte Menge des R110-Y, erkennbar an Absorptionsmaxima bei 467 nm und 494 nm, entstanden ist (Abb. 13). Diese Verbindung fungiert nicht mehr als Substrat der DP IV. Die Extinktionskoeffizienten der R110-Y-Derivate liegen in einem Bereich um $30\,000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (5.2.5).

Die Fluoreszenzspektren der enzymatischen Hydrolyse von mono- und bissubstituierten R110-Verbindungen weisen eine zeitabhängige Zunahme des Emissionsmaximums des R110 bei 522 nm auf.

Im Falle der Hydrolyse der symmetrisch bissubstituierten R110-Verbindungen $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ ist über die gesamte Inkubationszeit eine Zunahme der Emissionsbande bei 522 nm zu beobachten (Abb. 12B). Eine Differenzierung zwischen monosubstituierter Komponente und R110, wie im Falle der Absorptionsspektren, ist hier nicht möglich. Für die DP IV-katalysierte Hydrolyse der unsymmetrisch bissubstituierten Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y und der monosubstituierten Verbindungen Xaa-Pro-R110 (Abb. 11B) wird ebenfalls die Zunahme der Emissionsbande bei 522 nm beobachtet, deren Intensität im ersten Fall jedoch deutlich geringer ist (ca. 1/10 der R110-Fluoreszenz). Im Falle der monosubstituierten Verbindungen Xaa-Pro-R110 ist die Anfangsfluoreszenz des Substrates schon so stark, daß die Fluoreszenzänderung nach enzymatischer Hydrolyse im Vergleich zur Fluoreszenzänderung nach enzymatischer Hydrolyse der $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ -Substrate nur gering ist.

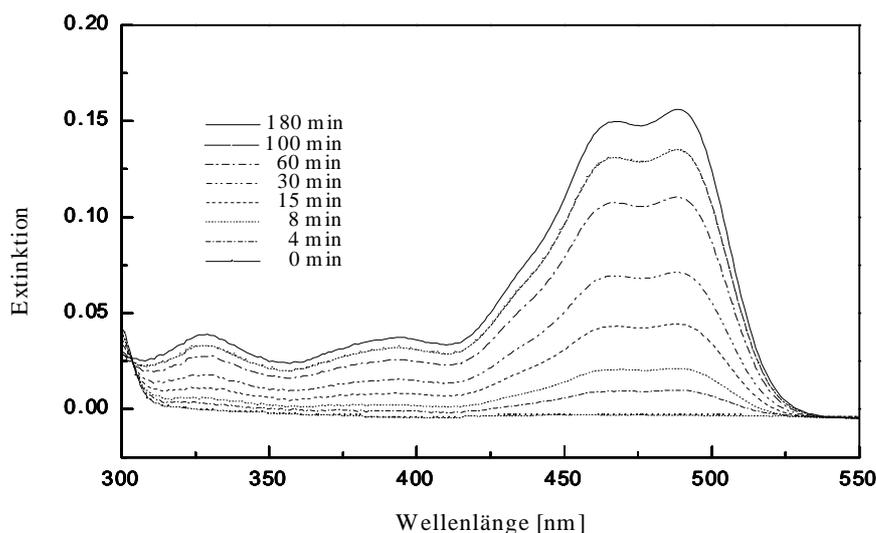


Abb. 13 Absorptionsspektrum der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Gly-Pro-R110-Y_2 ($\text{Y}_2 = -\text{CO-CH}_2\text{Cl}$) (Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, $I = 0.125$, $\text{pH} = 7.6$, 30°C ; $[\text{S}] = 5 \cdot 10^{-6}\ \text{M}$; DP IV aus Schweineniere: $3.42 \cdot 10^{-10}\ \text{M}$)

3.2.5 Konzentrations- und pH-Abhängigkeit des R110

Konzentrationsabhängigkeit des R110

Die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz muß beim Umgang mit Fluorophoren berücksichtigt werden.

Die Fluoreszenz der meisten Fluorophore verhält sich nur in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich linear und schränkt damit den Meßbereich stark ein. Die Fluoreszenz des R110 verhält sich bis zu einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ M linear (Abb. 14). Oberhalb dieser Konzentration ist eine Abweichung von der Linearität zu erkennen, ab einer Konzentration von 10^{-4} M ist sogar eine deutliche Fluoreszenzabnahme zu verzeichnen. Die Fluoreszenz von Gly-Pro-R110 ist durch eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit charakterisiert (nicht gezeigt).

Die Ursachen für die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz können wie unter 3.2.2 beschrieben vielfältig sein. Die Überlappung von Absorptions- und Emissionsspektrum des Rhodamin 110 als wichtige Bedingung für Reabsorptionsprozesse ist, wie in Abb. 10 dargestellt, erfüllt. Außerdem kann die konzentrationsabhängige Ausbildung nichtfluoreszierender Grundzustandsdimere diskutiert werden. Wie nach ARBELOA und OJEDA [1982], GHOMASHCHI et al. [1991] und KELKAR et al. [1990] beschrieben, werden Dimerisierungsprozesse verschiedener Rhodamine (R6G, RB) ab einer Konzentration von ca. 10^{-5} M durch das zusätzliche Auftreten einer hypsochrom verschobenen Bande im Absorptionsspektrum charakterisiert.

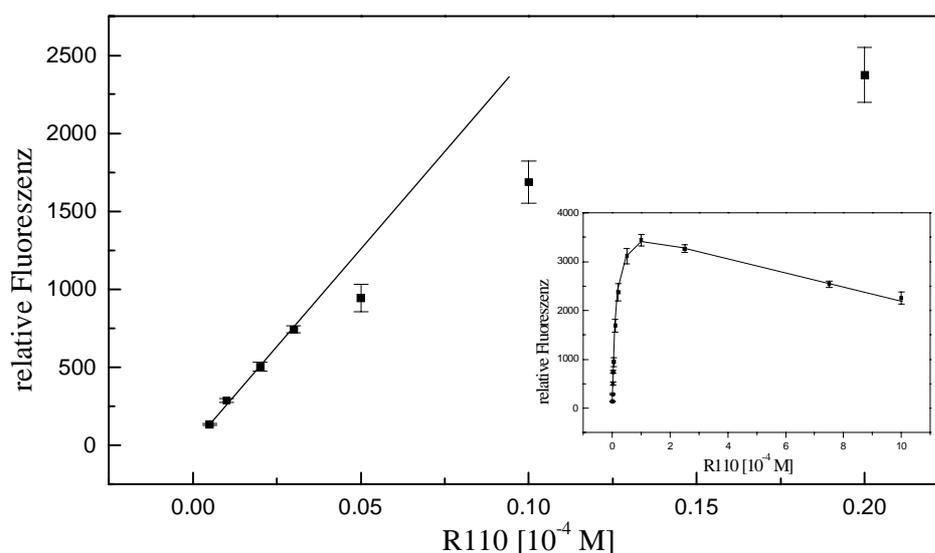


Abb. 14 Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Rhodamin 110

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, 30°C; Fluoreszenzplattenleser: $\lambda_{Ex} = 488$ nm; $\lambda_{Em.} = 520$ nm; Lampenspannung 1.5 V)

Eine Betrachtung der Absorptionsspektren des R110 zeigt innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 10^{-6} M bis 10^{-4} M keine Veränderungen im Bandenmuster. Lediglich eine geringfügige Verbreiterung des Hauptabsorptionssignals könnte einen Hinweis auf Dimerisierungsprozesse geben (Abb. 15A). Dies ist jedoch in keiner Weise mit Absorptionsspektren von RB oder R6G, die eine deutlich hypsochrom verschobene Schulter aufweisen, vergleichbar. Möglicherweise spielen Dimerisierungsprozesse des hydrophilen R110 keine so große Rolle wie im Falle hydrophoberer Rhodamine.

Daß die enzymkatalysierte Substratspaltung, gemessen an der Absorption und Fluoreszenzfreesetzung der $(\text{Abu-Pro})_2$ -R110-Hydrolyse unter Bildung von Abu-Pro-R110, oberhalb einer bestimmten Konzentration nicht mehr miteinander korreliert, verdeutlicht Abb. 15B. Auch dies ist auf die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz zurückzuführen. Generell muß bei jeder Messung von Fluoreszenzintensitäten die Konzentrationsabhängigkeit geklärt sein.

Die Anwendung der bis-(Dipeptidamido)-rhodamine für kinetische Untersuchungen unter Ausnutzung der Fluoreszenz ist aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz limitiert und nur bis zu einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ M des freien R110 möglich.

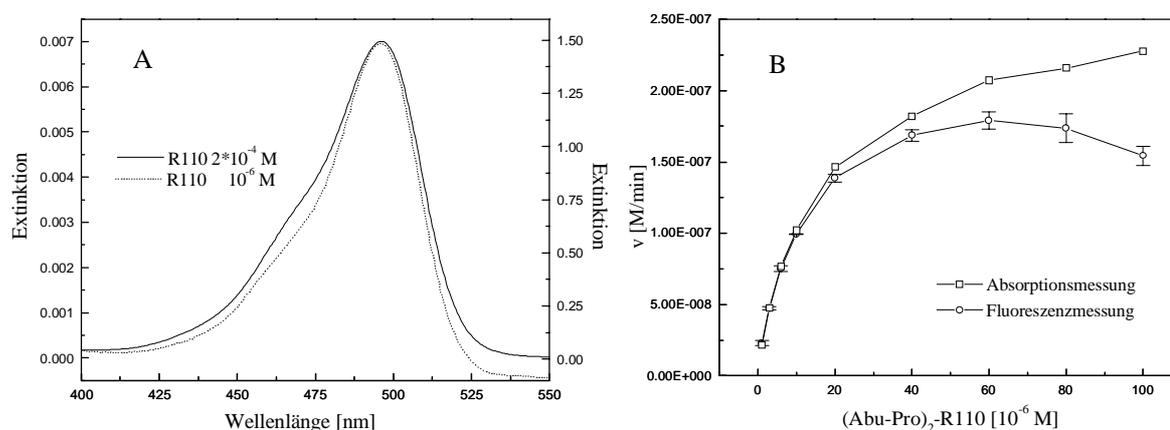


Abb. 15 A Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Absorptionsspektren von R110

B Verfolgung des Substratumsatzes von $(\text{Abu-Pro})_2$ -R110 unter Bildung von Abu-Pro-R110 durch isolierte DP IV anhand von Absorptions()- und Fluoreszenzmessungen (#)

(Meßbedingungen: **A:** $[\text{R110}] = 10^{-6}$ M und 10^{-4} M, 40 mM Tris/HCl, pH = 7.6, $I = 0.125$; **B:** 40 mM Tris/HCl, pH = 7.6, $I = 0.125$, 30°C, 60 s, DP IV im Ansatz: $4.15 \cdot 10^{-10}$ M; Absorption: 494 nm; Fluoreszenz: $\lambda_{\text{Ex}} = 490$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 520$ nm, $\lambda_{\text{Exp, Em sp}} = 4$ nm)

pH-Abhängigkeit des R110

R110 liegt aufgrund seiner nicht veresterten Benzoesäurestruktur in wässriger Lösung in zwei Dissoziationszuständen, einer kationischen und einer zwitterionischen Form, vor (3.2.2). Der pK-Wert wurde von DEUMIE und EL BARAKA [1993] mit 3.5 angegeben. In Abhängigkeit des pH-Wertes treten Gleichgewichtsverschiebungen beider Dissoziationszustände auf. Für die Bildung der laktoiden Struktur wurde ebenfalls von DEUMIE und EL BARAKA ein pK-Wert von

11.4 angegeben. Diese Struktur liegt jedoch nur in apolar aprotischen Lösungsmitteln vor. Unter physiologischen Bedingungen liegt der größte Anteil des R110 in seiner zwitterionischen Form vor.

Sowohl die kationische als auch die zwitterionische Form des R110 fluoreszieren. Die Fluoreszenz ist dabei innerhalb eines pH-Bereiches zwischen 4 und 9 nahezu stabil (Abb. 16). Dies ist ein wesentlicher Vorteil der Rhodamine im Vergleich zum Fluorescein, das aufgrund des Auftretens von vier unterschiedlich oder nicht fluoreszierenden Dissoziationszuständen innerhalb dieses pH-Bereiches starken Fluoreszenzschwankungen unterworfen ist [SJÖBACK et al., 1995].

Ein Vergleich der Absorptionsspektren des R110 bei pH 2.61 und pH 9.03 (Abb. 16) zeigt eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 3 nm, was auf die Bildung des Zwitterions zurückzuführen ist (3.2.2).

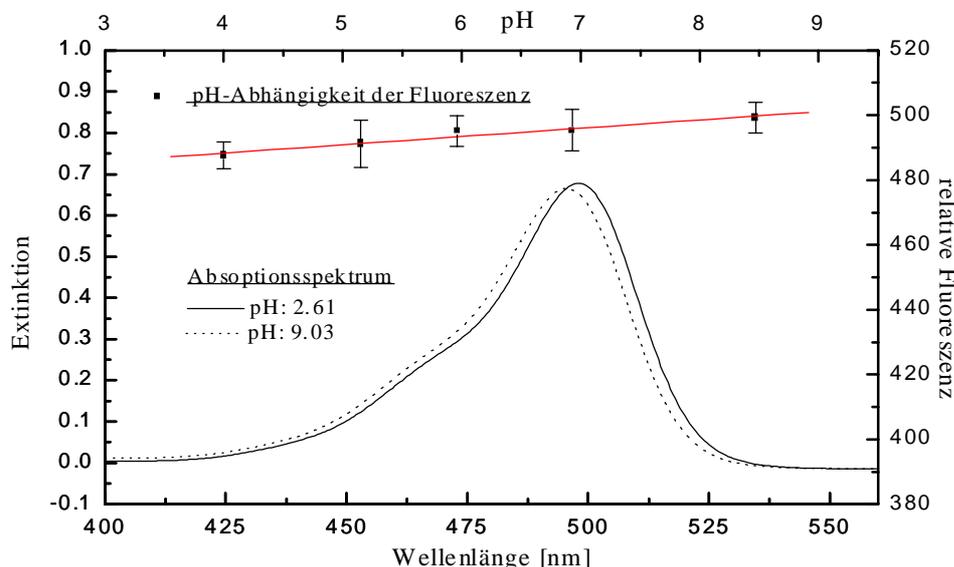


Abb. 16 pH-Abhängigkeit der Absorption und der Fluoreszenz von R110

(Meßbedingungen: wässrige Lösung, pH-Einstellung vor und nach jeder Messung, 30°C; Fluoreszenzmessungen: $\lambda_{Ex} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{Exp, Emsp} = 3.5 \text{ nm}$; $R110 = 10^{-8} \text{ M}$; Absorptionsmessung: $R110 = 10^{-5} \text{ M}$)

3.2.6 R110 in zellulären Systemen

Die Fluoreszenz ist stark vom umgebenden Milieu des Fluorophors abhängig. So beeinflussen Temperatur und Lösungsmittel sowohl die Quantenausbeute als auch die Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima.

Gleichermaßen wird die Fluoreszenz eines Fluorophors in zellulären Systemen von seiner Umgebung beeinflusst. In Abb. 17 ist die Fluoreszenzabnahme in Abhängigkeit der Zellzahl (U-937) dargestellt. Verschiedene Ursachen können diskutiert werden.

Einerseits kann eine Akkumulation des Fluorophors in Zellen oder in Zellorganellen oberhalb einer kritischen Konzentration die Ausbildung von R110-Aggregaten zu Folge haben. Im Falle des R123 wurde ein 4000-facher Gradient über die Mitochondrienmembran beschrieben

(3.2.2). Obwohl JEANNOT et al. [1997] nachweisen konnten, daß R110 bedeutend schlechter in Zellen akkumuliert wird als R123, diskutierten sie für R110 eine kritische extrazelluläre Fluorophorkonzentration von 10^{-5} M. Oberhalb dieser Konzentration wurde eine Abnahme der Linearität der intrazellulären Fluoreszenz von der R110-Konzentration beobachtet. Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, daß das Emissionsspektrum des intrazellulären R110 um 8 nm bathochrom verschoben ist, was auf Interaktionen mit Zellbestandteilen zurückgeführt wurde. In diesem Zusammenhang beschrieben DEUMIE und EL BARAKA [1993] die aus der Interaktion von R110 mit Lipidvesikeln resultierende Fluoreszenzabnahme, die mit einer bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums einhergeht. Daneben diskutierten ASUNCION-PUNZALAN et al. [1998] eine Verschiebung des Emissionsmaximums in Abhängigkeit der Tiefe der Fluorophorakkumulation in Membranen.

Die in unseren Versuchen eingesetzte Zelldichte von 10^6 Zellen/ml Ansatz, stellt einen Kompromiß zwischen Fluoreszenzlöschung und ausreichender Enzymaktivität dar.

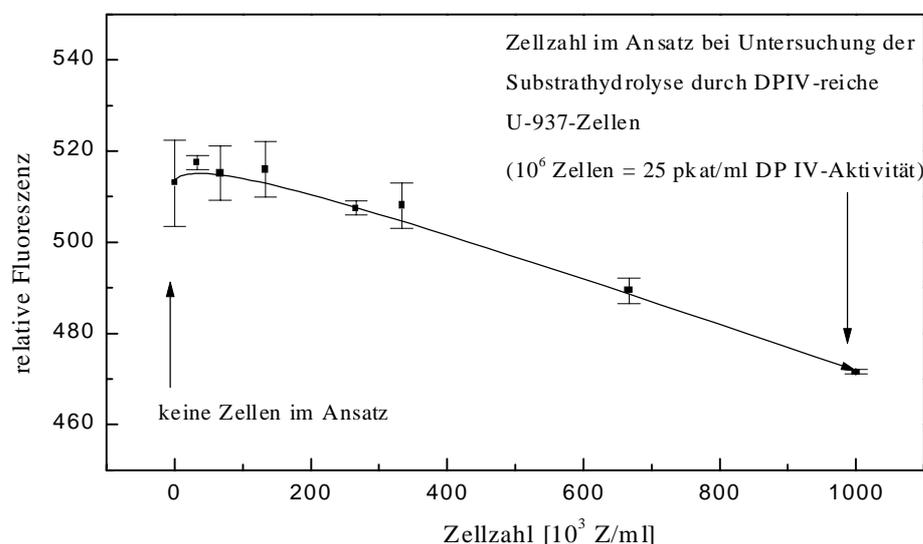


Abb. 17 Fluoreszenzlöschung des R110 im zellulären System

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7,2, 37°C; Fluoreszenzmessungen: λ_{Ex} = 490 nm, λ_{Em} = 520 nm, $\lambda_{Exp, Emsp}$ = 8 nm; Zellen U-937; [R110] = 10^{-8} M)

3.2.7 Hydrophobizität und Stabilität von (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen

Hydrophobizität von (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen

Die synthetisierten bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen als potentielle DP IV-Substrate unterscheiden sich in ihrer Polarität. Ausgehend davon, daß unpolare Verbindungen schneller durch Membranen penetrieren als polare Verbindungen, sollte in Abhängigkeit der molekularen Hydrophobizität der Substrate eine Differenzierung zwischen intra- und extrazellulärer DP IV-Aktivität möglich sein.

Daher wurden für die Kupplung mit (HCl-Pro)₂-R110 Aminosäuren eingesetzt, die sich in ihrer Polarität voneinander unterscheiden. Die Hydrophobizität der erhaltenen (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen wurde durch die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten in einem n-Oktanol/Puffer(PBS, pH 7.2)-System untersucht. Demnach ist (Leu-Pro)₂-R110 die unpolare synthetisierte Verbindung. Die Verringerung der Seitenkettenlänge von Xaa um je eine CH₂-Gruppe bzw. die Einführung hydrophiler funktioneller Gruppen bewirkt eine signifikante Erniedrigung des Verteilungskoeffizienten (Tab. 7).

Tab. 7 Verteilungskoeffizienten ausgewählter bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen

Verbindung	Verteilungskoeffizient P
R110	0.145 ± 0.041
(Gly-Pro) ₂ -R110	0.012 ± 0.008
(Ala-Pro) ₂ -R110	0.074 ± 0.030
(Abu-Pro) ₂ -R110	2.676 ± 0.164
(Leu-Pro) ₂ -R110	29.358 ± 3.207
(Ser-Pro) ₂ -R110	0.267 ± 0.008
(HCl-Cha-Pro) ₂ -R110	4.392 ± 0.280

(Meßbedingungen: n-Oktanol/PBS(pH 7.2)-System, Inkubation 2 h, 37°C; Vibrationsvorrichtung Typ Tyr, Stufe 5)

Stabilität von (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen und ausgewählten Gly-Pro-R110-Y-Verbindungen

Die Stabilität der (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen weist in Tris/HCl-Puffer (pH 7.6) und PBS (pH 7.2) deutliche Unterschiede auf. So wurde in PBS im Vergleich zu Tris/HCl-Puffer eine starke Stabilitätsabnahme beobachtet (Tab. 8). Der chemische Zerfall der Verbindungen geht mit einer deutlichen Fluoreszenzzunahme, als Resultat der Hydrolyse der Dipeptide unter Freisetzung der monosubstituierten Rhodamine bzw. des R110, einher. Ein möglicher Einfluß des pH-Wertes ist aufgrund der geringfügigen pH-Unterschiede beider Puffer auszuschließen. Vielmehr ist eine durch die Pufferionen vermittelte Katalyse des chemischen Zerfalls der Verbindungen anzunehmen. So beschrieben KÜLLERTZ et al. [1986] die Beeinflussung der Geschwindigkeit der nichtenzymatischen Hydrolyse von Gly-Pro-pNA in Abhängigkeit der Pufferart. Demnach katalysiert ein Phosphat-Puffer die nichtenzymatische Hydrolyse 4fach besser als ein Tris-Puffer.

In destilliertem Wasser sind alle Verbindungen mit Halbwertszeiten über 50 Stunden stabil.

Tab. 8 Halbwertszeiten ausgewählter (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen und Gly-Pro-R110-Y-Verbindungen in Tris/HCl-Puffer (pH 7.6) und PBS (pH 7.2)

Verbindung	t _{1/2} PBS (pH 7.2) [h]	t _{1/2} Tris/HCl (pH 7.6) [h]
(Gly-Pro) ₂ R110	6.19 ± 0.37	7.67 ± 0.16
(Ala-Pro) ₂ -R110	ca. 17	
(Abu-Pro) ₂ -R110	ca. 30	ca. 45
(Leu-Pro) ₂ -R110	8.49 ± 0.89	ca. 17
(Ser-Pro) ₂ -R110	4.65 ± 0.36	5.84 ± 0.52
(Lys-Pro) ₂ -R110	1.99 ± 0.16	9.80 ± 0.42
Gly-Pro-R110-Y ₂	20.45 ± 1.19	
Gly-Pro-R110-Y ₄	7.63 ± 0.25	

(Meßbedingungen: 37°C; Inkubationszeiten je 2-3-Halbwertszeiten aber maximal 20 h, alle 20 min eine Messung; Detektion mittels analytischer HPLC, λ = 220 nm)

3.3 Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchungen

3.3.1 Rhodamin 110-Derivate als Substrate isolierter DP IV

3.3.1.1 Dipeptidamido-rhodamine und bis-(Dipeptidamido)-rhodamine

Die kinetische Charakterisierung der DP IV-Substrate Xaa-Pro-R110 (Xaa = Gly, Ala, Phe) und (Xaa-Pro)₂-R110 (Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser, Lys, Cha und Phe) erfolgte an DP IV aus Schweineniere und humaner Niere bzw. löslicher rekombinanter humaner DP IV (rh DP IV). Um eine exakte Bestimmung der Konzentration aktiven Enzyms im Ansatz zu ermöglichen, wurden die aktiven Zentren aller verwendeten Enzyme mittels des irreversiblen DP IV-Inhibitors H-Pro-Pro^(P)[OPh-4Cl]₂ titriert (5.2.2).

Im Falle der Hydrolyse der (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen wurde die DP IV-Konzentration im Ansatz so eingestellt, daß während der Meßzeit nur monosubstituiertes R110 als Hydrolyseprodukt anfiel [LEYTUS et al., 1983a].

Hydrolyse durch DP IV aus Schweineniere

Untersuchungen an DP IV aus Schweineniere zeigten, daß außer (Phe-Pro)₂-R110 alle Substrate mit $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werten in einem Bereich zwischen $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ hydrolysiert werden (Tab. 9). Dabei ist mit Ausnahme von (Gly-Pro)₂-R110 und Gly-Pro-R110 in Abhängigkeit der Größe der Aminosäure in P₂-Position eine graduelle Abstufung der kinetischen Konstanten zu beobachten.

Der beste $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert wurde für (Ala-Pro)₂-R110 mit $4.30 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ermittelt. In Analogie zu den von HEINS et al. [1988] durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der enzymatischen Hydrolyse von Dipeptid-p-nitroaniliden, werden bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen mit hydrophoben Aminoacylresten in P₂-Position bevorzugt hydrolysiert. Schlechtere $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte wurden mit $1.48 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $1.19 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ für (Lys-Pro)₂-R110 und (Gly-Pro)₂-R110 ermittelt, wobei in beiden Fällen eine verringerte Affinität der Substrate zum aktiven Zentrum der DP IV, erkennbar an erhöhten K_{m} -Werten, gefunden wurde.

Nach BRANDT et al. [1995] ist die Interaktion der Seitenketten der Aminoacylreste inhibitorisch wirkender produktanaloger Aminosäurepyrrolidide mit der aromatischen Seitenkette des Trp⁶²⁸ des aktiven Zentrums der DP IV von Bedeutung für die Effizienz der Enzyminhibierung. In jedem Fall scheint also eine Interaktion der Aminosäure in P₂-Position mit Trp⁶²⁸ essentiell für die Substrathydrolyse bzw. für die Wirkung von DP IV-Effektoren zu sein. Darüber hinaus konnten HARADA et al. [1984] zeigen, daß die Modifikation von Trp-Resten in einer Abnahme der DP IV-Aktivität resultiert.

Im Fall der Substrate (Gly-Pro)₂-R110 und (Lys-Pro)₂-R110 könnte die Interaktion mit Trp⁶²⁸ einerseits aufgrund des Fehlens einer Seitenkette und andererseits bedingt durch erhöhte sterische Ansprüche unterdrückt sein. In diesem Zusammenhang wurde von HARADA et al. [1985] die S₂-Bindungstasche der DP IV mit einer Größe von 0.5 nm bis 0.6 nm charakterisiert. Die Autoren konnten zeigen, daß in Abhängigkeit der Länge der Aminosäure in P₂-Position zunächst eine Abnahme des K_{m} -Wertes, ab einer Länge von ca. 0.6 nm jedoch eine Zunahme

des K_m -Wertes zu beobachten ist. Für ein Substrat mit einem Lysylrest in P₂-Position wurde ein hoher K_m -Wert ermittelt, was mit der Größe der Lysylseitenkette in Verbindung gebracht wurde.

Tab. 9 Kinetische Konstanten der Hydrolyse von Xaa-Pro-R110 und (Xaa-Pro)₂-R110 durch isolierte DP IV aus Schweineiere

Verbindung	K_m [10^5 M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	K_i [10^4 M]	Kinetik
Ala-Pro-pNA*	1.14 ± 0.03	54.89 ± 4.17	$(4.81 \pm 0.39)\cdot 10^6$		MM
Ala-Pro-R110 [#]	2.50 ± 0.11	72.39 ± 3.46	$(2.90 \pm 0.19)\cdot 10^6$		MM
Gly-Pro-R110*	4.59 ± 1.33	72.02 ± 3.46	$(1.57 \pm 0.47)\cdot 10^6$		MM
Phe-Pro-R110*	4.65 ± 0.58	54.72 ± 4.26	$(1.18 \pm 0.17)\cdot 10^6$		MM
(Ala-Pro) ₂ -R110	1.47 ± 0.19	63.19 ± 11.38	$(4.30 \pm 0.95)\cdot 10^6$		MM
(Abu-Pro) ₂ -R110	2.55 ± 0.07	84.84 ± 2.11	$(3.33 \pm 0.12)\cdot 10^6$	5.10 ± 1.00	SÜ
(Leu-Pro) ₂ -R110	2.42 ± 0.23	58.36 ± 1.45	$(2.41 \pm 0.24)\cdot 10^6$	4.69 ± 1.82	SÜ
(Ser-Pro) ₂ -R110	3.42 ± 1.09	67.73 ± 4.21	$(1.98 \pm 0.68)\cdot 10^6$		MM
(Cha-Pro) ₂ -R110*	0.40 ± 0.11	6.87 ± 0.15	$(1.72 \pm 0.49)\cdot 10^6$	1.35 ± 0.05	SÜ
(Lys-Pro) ₂ -R110	5.42 ± 1.22	80.12 ± 9.59	$(1.48 \pm 0.39)\cdot 10^6$		MM
(Gly-Pro) ₂ -R110	9.91 ± 1.57	118.15 ± 18.70	$(1.19 \pm 0.27)\cdot 10^6$		MM
(Phe-Pro) ₂ -R110 [#]		keine	Hydrolyse		

* Verbindungen liegen als Hydrochloride vor, [#] Verbindungen liegen als Trifluoracetate vor

SÜ: Substratüberschußhemmung, MM: Michaelis-Menten-Kinetik

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, $I = 0.125$, pH = 7.6, 30°C, Messung über 120 s bei 494 nm (R110) und 390 nm (pNA); DP IV im Ansatz: zwischen $6.85\cdot 10^{-10}$ M und $2.34\cdot 10^{-9}$ M für Hydrolyse von Xaa-Pro-R110 in R110, zwischen $1.37\cdot 10^{-10}$ M und $2.28\cdot 10^{-10}$ M für Hydrolyse von (Xaa-Pro)₂-R110 in Xaa-Pro-R110, $4.56\cdot 10^{-10}$ M für Hydrolyse von Ala-Pro-pNA)

Für (Cha-Pro)₂-R110 wurde ein besonders niedriger K_m -Wert ermittelt, was für eine hohe Affinität des Substrates zum aktiven Zentrum der DP IV spricht. Der k_{cat} -Wert ist jedoch um eine Größenordnung geringer als die k_{cat} -Werte aller anderen Rhodamin 110-Substrate.

(Phe-Pro)₂-R110 wird von der DP IV nicht gebunden und nicht hydrolysiert. Das entsprechende nichtaromatische Analogon (Cha-Pro)₂-R110 ist jedoch ein Substrat der DP IV. Damit scheint der Verlust des aromatischen Ringsystems der Phenylalanylseitenkette und nicht die Molekülgröße für die Substrateigenschaften verantwortlich zu sein. Da (Phe-Pro)₂-R110 von der DP IV nicht gebunden wird, wird nicht eine die Hydrolyse hemmende Enzym-Substrat-Interaktion, sondern vielmehr die Ausbildung einer der DP IV nicht mehr zugänglichen

veränderten Substratkonformation an denen beide Phenylringe beteiligt sind, angenommen. Diese Theorie wird auch durch die Tatsache unterstützt, daß das entsprechende mono-(Dipeptidamido)-rhodamin Phe-Pro-R110 ein Substrat der DP IV ist.

BRANDT [unveröffentlichte Ergebnisse] konnte mit Hilfe von Moleküldynamiksimulationen die in Abb. 18 dargestellte Struktur des $(\text{Phe-Pro})_2\text{-R110}$ berechnen. Die Ausbildung einer "Sandwichstruktur" zwischen den Phenylringen der Phenylalanylreste könnte die Bindung im aktiven Zentrum der DP IV verhindern.

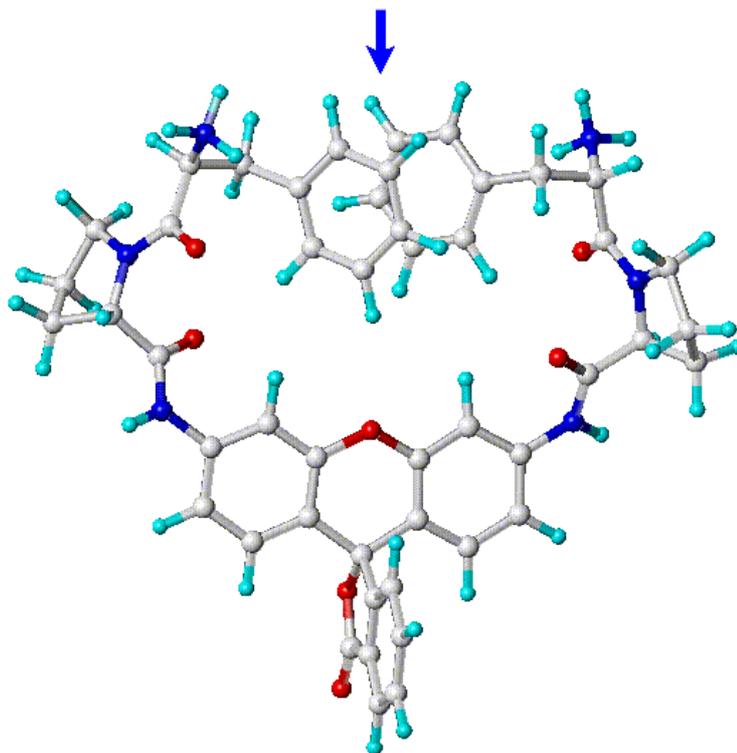


Abb. 18 Moleküldynamiksimulation der Struktur des $(\text{Phe-Pro})_2\text{-R110}$

Insgesamt sind die kinetischen Konstanten der untersuchten Rhodamin-Substrate durchaus vergleichbar mit den kinetischen Konstanten der bisher verwendeten Dipeptid-p-nitroanilide [HEINS et al., 1984, 1988]. Die Größe des Rhodaminmoleküls scheint demnach nur von untergeordneter Bedeutung zu sein, was darauf zurückzuführen ist, daß im Falle der Hydrolyse der Xaa-Pro-Substrate die Deacylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist [KÜLLERTZ et al., 1978].

Die v/S-Charakteristik der Hydrolyse der $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ Verbindungen mit Xaa = Ala, Ser, Lys und Gly sowie aller Xaa-Pro-R110-Verbindungen entspricht einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 19). $(\text{Abu-Pro})_2\text{-R110}$, $(\text{Leu-Pro})_2\text{-R110}$ und $(\text{Cha-Pro})_2\text{-R110}$ werden hingegen nach dem Modell der Substratüberschußhemmung hydrolysiert, wobei ein zweites Substratmolekül mit dem Enzym-Substrat-Komplex unter Ausbildung eines katalytisch nicht aktiven SES-Komplexes wechselwirkt. Innerhalb der Dipeptid-p-nitroanilide als Substrate der DP IV aus Schweineniere wird ebenfalls Leu-Pro-pNA nach dem Modell der

Substratüberschußhemmung hydrolysiert. Die v/S -Charakteristik der Hydrolyse von Abu-Pro-pNA folgt dagegen dem Modell der Michaelis-Menten-Kinetik [HEINS et al., 1984, 1988].

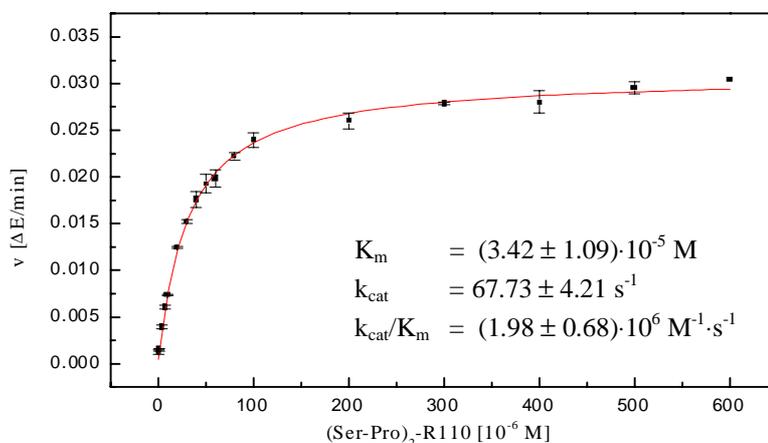


Abb. 19 Hydrolyse des Substrates $(\text{Ser-Pro})_2\text{-R110}$ durch DP IV aus Schweineniere, Modell der Michaelis-Menten-Kinetik

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, $I = 0.125$, $\text{pH} = 7.6$, 30°C , Messung über 120 s bei 494 nm; DP IV im Ansatz $2.28 \cdot 10^{-10}$ M)

Native humane und rekombinante humane DP IV

Die $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ -Derivate mit Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser und Cha werden von löslicher rekombinanter humaner DP IV (rh DP IV) hydrolysiert. In Analogie zur Hydrolyse durch DP IV aus Schweineniere wird $(\text{Phe-Pro})_2\text{-R110}$ von rh DP IV nicht als Substrat akzeptiert. Mit Ausnahme von $(\text{Cha-Pro})_2\text{-R110}$, das nach dem Modell der Substratüberschußhemmung hydrolysiert wird (Abb. 20), folgt die v/S -Charakteristik der Hydrolyse aller anderen Substrate einer Michaelis-Menten-Kinetik (Tab. 10).

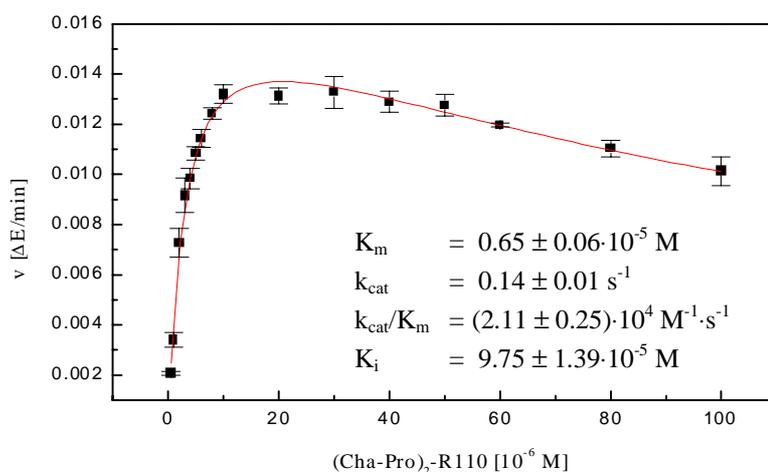


Abb. 20 Hydrolyse von $(\text{Cha-Pro})_2\text{-R110}$ durch rekombinante humane DP IV, Modell der Substratüberschußhemmung

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, $I = 0.125$, $\text{pH} = 7.6$, 30°C , Messung über 120 s bei 494 nm; DP IV im Ansatz $5.92 \cdot 10^{-8}$ M)

Damit unterscheidet sich die Hydrolyse von (Abu-Pro)₂-R110 und (Leu-Pro)₂-R110 durch rh DP IV von der Hydrolyse beider Substrate durch DP IV aus Schweineniere. Vergleichende Untersuchungen der Hydrolyse von Dipeptid-p-nitroaniliden durch DP IV aus Schweineniere und humaner Niere zeigten ebenfalls zwischen beiden Enzymen deutliche Unterschiede hinsichtlich der v/S-Charakteristiken der Substrathydrolyse [HEINS et al., 1984].

Der signifikanteste Unterschied der Hydrolyse der bis-(Dipeptidamido)-rhodamine durch rh DP IV im Vergleich zur Hydrolyse durch DP IV aus Schweineniere besteht in den um ca. zwei Größenordnungen verringerten k_{cat}/K_m -Werten (Tab. 10). Die Affinität der Verbindungen zum aktiven Zentrum der DP IV ist dabei kaum beeinflusst, erkennbar an den im Vergleich zur Substrathydrolyse durch Schweinenieren-DP IV nur geringfügig variierenden K_m -Werten. Die k_{cat} -Werte hingegen sind deutlich verringert.

Tab. 10 Kinetische Konstanten der Hydrolyse von Ala-Pro-pNA und (Xaa-Pro)₂-R110 durch rekombinante humane DP IV und humane Nieren-DP IV

Verbindung	K_m [10^5 M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	K_i [10^5 M]	Kinetik
Ala-Pro-pNA*	1.30 ± 0.04	0.91 ± 0.01	$(7.00 \pm 0.23)\cdot 10^4$	9.75 ± 1.39	MM
Ala-Pro-pNA* [‘]	1.20 ± 0.07	2.29 ± 0.03	$(1.91 \pm 0.11)\cdot 10^5$		MM
(Ala-Pro) ₂ -R110	2.73 ± 0.15	1.12 ± 0.02	$(4.10 \pm 0.24)\cdot 10^4$		MM
(Abu-Pro) ₂ -R110	3.15 ± 0.11	1.22 ± 0.01	$(3.87 \pm 0.14)\cdot 10^4$		MM
(Leu-Pro) ₂ -R110	4.11 ± 0.37	1.31 ± 0.04	$(3.19 \pm 0.30)\cdot 10^4$		MM
(Ser-Pro) ₂ -R110	8.00 ± 0.85	1.75 ± 0.07	$(2.19 \pm 0.25)\cdot 10^4$		MM
(Cha-Pro) ₂ -R110*	0.65 ± 0.06	0.14 ± 0.01	$(2.11 \pm 0.25)\cdot 10^4$		SÜ
(Gly-Pro) ₂ -R110	8.06 ± 0.59	1.68 ± 0.05	$(2.08 \pm 0.16)\cdot 10^4$	MM	
(Phe-Pro) ₂ -R110 [#]		keine	Hydrolyse		

* Verbindungen liegen als Hydrochloride vor, [#] Verbindungen liegen als Trifluoracetate vor

SÜ = Substratüberschußhemmung; MM = Michaelis-Menten-Kinetik

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, I = 0.125, pH 7.6, 30°C, Messung über 120 s bei 494 nm (R110) und 390 nm (pNA); DP IV im Ansatz: zwischen $7.40\cdot 10^{-9}$ und $5.92\cdot 10^{-8}$ M rh DP IV für Hydrolyse von (Xaa-Pro)₂-R110 in Xaa-Pro-R110 und für Hydrolyse von Ala-Pro-pNA, $7.60\cdot 10^{-9}$ M native humane Nieren-DP IV[‘] für Hydrolyse von Ala-Pro-pNA)

Obwohl nach KENNY et al. [1977] die im Falle der rh DP IV vorliegende Abspaltung der N-terminalen Verankerungsregion keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität hat, wurde von uns die Hydrolyse von Ala-Pro-pNA durch native humane Nieren-DP IV untersucht und deren kinetische Konstanten mit den kinetischen Konstanten der Ala-Pro-pNA-Hydrolyse durch rh DP IV verglichen. Dabei wurden für beide Enzyme im Vergleich zur

Ala-Pro-pNA-Hydrolyse durch Schweinenieren-DP IV (Tab. 9) deutlich verringerte k_{cat} -Werte gefunden (Tab. 10).

Die Ursache für diese Unterschiede in den kinetischen Konstanten der Hydrolyse identischer Substrate kann nur in der varrierenden speziesspezifischen Aminosäuresequenz der DP IV aus Schweineniere und humaner Niere zu suchen sein, obwohl innerhalb der Eukaryoten eine hohe Sequenzhomologie besteht [DARMOUL et al., 1992; MISUMI et al., 1992]. Da die Aminosäuresequenz der Schweinenieren-DP IV noch nicht aufgeklärt ist, ist ein direkter Vergleich mit DP IV aus humaner Niere nicht möglich.

Ähnliche Unterschiede im k_{cat} -Wert wurden von HOFFMANN et al. [1998] für Prolyl oligopeptidase aus *Flavobacterium meningosepticum* und aus Schweineniere beschrieben, wobei das bakterielle Enzym eine ca. 30fach höhere Katalysegeschwindigkeit aufweist als das Eukaryotenzym. DP IV und Prolyl oligopeptidase gehören zur Prolyl oligopeptidase-Familie (3.3.1).

3.3.1.2 Verbindungen des Typs Xaa-Pro-R110-Y

Die Hydrolyse der Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y mit Xaa = Gly, Ala und Y = Y₁ bis Y₉ wurde an aus Schweineniere isolierter DP IV untersucht.

Tab. 11 Kinetische Konstanten der Hydrolyse von Xaa-Pro-R110-Y durch DP IV aus Schweineniere

Verbindung	K_m [10^5 M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	K_i [10^4 M]
Gly-Pro-R110-Y				
Y ₁ = -CO-CH ₃	17.40 ± 6.24	235.60 ± 43.25	(1.35 ± 0.56)·10 ⁶	2.95 ± 1.04
Y ₂ = -CO-CH ₂ Cl	6.23 ± 0.61	70.84 ± 4.21	(1.14 ± 0.13)·10 ⁶	2.30 ± 0.25
Y ₃ = -CO-(CH ₂) ₃ Cl [#]	3.77 ± 0.40	67.49 ± 3.46	(1.79 ± 0.21)·10 ⁶	6.05 ± 0.90
Y ₄ = -CO-(CH ₂) ₄ Cl	3.83 ± 0.31	59.65 ± 2.55	(1.56 ± 0.14)·10 ⁶	2.24 ± 0.19
Y ₅ = -CO-(CH ₂) ₄ Br [#]	1.54 ± 0.17	42.39 ± 1.78	(2.75 ± 0.33)·10 ⁶	7.87 ± 1.58
Y ₆ = -CO-C ₆ H ₄ -CH ₂ Cl	1.10 ± 0.20	36.64 ± 3.74	(3.33 ± 0.69)·10 ⁶	1.02 ± 0.27
Y ₇ = -CO-(CH ₂) ₃ -C ₄ H ₂ O ₂ N [#]	2.67 ± 0.21	60.12 ± 2.08	(2.25 ± 0.19)·10 ⁶	6.32 ± 0.77
Y ₈ = -CO-(CH ₂) ₅ -C ₄ H ₂ O ₂ N [#]	1.25 ± 0.10	40.41 ± 1.23	(3.23 ± 0.28)·10 ⁶	3.69 ± 0.39
Ala-Pro-R110-Y ₉				
Y ₉ = -CO-(CH ₂) ₃ -C ₄ NO ₂ Cl ₂ [*]	0.58 ± 0.07	14.67 ± 0.92	(2.55 ± 0.44)·10 ⁶	0.80 ± 0.13

* Verbindungen liegen als Hydrochloride vor, [#] Verbindungen liegen als Trifluoracetate vor

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, I = 0.125, pH = 7.6, 30°C, Messung über 120 s bei 494 nm; DP IV im Ansatz: zwischen $6.85\cdot 10^{-10}$ und $1.37\cdot 10^{-9}$ M)

Obwohl die Hydrolyse von Gly-Pro-R110 und Ala-Pro-R110 (Tab. 9) dem Modell der Michaelis-Menten-Kinetik folgt, werden alle Verbindungen des Typs Xaa-Pro-R110-Y entsprechend einer Substratüberschußhemmung hydrolysiert. Die ermittelten kinetischen Konstanten liegen in einer Größenordnung. Die k_{cat}/K_m -Werte variieren in einem Bereich zwischen $1.14 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $3.33 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Tab. 11).

Für die Substrate Gly-Pro-R110-Y resultiert eine Zunahme der Hydrophobizität, verbunden mit einer Verlängerung des Restes Y, in einer erhöhten Affinität der Verbindungen zum aktiven Zentrum der DP IV. Dies ist an einer systematischen Abnahme der K_m -Werte erkennbar. Es ist anzunehmen, daß auch hier hydrophobe Interaktionen zwischen dem Rest Y und hydrophoben Bereichen des aktiven Zentrums der DP IV die Substratbindung positiv beeinflussen.

3.3.2 Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von (Gly-Pro)₂-R110

Ein Ziel unserer Arbeiten bestand in der Synthese hoch sensitiver fluorogener DP IV-Substrate. Der Vergleich der Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse dieser Verbindungen mit der Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse der bekannten Dipeptid-p-nitroanilide und Dipeptid-4-methylcumarine als Substrate der DP IV lag daher nahe. Wir entschieden uns für vergleichende Untersuchungen der enzymkatalysierten Freisetzung des Chromophors bzw. der Fluorophore aus Gly-Pro-pNA, Gly-Pro-MCA und (Gly-Pro)₂-R110. Dabei wird (Gly-Pro)₂-R110 unter Bildung des monosubstituierten Gly-Pro-R110 gespalten.

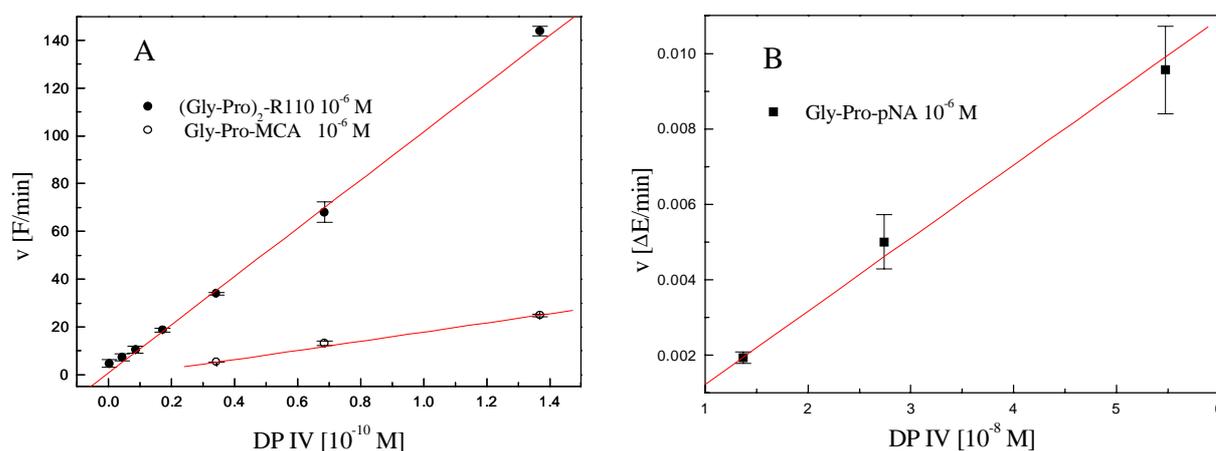


Abb. 21 Darstellung der Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von (Gly-Pro)₂-R110 (A), Gly-Pro-MCA (A) und Gly-Pro-pNA (B) durch DP IV aus Schweineiere
(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, $I = 0.125$, $\text{pH} = 7.6$, 30°C , Messung über 120 s; DP IV im Ansatz: $2.28 \cdot 10^{-10}$ M; Fluoreszenz: Gly-Pro-R110: $\lambda_{\text{Ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Exp, Emsp}} = 15 \text{ nm}$, MCA: $\lambda_{\text{Ex}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Exp, Emsp}} = 15 \text{ nm}$; Absorption: p-NA: 390 nm)

Wie in Abb. 21 erkennbar, ist die Hydrolyse von Gly-Pro-MCA und (Gly-Pro)₂-R110 sensitiver im Vergleich zur Hydrolyse von Gly-Pro-pNA. Der Nachweis des freigesetzten 7-Amino-4-methyl-cumarins (MCA) ist um ca. zwei Größenordnungen sensitiver. Um eine weitere Größenordnung besser wird das durch enzymkatalysierte Hydrolyse freigesetzte Gly-Pro-R110 detektiert. Hier wird mit ca. 1/10 der DP IV Konzentration im Ansatz eine mit MCA nahezu übereinstimmende Fluoreszenzintensität erreicht. Die Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von (Gly-Pro)₂-R110 ist ca. 4000fach sensitiver im Vergleich zur Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA (Abb. 21A und 21B).

Die Konzentration der Hydrolyseprodukte MCA und Gly-Pro-R110 ist unter den gewählten Meßbedingungen identisch. Die Unterschiede in der Nachweisempfindlichkeit sind daher auf die unterschiedliche Sensitivität der Fluorophore selbst zurückzuführen.

3.3.3 N^ε-Biotin- bzw. 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Lys-2-cyano-pyrrolidide als Inhibitoren isolierter DP IV

N^ε-Biotin- bzw. 4(5)-Carboxyfluorescein-markiertes Lys-2-cyano-pyrrolidid wurde hinsichtlich seiner inhibitorischen Eigenschaften auf die Hydrolyse von Gly-Pro-pNA durch DP IV aus Schweineniere untersucht.

Aminoacyl-2-cyano-pyrrolidide wurden mehrfach in der Literatur als potente kompetitive Inhibitoren der DP IV mit K_i-Werten im mikromolaren bis nanomolaren Bereich beschrieben [LI et al., 1995; ASHWORTH et al., 1996]. Ein großer Vorteil dieser Verbindungen besteht in ihrer hohen Stabilität, die den Einsatz in biologischen Systemen ermöglicht [ASHWORTH et al., 1996].

Die von uns synthetisierten Verbindungen Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid und Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid hemmen die DP IV-katalysierte Hydrolyse von Gly-Pro-pNA kompetitiv mit K_i-Werten um 10⁻⁸ M (Tab. 12, Abb. 22). Der Inhibitor konkurriert dabei mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Inhibitoren hemmen die DP IV um nahezu zwei Größenordnungen besser als die von HERMANN [1995] beschriebenen, ebenfalls an der ε-Aminogruppe des Lysins mit Biotin bzw. 4(5)-Carboxyfluorescein markierten, Lys-pyrrolidide.

Die generell verbesserten Inhibierungseigenschaften der Aminoacyl-2-cyano-pyrrolidide im Vergleich zu Aminoacylpyrrolididen könnten nach LI et al. [1995] auf die Bildung eines kovalenten Enzym-Inhibitor-Addukts als Folge der Ausbildung eines Imidoesters zwischen Nitrilkohlenstoff und Serylsauerstoff des aktiven Zentrums der DP IV zurückzuführen sein. Im Falle der Cysteinprotease Papain konnten MOON et al. [1986] eine derartige Interaktion zwischen N-Acetylphenylalanylitril und der reaktiven SH-Gruppe des Cysteinyrestes des aktiven Zentrums NMR-spektroskopisch nachweisen.

Tab. 12 Kinetische Konstanten der Inhibierung der DP IV aus Scheinennie durch N^e-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Lys-2-cyano-pyrrolidide

Verbindung	K _i [M]
Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid	$(0.64 \pm 0.02) \cdot 10^{-7}$
Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid	$(0.58 \pm 0.03) \cdot 10^{-7}$

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, I = 0.125, pH = 7.6, 30°C; Messung der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA über 90 s bei $\lambda = 390$ nm; DP IV im Ansatz: $1.37 \cdot 10^{-9}$ M)

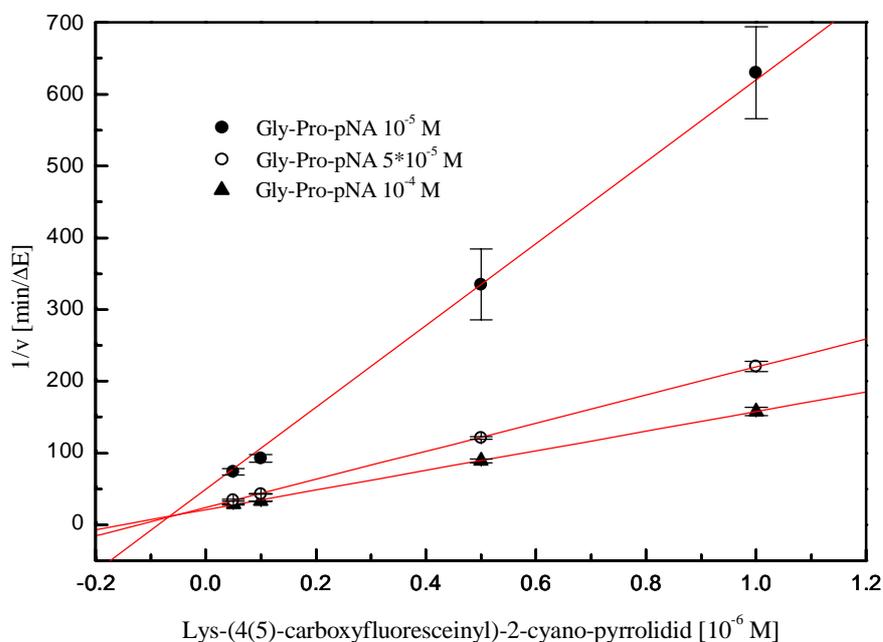


Abb. 22 Dixon-Auftragung der Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Gly-Pro-pNA (● = 10^{-5} , # = $5 \cdot 10^{-5}$ und + = 10^{-4} M) durch Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid

(Meßbedingungen: 40 mM Tris/HCl-Puffer, I = 0.125, pH = 7.6, 30°C; Messung der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA über 90 s bei $\lambda = 390$ nm; DP IV im Ansatz: $1.37 \cdot 10^{-9}$ M)

3.4 Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen

3.4.1 Allgemeine Bemerkungen

Eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion ist einerseits für die Simulierung physiologischer Antigen-Ligand-Interaktionen von Bedeutung, andererseits stellt sie eine wichtige Voraussetzung für den Nachweis von Oberflächenantigenen auf Zellen dar. Durch den Einsatz entsprechender fluoreszenzmarkierter antigenspezifischer Antikörper kann ein Zelloberflächenantigen sensitiv detektiert werden [MATTERN et al., 1995].

Für DP IV/CD26 sind mehrere monoklonale anti-CD26-Antikörper bekannt, die z.T. unterschiedliche Epitope von DP IV/CD26 erkennen und binden [SCHÖN und ANSORGE, 1990; TORIMOTO et al., 1992; DE MEESTER et al., 1993; KÄHNE, 1995; MATTERN et al., 1995; HÜHN et al., 1999]. Mit Ausnahme des von HOFFMANN et al. [1995] beschriebenen anti-CD26-Antikörpers PEG2/G11 und eines polyklonalen Antikörpers, die die Hydrolyse des Oligopeptides IL2(1-12), nicht jedoch die Hydrolyse von Gly-Pro-pNA hemmen, ist für keinen CD26-spezifischen Antikörper eine enzyminhibierende Wirkung bekannt. Über die katalytische Aktivität der DP IV kann somit durch den Einsatz DP IV-spezifischer Antikörper keine Aussage getroffen werden. Daher kommt Substraten und Inhibitoren eine besondere Bedeutung zu.

Daß die CD26-Expression auf Zellen nicht immer mit der gemessenen DP IV-Aktivität korreliert, konnten RUIZ et al. [1997] zeigen. Darüber hinaus wurde eine Vielzahl anderer Enzyme mit DP IV-Aktivität beschrieben (3.1.1). Die Charakterisierung von CD26-positiven Zellen sollte daher neben der Detektion einer CD26-spezifischen Antikörperreaktion auch die Ermittlung der enzymatischen Aktivität der DP IV einschließen. Optimal wäre die durchflußzytometrische Bestimmung beider Parameter in nur einem Reaktionsansatz, was einerseits die Anwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers und andererseits die enzymkatalysierte Freisetzung eines Fluorophors aus einem geeigneten Enzymsubstrat erfordert. Dabei sollten die Anregungsmaxima beider Fluorophore nahezu identisch, die Emissionsmaxima jedoch verschieden sein, um eine gezielte Differenzierung zwischen Antigen-Antikörper-Reaktion und Substrathydrolyse zu ermöglichen. In diesem Sinne wurde von RUIZ et al. [1996, 1997, 1998] eine 2-Farben-durchflußzytometrische Analyse angewendet, bei der einerseits ein PE(Phycoerythrin)-markierter anti-CD26-Antikörper und andererseits verschiedene R110-basierende DP IV-Substrate ((Gly-Pro)₂-R110 und (Ala-Ala)₂-R110) eingesetzt wurden. Innerhalb dieses Testsystems gelang es, einer einheitlichen Population CD26-positiver Zellen eine entsprechende DP IV-Aktivität zuzuordnen.

In ähnlicher Weise sollten auch die von uns synthetisierten fluorogenen Substrate angewendet werden.

DP IV ist ein Enzym, das über eine N-terminale Aminosäureregion in Membranen verankert ist [OGATA et al., 1989; HONG und DOYLE, 1990]. Daneben wurden aber auch lösliche Formen der DP IV beschrieben [DUKE-COHAN et al., 1995; IWAKI-EGAWA et al., 1998].

Auf zelluärer Ebene kommt DP IV sowohl extrazellulär membranständig als auch intrazellulär vor. So exprimieren Leberzellen neben einer DP IV der Plasmamembran [BÜCHSEL, 1986;

ZUZEL et al., 1995] in Golgi-Vesikeln und in den Membranen des ER DP IV-Transportformen [LOCH et al., 1992; VOLZ et al., 1995].

Im Immunsystem wurde die Lokalisation der DP IV ebenfalls extrazellulär membranständig und intrazellulär beschrieben [KENNETT et al., 1996; STANGE et al., 1998]. So konnten MATTERN et al. [1995] in 30% CD26-negativer T-Zellen sowohl intrazelluläres CD26 als auch die dafür kodierende m-RNA detektieren. Darüber hinaus ist DP IV aus Lymphozyten durch eine hohe Heterogenität charakterisiert. So beschrieben KÄHNE et al. [1996] acht verschiedene enzymatisch aktive Formen der DP IV im Lysat PHA-stimulierter humaner Lymphozyten. Daneben gelang es den Autoren, deutliche Unterschiede der DP IV-Lokalisation in ruhenden und PHA-stimulierten Lymphozyten aufzuzeigen.

3.4.2 bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Derivate als Substrate zellulärer DP IV

Die Synthese der Substrate des $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ -Typs erfolgte unter der Annahme, daß Verbindungen mit apolaren Aminosäuren in P_2 -Position über bessere Penetrationseigenschaften verfügen und damit besonders für zytosolische DP IV zugänglich sein sollten. Verbindungen mit polaren Aminosäuren in dieser Position sollten die Zellmembran schlechter penetrieren und daher bevorzugt von membranständiger DP IV hydrolysiert werden. Auf diesem Wege wurde eine Differenzierung zytosolischer und membranständiger DP IV-Aktivität anhand der Lokalisation der Fluoreszenzfreisetzung angestrebt. Es wurden daher eine Anzahl von $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ -Substraten der DP IV mit $\text{Xaa} = \text{Gly, Ala, Abu, Leu, Ser}$ und Cha synthetisiert (2.1.1), die sich nach Bestimmung der Verteilungskoeffizienten in einem n-Oktanol/Puffer-System (3.2.7) deutlich in ihrer Hydrophobizität unterscheiden. $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ mit $\text{Xaa} = \text{Leu, Cha}$ und Abu sollten demnach als unpolare Verbindungen besser die Zellmembran penetrieren als Verbindungen mit $\text{Xaa} = \text{Gly, Ala}$ oder Ser .

Die monosubstituierten Dipeptidamido-rhodamin 110-Verbindungen und $(\text{Lys-Pro})_2\text{-R110}$ konnten aufgrund ihrer hohen Eigenfluoreszenz bzw. Instabilität nicht zu Messungen an zellulären Systemen herangezogen werden.

3.4.2.1 Substrathydrolyse durch Zellen, Zellysats und isolierte DP IV

Im Vergleich zur Hydrolyse der $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ -Verbindungen durch DP IV intakter U-937-Zellen, wurde die Substratspaltung durch DP IV des U-937-Zellysats und durch isolierte rekombinante humane DP IV (rh DP IV) untersucht. Um eine einheitliche Enzymaktivität aller Ansätze zu gewährleisten, wurde zunächst die enzymatische Aktivität von Zellen, Lysat und rh DP IV mittels der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA auf 25 pkat/ml Ansatz eingestellt (5.3.3). Für eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ml wurde eine enzymatische Aktivität von 25 pkat/ml ermittelt. Im Lysat der gleichen Anzahl von Zellen wurde die DP IV-Aktivität jedoch zu 30 pkat/ml

bestimmt. Aufgrund der Zellfragmentierung kann diese um ca. 17% höhere DP IV-Aktivität des Zellysats einerseits auf eine bessere Zugänglichkeit der DP IV für das Substrat oder andererseits auf eine zusätzliche Freisetzung intrazellulären Enzyms zurückgeführt werden.

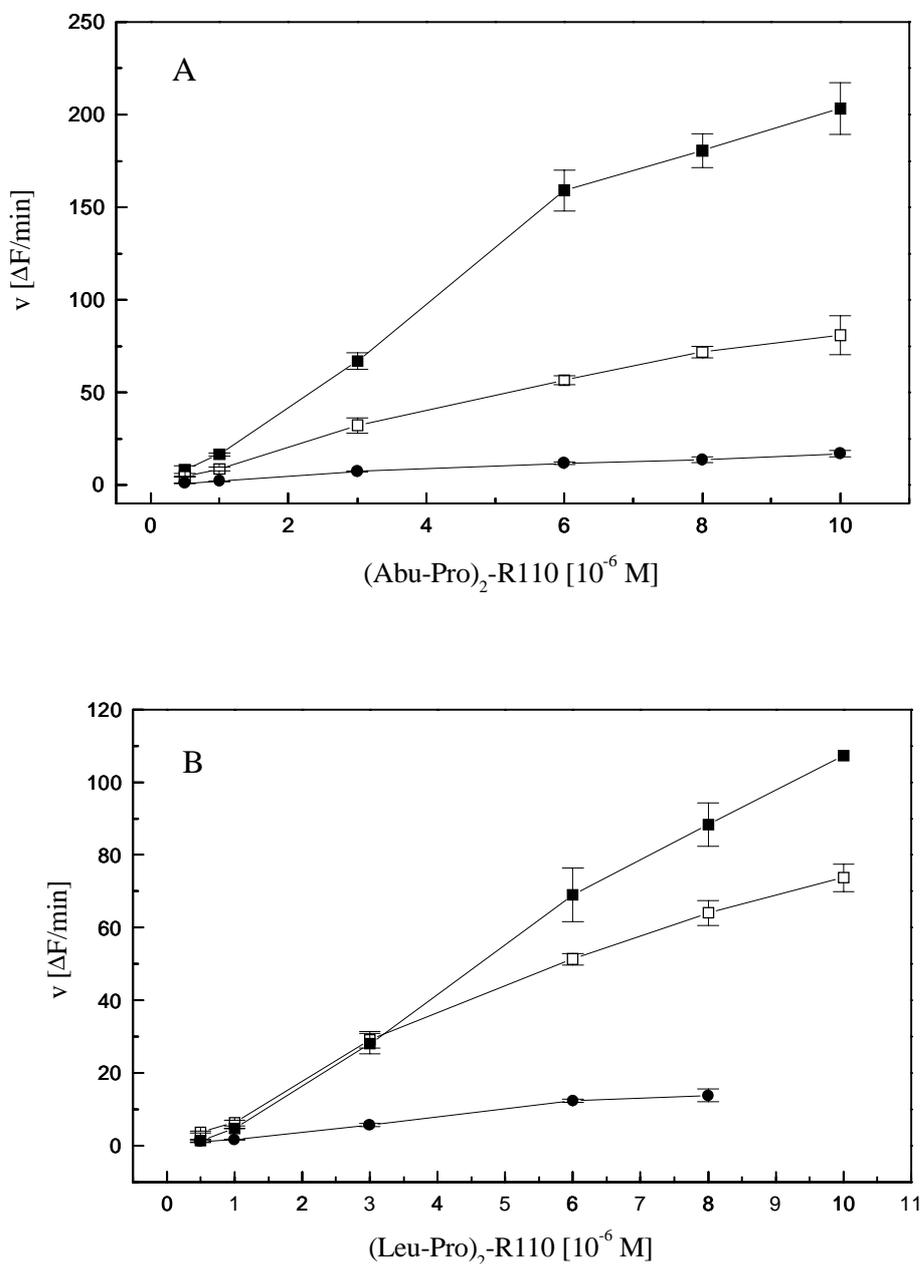


Abb. 23 Hydrolyse der Substrate (Xaa-Pro)₂-R110 durch DP IV intakter U-937-Zellen (●), DP IV des U-937-Zellysats (□) und isolierte rekombinante humane DP IV (■); A: (Abu-Pro)₂-R110, B: (Leu-Pro)₂-R110

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, Inkubation 5 min (rh DP IV), 20 min (U-937-Zellysat), 30 min (U-937-Zellen), 37°C; U-937-Zellen, U-937-Zellysat und rh DP IV einer Aktivität von 25 pkat/ml; Fluoreszenzplattenleser: $\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 525 \text{ nm}$, Lampenspannung 1.8 V)

Untersuchungen der Hydrolyse der (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen (Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser und Cha) durch DP IV der DP IV-reichen Zelllinie U-937 zeigten, daß alle Verbindungen Substrate des zellulären Enzyms sind. Bei identischen Substratkonzentrationen wurden jedoch deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzfreisetzung durch DP IV intakter Zellen (U-937), des Zellysats (U-937) sowie durch isolierte rekombinante humane DP IV sichtbar, obwohl die Enzymaktivitäten von Zellen, Lysat und rh DP IV im Ansatz auf eine identische Aktivität von 25 pkat/ml bezüglich der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA normiert waren (5.3.3). Für alle (Xaa-Pro)₂-R110-Substrate (Bsp. (Abu-Pro)₂-R110, Abb. 23A), mit Ausnahme von Xaa = Leu (Abb. 23B), wurde bei identischen Substratkonzentrationen durch Zellysat eine 5fach und durch rh DP IV eine 20fach erhöhte Fluoreszenzfreisetzung im Vergleich zur Fluoreszenzfreisetzung an intakten Zellen ermittelt.

Eine Ursache für die großen Unterschiede in der Fluoreszenzfreisetzung könnte in der sterischen Abschirmung des aktiven Zentrums der DP IV durch membranassoziierte Proteine bestehen. Die Interaktion des im Vergleich zum Dipeptid-pNA wesentlich größeren bis-(Dipeptidamido)-R110 mit der zellulären DP IV könnte daher aufgrund des Raumbedarfs des Rhodaminderivates eingeschränkt sein. Im Zellysat, in dem die zellulären Strukturen fragmentiert vorliegen, könnte das aktive Zentrum besser zugänglich sein, woraus eine schnellere enzymkatalysierte Hydrolyse resultiert. Ähnliche Effekte sollten für die stärkere Substrathydrolyse der bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen durch rh DP IV verantwortlich sein. Eine Fluoreszenzsteigerung infolge der Beteiligung intrazellulären Enzyms an der Substrathydrolyse im Zellysat kann unberücksichtigt bleiben, da die enzymatischen Aktivitäten von intakten Zellen und Lysat auf 25 pkat/ml angeglichen wurden. Die verringerte Fluoreszenzfreisetzung an Zellen und im Lysat im Vergleich zu isolierter DP IV kann aber auch mit einem Löschen der Fluoreszenz durch Zellbestandteile in Verbindung gebracht werden. So beträgt die Fluoreszenz des freien R110 bei einer Zellzahl, die einer enzymatischen Aktivität von 25 pkat/ml Ansatz entspricht, ca. 92% der Fluoreszenz einer zellfreien Lösung (3.2.6). Dieser vergleichsweise geringe Fluoreszenzunterschied allein kann jedoch nicht für die Unterschiede in den Fluoreszenzfreisetzungen nach Substrathydrolyse durch isolierte DP IV und DP IV intakter Zellen bzw. des Zellysats verantwortlich gemacht werden.

Ein Vergleich der durch die Substrathydrolyse an Zellen freigesetzten Fluoreszenz aller verwendeten (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen zeigte bei identischen Substratkonzentrationen geringe Unterschiede (nicht gezeigt). Eine genaue kinetische Charakterisierung der Substrathydrolyse konnte jedoch nicht vorgenommen werden, da aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz des R110 (3.2.5) und der Xaa-Pro-R110-Verbindungen, Messungen der Initialgeschwindigkeiten im Substratsättigungsbereich nicht möglich sind. Darüber hinaus verhindert die nahezu vollständige Überlappung der Fluoreszenzspektren von R110 und Xaa-Pro-R110 eine Quantifizierung beider Katalyseprodukte.

3.4.2.2 Spezifität der Hydrolyse der bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen durch DP IV intakter Zellen und des Zellysats

Die Spezifität der Hydrolyse der Substrate (Xaa-Pro)₂-R110 wurde mittels drei produktanaloger DP IV-Inhibitoren, Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid, Lys[Z(NO₂)]-piperidid und Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid, untersucht. Auf diesem Wege sollte abgesichert werden, daß die Substrate nur durch DP IV und keine anderen zellulären Enzyme hydrolysiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Hydrolyse aller Substrate sowohl an Zellen als auch im Lysat durch die genannten Inhibitoren nahezu vollständig gehemmt wird (Abb. 24 und Anhang A1). Für Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid und Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid wurde bereits bei einer Inhibitorkonzentration von 10⁻⁵ M im Ansatz eine ca. 90%ige Hemmung der Hydrolyse aller (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen an Zellen gefunden. Lediglich Lys[Z(NO₂)]-piperidid hemmt die Substrathydrolyse an Zellen und im Lysat schlechter (50% bis 80%).

Eine Beteiligung der DP II an der Substrathydrolyse durch Zellysate kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da eine Zerstörung der zellulären Strukturen eine Freisetzung der in den Lysosomen lokalisierten DP II zur Folge hat. Obwohl sich DP II und DP IV in ihrer Lokalisation, im Molekulargewicht, im pH-Optimum und in der N-terminalen Aminosäuresequenz unterscheiden [HUANG et al., 1996], ist die Substratspezifität beider Enzyme sehr ähnlich. So hydrolysiert DP II neben Xaa-Pro- auch Xaa-Ala-Dipeptide vom N-Terminus von Oligopeptiden. Daneben sind die als DP IV-spezifische Inhibitoren bekannten Aminoacyl-pyrrolidide und -thiazolidide ebenfalls gute Inhibitoren der DP II mit K_i-Werten im mikromolaren Bereich [STÖCKEL, 1997]. Da das pH-Optimum der DP II jedoch im sauren Bereich (5.5-6.0) liegt im Vergleich zum pH-Optimum der DP IV (7.6-7.8, [WOLF et al., 1978]), ist anzunehmen, daß die DP II-katalysierte Substrathydrolyse im Vergleich zur DP IV-katalysierten Hydrolyse bei pH 7.6 unterdrückt ist.

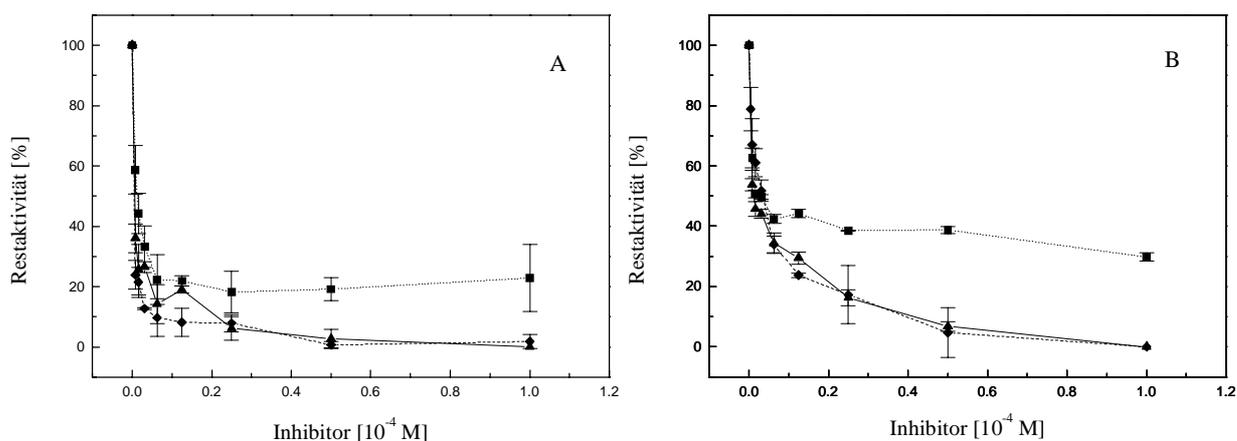


Abb. 24 Spezifität der Hydrolyse des Substrates (Abu-Pro)₂-R110 durch DP IV intakter U-937-Zellen (A) und des U-937-Zellysats (B) mittels DP IV-spezifischer Inhibitoren Lys[Z(NO₂)]-piperidid (■); Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid (◆) und Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid (▲) (Meßbedingungen: [(Abu-Pro)₂-R110] = 10⁻⁴ M, Inkubation 30 min, 37°C, U-937-Zellen und U-937-Zellysate von je 10⁶ Zellen/ml; Fluoreszenzplattenleser: λ_{Ex} = 488 nm, λ_{Em} = 525 nm, Lampenspannung 2.0 V)

3.4.2.3 Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse der Substrate (Xaa-Pro)₂-R110 durch zelluläre DP IV

Optische Testsysteme sind dann von Bedeutung, wenn es gelingt, geringste Mengen eines aktiven Enzyms, durch die enzymkatalysierte Hydrolyse eines geeigneten fluorogenen oder chromogenen Substrates nachzuweisen. Eine Voraussetzung dafür ist, daß das durch die enzymatische Hydrolyse freigesetzte Fluorophor oder Chromophor in niedrigen Konzentrationsbereichen noch sensitiv detektiert werden kann.

Die vergleichende Untersuchung der Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA und (Gly-Pro)₂-R110 durch isolierte DP IV (3.3.2) zeigte, daß das enzymkatalysiert freigesetzte Gly-Pro-R110 im Vergleich zum p-Nitroanilin ca. 4000fach sensitiver detektiert wird. In analoger Weise sollte die Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse der (Xaa-Pro)₂-R110-Substrate im Vergleich zur Hydrolyse von Gly-Pro-pNA durch zelluläre DP IV (U-937) untersucht werden.

Für die Hydrolyse einer 10⁻⁴ M Gly-Pro-pNA-Lösung wurde als Nachweisgrenze eine zelluläre DP IV-Aktivität von 4 pkat/ml ermittelt. Unterhalb dieser Enzymmenge, die einer Verringerung der Zellzahl unter 1.6·10⁵ Zellen/ml entspricht, konnte nach einer 30minütigen Inkubationszeit bei 37°C keine pNA-Freisetzung mehr gemessen werden.

Die Nachweisgrenze der Hydrolyse der untersuchten (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen durch zelluläre DP IV (U-937) liegt bei einer Substratkonzentration von 10⁻⁶ M und einer zellulären DP IV-Aktivität zwischen 1 und 2 pkat/ml Ansatz (Abb. 25). Die Hydrolyse der Substrate (Xaa-Pro)₂-R110 durch zelluläre DP IV ist demnach 400fach sensitiver als die Hydrolyse des Gly-Pro-pNA. Im Vergleich zum isolierten Enzym (3.3.2) stellt dieses Ergebnis eine um eine Größenordnung schlechtere Nachweisempfindlichkeit dar. Unterstützt wird dieser Befund durch die bereits dargestellten vergleichenden Messungen der (Xaa-Pro)₂-R110-Hydrolyse durch zelluläre DP IV, DP IV des Zellysats und rh DP IV, die gezeigt haben, daß die Fluoreszenzfreisetzung bei identischen Substratkonzentrationen an Zellen nur ca. 5% der Fluoreszenzfreisetzung durch isolierte DP IV entspricht. Unabhängig von der Größe oder Hydrophobizität der Aminosäure Xaa konnten keine signifikanten Unterschiede der Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse der einzelnen Substrate nachgewiesen werden (Abb. 25).

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Hydrolyse der Rhodaminsubstrate durch DP IV intakter Zellen offenbar aufgrund der Molekülgröße limitiert ist. Trotzdem sind die untersuchten Rhodamin-Derivate im Vergleich zu Dipeptid-p-nitroaniliden geeignetere Substrate, da es möglich ist, mit einer wesentlich geringeren Substratkonzentration im Ansatz enzymatische Aktivität nachzuweisen.

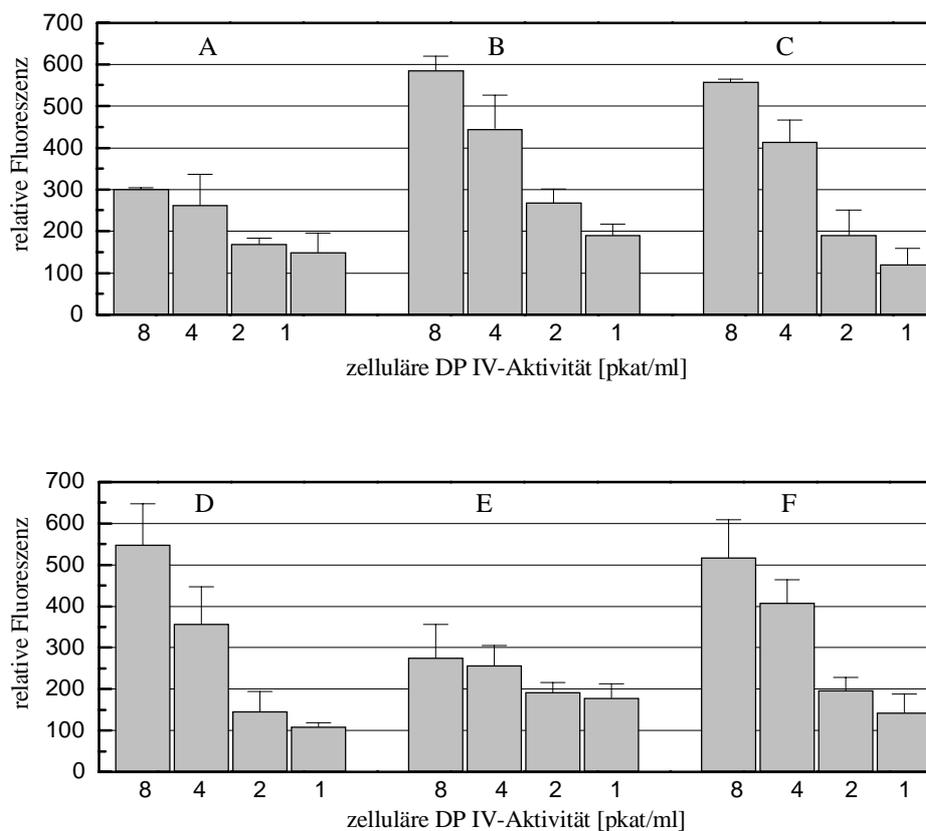


Abb.25 Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse der Verbindungen $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ durch DP IV DP IV-reicher U-937-Zellen; A: $(\text{Gly-Pro})_2\text{-R110}$, B: $(\text{Ala-Pro})_2\text{-R110}$, C: $(\text{Abu-Pro})_2\text{-R110}$, D: $(\text{Leu-Pro})_2\text{-R110}$, E: $(\text{Ser-Pro})_2\text{-R110}$, F: $(\text{Cha-Pro})_2\text{-R110}$
(Meßbedingungen: PBS, $\text{pH} = 7.2$, $[\text{S}] = 10^{-6} \text{ M}$; Inkubation 30 min, 37°C ; Fluoreszenzplattenleser: $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$, Lampenspannung 4.0 V)

3.4.2.4 Beurteilung der $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ -Verbindungen hinsichtlich ihrer Eignung zur Differenzierung zellulärer DP IV-Aktivität

Die Verbindungen $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ (Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser und Cha) sind spezifische und sensitive Substrate zellassoziierter DP IV.

Eine Differenzierung zwischen extrazellulär-membranständiger und intrazellulärer DP IV anhand der Lokalisation der Fluoreszenzfreisetzung mittels Fluoreszenzmikroskopie war nicht möglich (nicht gezeigt). Die Ursache dafür ist in der Diffusion des durch die enzymkatalysierte Hydrolyse freigesetzten R110 bzw. Xaa-Pro-R110 zu sehen, woraus eine hohe Hintergrundfluoreszenz des Mediums resultiert. Darüber hinaus penetrieren möglicherweise beide Hydrolyseprodukte in die intakten Zellen und verursachen dort eine unspezifische Fluoreszenz der gesamten Zelle, die keine Differenzierung zwischen stark oder schwach fluoreszierenden Regionen erlaubt.

Im Gegensatz zu dem unter 3.2.3 erwähnten R123, das bevorzugt in Mitochondrien angereichert wird, beschrieben JEANNOT et al. [1997] für R110 eine weniger spezifische Akkumulation. So ist nach ihren Untersuchungen R110 nur zum Teil in Mitochondrien lokalisiert. Darüber hinaus wurde eine Verteilung des Fluorophors über den gesamten intrazellulären Raum, einschließlich der Kernregion, beschrieben. Diese Befunde decken sich mit unseren Beobachtungen. Daneben zeigten die Autoren, daß die R110-Aufnahme in intakte Zellen im Gegensatz zur R123-Aufnahme erst nach ca. 10 h ($25\mu\text{M}$ R110) in den Sättigungsbereich eintritt. Nach Waschen der Zellen ist der vollständige R110-Austritt aus den Zellen in das umgebende Medium jedoch bereits nach 30 min abgeschlossen.

Unsere Untersuchungen hinsichtlich der Diffusion des R110 aus zuvor mit einer R110-Lösung inkubierten Zellen ($[\text{R110}] = 10^{-6} \text{ M}$, 2 h) zeigten ebenfalls einen extrem schnellen Austritt des Fluorophors in das Medium (Abb. 26).

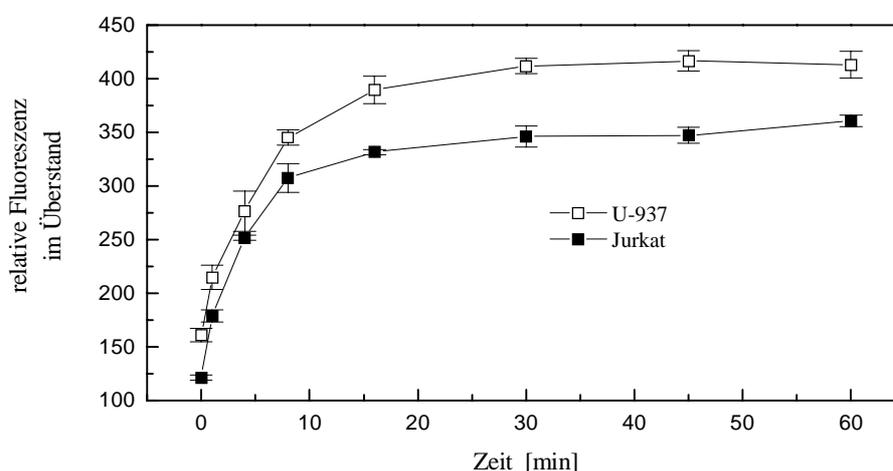


Abb. 26 Austritt von R110 aus intakten Zellen (■ Jurkat-Zellen, □ U-937-Zellen)

(Meßbedingungen: PBS, $\text{pH} = 7.2$, $[\text{R110}] = 10^{-6} \text{ M}$; Inkubation bis 120 min, 37°C ;
Fluoreszenzspektrometer: $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Exp, Emsp}} = 2.5 \text{ nm}$)

Die Substrate $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ eignen sich daher nicht für eine Differenzierung zellulärer DP IV-Aktivität, wohl aber für die Bestimmung der Gesamt-DP IV-Aktivität innerhalb eines Meßansatzes. Aufgrund der deutlich verbesserten Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse dieser Verbindungen im Vergleich zur Hydrolyse der bisher angewendeten Dipeptid-p-nitroanilide, stellen $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ -Substrate eine echte Alternative für qualitative Enzymaktivitätsuntersuchungen auf zellulärer Ebene dar.

Eine Quantifizierung des enzymatisch freigesetzten R110 bzw. der Xaa-Pro-R110 -Verbindungen war nicht möglich, da sich die Fluoreszenzspektren beider Spezies nahezu vollständig überlagern und so eine Unterscheidung zwischen R110 und Xaa-Pro-R110 erschwert wird.

3.4.3 Verbindungen des Typs Xaa-Pro-R110-Y als Substrate zellulärer DP IV

Mit Hilfe der DP IV-Substrate (Xaa-Pro)₂-R110 war aufgrund des Abdiffundierens der nach der Substrathydrolyse erhaltenen Spaltprodukte R110 und Xaa-Pro-R110 keine Differenzierung zellulärer DP IV-Aktivität möglich. Eine Voraussetzung dafür besteht in der stabilen Markierung der Zellen durch die nach der enzymkatalysierten Substrathydrolyse freigesetzten fluorogenen Spaltprodukte.

Daher wurden ausgehend von den monosubstituierten Gly-Pro-R110- und Ala-Pro-R110-Verbindungen unsymmetrisch substituierte R110-Derivate des Typs Xaa-Pro-R110-Y synthetisiert (2.1.2). Y stellt dabei eine funktionelle Gruppe dar, die über einen Spacer an der freien Aminogruppe des Xanthengerüsts des Xaa-Pro-R110 gebunden ist. Auf diese Weise entstanden bifunktionelle Verbindungen, die einerseits einen für die DP IV-Erkennung spezifischen Substratteil Xaa-Pro- tragen und andererseits über eine funktionelle Gruppe Y (Y₂ bis Y₉) zur kovalenten Fixierung der R110-Derivate an der Zelloberfläche verfügen. Dabei sollte die Verknüpfung des Fluorophors R110-Y mit der Zelle über SH- und NH₂-reaktive Substituenten (Alkylhalogenide, Maleinimide) erfolgen. Der Einfluß der Spacerlänge und der Reaktivität der funktionellen Gruppe auf eine stabile zelluläre Fluoreszenzmarkierung sollte untersucht werden.

Die in Abb. 27 aufgeführten Verbindungen wurden zu Untersuchungen an Zellen der DP IV-reichen myeloischen Zelllinie U-937 eingesetzt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Bestimmung der extrazellulär membranständigen DP IV-Aktivität. Gly-Pro-R110-Y₁, welche als einzige Verbindung mit einem Acetylrest keine funktionelle Gruppe aufweist, sollte dabei als Vergleichssubstanz dienen. Die Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y mit Y₂ bis Y₉ als reaktiver Ankergruppe dürften vorzugsweise an auf der Zelloberfläche lokalisierte thiolhaltige Proteine binden. Eine Reaktion mit Aminogruppen wird daher nur von untergeordneter Bedeutung sein.

Die als Anker eingesetzten Alkyl/Arylhalogenide (Y₂ bis Y₆) reagieren in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit SH- bzw. NH₂-Gruppen. Mit den als Anker eingesetzten Maleinimiden (Y₇ bis Y₉) reagieren SH-Gruppen in einer Additionsreaktion an die aktivierte Doppelbindung des Maleinimids.

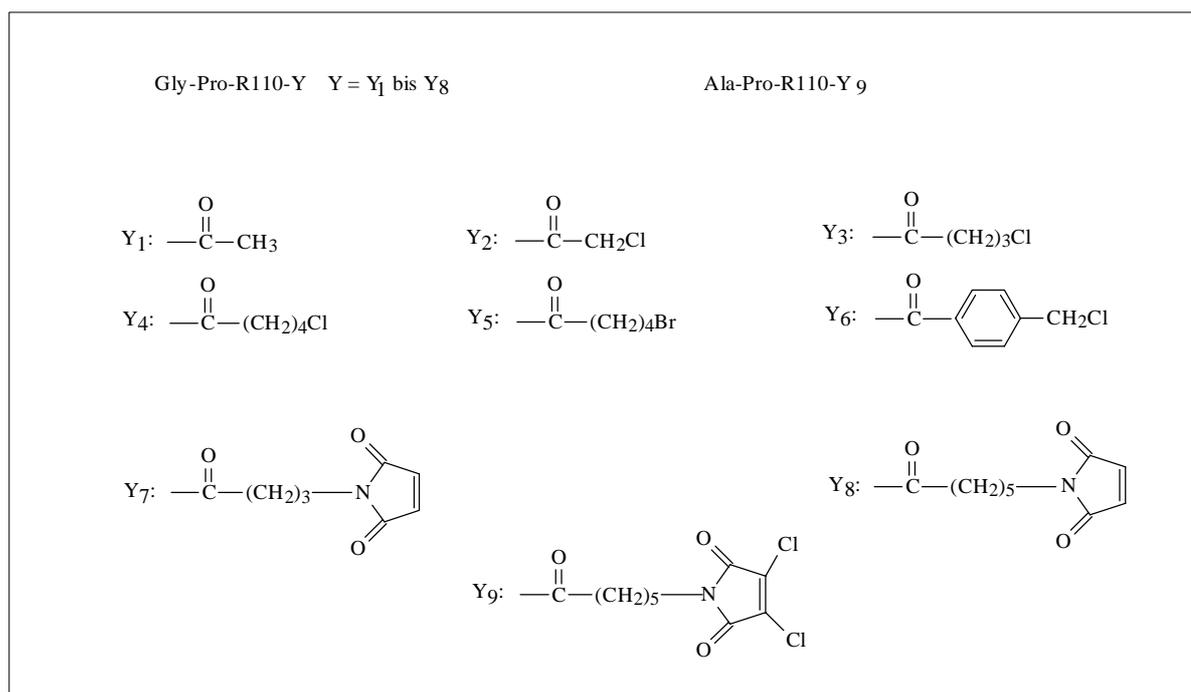


Abb. 27 *Synthetisierte Xaa-Pro-R110-Y-Derivate*

3.4.3.1 **Substrathydrolyse durch zelluläre DP IV**

Um zu untersuchen, ob die synthetisierten Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y Substrate der DP IV der myeloischen Zelllinie U-937 sind, wurden die Zellen mit variierenden Konzentrationen von Xaa-Pro-R110-Y bei 37°C inkubiert und die **Fluoreszenzfreesetzung im Ansatz** nach 30 min bestimmt. So konnte nachgewiesen werden, daß alle Verbindungen von zellulärem Enzym hydrolysiert werden. Die Fluoreszenzfreesetzung bei identischen Konzentrationen der unterschiedlichen Substrate variiert jedoch stark (Abb. 28, Anhang A2). So werden im Falle der Substrate Gly-Pro-R110-Y mit identischem Substratteil aber unterschiedlicher Ankerstruktur (Y₁ bis Y₈), die Verbindungen mit einem flexiblen Anker besser hydrolysiert als Verbindungen mit einem voluminösen und damit sterisch anspruchsvollen Rest oder mit einem sehr kurzen Spacer. Daraus läßt sich ableiten, daß die Größe des Restes Y einen die Substrathydrolyse limitierenden Faktor darstellt.

Die Fluoreszenzintensität des R110 und der monosubstituierten R110-Derivate verhält sich nur bis zu einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ M linear (**3.2.5**). Die Anwendung der Rhodaminsubstrate für kinetische Untersuchungen unter Ausnutzung der Fluoreszenz ist daher limitiert. Eine genaue kinetische Charakterisierung der Hydrolyse der Substrate Xaa-Pro-R110-Y konnte somit nicht durchgeführt werden, da Messungen der Initialgeschwindigkeiten im Substratsättigungsbereich nicht möglich waren.

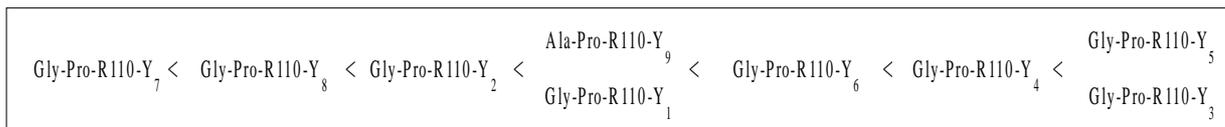


Abb. 28 Hydrolyse der Substrate Xaa-Pro-R110-Y mit Xaa = Gly und Ala und Y = Y₁ bis Y₉

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7,2, U-937-Zellen einer DP IV-Aktivität von 25 pkat/ml Ansatz; Inkubation 30 min, 37°C; Fluoreszenzplattenleser: $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$; Lampenspannung 2.0 V)

Ein Unterschied in der Fluoreszenzfreisetzung im gesamten Ansatz im Vergleich zur **Fluoreszenzfreisetzung an Zellen** wurde bei einer durchflußzytometrischen Messung der Hydrolyse einer $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Lösung der Substrate Gly-Pro-R110-Y (Y₂ bis Y₈) und Ala-Pro-R110-Y₉ beobachtet (Abb. 29). Die Hydrolyse dieser Verbindungen durch zelluläre DP IV resultiert in einer deutlich höheren zellassozierten Fluoreszenz als die Hydrolyse von Gly-Pro-R110-CO-CH₃ (Y₁). In jedem Fall bewirkt also die Einführung einer reaktiven Gruppe am Xaa-Pro-R110-Molekül (Y₂ bis Y₉) eine um ein Vielfaches höhere zelluläre Fluoreszenz im Vergleich zur zellulären Fluoreszenz, die nach der Hydrolyse des Gly-Pro-R110-CO-CH₃ gemessen wurde (Abb. 29).

Die Unterschiede zwischen der Fluoreszenzfreisetzung im gesamten Ansatz (Abb. 28) und der Fluoreszenzfreisetzung an den Zellen (Abb. 29), lassen Rückschlüsse auf die Reaktivität der Anker Y und deren Eignung für Quantifizierungszwecke zellassoziierter DP IV zu.

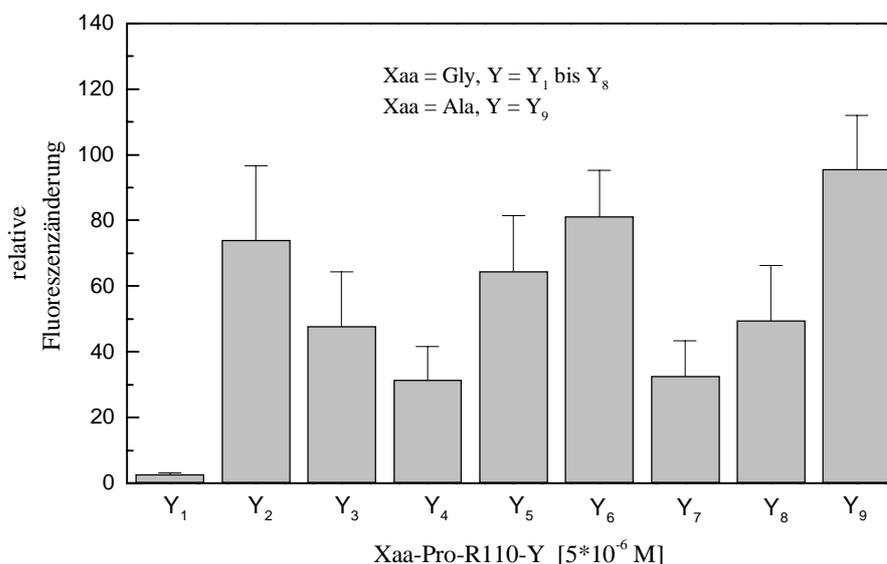


Abb. 29 Darstellung der zellulären Fluoreszenz (U-937) nach der Hydrolyse von Xaa-Pro-R110-Y (Y₁ bis Y₉) und dreimaligem Waschen der Zellen

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7,2, U-937-Zellen $2 \cdot 10^5$ Zellen/Ansatz; Inkubation 20 min, 37°C; Durchflußzytometer: $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 530/30 \text{ nm} = \text{FL1}$)

3.4.3.2 Spezifität der Substrathydrolyse durch zelluläre DP IV

Die Spezifität der Hydrolyse der Substrate Xaa-Pro-R110-Y durch zelluläre DP IV wurde in Analogie zu den bis-(Dipeptidamido)-rhodaminen mit zwei produktanalogen DP IV-Inhibitoren (Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid und Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Hydrolyse aller Substrate an Zellen durch die genannten Inhibitoren nahezu vollständig inhibiert wird (Abb. 30 und Anhang A3). Für beide Hemmstoffe wurde bereits bei einer Inhibitorkonzentration von 10⁻⁵ M im Ansatz eine ca. 90%ige Hemmung der Hydrolyse aller Xaa-Pro-R110-Y-Verbindungen an Zellen gemessen.

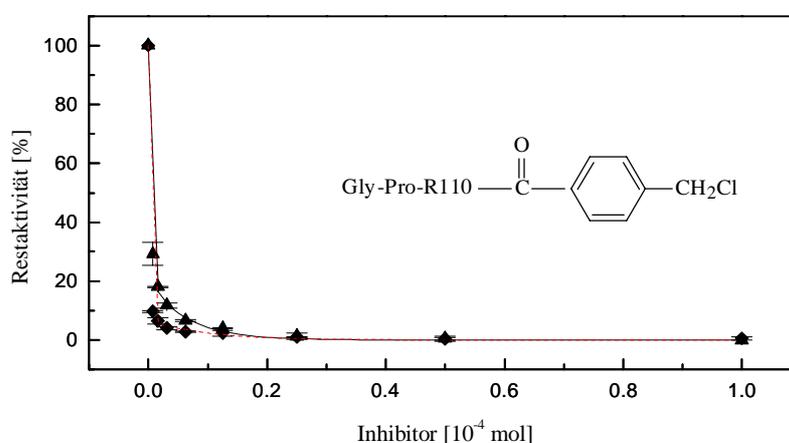


Abb. 30 Hemmung der Hydrolyse von Gly-Pro-R110-CO-C₆H₄-CH₂Cl (Gly-Pro-R110-Y₆) durch DP IV-spezifische Inhibitoren Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid (◆) und Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid (▲) (Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, U-937-Zellen 10⁶ Zellen/ml; Inkubation 30 min, 37°C; Fluoreszenzplattenleser: λ_{Ex} = 488 nm, λ_{Em} = 525 nm, Lampenspannung 2.5 V)

3.4.3.3 Untersuchung der Eignung der Ankersubstrate zur Bindung an Zelloberflächen

Die Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y wurden mit dem Ziel synthetisiert, über den Anker Y eine kovalente Fixierung der R110-Derivate an der Zelle zu erreichen. Die Eignung der Anker Y₂ bis Y₉ für diese Zwecke, wurde durch Inkubation DP IV-reicher U-937-Zellen mit identischen Konzentrationen der jeweiligen Substrate untersucht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die zellassoziierte Fluoreszenz der Hydrolyseprodukte R110-Y im Ansatz sowie nach ein bis vier Waschrufen bestimmt. Auf diesem Wege konnten die Verbindungen hinsichtlich der Reaktivität der Ankerstruktur klassifiziert werden (Abb. 31A bis D, Tab. 13).

Gly-Pro-R110-Y₁ bzw. R110-Y₁ mit einer Acetylgruppe als Rest Y, kann in keiner Weise mit SH-Gruppen reagieren. Für diese Verbindungen können daher nur schwache hydrophobe Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen auf oder in der Zelle diskutiert werden. Entsprechend dieser Annahme, wurde für das Hydrolyseprodukt R110-Y₁ nach vier

Waschschritten nur noch eine zellassozierte Fluoreszenz von 2.6% der zellassozierten Fluoreszenz im Ansatz gefunden (Abb. 31A). Die größte Menge des enzymatischen Spaltproduktes R110-Y₁ diffundiert frei in Lösung.

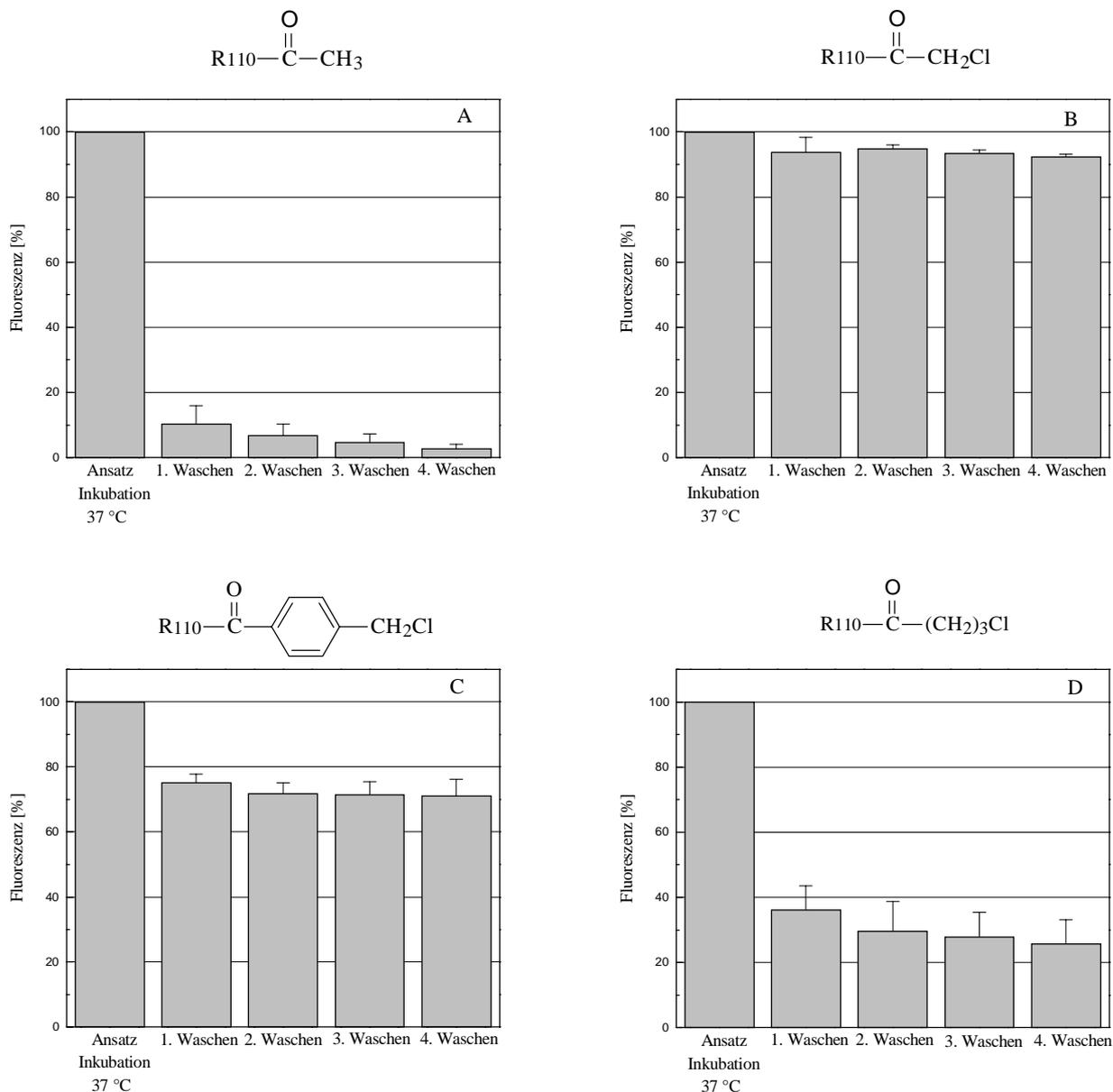


Abb. 31 Fluoreszenz an DP IV-reichen U-937-Zellen nach Inkubation mit Substraten der Struktur Xaa-Pro-R110-Y

A bis D stellen die Unterschiede der nach der Substrathydrolyse gemessenen zellassozierten Fluoreszenz im Ansatz sowie nach ein bis vier Waschschritten dar

Substrate: Gly-Pro-R110-Y (Y = Y₁, Y₂, Y₃ und Y₆)

A: Y = Y₁, B: Y = Y₂, C: Y = Y₆; vergleichbar mit Y₇, Y₈ und Y₉, D: Y = Y₃; vergleichbar mit Y₄, Y₅

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, U-937-Zellen 10⁶ Zellen/ml; [Xaa-Pro-R110-Y] = 5 · 10⁻⁶ M; Inkubation 30 min, 37°C; Durchflußzytometer: λ_{Ex} = 488 nm, λ_{Em} = 530/30 nm = FL1)

Die Verbindungen Gly-Pro-R110-Y mit Y₂ bis Y₆ besitzen als Rest Y SH-reaktive Halogenalkylcarbonyl(Y₂ bis Y₅)- bzw. Chlormethylbenzoyl(Y₆)-Strukturen. Diese Reste reagieren mit Nucleophilen (-SH-Gruppen) über eine nucleophile Substitutionsreaktion unter Ausbildung einer kovalenten C-S-Bindung. Das Nucleofug (-Halogen) wird in Form des Halogenwasserstoffs freigesetzt. Die Reaktivität der Verbindungen hängt wesentlich von der Reaktivität der Abgangsgruppe ab.

So wurde für das Hydrolyseprodukt R110-Y₂, mit einer Chloracetylgruppe als Rest Y, nach vier Waschschrinen eine zellassozierte Fluoreszenz von 92.4% im Vergleich zur zellassozierten Fluoreszenz im Ansatz gefunden (Abb. 31B). Diese hohe Fluoreszenz deutet auf eine hohe Reaktivität der Ankerstruktur hin, der Anteil der Verbindung R110-Y₂ in Lösung ist daher nur gering. Die hohe Reaktivität des Chloracetylrestes ist auf die dem Halogenatom unmittelbar benachbarte Carbonylfunktion zurückzuführen.

Tab. 13 Restfluoreszenz an DP IV-reichen U-937-Zellen nach Inkubation mit Substraten der Struktur Xaa-Pro-R110-Y

Substrat: Xaa-Pro-R110-Y			Ansatz Fluoreszenz [%]	1. Waschen Fluoreszenz [%]	2. Waschen Fluoreszenz [%]	3. Waschen Fluoreszenz [%]	4. Waschen Fluoreszenz [%]
Gr.	Xaa	Y					
A	Gly	Y ₁	100	10.40 ± 5.40	6.84 ± 3.40	4.62 ± 2.67	2.73 ± 1.28
B	Gly	Y ₂	100	93.84 ± 4.43	94.82 ± 1.24	93.50 ± 0.91	92.50 ± 0.78
C	Gly	Y ₆	100	75.23 ± 2.58	71.81 ± 3.29	71.50 ± 3.93	71.03 ± 5.14
	Gly	Y ₇	100	89.56 ± 8.73	78.09 ± 9.39	71.04 ± 8.28	67.54 ± 8.79
	Gly	Y ₈	100	88.46 ± 6.26	80.36 ± 9.51	74.78 ± 8.81	72.42 ± 9.40
	Ala	Y ₉	100	93.59 ± 5.46	85.31 ± 9.83	80.26 ± 9.63	77.39 ± 9.57
D	Gly	Y ₃	100	36.18 ± 7.34	29.65 ± 9.04	27.97 ± 7.55	25.72 ± 7.48
	Gly	Y ₄	100	24.77 ± 5.44	14.07 ± 5.38	11.91 ± 4.26	9.91 ± 3.91
	Gly	Y ₅	100	42.77 ± 0.82	36.94 ± 5.02	35.36 ± 5.87	32.90 ± 7.02

(Messbedingungen: PBS, pH = 7.2, U-937-Zellen 10⁶ Zellen/ml; [Xaa-Pro-R110-Y] = 5·10⁻⁶ M, Inkubation 30 min, 37°C; Durchflußzytometer: λ_{Ex} = 488 nm, λ_{Em} = 530/30 nm = FL1)

Für alle anderen eingesetzten DP IV-Substrate Gly-Pro-R110-Y mit Y als Halogenalkylcarbonyl-Rest (Y₃, Y₄ und Y₅) wurde eine deutlich geringere zellassozierte Fluoreszenz der Hydrolyseprodukte nach vier Waschschrinen detektiert (Tab. 13, Abb. 31D). Dies dürfte auf den größeren Abstand der Abgangsgruppe zur Carbonylfunktion zurückzuführen sein.

Die Reaktivität des Chlormethylbenzoyl-Ankers und die Reaktivität aller verwendeten Maleinimidanker liegen mit einer zellassozierten Fluoreszenz der Spaltprodukte nach vier Waschschrinen von ca. 70% in der gleichen Größenordnung (Abb. 31C, Tab. 13). Die SH-Gruppen reagieren mit den als Anker eingesetzten Maleinimiden in Form einer Additionsreaktion an die reaktivierte Doppelbindung des Maleinimids unter Ausbildung einer Einfachbindung. Die Spacerlänge zwischen funktioneller Gruppe und der in die Amidbindung

zum R110 involvierten Carbonylfunktion beeinflusst die Reaktivität des Ankers nicht. Vielmehr sollte eine Reaktivierung der Doppelbindung durch zusätzliche Chlorierungen des Maleinimids erreicht werden. Nach der Hydrolyse der von uns untersuchten Verbindung Ala-Pro-R110-Y₉ mit Y₉ als 2,3-Dichlormaleinimido-pentanoyl-Anker wurde mit einer zellassozierten Fluoreszenz des Spaltproduktes R110-Y₉ von 77.4% jedoch keine wesentlich verbesserte Bindung im Vergleich zu der Verbindung mit einem Maleinimido-pentanoyl- oder einem Maleinimido-propanoyl-Anker erreicht (72.1% und 67.6%, Tab. 13).

Mit den Rhodamin-Derivaten Xaa-Pro-R110-Y stehen Verbindungen zur Verfügung, die eine stabile Bindung des nach der Substrathydrolyse freigesetzten Fluorophors an der Zelle ermöglichen.

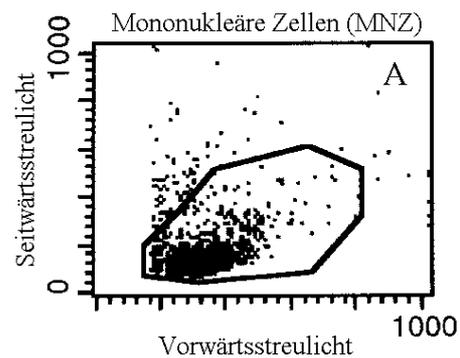
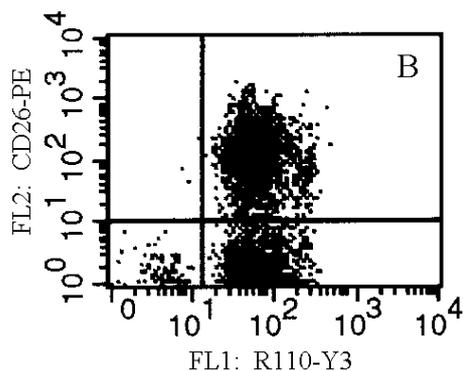
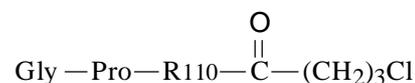
3.4.3.4 Differenzierung der Enzymaktivität auf Zelloberflächen mittels der Durchflußzytometrie

Die Bestimmung enzymatischer Aktivitäten (DP IV) auf zellulärer Ebene ist besonders dann von Bedeutung, wenn es gelingt, innerhalb einer Population von in ihrer enzymatischen Aktivität differierenden Zellen, eine Unterscheidung zwischen enzymatisch aktiven und enzymatisch inaktiven Zellen zu erreichen. Eine solche Enzymaktivitätsdifferenzierung könnte die Unterscheidung von DP IV-stark- und DP IV-schwach-exprimierenden Zellen mittels einer anti-CD26-spezifischen Antikörperfärbung hervorragend ergänzen.

Zu diesem Zwecke wurden die von uns synthetisierten Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y (Y₂ bis Y₉) hinsichtlich ihrer Hydrolyse durch zelluläre DP IV von aus Vollblut separierten mononukleären Zellen (MNZ) untersucht. Es handelt sich dabei um Zellen, zu denen neben Monozyten auch ein großer Anteil von Lymphozyten gehört. Lymphozyten sind durch eine einheitliche Zellgröße und Granularität charakterisiert. In ihrer CD26-Expression lassen sie sich jedoch in eine CD26-positive und eine CD26-negative Zellfraktion unterteilen. Wie unter 3.1.4 erwähnt, wird CD26 von CD4-positiven Zellen exprimiert, die den Fc-Receptor für IgM tragen.

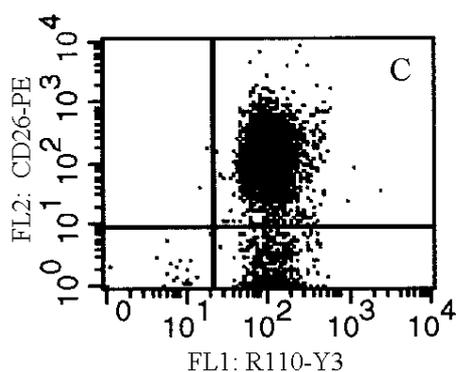
Die mittels anti-CD26-spezifischer Antikörper nachweisbare durchflußzytometrische Differenzierung der Lymphozyten sollte auch mittels DP IV-spezifischer Substrate Xaa-Pro-R110-Y (Y₂ bis Y₉) untersucht werden.

Es wurde daher eine Doppelmarkierung der Zellen unter Anwendung eines PE-markierten anti-CD26-Antikörpers und der von uns synthetisierten Substrate vorgenommen. Die Antikörperbindung beeinflusst die enzymatische Aktivität dabei in keiner Weise. PE und R110-Y werden bei einer identischen Wellenlänge angeregt ($\lambda = 488$ nm), emittieren Fluoreszenz jedoch bei unterschiedlichen Wellenlängen (PE: $\lambda = 578$ nm; R110-Y: $\lambda = 525$ nm), wodurch eine Differenzierung beider Fluorophore möglich ist. Durch eine zweidimensionale Auftragung der gemessenen Antikörperfluoreszenz gegen die nach der Substrathydrolyse gemessene Fluoreszenz des R110-Y der jeweils eingegrenzten Zellen (Abb. 32B bis 32D), können beide Färbungen miteinander korreliert werden.

Substrat: Gly-Pro-R110-Y₃

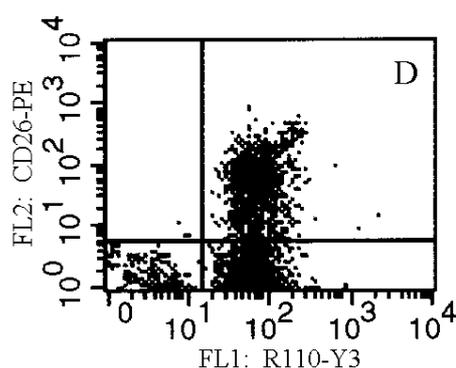
Tab. B: MNZ gesamt

Quadrant	% Zellen im Auswertefenster	X mittl. Fl.-Int.	Y mittl. Fl.-Int.
OR	46.85	78.64	180.90
UR	51.19	64.81	1.99



Tab. C: MNZ CD26-positive Zellfraktion

Quadrant	% Zellen im Auswertefenster	X mittl. Fl.-Int.
OR	90.12	112.41
UR	9.42	121.89



Tab. D: MNZ CD26-negative Zellfraktion

Quadrant	% Zellen im Auswertefenster	X mittl. Fl.-Int.
OR	29.86	71.53
UR	66.31	57.32

Abb. 32 Darstellung der anti-CD26-PE-Antikörperfärbung als Funktion der durch DP IV-spezifische Hydrolyse von Gly-Pro-R110-Y₃ gemessenen zellulären R110-Y-Fluoreszenz (A: Punkthistogramm-darstellung der gemessenen Zellen, B: MNZ gesamt, C: Fraktion CD26-positiver MNZ, D: Fraktion CD26-negativer MNZ)

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, MNZ 2·10⁵ Zellen/Ansatz; [S] = 5·10⁻⁶ M, 20 min, 37°C; Durchflußzytometer: λ_{Ex} = 488 nm, λ_{Em} = 530/30 nm (FL1, R110-Y₃), λ_{Em} 585/42 nm (FL2, CD26-PE))

Nach anti-CD26-Antikörperfärbung der MNZ konnten zwei Lymphozytenpopulationen (CD26-positive Zellen und CD26-negative Zellen) anhand deutlich variierender Antikörperfluoreszenz unterschieden werden (Abb. 32B). Beim Einsatz aller von uns synthetisierten Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y (Y_2 bis Y_9) wurde jedoch für beide Zellpopulationen eine nahezu einheitliche R110-Y-Fluoreszenz als Resultat der zellulären DP IV-Hydrolyse detektiert. Nach einer Trennung beider Populationen unter Erhalt einer zu ca. 90% aus DP IV-reichen Lymphozyten (Abb. 32C) und einer zu ca. 70% aus DP IV-armen Lymphozyten (Abb. 32D) bestehenden Population konnte jedoch gezeigt werden, daß beide isolierten Zellpopulationen eine variierende R110-Y-Fluoreszenz aufweisen. Liegen die Zellen innerhalb einer weitgehend enzymatisch einheitlichen Population vor, ist eine Enzymaktivitätsdifferenzierung möglich. Im Falle eines Gemisches DP IV-reicher und DP IV-armer Zellen ist dies jedoch nicht möglich.

Die Ursachen dafür können vielfältig sein. Einerseits ist ungeklärt, in welcher Weise die Substrathydrolyse bzw. Substratbindung an den Zellen zustande kommt. So kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob zunächst die Substrathydrolyse und danach die R110-Y-Bindung oder ob die Substrathydrolyse nach der Substratbindung an der Zelle erfolgt. Andererseits ist es denkbar, daß das nach enzymatischer Hydrolyse freigesetzte R110-Y von der Zelle abdiffundiert und an einer anderen, möglicherweise DP IV/CD26-negativen Zelle, bindet.

Ein weiterer Aspekt, der ebenfalls nicht vernachlässigt werden sollte, ist die wechselseitige Beeinflussung der Zellen untereinander. So besteht die Möglichkeit, daß DP IV/CD26 einer Zelle das auf einer Nachbarzelle gebundene Substrat hydrolysiert. Darüber hinaus könnte DP IV/CD26 von der Zelle abgeschieden (shedding) werden. Das dann in Lösung vorliegende Enzym könnte in der Lage sein, an der Zelloberfläche gebundenes Substrat zu hydrolysieren. Einigen dieser Fragen soll im folgenden nachgegangen werden.

3.4.3.5 Substrathydrolyse von an Zelloberflächen gebundenen Substraten durch zelluläre DP IV

Separierte mononukleäre Zellen wurden mit dem jeweiligen Substrat Xaa-Pro-R110-Y (Y_2 bis Y_9) in Gegenwart des spezifischen DP IV-Inhibitors Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid inkubiert. Unter diesen Bedingungen binden die Substrate an der Zelle, werden jedoch aufgrund der Hemmung der zellulären DP IV-Aktivität nicht hydrolysiert. Nach dem Abwaschen des Inhibitors und einer weiteren Inkubation dieser Zellen (20 min, 37°C) wurde die zellassozierte Fluoreszenz der Hydrolyseprodukte R110-Y durchflußzytometrisch gemessen. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Zellen in der Lage sind, gebundenes Substrat zu hydrolysieren bzw. ob in Gegenwart DP IV-reicher Zellen (U-937) oder isolierter DP IV eine zusätzliche Zunahme der zellassozierten Fluoreszenz der MNZ beobachtet wird. Dies würde Rückschlüsse auf die Hydrolyse zellgebundener Substrate durch DP IV von Nachbarzellen oder isolierte DP IV zulassen.

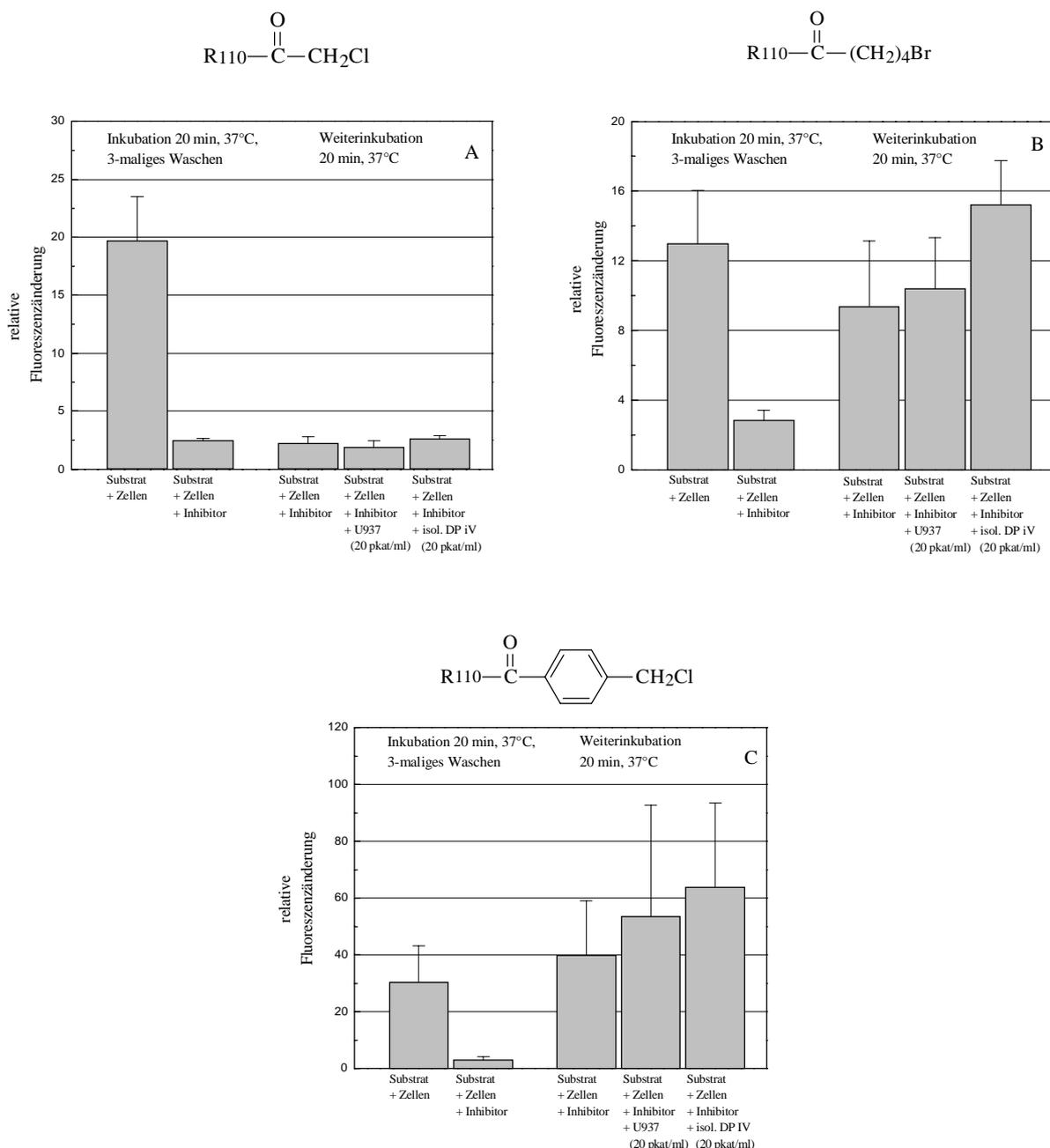


Abb. 33 Untersuchung der Hydrolyse von MNZ-gebundenen Substraten durch zelleigene DP IV, isolierte DP IV und DP IV auf Nachbarzellen (U-937)

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, $[S] = 5 \cdot 10^{-6}$ M, $[Lys[Z(NO_2)]\text{-thiazolidid}] = 10^{-4}$ M, Inkubation jeweils 20 min, 37°C, MNZ 10^6 Zellen/ml, Durchflußzytometer: $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 530/30$ nm = FL1)

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen machen deutlich, daß in Abhängigkeit der Länge der Ankerstruktur Y eine Hydrolyse von MNZ-gebundenem Substrat sowohl durch DP IV-reiche Nachbarzellen (U-937) als auch durch dem Ansatz zugesetzte isolierte DP IV möglich ist.

So wird das Substrat mit einem sehr kurzen Anker (Chloracetyl(Y_2)-) bei Bindung an die Zelle (MNZ) auch in Gegenwart isolierter DP IV nicht hydrolysiert (Abb. 33A). Für Substrate mit einem längeren Anker (Brombutyryl(Y_5)- oder Chlormethylbenzoyl(Y_6)-) wurde im

Gegensatz dazu eine deutliche Zunahme der zellassoziierten (MNZ) Fluoreszenz nach Weiterinkubation der MNZ in Gegenwart DP IV-reicher U-937-Zellen sowie in Gegenwart isolierter DP IV (Abb. 33B und 33C) beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Zellen innerhalb eines Ansatzes durchaus in der Lage sind, Substrate, die an benachbarten Zellen gebunden sind, zu hydrolysieren.

Daneben wurde dem Aspekt des Freisetzens (shedding) von zellulärer DP IV, die dann als lösliches Enzym ebenfalls zellverankertes Substrat spalten könnte, nachgegangen. Es wurde die zeitabhängige Zunahme der DP IV-Aktivität im Überstand einer U-937-Zellsuspension einer Aktivität von 20 pkat/ml untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die DP IV-Aktivität des Überstandes auch nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C sehr gering ist (Abb. 34). Die Beteiligung der von den Zellen freigesetzten DP IV an der Hydrolyse von zellassoziiertem Substrat innerhalb der von uns gewählten Inkubationszeit kann daher vernachlässigt werden.

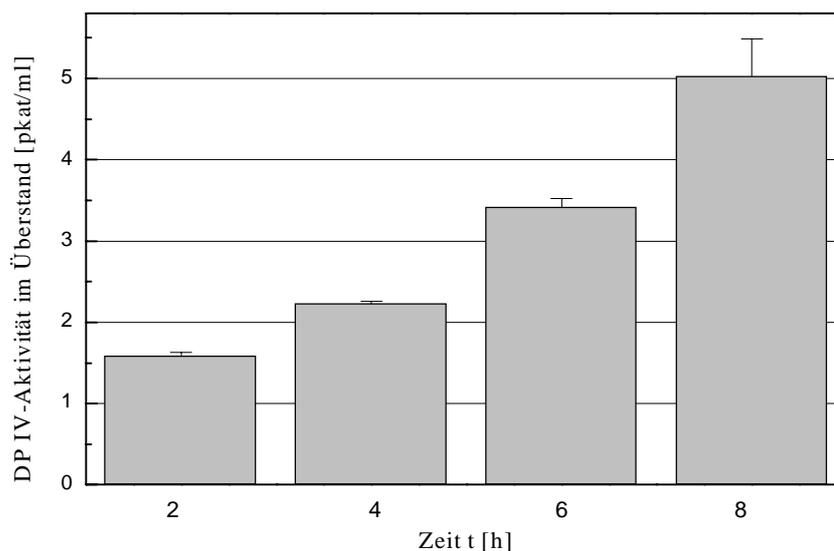


Abb. 34 Untersuchung der Zeitabhängigkeit der DP IV-Freisetzung einer Suspension DP IV-reicher U-937-Zellen

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, U-937-Zellen einer Aktivität von 20 pkat/ml, Inkubation 8 h, 37°C; Messung der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA bei 390 nm nach 0 min und 60 min bei 37°C)

Insgesamt wird die Summe mehrerer Effekte dafür verantwortlich sein, daß sich eine durchflußzytometrische Bestimmung der Enzymaktivität innerhalb eines Gemisches DP IV-reicher und DP IV-armer Zellen schwierig gestaltet. Die für durchflußzytometrische Messungen erforderliche hohe Zelldichte ist dabei eine Voraussetzung für die zelluläre Interaktion hinsichtlich der Substrathydrolyse und die damit verbundene limitierte Differenzierung zellulärer DP IV-Aktivität.

Die Frage, inwiefern Lymphozyten andere Formen von DP IV exprimieren, sollte ebenfalls in diese Diskussion einbezogen werden. So beschrieben DUKE-COHAN et al. [1996] die Expression von DPPT-L auf aktivierten Lymphozyten. Ruhende Lymphozyten exprimieren dagegen nur wenig DPPT-L. Die von JACOTOT et al. [1996a] und BLANCO et al. [1997] beschriebene DP IV- β besitzt ebenfalls DP IV-Aktivität und wird von einer Reihe CD4-positiver T-Zelllinien exprimiert. Darüber hinaus konnten BLANCO et al. [1998] 80% der gesamten DP IV-Aktivität ruhender MNZ als DP IV- β -Aktivität charakterisieren. Sowohl DPPT-L als auch DP IV- β zeigen eine im Vergleich zu DP IV veränderte Bindung der bekannten anti-CD26-Antikörper. Unter diesem Gesichtspunkt kommt spezifischen Substraten der DP IV eine besondere Bedeutung zu. Im Gegensatz zu DP IV-spezifischen Antikörpern würden sie den Einfluß anderer DP IV-Aktivitäten mit berücksichtigen. Der Vergleich einer anti-CD26-Antikörperfärbung mit einer durch DP IV-spezifische Substrathydrolyse verursachten Zellfärbung muß daher sehr vorsichtig diskutiert werden.

3.4.3.6 Differenzierung der Enzymaktivität auf Zelloberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Ob im Falle einer räumlichen Trennung CD26-positiver und CD26-negativer Zellen eine Enzymaktivitätsdifferenzierung innerhalb eines Ansatzes vorgenommen werden kann, wurde mit Hilfe CD26-transfizierter CHO-Zellen und Wildtyp-CHO-Zellen untersucht [HONG et al., 1989]. Es fanden sowohl Zellen, die mit enzymatisch aktiver DP IV, als auch Zellen, die mit enzymatisch inaktiver DP IV transfiziert waren, Anwendung. Bei letzteren war die DP IV-Aktivität aufgrund des Austausches des Serins des aktiven Zentrums gegen Alanin aufgehoben. Wildtyp-CHO-Zellen exprimieren keine DP IV.

Die adhärennten Zellen wurden als Gemisch aus CD26(aktiv)- mit CD26(inaktiv)-transfizierten und aus CD26(aktiv)-transfizierten mit Wildtyp-CHO-Zellen ausgesät und zwei bis drei Tage kultiviert. Danach wurden die Zellgemische hinsichtlich einer möglichen Differenzierung zwischen DP IV-aktiven und DP IV-inaktiven Zellen untersucht. Die zelluläre Fluoreszenz, die aus der enzymkatalysierten Hydrolyse der eingesetzten Substrate resultiert, wurde mit einer anti-CD26-TR-Antikörperfärbung dieser Zellen verglichen. Für diese Zwecke wurden die Substrate Gly-Pro-R110-Y₆ und Ala-Pro-R110-Y₉ eingesetzt, da hier die stärkste zelluläre Fluoreszenz nach der Substrathydrolyse durch zelluläre DP IV nachgewiesen wurde (Abb. 29).

Es konnte gezeigt werden, daß mit den eingesetzten Substraten innerhalb beider Zellgemische eine Differenzierung unterschiedlicher zellulärer DP IV-Aktivitäten möglich ist. So sind innerhalb des Gemisches CD26(aktiv)- mit CD26(inaktiv)-transfizierten CHO-Zellen deutliche Unterschiede hinsichtlich der durch Substrathydrolyse bedingten R110-Y-Fluoreszenz der Zellen zu verzeichnen, die auf enzymatisch aktive und enzymatisch inaktive DP IV/CD26 zurückzuführen sind (Abb. 35A). Daneben zeigen alle Zellen eine starke Antikörperfärbung als Zeichen starker CD26-Expression (Abb. 35B).

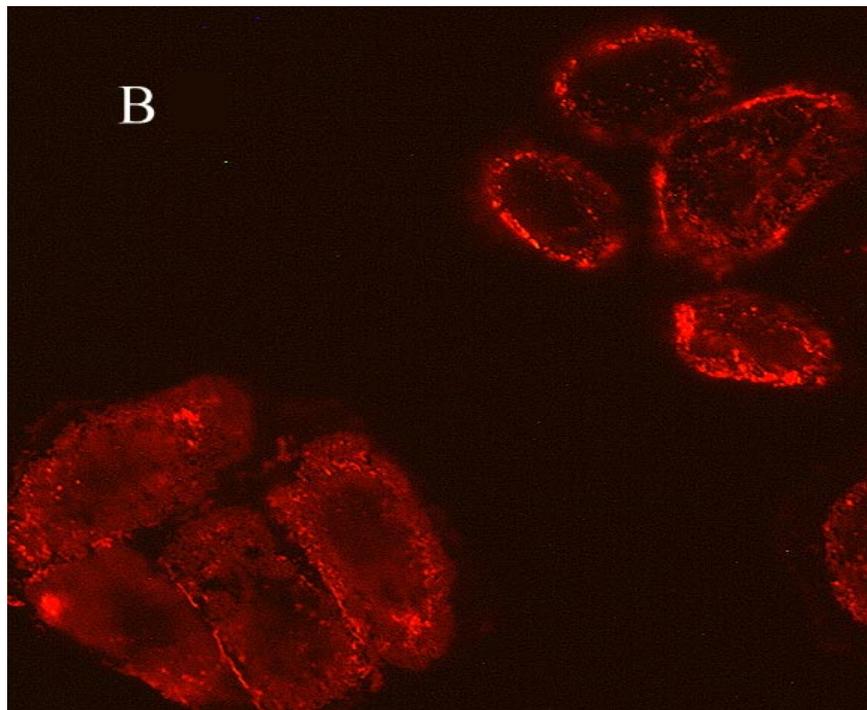
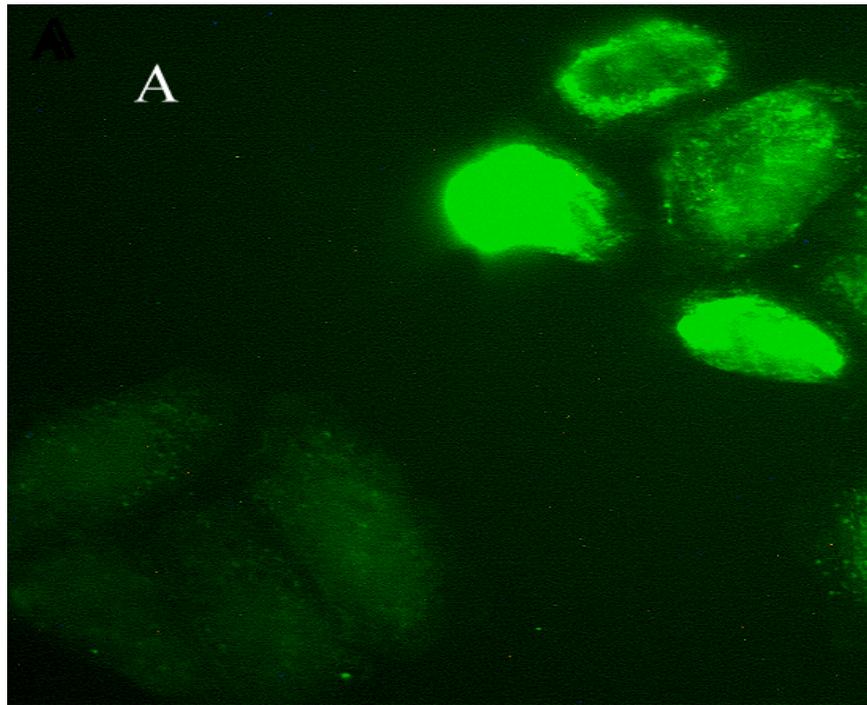


Abb. 35 Differenzierung zellulärer DP IV-Aktivität

A und B: Gemisch CD26(aktiv)- und CD26(inaktiv)-transfizierter CHO-Zellen (**A:** Fluoreszenz R110-Y₉, Filter: 450-490/FT510/515-585, **B:** Fluoreszenz anti-CD26-TR, Filter: 530-585/FT600/LP615 (Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, Inkubation jeweils 30 min, Raumtemperatur)

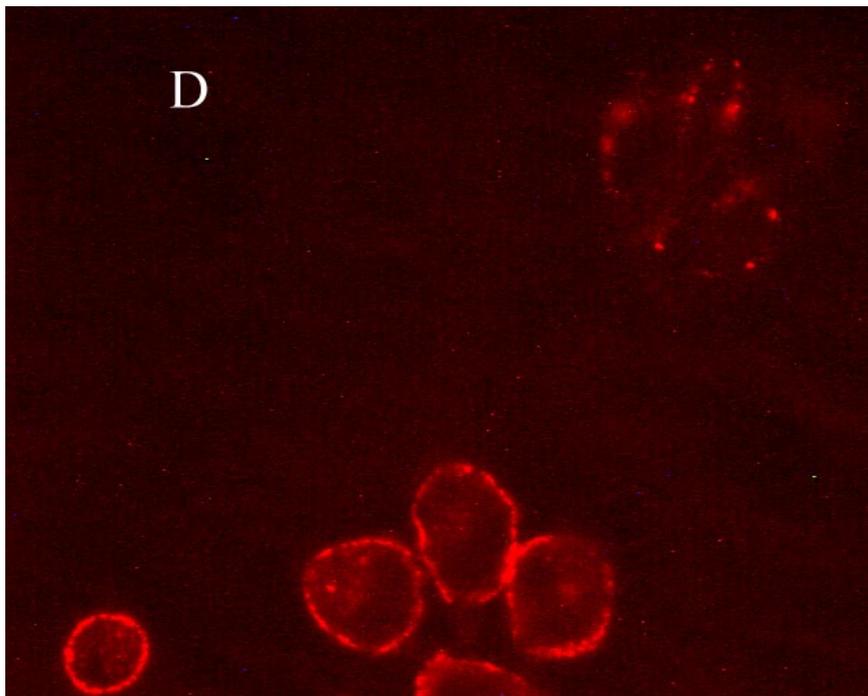
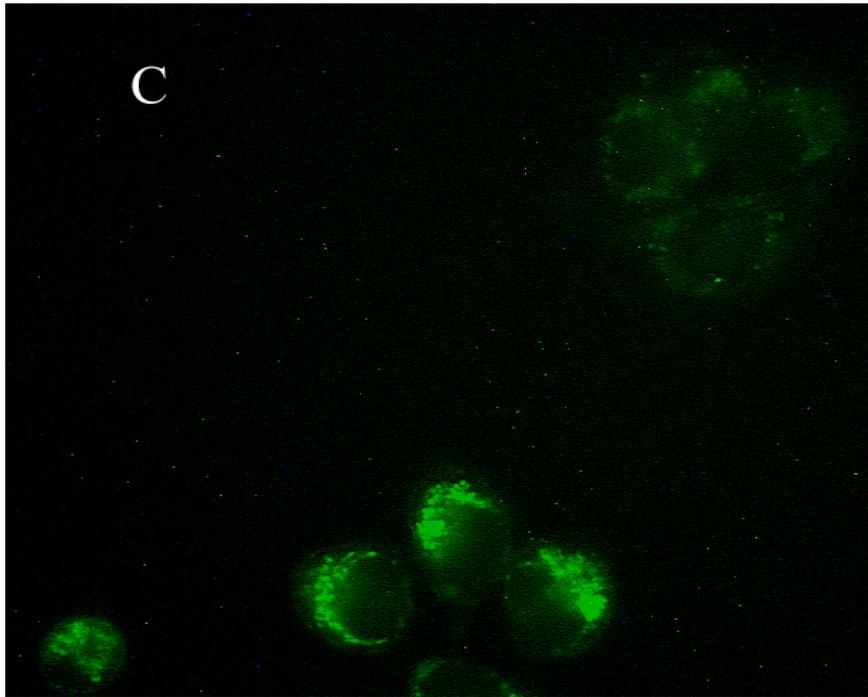


Abb. 35 Differenzierung zellulärer DP IV-Aktivität

B und C: Gemisch CD26(aktiv)-transfizierter und Wildtyp-CHO-Zellen, **C:** Fluoreszenz R110-Y₉, Filter: 450-490/FT510/515-585, **D:** Fluoreszenz anti-CD26-TR, Filter: 530-585/FT600/LP615
(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, Inkubation jeweils 30 min, Raumtemperatur)

Innerhalb eines Gemisches CD26(aktiv)-transfizierter mit Wildtyp-CHO-Zellen ist mittels anti-CD26-Antikörperfärbung eine deutliche Differenzierung zwischen DP IV-reichen und DP IV-armen Zellen möglich (Abb. 35D). Darüber hinaus zeigen die nach Antikörperfärbung als DP IV-reich charakterisierten CHO-Zellen eine starke zellassozierte R110-Y-Fluoreszenz, während die nach Antikörperfärbung als DP IV-arm charakterisierten CHO-Zellen eine schwache R110-Y-Fluoreszenz nach Substrathydrolyse aufweisen (Abb. 35C).

Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor in Abhängigkeit der Zelldichte diskutierte Zell-Zell-Interaktion hinsichtlich der Hydrolyse von an der Zelle gebundenem Substrat. Liegen Zellen mit unterschiedlicher DP IV-Expression isoliert vor, ist eine Differenzierung der enzymatischen Aktivität mit den synthetisierten Substraten Xaa-Pro-R110-Y möglich. Ist die Zelldichte von unterschiedlich DP IV-exprimierenden Zellen jedoch so hoch, daß sie miteinander wechselwirken können, so ist dies nicht möglich.

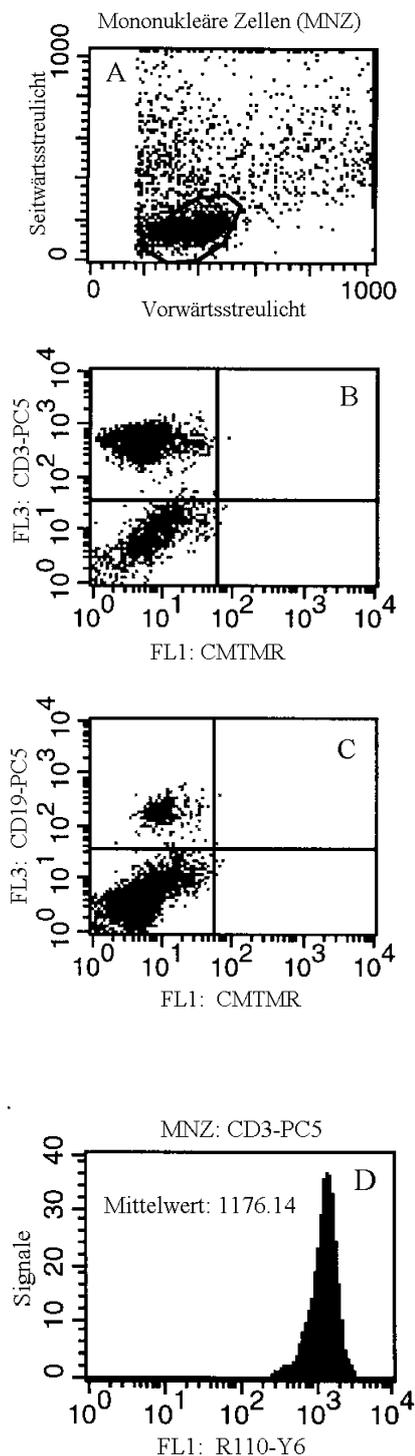
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen machen aber auch deutlich, daß die Bindung der Substrate nicht ausschließlich an der Zelloberfläche erfolgt.

3.4.3.7 Bedeutung des zellulären Thiolstatus für die Verankerung der Verbindungen Xaa-Pro-R110-Y an Zellen

Die kovalente Fixierung des Ankers Y sollte an auf der Zelloberfläche lokalisierte thiolhaltige Proteine erfolgen. Die Kenntnis über die Expression dieser Proteine auf der Oberfläche der von uns untersuchten Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten) ist daher von Bedeutung. So konnten TÄGER et al. [1997] zeigen, daß B-Lymphozyten thiolhaltige Membranproteine ca. 3fach stärker exprimieren als T-Lymphozyten. Der Nachweis dieser Proteine erfolgt mit dem SH-reaktiven Reagenz 5(6)-(((4-Chlormethyl)benzoyl)amino)-tetramethylrhodamin (CMTMR), das unter definierten Bedingungen ausschließlich an extrazelluläre Proteine bindet.

Wir konnten diese Ergebnisse bestätigen und ebenfalls zeigen, daß CD19-positive B-Zellen (Abb. 36C und Tab. C) eine 2fach höhere Expression SH-Gruppen-tragender Membranproteine aufweisen als CD3-positive T-Lymphozyten (Abb. 36B und Tab. B).

Werden Xaa-Pro-R110-Y-Substrate in Gegenwart eines anti-CD3-PerCP-markierten Antikörpers bzw. in Gegenwart eines anti-CD19-PerCP-markierten Antikörpers mit MNZ, die sowohl B- als auch T-Lymphozyten enthalten, inkubiert, so ist jedoch nur eine geringe Unterscheidung der Mittelwerte der zellassozierten R110-Fluoreszenz von B- und T-Zellen möglich (Abb. 36D und 36E). Dieses Ergebnis bestätigt die durch fluoreszenzmikroskopische Experimente gewonnene Erkenntnis, daß die Bindung der Strukturen R110-Y unter den von uns gewählten Bedingungen nicht ausschließlich an membranständige Bereiche erfolgt.



Tab. B: MNZ gesamt

Quadrant	% Zellen im Auswertefenster	X Mittelwert	Y Mittelwert
OL	75.72	6.37	531.46
UL	24.11	9.71	10.17

Tab. C: MNZ gesamt

Quadrant	% Zellen im Auswertefenster	X Mittelwert	Y Mittelwert
OL	7.55	11.44	209.02
UL	92.30	6.12	5.41

Abb. 36 Vergleich des zellulären Thiolstatus mit der durch R110-Y₆ verursachten zellulären Fluoreszenz
A: Punkthistogrammdarstellung der gemessenen Zellen, **B:** Korrelation der CD3-Expression mit Membranthiolstatus (CMTMR), **C:** Korrelation der CD19-Expression mit Membranthiolstatus (CMTMR), **D:** Histogrammdarstellung der R110-Y₆-Fluoreszenz an CD3-positiven MNZ, **E:** Histogrammdarstellung der R110-Y₆-Fluoreszenz an CD19-positiven MNZ
 (Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, MNZ 10⁶ Zellen/ml, [S] = 5·10⁻⁶ M, Inkubation 30 min, 37°C; Durchflußzytometer: λ_{Ex} = 488 nm, λ_{Em} = 530/30 (R110-Y₆), 585/42 (CTMTR), 650LP (PC5))

3.4.4 N^ε-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Lys-2-cyano-pyrrolidide als Inhibitoren zellulärer DP IV

3.4.4.1 Allgemeine Bemerkungen

Im Rahmen der von HERMANN [1995] angefertigten Diplomarbeit wurden bereits N^ε-markierte Inhibitoren des Lys-Pyrrolidid-Typs (Lys-(biotinyl)-pyrrolidid, Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-pyrrolidid, Lys-(biotinyl-capronyl)-pyrrolidid und Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl-capronyl)-pyrrolidid) synthetisiert. Diese Strukturen wurden sowohl hinsichtlich ihrer Hemmeigenschaften an isolierter DP IV aus Schweineniere als auch an DP IV-reichen U-937-Zellen untersucht.

Folgende Erkenntnisse konnten gewonnen werden:

- Alle Verbindungen sind kompetitive Inhibitoren isolierter Schweinenieren-DP IV mit K_i-Werten zwischen $1.53 \cdot 10^{-6}$ M und $2.08 \cdot 10^{-6}$ M.
- Alle Verbindungen sind Inhibitoren der zellulären DP IV der DP IV-reichen Zelllinie U-937. Dabei hemmen spacerfreie Verbindungen die zelluläre DP IV schlechter als Verbindungen, die einen Spacer zwischen Markermolekül und Lysinseitenkette besitzen. Eine bessere Hemmung der DP IV-Aktivität wurde im Lysat im Vergleich zu intakten Zellen beschrieben. 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte Lys-pyrrolidide sind schlechtere Inhibitoren der zellulären DP IV als Biotin-markierte Lys-pyrrolidide.
- Eine stabile Markierung der DP IV auf CD26-exprimierenden Zellen war nicht möglich. Die angestrebte Differenzierung DP IV-aktiver und DP IV-inaktiver Zellen mit Hilfe der oben aufgeführten Lys-pyrrolidide war nicht realisierbar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten DP IV-Inhibitoren synthetisiert werden, die eine stabile Verankerung des Inhibitors im aktiven Zentrum der DP IV gewährleisten. Ausgehend von Lys-2-cyano-pyrrolidid sollten entsprechende N^ε-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-Lys-2-cyano-pyrrolidide synthetisiert werden. MOON et al. [1986] beschrieben die Ausbildung eines kovalenten Enzym-Inhibitor-Addukts zwischen Nitrilkohlenstoff des α -N-Acetylphenylalanyl-glycyl-nitrils und der im aktiven Zentrum von Papain (Cysteinprotease) befindlichen SH-Gruppe. Eine derartige Interaktion zwischen der Cyanogruppe von Aminoacyl-2-cyano-pyrrolididen mit der reaktiven OH-Gruppe des Serylrestes des aktiven Zentrums der DP IV unter Ausbildung eines Imidoesters wurde von LI et al. [1995] postuliert und für die verbesserten Inhibierungseigenschaften dieser Verbindungen im Vergleich zu Aminoacylpyrrolididen verantwortlich gemacht. Dadurch sollte eine stabile Markierung zellulärer DP IV ermöglicht werden.

3.4.4.2 Hemmung zellulärer DP IV-Aktivität

Die inhibitorische Wirkung von N^E-Biotin- bzw. 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolididen auf die DP IV-Aktivität wurde an DP IV-reichen U-937-Zellen anhand der Hemmung der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Gly-Pro-pNA untersucht.

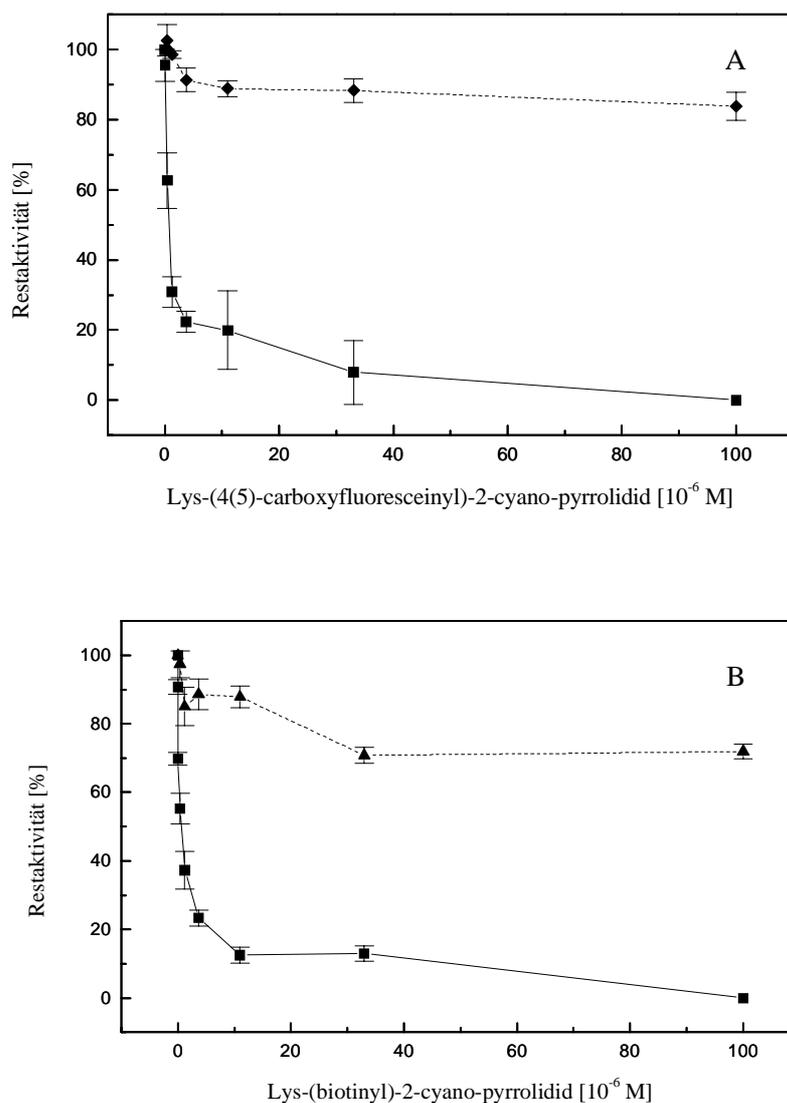


Abb. 37 Darstellung der Inhibierung der DP IV-Aktivität intakter U-937-Zellen (■) und des Zellysats (▲) DP IV-reicher U-937-Zellen

A: Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid; B: Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7,2, U-937-Zellen 10^6 Zellen/ml, [Gly-Pro-pNA] = $1,65 \cdot 10^{-3}$ M, Inkubation 60 min, 37°C; Absorption: 390 nm)

Die Hemmung der enzymatischen Aktivität intakter Zellen ist dabei deutlich geringer als die Hemmung der DP IV-Aktivität im Zellysats (Abb. 37). So wird mit einer 10^{-4} M Lösung von Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid und Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid die zelluläre DP IV-Aktivität intakter Zellen um 28% und 16% inhibiert. Im Zellysats beträgt die

Hemmung der DP IV-Aktivität durch beide Inhibitoren dagegen 100%. Das Biotin-markierte Derivat stellt an intakten Zellen den besseren Inhibitor dar. Hier könnte eine verbesserte sterische Zugänglichkeit des aktiven Zentrums der DP IV für das kleinere Biotinmolekül im Vergleich zum größeren 4(5)-Carboxyfluoresceinmolekül diskutiert werden. Ebenso kann im Zellysat, in dem die zellulären Strukturen fragmentiert vorliegen, das aktive Zentrum der DP IV besser sterisch zugänglich sein, woraus die stärkere Inhibierung der enzymatischen Aktivität im Vergleich zur Inhibierung an intakten Zellen resultieren könnte.

3.4.4.3 Anwendung N^ε-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein markierter Lys-2-cyano-pyrrolidide zur Differenzierung DP IV-exprimierender Zellen

Zur Untersuchung der Eignung N^ε-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierter Lys-2-cyano-pyrrolidide für die Differenzierung unterschiedlich DP IV-exprimierender Zellen, wurden separierte MNZ simultan mit einem PerCP-markierten anti-CD26-Antikörper und den markierten Lys-2-cyano-pyrrolididen inkubiert. In Analogie zu den beschriebenen Rhodaminsubstraten konnte auch im Falle der Inhibitor-markierung der Zellen die für die Antikörperfärbung detektierte Differenzierung der Lymphozyten in eine CD26-positive und eine CD26-negative Zellpopulation nicht bestätigt werden. Alle Zellen wiesen eine durch die Bindung des Inhibitors verursachte identische Fluoreszenz auf (nicht gezeigt). Daneben konnte gezeigt werden, daß DP IV-negative Jurkat-Zellen ebenfalls eine starke zelluläre Fluoreszenz nach Inkubation mit den markierten Lys-2-cyano-pyrrolididen aufweisen. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß diese Zellen nach JACOTOT et al. [1996a] DP IV- β exprimieren.

Die gemessene möglicherweise unspezifische Fluoreszenz erwies sich als sehr stabil und konnte weder durch Waschschriffe der Zellen mittels PBS unterschiedlichen pH-Wertes (6.5-7.5) noch mittels Harnstofflösungen variierender Konzentrationen (bis max. 0.1 M) verringert werden.

Eine Ursache für diese zelluläre Fluoreszenz könnte in der Wechselwirkung der Cyanogruppe mit thiolhaltigen Proteinen zu suchen sein. So werden als SH-spezifische Reagenzien auch Cyanoverbindungen eingesetzt. Die unter diesen Umständen ausgebildete kovalente Bindung sollte tatsächlich stabil genug sein, um eine wie in unserem Fall beschriebene stabile zelluläre Fluoreszenz zu gewährleisten.

Wenn die Inhibitoren eine kovalente Bindung zu SH-Gruppen thiolhaltiger Proteine eingehen, könnte einerseits die daraus resultierende effektive Inhibitor-konzentration, die für eine Enzym-inhibierung zur Verfügung steht derartig verringert werden, daß eine vollständige Enzymhemmung nicht möglich ist. Diese sollte dann allerdings bei höheren Inhibitor-konzentrationen erreicht werden. Die von uns untersuchten Inhibitoren hemmen die zelluläre DP IV jedoch auch bei hohen Konzentrationen nur in geringem Maße. Trotzdem wurde der Versuch unternommen, durch Absättigung der Zelloberflächen-SH-Gruppen eine Verbesserung der Hemmung zellulärer DP IV durch markierte Lys-2-cyano-pyrrolidide zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden Rinderserumalbumin, zum Absättigen unspezifischer

Bindungsstellen, sowie Ala-Ala-Pro-Val-Chlormethylketon und Malodinitril als SH-spezifische Reagenzien mit DP IV-reichen U-937-Zellen inkubiert und die zelluläre Enzymaktivität in Abhängigkeit der Konzentration der Reagenzien untersucht. Wenn eine Absättigung von Zelloberflächen-SH-Gruppen möglich ist, sollte mit steigender Konzentration der genannten Agenzien eine Zunahme der Inhibierung der zellulären DP IV-Aktivität möglich sein. Für alle verwendeten Reagenzien konnte jedoch innerhalb eines Konzentrationsbereiches von zwei Größenordnungen keine verbesserte Hemmung zellulärer DP IV-Aktivität festgestellt werden (Abb. 38). Darüber hinaus wurde die durch die Inhibitoren verursachte zelluläre Fluoreszenz nach Inkubation der Zellen mit den Reagenzien in keiner Weise beeinflusst.

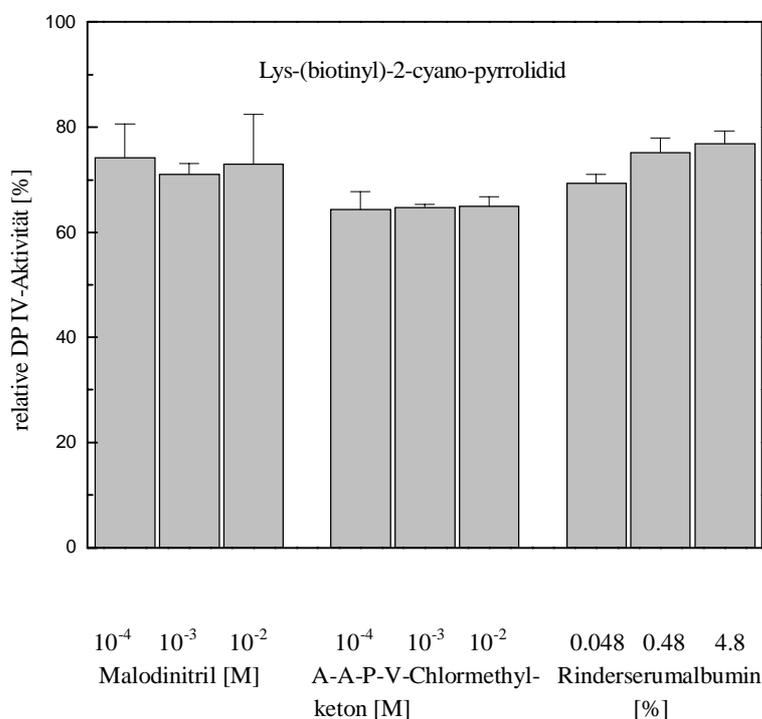


Abb. 38 Beeinflussung der Hemmung der DP IV-Aktivität intakter U-937-Zellen (durch Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid (10^{-4} M) durch Malodinitril, Ala-Ala-Pro-Val-Chlormethylketon und Rinderserumalbumin

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, U-937-Zellen 10^6 Zellen/ml, Inkubation 30 min, 37°C , [Gly-Pro-pNA] = 10^{-4} M, Absorption: 390 nm)

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Interaktionen der markierten Lys-2-cyano-pyrrolidide mit auf der Zelloberfläche lokalisierten Strukturen möglicherweise nicht ausschließlich auf die Ausbildung kovalenter Bindungen mit SH-Gruppen sondern auch auf nichtkovalente Wechselwirkungen zurückzuführen sind.

Darüber hinaus muß auch hier die bereits angesprochene Expression anderer Proteine mit DP IV-Aktivität, insbesondere bei Nutzung mononukleärer Zellen, berücksichtigt werden .

4 Zusammenfassung

Die biologische Bedeutung der Serinprotease Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV, CD26, EC 3.4.14.5), die von einer Vielzahl epithelialer Zellen und von aktivierten Immunzellen exprimiert wird, ist bislang noch weitgehend ungeklärt. Andererseits zeigen zahlreiche Literaturbefunde, daß das Protein in Signaltransduktionsprozesse innerhalb von T-Zell-Aktivierungs- und Proliferationsprozessen involviert ist. Darüber hinaus wird der DP IV eine Rolle als Tumormarker und eine funktionelle Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen zugewiesen. Die Relevanz der enzymatischen Aktivität der DP IV für viele dieser Prozesse ist unumstritten. Neben einer Bestimmung der zellulären DP IV-Expression ist daher ein hochsensitiver Nachweis zellulärer DP IV-Aktivität von zentraler Bedeutung.

Das Ziel dieser Arbeit war es auf der Basis des stark fluoreszierenden Rhodamin 110, DP IV-Substrate zu synthetisieren und zu optimieren, die eine sensitive Quantifizierung zellulärer DP IV-Aktivität mittels Durchflußzytometrie bzw. Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen sollten. Daneben war die Synthese fluorogener DP IV-Inhibitoren zur Lokalisation zellulärer DP IV vorgesehen.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten N^ε-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidide erwiesen sich als potente kompetitive Inhibitoren isolierter DP IV mit K_i-Werten von 6.4·10⁻⁸ M und 5.8·10⁻⁸ M.

Auf zellulärer Ebene wurde im Vergleich zu den entsprechenden fluorogenen Lys-pyrrolididen (Hemmung der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Gly-Pro-pNA zwischen 70% und 80%, [I] = 10⁻⁴ M) jedoch nur eine geringe Hemmung der DP IV-Aktivität von 16% und 28% ([I] = 10⁻⁴ M) nachgewiesen. Eine Differenzierung unterschiedlich CD26-exprimierender Zellen war nicht möglich.

Auf der Substratebene wurden zunächst Verbindungen der Struktur (Xaa-Pro)₂-R110 mit Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser, Lys, Cha und Phe zur Bestimmung isolierter und zellassoziierter DP IV-Aktivität synthetisiert. Der Nachweis der Substrathydrolyse basiert dabei auf der durch DP IV katalysierten Abspaltung des entsprechenden Dipeptides Xaa-Pro, wobei das farblose, nichtfluoreszierende (Xaa-Pro)₂-R110 zunächst in das fluoreszierende monosubstituierte Xaa-Pro-R110-Derivat und nach dessen enzymkatalysierter Hydrolyse in das 10fach stärker fluoreszierende freie R110 überführt wird.

Die (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen erwiesen sich mit Ausnahme des (Phe-Pro)₂-R110 als gute Substrate isolierter DP IV aus Schweineniere mit k_{cat}/K_m-Werten zwischen 1.19·10⁶ und 4.30·10⁶ M⁻¹·s⁻¹. Diese Werte sind durchaus mit den kinetischen Konstanten der vorwiegend eingesetzten Dipeptid-p-Nitroanilide als Substrate isolierter DP IV vergleichbar. Für (Phe-Pro)₂-R110, das von DP IV weder gebunden noch hydrolysiert wird, konnte nach Moleküldynamiksimulationen eine Konformation wahrscheinlich gemacht werden, bei der die

sandwichartige Überlappung der aromatischen Ringsysteme beider Phe-Reste die Erkennung des Substrates durch DP IV nicht mehr gewährleistet.

Die um einen Faktor 50 schlechteren kinetischen Konstanten der Hydrolyse der (Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen durch rekombinante humane DP IV sind sicherlich auf artspezifische Enzymvariationen zurückzuführen.

Auch auf zellulärer Ebene sind die Verbindungen (Xaa-Pro)₂-R110 mit Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser und Cha für einen sensitiven Nachweis zellulärer DP IV-Aktivität geeignet. Die Substrate werden bei einer 400fach höheren Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse dieser Verbindungen im Vergleich zur Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von Xaa-Pro-p-nitroaniliden DP IV-spezifisch hydrolysiert. Ein wesentlicher Nachteil dieser Substrate besteht jedoch in dem sehr schnellen Abdiffundieren der stark fluoreszierenden Hydrolyseprodukte R110 bzw. Xaa-Pro-R110 von den Zellen in das umgebende Medium und in Nachbarzellen. Daher war eine zelluläre Enzymaktivitätsbestimmung mittels Durchflußzytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie nicht möglich.

Zur Umgehung dieser Schwierigkeiten wurde eine Optimierung der Rhodaminsubstrate vorgenommen. Dies führte zu Verbindungen der Struktur Xaa-Pro-R110-Y mit Xaa = Gly und Ala und Y = SH-reaktive funktionelle Gruppe variierender Reaktivität und Spacerlänge. Die auf diese Weise erhaltenen bifunktionellen Verbindungen verfügen einerseits über die für DP IV spezifische Substratstruktur Xaa-Pro- und andererseits über eine funktionelle Gruppe, die kovalente Bindungen mit Nukleophilen eingehen kann. Die am R110 gebundenen Anker Y gewährleisten dabei eine kovalente Verankerung der Substrate Xaa-Pro-R110-Y oder der Spaltprodukte R110-Y auf der Zelloberfläche. Die als Reste Y vorzugsweise eingesetzten Halogenalkylcarbonyl-, Maleinimidoalkylcarbonyl- oder Halogenalkylarylcabonyl-Reste sollten mit SH- und NH₂-Gruppen von Proteinen auf der Zelloberfläche reagieren.

Die enzymkatalysierte Hydrolyse der Verbindungen führt zur Abspaltung des Xaa-Pro-Dipeptides unter Freisetzung von R110-Y, das weder ein Substrat noch einen Inhibitor der DP IV darstellt.

Die enzymkinetische Charakterisierung der Hydrolyse der Substrate Xaa-Pro-R110-Y durch isolierte DP IV aus Schweineniere zeigte, daß auch diese Verbindungen mit k_{cat}/K_m -Werten zwischen $1.14 \cdot 10^6$ und $3.33 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ gute Substrate der DP IV sind. Mit zunehmender Hydrophobizität des Restes Y wird eine erhöhte Affinität der Substrate zum aktiven Zentrum der DP IV beobachtet.

Die Rhodamin-Anker-Substrate eignen sich für die Bestimmung von DP IV-Aktivität auf zellulärer Ebene. Der Vorteil der Xaa-Pro-R110-Y-Verbindungen besteht in der stabilen Verankerung des fluoreszierenden Hydrolyseproduktes R110-Y an der Zelle, wodurch diese Substrate zur Bestimmung der DP IV-Aktivität auf Einzelzellniveau mit Hilfe der Durchflußzytometrie geeignet sind. Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß über den Anker Y an der Zelle gebundenes Substrat Xaa-Pro-R110-Y, in Abhängigkeit der Länge des Spacers, sowohl von DP IV benachbarter Zellen als auch von dem Ansatz zugesetzter isolierter DP IV hydrolysiert werden kann. Dieser Befund wirkt sich insbesondere dann einschränkend aus, wenn eine Differenzierung der DP IV-Aktivitäten innerhalb eines

Gemisches unterschiedlich DP IV-exprimierender Zellen vorgenommen werden soll. Dagegen konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Verringerung der Zelldichte eine Differenzierung unterschiedlich DP IV-exprimierender Zellen erreicht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Rhodamin 110-Substrate für die DP IV stellen eine Alternative zu den bisher eingesetzten Xaa-Pro-p-nitroaniliden bzw. -4-methylcumarinen dar. Neben der deutlich sensitiveren Nachweisempfindlichkeit der R110-Fluoreszenz sind diese Substrate aufgrund der Anregungswellenlänge des R110 im sichtbaren Bereich des Lichtes prädestiniert für eine durchflußzytometrische Anwendung. Eine ebenso wichtige Voraussetzung für den Einsatz dieser Verbindungen in der klinisch relevanten Durchflußzytometrie ist eine stabile Verankerung des durch die Enzymkatalyse freigesetzten Fluorophors an der Zelle. Hier liegt der entscheidende Vorteil der Xaa-Pro-R110-Y-Verbindungen, bei denen über eine thiolreaktive Ankergruppierung Y eine kovalente und stabile Fixierung des Substrates oder des Hydrolyseproduktes an der Zelle gewährleistet ist. Dadurch ist eine Bestimmung der Proteaseaktivität auf Einzelzellniveau mit Hilfe der Durchflußzytometrie möglich. Unter diesem Gesichtspunkt kommt spezifischen DP IV-Substraten der Struktur Xaa-Pro-R110-Y eine besondere Bedeutung zu.

5 Experimenteller Teil

5.1 Synthese

5.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heitztischmikroskop nach BOETIUS (Analytik Dresden) bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Messung der optischen Aktivität erfolgte an einem Polamat A (Carl Zeiss Jena). Die Massenspektren wurden an einem VG-BIOQ-Massenspektrometer mit Elektrospray Interface (Fisons-Instruments) aufgenommen. In einem konstanten Fluß von 4 µl/min von Acetonitril/Wasser (50:50 v/v, 0.5% Ameisensäure) wurden 2 µl der Probenlösung über ein Schleifendosierventil direkt in die Quelle injiziert.

Die ¹H-NMR-Spektren wurden an einem ARX 500-Spektrometer (Bruker) bei 500.141 MHz und an einem VARIAN UNITY 500-Spektrometer bei 499.884 MHz aufgenommen. Die Spektrenaufnahme erfolgte bei 303 K. Alle ¹H-chemischen Verschiebungen wurden auf restliches DMSO-d₆ bei 2.50 ppm referenziert. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch kombinierte Analyse von zweidimensionalen H,H-COSY-, TOCSY- und ROESY-Spektren. Die Verhältnisse der *cis/trans*-Isomeren wurden über die Integrale gut aufgelöster Signale der ¹H-Spektren bestimmt.

Die Reinheit der synthetisierten Verbindungen wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄) in folgenden DC-Systemen überprüft:

A	Chloroform/Methanol/Eisessig	180:20:1
B	Benzen/Aceton/Eisessig	50:20:1
C	Essigsäureethylester/Pyridin/Eisessig/Wasser	90:15:4.5:2.3
D	n-Butanol/Essigsäureethylester/Ameisensäure/Wasser	1:1:1:1
E	sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser	15:4:3
F	n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser	15:10:3:12

Die Detektion der Verbindungen erfolgte bei 254 nm und 366 nm sowie durch Anfärbung mit Ninhydrin und Kaliumjodid/Stärke. Die Reinigung der N-geschützten Verbindungen wurde mittels MPLC (Büchi, Kieselgel 60, Korngröße 0.015-0.040 nm) durchgeführt. Zur Reinigung bzw. Reinheitskontrolle der N-ungeschützten Verbindungen wurde die HPLC (Merck, Knauer) eingesetzt. Als HPLC-Laufmittel wurde ein Gemisch aus 0.1%iger Trifluoressigsäure (TFA, analytisch, B) oder Wasser (präparativ, B) und 70%igem Acetonitril in 0.09%iger TFA (A) verwendet. Die Trennungen wurden an Fertigsäulen LiChroCART[®] 125-4 (LiChrospher[®] 100, RP18, 5 µm, 125×4 mm, Merck, analytisch) und Hibar (LiChrosorb[®], RP18, 7 µm, 250×25 mm, Merck, präparativ) durchgeführt.

Alle Chemikalien entstammen kommerziellen Quellen und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Lösungsmittel wurden generell analysenrein eingesetzt.

5.1.2 Allgemeine Synthesevorschriften

Mischanhydridmethode (Methode A)

1.1 mmol der N-geschützten Aminosäure werden in 2 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Unter Rühren werden bei -15°C nacheinander jeweils 1.1 mmol Chlorameisensäureisobutylester (CAIBE) und N-Ethylmorpholin (NEM) zugegeben. Die Suspension wird 15 min bei -15°C gerührt und anschließend mit 0.5 mmol der Aminokomponente (und weiteren 0.5 mmol NEM, wenn die Aminokomponente als Salz vorliegt) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei -15°C sowie weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Eingießen des Reaktionsansatzes in 60 ml Eiswasser. Die wässrige Lösung wird dreimal mit insgesamt 100 ml Essigsäureethylester (EE) ausgeschüttelt. Die vereinigten EE-Phasen werden mehrfach mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert.

Carbodiimidmethode (Methode B)

1 mmol der Boc-geschützten Aminosäure wird in 2 ml DMF gelöst. Die Suspension wird auf 4°C abgekühlt und anschließend unter Rühren mit 1 mmol 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) versetzt. Danach wird 1 mmol der Aminokomponente (sowie 1 mmol NEM, wenn die Aminokomponente als Salz vorliegt) zugegeben und der Reaktionsansatz 1 h bei 4°C und weitere 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Eingießen des Reaktionsansatzes in 60 ml Eiswasser. Die wässrige Lösung wird dreimal mit insgesamt 100 ml EE ausgeschüttelt. Die vereinigten EE-Phasen werden mehrfach mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert.

Säurechloridmethode (Methode C)

1 mmol Boc-Gly-Pro-R110 wird in 2 ml DMF gelöst und in der Kälte (4°C) und unter Rühren mit 1 mmol der als Säurechlorid vorliegenden Carboxykomponente sowie 1 mmol Triethylamin (TEA) versetzt. Der Ansatz wird 1 h bei 4°C und anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Eingießen des Reaktionsansatzes in 60 ml Eiswasser. Die wässrige Lösung wird dreimal mit insgesamt 100 ml EE ausgeschüttelt. Die vereinigten EE-Phasen werden mehrfach mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe (Methode D1)

1 mmol der Boc-geschützten Verbindung wird in 1 ml Eisessig gelöst und mit HCl in Eisessig (1.1 mol HCl pro mmol Verbindung) versetzt. Der Ansatz wird 20 bis 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird das Produkt mit Diethylether in der Kälte ausgefällt, filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Vakuum über Phosphor(V)-oxid getrocknet.

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe (Methode D2)

1 mmol der Boc-geschützten Verbindung wird in 1 ml Dichlormethan gelöst und mit 0.1 ml TFA versetzt. Der Reaktionsansatz wird 3 h bei Raumtemperatur stehengelassen und das Produkt mit Diethylether in der Kälte ausgefällt. Das ausgefällte Produkt wird filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Vakuum über Phosphor(V)-oxid getrocknet.

Acetylierung (Methode E)

1 mmol Boc-Gly-Pro-R110 wird in 0.5 ml Pyridin gelöst und mit 0.1 ml Acetanhydrid versetzt. Nach 24stündigem Stehen bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in Toluol gelöst und das Lösungsmittel wird erneut abdestilliert. Das Produkt wird anschließend mit Diethylether ausgefällt, filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Vakuum über Phosphor(V)-oxid getrocknet.

5.1.3 Synthese der Rhodamin 110-Derivate

5.1.3.1 Synthese der N,N'-bis-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110-Verbindungen

N,N'-bis-(Prolin)-rhodamin 110

N,N'-bis-(Boc-prolin)-rhodamin 110

Die Synthese erfolgte durch Kupplung von Boc-Pro-OH mit R110·HCl nach **Methode A**. Die Reinigung wurde mittels MPLC durch isokratische Elution des Produktes durchgeführt.

Ausbeute: 35.6%

F_p: amorph

Summenformel: C₄₀H₄₄O₉N₄

MG: 724.31 g/mol MS: 725 [M+H]⁺

DC: 0.68/A, 0.40/B

MPLC: EE/PEth = 9:1

N,N'-bis-(Prolin)-rhodamin 110

Die Verbindung wurde durch acidolytische Deblockierung von (Boc-Pro)₂-R110 nach **Methode D1** erhalten. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe der präparativen HPLC durch Elution mit aufsteigendem Acetonitril-Gradienten (A). Von den gesammelten Fraktionen wurde das organische Lösungsmittel abdestilliert. Die Substanz, die in der wässrigen Phase vorlag, wurde auf RP8-Minisäulen aufgetragen, mit Wasser neutral gewaschen und mit Methanol eluiert. Das organische Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand in 5 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Das Produkt ist farblos und chromatographisch einheitlich.

Ausbeute: 98.8%

F_p: 156-159°C

[α]_D²⁰: -10.39° (c = 0.77, Wasser)

Summenformel: C₃₀H₂₈O₅N₄

MG: 524.21 g/mol MS: 525 [M+H]⁺

DC: 0.41/D, 0.45/F

HPLC: 28 min (0-100% A/60 min)

N,N'-bis-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110N,N'-bis-(Boc-aminoacyl-prolin)-rhodamin 110

Die Synthese erfolgte durch Verknüpfung von Boc-Xaa-OH (Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser, Lys) mit (HCl-Pro)₂-R110 nach **Methode A**. Die Reinigung der erhaltenen (Boc-Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen erfolgte mit Hilfe der MPLC durch isokratische Elution mittels EE/PEth- oder CH₂Cl₂/MeOH-Gemische. Die analytischen Daten der Verbindungen sind in Tab. 14 zusammengefaßt.

Tab. 14 Boc-geschützte bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen

Verbindung	Ausbeute [%] Summenformel	MS [M+H] ⁺ MG [g/mol]	DC Rf/System	MPLC Laufm.- Gemisch
(Boc-Gly-Pro) ₂ -R110	49.8 C ₄₄ H ₅₀ O ₁₁ N ₆	839 838.35	0.35/C	EE
(Boc-Ala-Pro) ₂ -R110	45.7 C ₄₆ H ₅₄ O ₁₁ N ₆	867 866.39	0.49/C	EE
(Boc-Abu-Pro) ₂ -R110	79.3 C ₄₈ H ₅₈ O ₁₁ N ₆	895 894.42	0.56/C	EE/PEth = 19:1
(Boc-Leu-Pro) ₂ -R110	41.8 C ₅₂ H ₆₆ O ₁₁ N ₆	951 950.48	0.75/A 0.48/B	EE/PEth = 8:2
(Boc-Ser-Pro) ₂ -R110	79.0 C ₄₆ H ₅₄ O ₁₃ N ₆	899 898.37	0.57/A 0.08/B	CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9.1:0.9
(Boc-Lys(Boc)-Pro) ₂ -R110	43.9 C ₆₂ H ₈₄ O ₁₅ N ₈	1182 1180.61	0.73/A 0.35/B	EE

N,N'-bis-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110

Die Verbindungen wurden durch acidolytische Schutzgruppenabspaltung der (Boc-Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen nach **Methode D1** erhalten. Die Reinigung der (HCl·Xaa-Pro)₂-R110-Verbindungen mit Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser und Lys erfolgte mit Hilfe der präparativen HPLC durch Elution mit aufsteigendem Acetonitrilgradienten (A). Von den gesammelten Fraktionen wurde das organische Lösungsmittel abdestilliert. Die Substanz, die in der wässrigen Phase vorlag, wurde auf RP8-Minisäulen aufgetragen, mit Wasser neutral gewaschen und mit Methanol eluiert. Das organische Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand in 5 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC. Die Retentionszeiten und Laufmittelzusammensetzungen (analytische HPLC) sind in Tab. 1 wiedergegeben. Die Verbindungen sind farblos und chromatographisch einheitlich.

(HCl·Cha-Pro)₂-R110 und (TFA·Phe-Pro)₂-R110 wurden von Dr. J. Faust, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt.

Die ¹H-chemischen Verschiebungen der Verbindungen, sowie die *cis/trans*-Verhältnisse der Xaa-Pro-Bindung sind in Tab. A5.1 im Anhang aufgeführt.

5.1.3.2 Synthese der N-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110-Verbindungen

N-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110

N-(Boc-aminoacyl-prolin)-rhodamin 110

Die Verbindungen wurden nach **Methode B** aus Boc-Xaa-Pro-OH (Xaa = Gly, Ala) und R110-HCl synthetisiert. Die resultierenden Boc-Xaa-Pro-R110-Verbindungen (Tab. 15) wurden mittels MPLC durch isokratische Elution mit EE gereinigt.

Tab. 15 Boc-geschützte Dipeptidamido-rhodamin 110-Verbindungen

Verbindung	Ausbeute [%] Summenformel	MS [M+H] ⁺ MG [g/mol]	DC Rf/System
Boc-Gly-Pro-R110	28.3	585	0.47/A
	C ₃₂ H ₃₂ O ₇ N ₄	584.23	0.15/B
Boc-Ala-Pro-R110	28.7	599	0.54/A
	C ₃₃ H ₃₄ O ₇ N ₄	598.24	0.21/B

N-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110

Die Verbindungen (Tab. 2) wurden nach Deblockierung von Boc-Xaa-Pro-R110 (Xaa = Gly, Ala) nach **Methode D1** erhalten. Die Substanzen sind stark orange gefärbt und liegen in einem Verhältnis von 1:1 als Diastereoisomere (bezüglich C₉ als Asymmetriezentrum) vor. Die *cis*- und *trans*-Isomeren liegen demnach sowohl in einer S- als auch in einer R-Konfiguration vor [MRESTANI-KLAUS et al., 1996]. Phe-Pro-R110-HCl wurde von Dr. J. Faust, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt.

5.1.3.3 Synthese der Gly-Pro-R110-Y-Verbindungen

N-(Chlormethylbenzoyl)-N'-(glycyl-prolin)-rhodamin 110 (Gly-Pro-R110-Y₆)

N-(Boc-glycyl-prolin)-N'-(chlormethylbenzoyl)-rhodamin 110 (Boc-Gly-Pro-R110-Y₆)

Die Synthese erfolgte durch Umsetzung von Boc-Gly-Pro-R110 mit p-Chlormethylbenzoesäurechlorid entsprechend **Methode C**. Das Säurechlorid wurde durch Umsetzung von 1 Äquivalent Chlormethylbenzoesäure mit 1.5 Äquivalenten Thionylchlorid nach 3stündigem Kochen unter Rückfluß und anschließender Vakuumdestillation erhalten. Die Reinigung von Boc-Gly-Pro-R110-Y₆ erfolgte mit Hilfe der MPLC durch isokratische Elution der Substanz mit EE.

Ausbeute: 18.6%

F_p: amorph

Summenformel: C₄₀H₃₇O₈N₄Cl

MG: 736.23 g/mol

MS: 737 [M+H]⁺

DC: 0.22/B

N-(Chlormethylbenzoyl)-N'-(glycyl-prolin)-rhodamin 110 (Gly-Pro-R110-Y₆)

Die Verbindung wurde nach Boc-Abspaltung aus Boc-Gly-Pro-R110-Y₆ nach **Methode D2** erhalten. Nach HPLC-Reinigung ist die Substanz farblos und chromatographisch einheitlich.

Ausbeute: 69.3%

F_p: amorph

$[\alpha]_D^{20}$: -60.11° (c = 0.61, Methanol)

Summenformel: C₃₅H₂₉O₆N₄Cl MG : 636.18 g/mol MS: 637 [M+H]⁺

DC: 0.49/D, 0.53/E, 0.61/F HPLC: 40 min (0-100% A/60 min)

N-(Glycyl-prolin)-N'-(halogenalkylcarbonyl)-rhodamin 110 (Gly-Pro-R110-Y, Y = Y₂, Y₃, Y₄ und Y₅)N-(Boc-glycyl-prolin)-N'-(halogenalkylcarbonyl)-rhodamin 110 (Boc-Gly-Pro-R110-Y, Y = Y₂, Y₃, Y₄ und Y₅)

Alle N-(Boc-glycyl-prolin)-N'-(halogenalkylcarbonyl)-rhodamin 110-Verbindungen (Boc-Gly-Pro-R110-Y, Y = Y₂ bis Y₅) wurden durch Kupplung von Boc-Gly-Pro-R110 mit dem jeweiligen Halogen-carbonsäurechlorid (2-Chloressigsäurechlorid/Cl-Y₂, 4-Chlorbuttersäurechlorid/Cl-Y₃, 5-Chlorvaleriansäurechlorid/Cl-Y₄, 5-Bromvaleriansäurechlorid/Br-Y₅) nach **Methode C** synthetisiert.

Die Reinigung der Verbindungen erfolgte über MPLC. Alle Verbindungen sind farblos. Die analytischen Daten sind in Tab. 16 zusammengefaßt.

N-(Glycyl-prolin)-N'-(halogenalkylcarbonyl)-rhodamin 110 (Gly-Pro-R110-Y, Y = Y₂, Y₃, Y₄ und Y₅)

Die Boc-Schutzgruppe der in Tab. 16 aufgeführten Verbindungen Boc-Gly-Pro-R110-Y (Y = Y₂ bis Y₅) wurde acidolytisch nach **Methode D2** abgespalten. Mit Ausnahme von Gly-Pro-R110-Y mit Y = Y₃ und Y₅ wurden alle Verbindungen durch präparative HPLC gereinigt. Die Produkte sind farblos. Die analytischen Daten sind in Tab. 4 aufgeführt.

N-(Glycyl-prolin)-N'-(maleinimidoalkylcarbonyl)-rhodamin 110 (Gly-Pro-R110-Y, Y = Y₇ und Y₈)N-(Boc-glycyl-prolin)-N'-(maleinimidoalkylcarbonyl)-rhodamin 110 (Boc-Gly-Pro-R110-Y, Y = Y₇ und Y₈)

Die N-(Boc-glycyl-prolin)-N'-(maleinimidoalkylcarbonyl)-rhodamin 110-Verbindungen (Boc-Gly-Pro-R110-Y, Y = Y₇ und Y₈) wurden durch Kupplung von 4-Maleinimidobuttersäure/HO-Y₇ und 6-Maleinimidocaprinsäure/HO-Y₈ mit Boc-Gly-Pro-R110 nach **Methode B**

erhalten. Die Reinigung beider Verbindungen erfolgte mittels MPLC. Die Verbindungen sind farblos. Die analytischen Daten sind in Tab. 16 angegeben.

N-(Glycyl-prolin)-N'-(maleinimidoalkylcarbonyl)-rhodamin 110 (Gly-Pro-R110-Y, Y = Y₇ und Y₈)

Die Boc-Schutzgruppe der oben aufgeführten Verbindungen Boc-Gly-Pro-R110-Y (Y = Y₇ und Y₈) wurde acidolytisch nach **Methode D2** abgespalten. Die Produkte sind farblos. Die analytischen Daten sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 16 Analytische Daten der Boc-Gly-Pro-R110-Y-Verbindungen (Y = Y₂-Y₅, Y₇ und Y₈)

Verbindung	Ausbeute [%] Summenformel, Methode	MS MG [g/mol]	DC Rf/System MPLC
Boc-Gly-Pro-R110-Y ₂	62.6 C ₃₄ H ₃₃ O ₈ N ₄ Cl, Methode C	661 660.20	0.59/A 0.18/B EE
Boc-Gly-Pro-R110-Y ₃	58.5 C ₃₆ H ₃₇ O ₈ N ₄ Cl, Methode C	689 688.23	0.21/B EE
Boc-Gly-Pro-R110-Y ₄	57.9 C ₃₇ H ₃₉ O ₈ N ₄ Cl, Methode C	703 702.25	0.62/A 0.21/B EE
Boc-Gly-Pro-R110-Y ₅	49.2 C ₃₇ H ₃₉ O ₈ N ₄ Br, Methode C	747 746.20	0.22/B EE
Boc-Gly-Pro-R110-Y ₇	64.9 C ₄₀ H ₃₉ O ₁₀ N ₅ , Methode B	750 749.27	0.61/A 0.14/B EE/PEth = 9:1
Boc-Gly-Pro-R110-Y ₈	43.6 C ₄₂ H ₄₃ O ₁₀ N ₅ , Methode B	778 777.30	0.61/A 0.16/B EE/PEth = 8:2

N-Acetyl-N'-(glycyl-prolin)-rhodamin 110 (Gly-Pro-R110-Y₁)

N-Acetyl-N'-(boc-glycyl-prolin)-rhodamin 110 (Boc-Gly-Pro-R110-Y₁)

Die Verbindung wurde ausgehend von der in **5.1.3.2** beschriebenen Verbindung Boc-Gly-Pro-R110 durch Acetylierung der freien Aminogruppe des R110 mit Acetanhydrid nach **Methode E** erhalten.

Ausbeute: 96.3%

Summenformel: C₃₄H₃₄O₈N₄

MG: 626.24 g/mol

MS: 627 [M+H]⁺

DC: 0.43/A

N-Acetyl-N'-(glycyl-prolin)-rhodamin 110 (Gly-Pro-R110-Y₁)

Die Verbindung wurde durch acidolytische Boc-Schutzgruppenabspaltung aus Boc-Gly-Pro-R110-Y₁ nach **Methode D1** erhalten und mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 60.6%

F_p: 201-205°C

Summenformel: C₂₉H₂₆O₆N₄

MG: 526.19 g/mol

MS: 527 [M+H]⁺

DC: 0.47/D, 0.51/E, 0.53/F

HPLC: 38 min (0-70% A/60 min)

Die ¹H-chemischen Verschiebungen der Xaa-Pro-R110-Y-Verbindungen, sowie die *cis/trans*-Verhältnisse der Xaa-Pro-Bindung sind in Tab. A5.2 (Anhang) aufgeführt.

N-Chlormethylbenzoyl-rhodamin 110 (R110-Y₆)

Die Synthese erfolgte aus R110·HCl und Chlormethylbenzoesäure nach **Methode B**. Die Reinigung erfolgte mittels MPLC.

Ausbeute: 10.0%

F_p: amorph

Summenformel: C₂₈H₁₉O₄N₂Cl

MG: 482.10 g/mol

MS: 483 [M+H]⁺

DC: 0.88/D, 0.81/E, 0.75/F

MPLC: EE/PEth = 1:1

5.1.4 Synthese der N^ε-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidide**Fmoc-Lys(Boc)-Prolinamid**

Die Synthese von Fmoc-Lys(Boc)-Pro-NH₂ erfolgte in Analogie zu LI et al. [1995]. Dazu wurden 2 mmol Prolinamid in 6.6 ml Tetrahydrofuran (THF) und 3.3 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 2 mmol Fmoc-Lys(Boc)-OH sowie jeweils 2.2 mmol EDC und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) wurde die Suspension 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte durch Abdestillieren des Lösungsmittels und anschließende Resuspension des Rückstandes in Chloroform. Die organische Phase wurde nacheinander dreimal mit 10% iger Zitronensäure, Wasser, NaCl-gesättigtem Wasser und nochmals Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend abdestilliert. Das Produkt ist farblos, amorph und dünnschichtchromatographisch einheitlich.

Ausbeute: quantitativ

DC: 0.45/A, 0.15/B, 0.50/C

Summenformel: C₃₁H₄₀O₆N₄

MG: 564.29 g/mol

MS: 565 [M+H]⁺

Fmoc-Lys(Boc)-2-cyano-pyrrolidid

Nach JINGRONG et al. [1995] wurde 1 mmol Fmoc-Lys(Boc)-Pro-NH₂ in 12 ml THF gelöst. Nach Abkühlen der Suspension auf 5°C wurden über einen Zeitraum von 5 min zwei Äquivalente Trifluoressigsäureanhydrid in vier gleichen Portionen zupipettiert. Der Ansatz

wurde anschließend noch 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Abdestillieren des Lösungsmittels und Resuspension des Rückstandes in 2 ml Chloroform. Das Produkt wurde mit Hilfe der MPLC durch isokratische Elution mittels $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9.5:0.5$ gereinigt und ist dünnenschichtchromatographisch einheitlich.

Ausbeute: 89.3% DC: 0.70/A, 0.49/B, 0.82/C
Summenformel: $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{N}_4$ MG: 546.28 g/mol MS: 547 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Fmoc-Lys-2-cyano-pyrrolidid

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte acidolytisch nach **Methode D1**. Das Produkt, das als bräunliches Öl anfiel, wurde mit EE/PEth ausgefällt.

Ausbeute: 47.8% DC: 0.62/D, 0.45/E, 0.66/F
Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{N}_4$ MG: 446.23 g/mol MS: 447 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Fmoc-Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid

1 mmol Biotin wurde in Analogie zu **Methode A** mit 1 mmol Fmoc-Lys-2-cyano-pyrrolidid umgesetzt. Nach MPLC-Reinigung wurde dünnenschichtchromatographisch einheitliches pulverförmiges Produkt erhalten.

Ausbeute: 57.4% DC: 0.19/A, 0.14/C
Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{N}_6\text{S}$ MG: 672.31 g/mol MS: 673 $[\text{M}+\text{H}]^+$
MPLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 8.7:1.3$

Fmoc-Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid

1 mmol 4(5)-Carboxyfluorescein wurde in Analogie zu **Methode A** mit 1 mmol Fmoc-Lys-2-cyano-pyrrolidid umgesetzt. Nach MPLC-Reinigung wurde dünnenschichtchromatographisch einheitliches pulverförmiges Produkt erhalten.

Ausbeute: 51.6% DC: 0.20/A, 0.15/B, 0.52/C
Summenformel: $\text{C}_{47}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{N}_4$ MG: 804.28 g/mol MS: 805 $[\text{M}+\text{H}]^+$
MPLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 8.7:1.3$

Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid / Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid

0.1 mmol der Fmoc-geschützten Verbindung wurde in 1 ml Morpholin gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte durch Abdestillieren des Morpholins unter Vakuum. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst und das Lösungsmittel wurde abdestilliert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das Produkt wurde aus MeOH/Diethylether ausgefällt.

Die analytischen Daten der Verbindungen Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid und Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid sind in Tab. 5 aufgeführt.

5.2 Enzymkinetische Methoden

5.2.1 Allgemeine Bemerkungen

Alle spektrophotometrischen Messungen wurden an einem UV/VIS-Spektrometer DU 650 (Beckmann) durchgeführt. Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen wurde ein Lumineszenzspektrometer LS50B (Perkin Elmer) eingesetzt.

Für alle Enzymansätze wurde ein 0.04 M Tris-Puffer, dessen Ionenstärke mit KCl auf 0.125 und dessen pH-Wert mit HCl auf 7.6 eingestellt wurde, verwendet. Die kinetischen Konstanten der Substrathydrolyse wurden aus Doppelbestimmungen von mindestens zwei unabhängigen Meßreihen ermittelt. Die K_i -Werte der untersuchten Inhibitoren gehen auf Dreifachbestimmungen zurück. Alle weiteren Meßwerte wurden durch mindestens einmalige Versuchswiederholung abgesichert.

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Software (Microcal Origin 4.10, Ez-fit). Die kinetischen Konstanten der Substrathydrolyse wurden aus dem Fit der Einzelmeßwerte ermittelt und sind mit dem Standardfehler angegeben.

5.2.2 Bestimmung der aktiven Zentren der DP IV

Die Bestimmung der aktiven Zentren der DP IV aus Schweineniere, humaner Niere sowie rekombinanter humaner DP IV erfolgte mittels des irreversiblen DP IV-Inhibitors H-Pro-Pro^(P)[OPh-4Cl]₂, der von Dr. B. Stiebitz, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt wurde.

Identische Konzentrationen isolierter DP IV der entsprechenden Quellen wurden über Nacht mit variierenden Konzentrationen des Inhibitors (10^{-10} M bis $4 \cdot 10^{-9}$ M für DP IV aus Schweineniere; $5 \cdot 10^{-9}$ M bis $5 \cdot 10^{-8}$ M für humane rekombinante DP IV; 10^{-9} M bis 10^{-8} M für DP IV aus humaner Niere) in 0.04 M Tris/HCl-Puffer bei einer Temperatur von 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Initialgeschwindigkeit der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA (10^{-4} M) über eine Zeit von 120 s durch Messung der Freisetzung des p-Nitroanilins bei 390 nm bestimmt. Durch Auftragung der Initialgeschwindigkeit gegen die Inhibitorkonzentration und lineare Regression der Meßdaten konnte die Enzymkonzentration aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse ermittelt werden.

5.2.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten der enzymkatalysierten Substrathydrolyse durch DP IV

Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten der enzymkatalysierten Substrathydrolyse der Rhodamin 110-Derivate wurden die Initialgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Substratkonzentration, die in einem Bereich des 0.05 bis 8-fachen der K_m -Wert-Konzentration des zu untersuchenden Substrates variierte, ermittelt. Die eingesetzte Enzymkonzentration war mindestens zwei Größenordnungen geringer und wurde so gewählt, daß maximal 5% des Substrates während der Meßzeit hydrolysiert wurde. Für die Untersuchungen der

enzymatischen Hydrolyse der N,N'-bis-(Aminoacyl-prolin)-rhodamin 110-Verbindungen wurde die Enzymkonzentration im Ansatz so eingestellt, daß nur das entsprechende mono-(Dipeptidamido)-rhodamin 110 während der Meßzeit entstand, was einem Substratumsatz von ca. 2% entsprach.

Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 1 ml enthielt 0.04 M Tris/HCl-Puffer (pH 7.6, I = 0.125). Die Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten der Substrathydrolyse erfolgte über einen Zeitraum von 120 s bei einer Temperatur von 30°C und einer Wellenlänge von 494 nm. Die Enzymkonzentration im Ansatz wurde nach Bestimmung der aktiven Zentren der DP IV mittels eines irreversiblen Inhibitors ermittelt (5.2.2). Die kinetischen Konstanten wurden durch Anpassung der als Funktion der Substratkonzentration aufgetragenen Initialgeschwindigkeit an eine Hyperbole entsprechend einer Michaelis-Menten-Kinetik nach Gleichung (1) erhalten.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Im Falle einer Substratüberschußhemmung wurden die k_{cat} -, K_m - und K_i -Werte durch nichtlineare Regression der v/S -Wertepaare nach Gleichung (2) bestimmt.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right) \cdot [S]} \quad (2)$$

Die DP IV aus Schweineniere wurde von Dr. J. Rahfeld, Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft e.V., Halle, zur Verfügung gestellt. Deren Proteinkonzentration betrug 1.54 mg/ml. Die DP IV aus humaner Niere mit einer Proteinkonzentration von 0.57 mg/ml und die rekombinante humane DP IV mit einer Proteinkonzentration von 3.34 mg/ml wurde von Dr. T. Kähne, Institut für Experimentelle Innere Medizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, bereitgestellt. Die Proteinkonzentrationen wurden in Analogie zu 5.2.2 aus der Anzahl der aktiven Zentren ermittelt. Das Molekulargewicht der DP IV wurde mit 115 kDa für die Berechnungen zugrunde gelegt.

5.2.4 Untersuchung der reversiblen kompetitiven Inhibierung der DP IV

Die Untersuchung der reversiblen kompetitiven Inhibierung der Substrathydrolyse erfolgte bei drei Substratkonzentrationen (Gly-Pro-pNA: $2 \cdot 10^{-5}$ M, $6 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-4}$ M) und vier Inhibitorkonzentrationen ($5 \cdot 10^{-8}$ M bis $1 \cdot 10^{-6}$ M) durch Messung der Initialgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Freisetzung des p-Nitroanilins bei einer Temperatur von 30°C und einer Wellenlänge von 390 nm. Der Substratumsatz während der Meßzeit (120 s) lag dabei

unter 5%, bei einer Enzymkonzentration, die mindestens drei Größenordnungen unter der Substratkonzentration lag. Die Auswertung der Meßdaten und die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte nach Dixon durch Auftragung der reziproken Initialgeschwindigkeit als Funktion der Inhibitorkonzentration und lineare Regression der Wertepaare der verschiedenen Substratkonzentrationen. Die so erhaltenen Geraden schneiden sich im zweiten Quadranten und definieren den negativen K_i -Wert als Lot des Geradenschnittpunktes auf die x-Achse.

5.2.5 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Rhodamin 110-Derivate

Die Extinktionskoeffizienten der mono-(Dipeptidamido)-Rhodamin 110-Verbindungen sowie des R110 (Tab. 17) wurden nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$) bestimmt. Dazu wurde die Extinktion von drei verschiedenen konzentrierten Lösungen der Ausgangsverbindung ($5 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M und $2 \cdot 10^{-5}$ M) ermittelt. Durch Auftragung der Extinktion als Funktion der Substratkonzentration wurden die Extinktionskoeffizienten bestimmt. Die bis-(Dipeptidamido)-R110-Verbindungen zeigen keine Absorption bei 494 nm. Für die monosubstituierten R110-Verbindungen Xaa-Pro-R110 mit Xaa = Abu, Leu, Ser, Lys, Cha und Phe wurden die Extinktionskoeffizienten nicht ermittelt. Für die kinetischen Untersuchungen der enzymatischen Spaltung dieser Substrate wurde der Mittelwert der Extinktionskoeffizienten von Gly-Pro-R110 und Ala-Pro-R110 verwendet.

Zur Untersuchung der Extinktionsänderung nach enzymatischer Hydrolyse der bis-(Dipeptidamido)-Rhodamin 110-Verbindungen wurden drei Konzentrationen der Ausgangsverbindung ($5 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M und $2 \cdot 10^{-5}$ M) enzymatisch gespalten (10^{-8} M DP IV) und die Extinktionsänderungen spektrophotometrisch verfolgt.

Die Extinktionskoeffizienten der Verbindungen der allgemeinen Struktur R110-Y mit Y = Y₁ bis Y₉ wurden nach enzymatischer Hydrolyse des jeweiligen Substrates (Gly-Pro-R110-Y mit Y = Y₁ bis Y₈ und Ala-Pro-R110-Y₉) nach zweimaliger Enzymgabe (10^{-8} M) und einer Inkubationszeit von 5 h bei 30°C bestimmt. Der Ansatz enthielt 400 µl Tris/HCl-Puffer (0.1 M, pH 7.6), bis 500 µl Substrat, 10 µl Enzym der oben genannten Konzentration und wurde auf 1 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Darüber hinaus wurden die Extinktionskoeffizienten einiger R110-Y-Verbindungen nach vollständiger Hydrolyse der Pro-R110-Bindung der entsprechenden Gly-Pro-R110-Y-Verbindungen durch 8stündige Inkubation mit 6 M HCl bei Raumtemperatur ermittelt. Nach Neutralisation mit 6 M NaOH-Lösung wurde die zu vermessende Konzentration mit Tris/HCl-Puffer (pH 7.6) eingestellt.

Mit Ausnahme von Gly-Pro-R110-Y mit Y = Y₆ und Y₈ sowie von Ala-Pro-R110-Y₉ wurden für die Berechnung der k_{cat} -Werte die nach vollständiger enzymatischer Hydrolyse der Substrate erhaltenen Extinktionskoeffizienten der R110-Y-Verbindungen zugrunde gelegt. Für die Bestimmung der k_{cat} -Werte der Hydrolyse der genannten Substrate Gly-Pro-R110-Y (Y₆ und Y₈) und Ala-Pro-R110-Y₉ wurden die nach vollständiger Säurehydrolyse erhaltenen Extinktionskoeffizienten (R110-Y₈ und R110-Y₉) bzw. der Extinktionskoeffizient des Syntheseproduktes (R110-Y₆) verwendet.

Tab. 17 Extinktionskoeffizienten der Rhodamin 110-Derivate Xaa-Pro-R110 und R110-Y

Verbindung	Absorptionsmaximum [nm]	Extinktionskoeffizient $\epsilon_{494\text{nm}}$ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]	Extinktionskoeffizienten des enzymatischen Hydrolyseprodukts $\epsilon_{494\text{nm}}$ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
Rhodamin 110	494	63 345	
<u>Xaa-Pro-R110</u>			
Xaa = Gly	467, 494	31 245 [#]	
Ala	467, 494	30 391 [#]	
Phe	467, 494	26 471 [#]	
<u>R110-Y</u>			<u>Gly-Pro-R110-Y→R110-Y</u>
Y ₁ : -COCH ₃	467, 494	24 496 ^s	25 495
Y ₂ : -COCH ₂ Cl	467, 494	-	30 687
Y ₃ : -CO(CH ₂) ₃ Cl	467, 494	-	30 263
Y ₄ : -CO(CH ₂) ₄ Cl	467, 494	-	29 653
Y ₅ : -CO(CH ₂) ₄ Br	467, 494	-	28 256
Y ₆ : -COC ₆ H ₄ CH ₂ Cl	467, 494	9 686 [#]	-
Y ₇ : -CO(CH ₂) ₃ C ₄ H ₂ O ₂ N	467, 494	-	30 237
Y ₈ : -CO(CH ₂) ₅ C ₄ H ₂ O ₂ N	467, 494	29 204 ^s	-
Y ₉ : -CO(CH ₂) ₅ C ₄ O ₂ NCl ₂	467, 494	32 173 ^s	<u>Ala-Pro-R110-Y→R110-Y</u>
			-

[#] aus Syntheseprodukt ermittelt, ^s nach Säurehydrolyse ermittelt

5.2.6 Untersuchung des nichtenzymatischen Zerfalls der Rhodamin 110-Derivate

Die Stabilität der bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen wurde mittels HPLC für je drei Konzentrationen (0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml und 0.3 mg/ml) in PBS (pH 7.2) und Tris/HCl-Puffer (pH 7.6) bei einer Temperatur von 37°C untersucht. Die Halbwertszeit, die durch Gleichung (3) beschrieben ist, als die Zeit, in der die Hälfte der Verbindung zerfallen ist, konnte nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung, durch Auftragung des Logarithmus der Stoffkonzentration gegen die Zeit, bestimmt werden.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3)$$

Der aus dieser Auftragung durch lineare Regression ermittelte Anstieg geht in die Berechnung der Zerfallskonstanten k ein.

Die Verbindungen wurden im jeweiligen Lösungsmittel gelöst und nach Temperierung kontinuierlich (alle 20 min) in die HPLC injiziert. Die Elution erfolgte isokratisch bei, in Abhängigkeit der Verbindung, variierenden Laufmittelverhältnissen A und B. Durch Integration der Peakflächen wurden die Substanzmengen quantifiziert. Die Gesamtdauer der

Messung wurde auf 2-3 Halbwertszeiten festgelegt, wenn diese kleiner als 10 Stunden waren. Halbwertszeiten größer als 10 Stunden wurden anhand des Zerfalls der ersten 20 Inkubationsstunden abgeschätzt. Die Halbwertszeiten ausgewählter R110-Derivate sind unter **3.2.7** angegeben.

5.2.7 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der bis-(Dipeptidamido)-rhodamine

Die Verteilungskoeffizienten wurden in einem n-Oktanol/Puffer(PBS, pH 7.2)-System nach 2ständiger Inkubation bei 37°C bestimmt. 3 ml der zu untersuchenden Verbindung, die in einer Konzentration von 0.2 mg/ml in PBS gelöst war, sowie 3 ml PBS-gesättigten n-Oktanols wurden in eine Ampulle eingeschweißt. Um die Entstehung von Diffusionsschichten zu verhindern, wurde die Probenhalterung in einer Vibrationsvorrichtung verankert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Substanzkonzentration in der wässrigen Phase mittels HPLC durch Integration der Peakflächen ermittelt. Der Verteilungskoeffizient P berechnet sich nach Gleichung (4) als Quotient aus der Stoffkonzentration in der lipophilen ($c(L)$) und der hydrophilen ($c(H)$) Phase. Die Verteilungskoeffizienten ausgewählter bis-(Dipeptidamido)-rhodamine sind unter **3.2.7** angegeben.

$$P = \frac{c(L)}{c(H)}$$

(4)

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Allgemeine Bemerkungen

Als Zellmaterial wurde die humane myeloische Zelllinie U-937 [SUNDSTROM und NILSSON, 1976] und die humane T-Zelllinie Jurkat eingesetzt. CD26 transfizierte CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovarian, [HONG et al., 1989]) als auch Wildtyp CHO-Zellen wurden von Dr. M. Gorrel und Dr. C. Abbott, Centenary Institute, Royal Prince Alfred Hospital, Camperdown, Sidney, zur Verfügung gestellt.

Alle für die Messungen verwendeten Verbindungen wurden grundsätzlich als 10^{-2} M Stammlösung in DMSO eingesetzt und mit PBS (pH 7.2) so verdünnt, daß die DMSO-Konzentration im Ansatz unter 1% lag. Jegliches Zellmaterial wurde in PBS aufgenommen. Die unmarkierten anti-CD26-Antikörper B10 und A10 wurden von Dr. T. Kähne, Institut für Experimentelle Innere Medizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, zur Verfügung gestellt. Alle Versuche wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt und durch zweimalige Versuchswiederholung abgesichert. Die statistische Auswertung der Meßdaten erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Software (Microcal Origin 4.10) unter Angabe der Standardabweichung.

Als Geräte zur Messung der enzymkatalysiert freigesetzten Fluoreszenz wurden ein Fluoreszenzplattenleser FLUOROLITE 1000 (Dynatech Laboratories Inc.) sowie die Durchflußzytometer COULTER (Epics Profile II, Coulter-Immunotech) und Facs Calibur (Becton Dickinson Immunocytometrische Systeme, BDIS) sowie das Fluoreszenzmikroskop AXIOVERT 135 TV (Zeiss) eingesetzt.

5.3.2 Methoden zu Zellisolation, Zellaufschluß und Zellkultivierung

Zellkulturbedingungen

U-937, Jurkat

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS sowie 10^{-3} M Glutamin bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Sättigung kultiviert. Um Kontaminationen vorzubeugen wurde ein Gemisch aus Penicillin und Streptomycin zugefügt.

CHO

Die CHO-Wildtyp-Zellen wurden in IDEM-Medium mit 10% FCS kultiviert, die CD26-transfizierten CHO-Zellen wurden in dem Selektionsmedium G-MEM-S kultiviert.

Zum Ablösen der Zellen wurde der Mediumüberstand entnommen und die Zellen mit 10 ml PBS steril gewaschen. Nach Entfernen der PBS-Waschlösung wurden 3 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und die steril verschlossene Flasche unter Schütteln bei Raumtemperatur oder 37°C inkubiert. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde die Zellsuspension mit der dreifachen Menge Medium versetzt und anschließend 5 min bei 550xg

zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und in einer geeigneten Verdünnung in Kulturflaschen oder auf Objektträgern steril ausgesät.

Separation mononukleärer Zellen (MNZ)

Durch Dichtegradientenzentrifugation wurden periphere mononukleäre Zellen (MNZ) aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen. Dazu wurde Vollblut im Verhältnis 1:2 mit PBS (50 IU Heparin/ml enthaltend) verdünnt. Durch Überschichten des Dichtegradientenmediums Fikoll-Paque ($d = 1.077 \text{ g/cm}^3$) mit diesem Gemisch in einem Verhältnis von 2:4 und anschließende Zentrifugation ($550 \times g$, 20°C , 30 min) reichern sich Lymphozyten in der Interphase beider Medien an. Nach Entnahme dieses Interphaseringes und dreimaligem Waschen ($400 \times g$, 20°C , 10 min, PBS) wurden die Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt.

Separation CD26-positiver und CD26-negativer MNZ

$5 \cdot 10^7$ MNZ wurden mit dem anti-CD26-Antikörper B10 markiert. Anschließend wurden die Zellen in 400 μl Puffer 2 resuspendiert und mit 100 μl Goat-anti-Maus-Microbeads inkubiert. Eine MiniMACS-Säule (Miltenyi Biotec mbH) wurde in einer MiniMACS-Separierungseinheit (Magnet) plziert. Nach Äquilibrierung der Säule mit 3 ml eisgekühlten Puffer 2 wurden die Zellen auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml Puffer 2 gewaschen, wobei die unmarkierten Zellen als CD26-negative Fraktion eluiert wurden. Anschließend wurde die Säule aus der MiniMACS-Separierungseinheit entfernt. Die markierten Zellen (CD26-positive Zellfraktion) wurden durch Waschen der Säule mit Puffer 2 eluiert.

Bestimmung der Zellzahl und Vitalität der Zellen

Die zu zählenden Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit 0.1%igem Trypanblau gemischt und in der Neubauerkammer (Tiefe: 0.1 mm, $1/400 \text{ mm}^2$) gezählt. Membranperforierte Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau gefärbt.

Die Untersuchung der Vitalität mittels Durchflußzytometrie erfolgte durch Anfärben der Zellen mit Propidiumjodid (5 $\mu\text{l}/250\,000$ Zellen, 5 min Inkubation bei Raumtemperatur). Nach Anregung bei 488 nm zeigen Zellen deren Membran nicht intakt ist eine rote Fluoreszenz im Durchflußzytometer.

Zellaufschluß

Intakte Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und unter Eiskühlung ca. 5 min mit Ultraschall behandelt.

5.3.3 Spektralphotometrische Bestimmung zellulärer DP IV-Aktivität

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DP IV wurde mit Hilfe des Substrates Gly-Pro-pNA durchgeführt. Die DP IV katalysiert die Hydrolyse dieser Verbindung in das Dipeptid Glycyl-Prolin und p-Nitroanilin, dessen Konzentration sich durch die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 390 nm bestimmen läßt ($\epsilon = 11500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Für die Bestimmung der DP IV-Aktivität auf Zellen (U-937), im Lysat (U-937) und des isolierten rekombinanten humanen Enzyms wurde eine Zweipunktmessung durchgeführt. Dazu wurden jeweils 100 μl der DP IV-enthaltenden Suspension (intakte Zellen, Lysat oder isolierte DP IV) mit 100 μl einer 3.3 mM Gly-Pro-pNA-Lösung gemischt. Die Substratkonzentration im Messansatz betrug damit $1.65 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. In 100 μl des Ansatzes wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl Azetatpuffer (1 M, pH 4.4) gestoppt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (90 s, 10 000xg) und die Extinktion des Überstandes bei 390 nm bestimmt. Das restliche Proben-Substrat-Gemisch wurde zwischen 5 min (isolierte DP IV) und 30 min (intakte Zellen U-937 und Zellysat U-937) bei 37°C inkubiert und anschließend in gleicher Weise mittels Azetatpuffer abgestoppt, zentrifugiert und spektralphotometrisch vermessen. Unter der Voraussetzung eines linearen Verlaufs der Substratumsetzung während der Inkubationszeit, erfolgte die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Zellsuspension, Lysat und isoliertem Enzym nach Gleichung (5).

$$A = \frac{(\Delta E \cdot V)}{(\epsilon \cdot d \cdot v \cdot t)} \quad (5)$$

A	= Enzymaktivität [pkat/ml]
ΔE	= Extinktionsänderung ($\Delta E = E_{t=30 \text{ min}} - E_{t=0}$)
V	= Ansatzvolumen [ml]
d	= Schichtdicke der Küvette [cm]
t	= Inkubationszeit [s]
v	= Probenvolumen (Zellen, Lysat, isol. Enzym) [ml]
ϵ	= molarer Extinktionskoeffizient [cm^2/mol]

Für die Untersuchung der Hemmung zellulärer DP IV durch Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierte DP IV-Inhibitoren enthielt der Ansatz zusätzlich verschiedene Konzentrationen des zu untersuchenden Inhibitors ($5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ bis 10^{-4} M).

5.3.4 Untersuchung zellulärer Enzymaktivität mittels Fluoreszenzplattenleser

Für alle Ansätze wurden 96-Loch-Platten verwendet. Das Gesamtvolumen aller Ansätze betrug 100 μl , sowohl Zellen als auch Substrate wurden in PBS (pH 7.2) aufgenommen. Während des Pipettierens der Ansätze wurden die Platten auf Eis gestellt um eine vorzeitige Hydrolyse zu verhindern.

Hydrolyse der Rhodamin-Substrate durch zelluläre und isolierte DP IV

Intakte Zellen, Zellysat und isoliertes Enzym wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-6} M bis 10^{-5} M) der farblosen nichtfluoreszierenden R110-Substrate (Xaa-Pro)₂-R110 (Xaa = Gly, Ala, Abu, Leu, Ser und Cha) und Xaa-Pro-R110-Y (Xaa = Gly, Ala und Y = Y₁ bis Y₉) bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. DP IV katalysiert dabei die Abspaltung der entsprechenden Dipeptide Xaa-Pro unter Freisetzung des fluoreszierenden Xaa-Pro-R110 und des R110 im Falle der bis-(Dipeptidamido)-rhodamin 110-Verbindungen sowie unter Freisetzung des fluoreszierenden R110-Y im Falle der Xaa-Pro-R110-Y-Substrate. Die Hydrolyserate wurde durch Bestimmung der Fluoreszenzfreisetzung zur Zeit $t = 0$ min und $t = 30$ min (intakte Zellen U-937), $t = 20$ min (Zellysat U-937) und $t = 5$ min (isolierte rekombinante humane DP IV) mittels eines Fluoreszenzplattenlesers bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm sowie einer Lampenspannung zwischen 1.8 V und 2.5 V ermittelt. Zellen, Zellysat und isolierte DP IV wurden nach 5.3.3 auf eine einheitliche Aktivität von 25 pkat/ml Ansatz eingestellt. (Lys-Pro)₂-R110 wurde aufgrund seiner geringen Stabilität nicht zu Untersuchungen an Zellen herangezogen. Für alle anderen Substrate wurde der nichtenzymatische Zerfall bei der Auswertung berücksichtigt. Innerhalb der von uns gewählten Inkubationszeiten wurde eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzfreisetzung pro Zeit beobachtet.

Untersuchung der Spezifität der Hydrolyse der Rhodamin-Substrate durch DP IV

Zur Überprüfung der Spezifität der Substrathydrolyse wurden spezifische DP IV-Inhibitoren (Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid, Lys-[Z(NO₂)]-piperidid und Lys-[Z(NO₂)]-thiazolidid) variierender Konzentrationen ($5 \cdot 10^{-7}$ M bis 10^{-4} M) eingesetzt und nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C deren Effekt auf die Hydrolyse einer 10^{-4} M Substratlösung der jeweiligen Rhodamin 110-Verbindung durch intakte Zellen (U-937) und Zellysat (U-937) bei einer Lampenspannung zwischen 1.8 V und 2.5 V untersucht. Die Zellen bzw. das Zellysat wurden in einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml Ansatz eingesetzt.

Untersuchung der Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von (Xaa-Pro)₂-R110 durch zelluläre DP IV

Untersuchungen zur Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse der synthetisierten Rhodamin 110-Verbindungen (Xaa-Pro)₂-R110 erfolgten bei variierenden Substratkonzentrationen (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M und 10^{-4} M) und DP IV-Aktivitäten der intakten U-937-Zellen (0.5 pkat/ml bis 8 pkat/ml Ansatz). Bei Lampenspannungen zwischen 2.0 V und 4.5 V wurde die enzymkatalysiert freigesetzte Fluoreszenz im Ansatz nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C bestimmt.

Als Vergleich wurde die Nachweisempfindlichkeit der Hydrolyse von Gly-Pro-pNA untersucht. Dazu wurde Gly-Pro-pNA (Endkonzentration 10^{-5} M und 10^{-4} M) mit einer Zellzahl variierender DP IV-Aktivität (0.5 pkat/ml bis 10 pkat/ml) bei 37°C inkubiert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 500 µl. Die spektrophotometrische Bestimmung des

enzymkatalysiert freigesetzten pNA erfolgte zur Zeit $t = 0$ min und $t = 30$ min bei 390 nm. Um die Reaktion abzustoppen wurden die Ansätze auf Eis gestellt.

5.3.5 Untersuchung zellulärer Enzymaktivität mittels Durchflußzytometrie

Im Falle der durchflußzytometrischen Untersuchungen erfolgten alle Waschschrirte mit 200 μ l PBS (pH 7.2). Die Zellen wurden dabei 5 min bei 400xg zentrifugiert. Alle Antikörperreaktionen mononukleärer Zellen erfolgten bei 4°C.

Für durchflußzytometrische Untersuchungen, die mit Zellen der Zelllinie U-937 sowie peripheren mononukleären Zellen (MNZ) durchgeführt wurden, wurde eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Substratkonzentration im Ansatz betrug $5 \cdot 10^{-6}$ M. Die Inkubation von 200 μ l der Zellen ($2 \cdot 10^5$ Zellen im Ansatz) mit den Substraten Xaa-Pro-R110-Y erfolgte 20 min bei einer Temperatur von 37°C. Danach wurden die Zellen dreimal gewaschen und die zelluläre Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argonlaser) und einem Emissionsfilter von 530/30 nm (FL1) gemessen. Für Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität der zellulären Fluoreszenz wurde nach jedem Waschschrirte die verbleibende zellassozierte Fluoreszenz bestimmt.

Für Untersuchungen hinsichtlich der Hydrolyse zellulär gebundenen Substrates durch Nachbarzellen oder isolierte DP IV wurden 200 μ l MNZ ($2 \cdot 10^5$ Zellen im Ansatz) 20 min bei 37°C mit einer $5 \cdot 10^{-6}$ M Substratlösung (Xaa-Pro-R110-Y) sowie einer 10^{-4} M Konzentration von Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid inkubiert. Unter diesen Bedingungen binden die Substrate an die Zelle, werden aber aufgrund der Inhibierung der enzymatischen Aktivität nicht hydrolysiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen, wodurch der Inhibitor und nicht gebundenes Substrat aus dem Ansatz entfernt wurden, wurden die MNZ weitere 20 min bei 37°C in Gegenwart DP IV-reicher U-937-Zellen oder isolierter rekombinanter humaner DP IV einer Aktivität von 20 pkat/ml Ansatz inkubiert. Die zelluläre Fluoreszenzfreesetzung der MNZ wurde durchflußzytometrisch gemessen.

Für die durchflußzytometrische Differenzierung enzymatischer Aktivität auf Immunzellen (MNZ) wurden zunächst DP IV-reiche von DP IV-armen T-Lymphozyten nach 5.3.2 separiert. 50 μ l ($2.5 \cdot 10^5$ Zellen enthaltend) der CD26-positiven und CD26-negativen Zellpopulation wurden 30 min mit dem Maus-anti-CD26-Antikörper A10 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 50 μ l PBS resuspendiert und weitere 30 min mit einem PerCP- oder PE-markierten Ratte-anti-Maus-IgG inkubiert. Nach wiederholtem zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen und mit dem jeweiligen DP IV-Substrat Xaa-Pro-R110-Y (Endkonzentration $5 \cdot 10^{-6}$ M) und Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid (Endkonzentration 10^{-4} M) als Inhibitor 20 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Die Ermittlung

der Fluoreszenzintensität erfolgte durchflußzytometrisch nach Anregung bei 488 nm und Messung der Fluoreszenzemission unter Verwendung der Filter 530/30 nm (R110-Y, FL1), 585/42 nm (PE, FL2) sowie 670LP nm (PerCP, FL3).

5.3.6 Fluoreszenzmikroskopische Differenzierung von DP IV- Aktivität auf CHO-Zellen

Ein Gemisch CD26(aktiv)- und CD26(inaktiv)-transfizierter CHO-Zellen sowie ein Gemisch CD26(aktiv)-transfizierter und Wildtyp-CHO-Zellen der Verhältnisse 1:3, 1:1 und 3:1 wurde in Analogie zu **5.3.2** in Zelldichten von 1 000, 5 000 und 10 000 Zellen auf einem Deckglaschen steril ausgesät. Nach zwei Tagen Inkubationszeit konnte das typische Erscheinungsbild adhärenter Zellen nachgewiesen werden.

Die zellbewachsenen Deckglaschen wurden in 8-Loch-Platten 3fach gewaschen und danach in 500 µl PBS aufgenommen. Die zunächst vorgenommene anti-CD26-Antikörperfärbung erfolgte durch 30minütige Inkubation der Zellen mit dem unmarkierten Maus-anti-CD26-Antikörper A10. Nach 3maligem Waschen der Zellen mit je 500 µl PBS wurde der sekundäre Antikörper, ein Texas Rot(TR)-markiertes Schaf-anti-Maus-IgG, zugegeben und der Ansatz weitere 30 min inkubiert. Nach 3maligem Waschen der Zellen mit je 500 µl PBS wurden die Substrate Gly-Pro-R110-Y₆ oder Ala-Pro-R110-Y₉ ($5 \cdot 10^{-6}$ M Endkonzentration) und der spezifische DP IV-Inhibitor Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid (10^{-4} M Endkonzentration) zugegeben und der Ansatz weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Nach 3maligem Waschen der Zellen und weiterer Inkubation für 20 min bei 37°C wurde die zelluläre Fluoreszenz fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Dabei wurden für die R110-Y-Fluoreszenz die Filter 495/515 und für die Fluoreszenz des Texas-Rot-markierten Antikörpers die Filter 590/670 verwendet.

5.3.7 Untersuchung des Thiolstatus separierter MNZ

Zum Nachweis membranständiger Thiole wurden 50 µl separierte MNZ (10^6 Zellen/50 µl Puffer 1) mit einer 12.5 µM CMTMR-Lösung 3 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit eisgekühltem Puffer 1 gewaschen und deren Fluoreszenz nach Anregung bei 488 nm unter Nutzung des Filters 530/30 nm (FL1) durchflußzytometrisch gemessen.

5.3.8 Untersuchungen zu Hemmeigenschaften kompetitiver reversibler Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierter Inhibitoren zellulärer DP IV

Zur Untersuchung der Hemmeigenschaften markierter Lys-2-cyano-pyrrolidide wurden 400 μl intakter U-937-Zellen sowie des Zellysats ($4 \cdot 10^5$ Zellen im Ansatz) mit Gly-Pro-pNA ($1.65 \cdot 10^{-3}$ M Endkonzentration) in Gegenwart variierender Inhibitorkonzentrationen des N^ε-Biotin bzw. 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidides (10^{-7} M bis 10^{-4} M) 30 min bei 37°C inkubiert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 500 μl . Die Messung des enzymkatalysiert freigesetzten pNA erfolgte spektrophotometrisch bei einer Absorption von 390 nm zur Zeit $t = 0$ und $t = 30$ min. Die Reaktion wurde auf Eis abgestoppt. Um die Beeinflussung verschiedener Agenzien (Malodinitril, Ala-Ala-Pro-Val-Chlormethylketon und BSA) auf die zelluläre Bindung der Inhibitoren und deren Hemmung der Enzymaktivität zu untersuchen, wurden diese dem oben genannten Ansatz in verschiedenen Konzentrationen (Malodinitril und Ala-Ala-Pro-Val-Chlormethylketon: 10^{-4} M, 10^{-3} M und 10^{-2} M, BSA: 0.048%, 0.48% und 4.8%) zugefügt. Auch hier erfolgte die Untersuchung der Enzymaktivität durch spektrophotometrische Bestimmung der Gly-Pro-pNA-Hydrolyse.

Zur Untersuchung der Eignung des N^ε-Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidids zur Detektion zellulärer DP IV mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden 10 μl einer Zellsuspension (U-937, MNZ) einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml 15 min auf 8-Loch-Objektträgern inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes und einer 15minütigen Inkubation der Zellen mit jeweils verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M und 10^{-4} M) wurden die Zellen dreimal mit je 50 μl PBS gewaschen. Im Falle des Biotin-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidids wurden die Zellen weitere 15 min mit DTAF-Streptavidin inkubiert. Die Messung der zellassozierten Fluoreszenz erfolgte bei 520 nm nach Anregung bei 495 nm.

Literaturverzeichnis

1. ABRAMS, M.J.; PICKER, D.H.; FACKLER, P.H.; LOCK, C.J.L.; HOWARD-LOCK, H.E.; FAGGIANI, R.; TEICHER, B.A.; RICHMOND, R.C.: Synthesis and structure of [Rhodamine 123]₂PtCl₄·4H₂O: The first tetrachloroplatinate (II) salt with anticancer activity. *Inorg Chem.* 25 (1986) 3980-3983.
2. AHMAD, S.; WANG, L.; WARD, P.E.: Dipeptidylaminopeptidase IV and Aminopeptidase M metabolize circulating Substance P *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther.* 260 (1992) 1257-1261.
3. AJTAI, K.; BURGHARDT, T.P.: Conformation of xanthene dyes in the sulfhydryl binding site of myosin. *Biochemistry.* 34 (1995) 15943-15952.
4. ARBELOA, I.L.; OJEDA, P.R.: Dimeric states of Rhodamine B. *Chem Phys Lett.* 87 (1982) 556-560.
5. ARBELOA, I.L.; ROHATGI-MUKHERJEE, K.K.: Solvent effect on photophysics of the molecular forms of Rhodamine B. Internal conversion mechanism. *Chem Phys Lett.* 129 (1986a) 607-614.
6. ARBELOA, I.L.; ROHATGI-MUKHERJEE, K.K.: Solvent effect on photophysics of the molecular forms of Rhodamine B. Solvation models and spectroscopic parameters. *Chem Phys Lett.* 128 (1986b) 474-479.
7. ARBELOA, F.; ARBELOA, T.; ESTEVEZ, M.J.T.; ARBELOA, I.L.: Photophysics of rhodamines. Molecular structure and solvent effects. *J Phys Chem.* 95 (1991) 2203-2208.
8. ASAI, Y.; NONAKA, N.; NISHIO, M.; OKAMURA, K.; DATE, T.; SUGITA, T.; OHNUKI, T.; KOMATSUBARA, S.: TMC-2A, -2B and -2C, new Dipeptidyl Peptidase IV inhibitors produced by *Aspergillus oryzae* A 374. II. Isolation and structure determination. *J Antibiot.* 50 (1997) 653-658.
9. ASHWORTH, D.M.; ATRASH, B.; BAKER, G.R.; BAXTER, A.J.; JENKINS, P.D.; JONES, D.M.; SZELKE, M.: 2-Cyanopyrrolidides as potent and stable inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV. *Bioorg Med Chem Lett.* 6 (1996a) 1163-1166.
10. ASHWORTH, D.M.; ATRASH, B.; BAKER, G.R.; BAXTER, A.J.; JENKINS, P.D.; JONES, D.M.; SZELKE, M.: 4-Cyanothiazolidides as very potent, stable inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV. *Bioorg Med Chem Lett.* 6 (1996b) 2745-2748.
11. ASSFALG-MACHLEIDT, J.; ROTHE, G.; KLINGEL, S.; BANATI, R.B.; MANGEL, W.F.; VALET, G.; MACHLEIDT, W.: Membrane permeable fluorogenic rhodamine substrates for selective determination of Cathepsin L. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 373 (1992) 433-440.
12. ASUNCION-PUNZALAN, E.; KACHEL, K.; LONDON, E.: Groups with polar characteristics can locate at both shallow and deep locations in membranes: The behavior of dansyl and related probes. *Biochemistry.* 37 (1998) 4603-4611.
13. BAI, J.P.F.; CHANG, L.L.: The involvement of Dipeptidyl Peptidase IV in brush border degradation of GRF(1-29)NH₂ by intestinal mucosal cells. *J Pharm Pharmacol.* 47 (1995) 698-701.

14. BARTH, A.; SCHULZ, H.; NEUBERT, K.: Untersuchungen zur Reinigung und Charakterisierung der Dipeptidyl-Aminopeptidase IV. *Acta Biol Med Ger.* 32 (1974) 157-174.
15. BARTLES, J.R.; BRAITERMAN, T.; HUBBARD, A.L.: Biochemical characterisation of domain-specific glycoproteins of the rat hepatocyte plasma membrane. *J Biol Chem.* 260 (1985) 12792-12802.
16. BAUVOIS, B.: A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as Dipeptidyl Peptidase IV. *Biochem J.* 252 (1988) 723-731.
17. BEAUMONT, P.C.; JOHNSON, D.G.; PARSONS, B.J.: Photophysical properties of laser dyes: Picosecond laser flash photolysis studies of Rhodamine 6G, Rhodamine B and Rhodamine 101. *J Chem Soc Faraday Trans.* 89 (1993) 4185-4191.
18. BEAUMONT, P.C.; JOHNSON, D.G.; PARSONS, B.J.: Excited state and free radical properties of rhodamine dyes in aqueous solution: A laser flash photolysis and pulse radiolysis study. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 107 (1997) 175-183.
19. BEAUVAIS, A.; MONOD, M.; WYNIGER, J.; DEBEAUPUIS, J.P.; GROUZMAN, E.; BRAKCH, N.; SVAB, J.; HOVANESSIAN, A.G.; LATGE, J.P.: Dipeptidyl Peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. *Infect Immun.* 65 (1997) 3042-3047.
20. BECKER, S.; GREGOR, I.; THIEL, E.: Photoreactions of rhodamine dyes in basic solvents. *Chem Phys Lett.* 283 (1998) 350-356.
21. BELLEAU, B.; MALEK, G.: A new convenient reagent for peptide synthesis. *J Am Chem Soc.* 90 (1968) 1651-1652.
22. BENSON, D.M.; BRYAN, J.; PLANT, A.L.; GOTTO, A.M.; SMITH, L.C.: Digital imaging fluorescence microscopy: Spatial heterogeneity of photobleaching rate constants in individual cells. *J Cell Biol.* 100 (1985) 1309-1323.
23. BERGER, E.; FISCHER, G.; NEUBERT, K.; BARTH, A.: Stepwise degradation of the hexapeptide Met-Ala-Ser-Pro-Phe-Ala by Dipeptidyl Peptidase IV. *Biomed Biochim Acta.* 46 (1987) 671-676.
24. BERMPOHL, F.; LOSTER, K.; REUTTER, W.; BAUM, O.: Rat Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) exhibits endopeptidase activity with specificity for denatured fibrillar collagens. *FEBS Lett.* 428 (1998) 152-156.
25. BERNAL, S.; LAMPIDIS, T.J.; SUMMERHAYES, I.C.; CHEN, L.B.: Rhodamine-123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells *in vitro*. *Science.* 218 (1982) 1117-1119.
26. BERNAL, S.; LAMPIDIS, T.J.; MC ISAAC, R.M.; CHEN, L.B.: Anticarcinoma activity *in vivo* of Rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye. *Science.* 222 (1983) 169-172.
27. BLANCO, J.; MARIE, J.; CALLEBAUT, C.; JACOTOT, E.; KRUST, B.; HOVANESSIAN, A.G.: Specific binding of Adenosine Desaminase but not HIV-1 Transactivator Protein Tat to human CD26. *Exp Cell Res.* 225 (1996) 102-111.

28. BLANCO, J.; JACOTOT, E.; CALLEBAUT, C.; KRUST, B.; HOVANESSIAN, A.G.: Further characterization of DPPIV- β , a novel cell surface expressed protein with Dipeptidylpeptidase IV activity. *Adv Exp Med Biol.* 421 (1997) 193-199.
29. BLANCO, J.; NGUYEN, C.; CALLEBAUT, C.; JACOTOT, E.; KRUST, B.; MAZALEYRAT, J.-P.; WAKSELMAN, M.; HOVANESSIAN, A.G.: Dipeptidyl-Peptidase-IV-beta - further characterization and comparison to Dipeptidyl Peptidase IV activity. *Eur J Biochem.* 256 (1998) 369-378.
30. BODUSZEK, B.; OLEKSYSZYN, J.; KAM, C.M.; SELZLER, J.; SMITH, R.E.; POWERS, J.C.: Dipeptide phosphonates as inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV. *J Med Chem.* 37 (1994) 3969-3976.
31. BONGERS, J.; LAMBROS, T.; AHMAD, M.; HEIMER, E.P.: Kinetics of Dipeptidyl Peptidase IV proteolysis of Growth Hormone Releasing Factor and analogs. *Biochim Biophys Acta.* 1122 (1992) 147-153.
32. BORDALLO, C.; SCHWENCKE, J.; SUAREZ RENDUELES, M.: Localisation of the thermosensitive X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 173 (1984) 199-203.
33. BORN, I.; FAUST, J.; HEINS, J.; BARTH, A.; NEUBERT, K.: Potent inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV. *Eur J Cell Biol Supp* 40. 63 (1994) S23.
34. BOURAS, M.; HUNEAU, J.F.; LUENGO, C.; ERLANSON-ALBERTSSON, C.; TOME, D.: Metabolism of Enterostatin in rat intestine, brain membranes and serum: Differential involvement of proline-specific peptidases. *Peptides.* 16 (1995) 399-405.
35. BRANDSCH, M.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F.H.: Role of Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) in intestinal and renal absorption of peptides. In: Molecular Biology Intelligence unit. Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in Metabolism and the Immune Response. (1995) 111-123, Fleischer, B. (Ed), Austin, Texas, USA.
36. BRANDT, W.; LEHMANN, T.; THONDORF, I.; BORN, I.; SCHUTKOWSKI, M.; RAHFELD, J.; NEUBERT, K.; BARTH, A.: A model of the active site of Dipeptidyl Peptidase IV predicted by comparative molecular field analysis and molecular modelling simulations. *Int J Pep Prot Res.* 46 (1995) 494-507.
37. BRANDT, W.; LUDWIG, O.; THONDORF, I.; BARTH, A.: A new mechanism in serine proteases catalysis exhibited by Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV). *Eur J Biochem.* 236 (1996) 109-114.
38. BRENNER, S.: The molecular evolution of genes and proteins: A tale of two serines. *Nature.* 344 (1988) 528-530.
39. BRISTOL, L.A.; SAKAGUCHI, K.; APPELLA, E.; DOYLE, D.; TAKACS, L.: Thymocyte costimulating antigen is CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV). Costimulation of granulocyte, macrophage, and T lineage cell proliferation via CD26. *J Immunol.* 149 (1992) 367-372.
40. BRISTOL, L.A.; BACHOVCHIN, W.W.; TAKACS, L.: Inhibition of CD26 enzyme activity with Pro-boro-Pro stimulates rat granulocyte/macrophage colony formation and thymocyte proliferation *in vitro*. *Blood.* 12 (1995) 3602-3609.

41. BRODER, C.C.; NUSSBAUM, O.; GUTHEIL, W.G.; BACHOVCHIN, W.W.; BERGER, E.A.: CD26 antigen and HIV fusion? *Science*. 264 (1994) 1156-1165.
42. BRYNES, P.J.; BEVILACQUA, P.; GREEN, A.: 6-Aminoquinolinone as a fluorogenic leaving group in peptide cleavage reactions: A new fluorogenic substrate for Chymotrypsin. *Anal Biochem*. 116 (1981) 408-413.
43. BÜCHSEL, R.: Localisation and turnover of Dipeptidyl Peptidase IV in the domains of rat liver plasma membrane. *Eur J Cell Biol*. 40 (1986) 53-57.
44. BÜHLING, F.; KUNZ, D.; REINHOLD, D.; ULMER, A.J.; ERNST, M.; FLAD, H.-D.; ANSORGE, S.: Expression and functional role of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) on human natural killer cells. *Nat Immun*. 13 (1994) 270-279.
45. BÜHLING, F.; JUNKER, U.; NEUBERT, K.; JÄGER, L.; ANSORGE, S.: Functional role of CD26 on human B lymphocytes. *Immunol Lett*. 45 (1995) 47-51.
46. BUTENAS, S.; DI LORENZO, M.E.; MANN, K.G.: Ultrasensitive fluorogenic substrates for serine proteases. *Thromb Haemost*. 78 (1997) 1193-1201.
47. CALLEBAUT, C.; KRUST, B.; JACOTOT, E.; HOVANESSIAN, A.G.: T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4⁺ cells. *Science*. 262 (1993) 2045-2050.
48. CASEY, M.G.; MEYER, J.: Presence of X-Prolyl-Dipeptidyl Aminopeptidase in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*. 58 (1985) 3212-3215.
49. CHEN, W.-T.: Proteases associated with Invadopodia and their role in degradation of extracellular matrix. *Enzyme Protein*. 49 (1996) 59-71.
50. CHENG, H.C.; ABDEL, G.; ELBLE, R.C.; PAULI, B.U.: Lung endothelial Dipeptidyl Peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem*. 273 (1998) 24207-24215.
51. CHICH, J.-F.; RIGOLET, P.; NARDI, M.; GRIPON, J.-C.; RIBADEAU-DUMAS, B.; BRUNIE, S.: Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of PepX, an prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*. *Proteins*. 23 (1995) 278-281.
52. COBURN, M.C.; HIXSON, D.C.; REICHNER, J.; *In vitro* immune responsiveness of rats lacking active Dipeptidyl Peptidase IV. *Cell Immunol*. 158 (1994) 269-280.
53. CORRIE, J.E.T.; CRAIK, J.S.; MUNASINGHE, V.R.N.: A homobifunctional rhodamine for labeling proteins with defined orientations of a fluorophore. *Bioconjug Chem*. 9 (1998) 160-167.
54. COUTTS, S.J.; KELLY, T.A.; SNOW, R.J.; KENNEDY, C.A.; BARTON, R.W.; ADAMS, J.; KROLIKOWSKI, D.A.; FREEMAN, D.M.; CAMPBELL, S.J.; KSIAZEK, J.F.; BACHOVCHIN, W.W.: Structure-activity relationship of boronic acid inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV. 1. Variation of the P2-position of XaaboroPro dipeptides. *J Med Chem*. 39 (1996) 2087-2094.
55. CUNNINGHAM, D.F.; O'CONNOR, B.: Proline specific peptidases. *Biochim Biophys Acta*. 1343 (1997) 160-186.
56. DANG, N.H.; TORIMOTO, Y.; DEUSCH, K.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Comitogenic effect of solid-phase immobilized anti-1F7 on human

- CD4 T cell activation via CD3 and CD2 pathways. *J Immunol.* 144 (1990a) 4092-4100.
57. DANG, N.H.; TORIMOTO, Y.; SUGITA, K.; DALEY, J.F.; SCHOW, P.; PRADO, C.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. *J Immunol.* 145 (1990b) 3963-3971.
58. DANG, N.H.; TORIMOTO, Y.; SHIMAMURA, K.; TANAKA, T.; DALEY, J.F.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: 1F7 (CD26): A marker of thymic maturation involved in the differential regulation of the CD3 and CD2 pathways of human thymocyte activation. *J Immunol.* 147 (1991) 2825-2832.
59. DARMOUL, D.; LACASA, M.; BARICAULT, L.; MARGUET, D.; SAPIN, C.; TROTOT, P.; BARBAT, A.; TRUGNAN, G.: Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HAT-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 (1992) 4824-4833.
60. DARMOUL, D.; VOISIN, T.; COUVINEAU, A.; ROUYER-FESSARD, C.; SALOMOM, R.; WANG, Y.; SWALLOW, D.M.; LABURTHE, M.: Regional expression of epithelial Dipeptidyl Peptidase IV in the human intestines. *Biochem Biophys Res Com.* 203 (1994) 1224-1229.
61. DARZYNKIEWICZ, Z.; STAIANOCOICO, L.; MELAMED, M.R.: Increased mitochondrial uptake of Rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78 (1981) 2383-2387.
62. DAVID, F.; BERNARD, A.-M.; PIERRES, M.; MARGUET, D.: Identification of Serine 624, Aspartic Acid 702 and Histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse Dipeptidyl Peptidase IV (CD26). *J Biol Chem.* 268 (1993) 17247-17252.
63. DAVIDSON, R.S.; HILCHENBACH, M.M.: The use of fluorescent probes in immunochemistry. *Photochem Photobiol.* 52 (1990) 431-438.
64. DE MEESTER, I.; VANHOOF, G.; HENDRIKS, D.; DEMUTH, H.-U.; YARON, A.; SCHARPE, S.: Characterization of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) from human lymphocytes. *Clin Chim Acta.* 210 (1992) 23-34.
65. DE MEESTER, I.; SCHARPE, S.; VANHAM, G.; BOSMANS, E.; HEYLIGEN, H.; VANHOOF, G.; CORTE, G.: Antibody binding profile of purified and cell-bound CD26. Designation of BT5/9 and Ta5.9 to the CD26 cluster. *Immunobiology.* 188 (1993) 145-158.
66. DE MEESTER, I.; VANHAM, G.; KESTENS, L.; VANHOOF, G.; BOSMANS, E.; GIGASE, P.; SCHARPE, S.: Binding of Adenosine Desaminase to the lymphocyte surface via CD26. *Eur J Immunol.* 24 (1994) 566-570.
67. DE MEESTER, I.; BELYAEV, A.; LAMBEIR, A.-M.; DE MEYER, G.R.Y.; VAN OSSELAER, N.V.; HAEMERS, A.; SCHARPE, S.: *In vivo* inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV activity by Pro-Pro-diphenyl-phosphonate (Prodipine). *Biochem Pharmacol.* 54 (1997) 173-179.
68. DEMUTH, H.-U.: Studien zur Entwicklung und zum Funktionsmechanismus irreversibler Inhibitoren von Serinproteasen unter besonderer Berücksichtigung post-

- prolinspaltender Enzyme. Habilitation, MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG (1989)
69. DEMUTH, H.-U.; BAUMGRASS, R.; SCHAPER, C.; FISCHER, G.; BARTH, A.: Dipeptidyl Peptidase IV-inactivation with N-Peptidyl-O-aryl-hydroxylamines. *J Enzyme Inhib.* 2 (1988) 129-142.
 70. DEMUTH, H.-U.; SCHÖNLEIN, C.; BARTH, A.: Potent and selective inactivation of proteinases with N-Peptidyl-O-acylhydroxylamines. *Biochim Biophys Acta.* 996 (1989a) 19-22.
 71. DEMUTH, H.-U.; FISCHER, G.; BARTH, A.; SCHOWEN, R.L.: N-O-bond fission as the rate-determining step in the aqueous conversion of N-Peptidyl-O-(p-nitrobenzoyl)-hydroxylamines to p-Nitrobenzoic Acid and Peptidylhydroxamic Acid. *J Org Chem.* 54 (1989b) 5880-5883.
 72. DEMUTH, H.-U.; NEUMANN, U.; BARTH, A.: Reactions between Dipeptidyl Peptidase IV and diacyl hydroxylamines: Mechanistic investigations. *J Enzyme Inhib.* 2 (1989c) 239-248.
 73. DEMUTH, H.-U.; STÖCKEL, A.; SCHIERHORN, A.; FITTKAU, S.; KIRSCHKE, H.; BRÖMME, D.: Inhibition of aminopeptidases by N-Aminoacyl-p-4-nitrobenzoylhydroxamates. *Biochim Biophys Acta.* 1202 (1993) 265-270.
 74. DEUMIE, M.; EL BARAKA, M.: Self-aggregation of R110 and R123 rhodamines with surfactants and phospholipid vesicles of negative charge: A qualitative fluorescence study. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 74 (1993) 255-266.
 75. DOLBEARE, F.A.; SMITH, R.E.: Flow cytometric measurements of peptidases with use of 5-Nitrosalicylaldehyde and 4-Methoxy- β -naphthylamine derivatives. *Clin Chem.* 23 (1977) 1485-1491.
 76. DONG, R.P.; KAMEOKA, J.; HEGEN, M.; TANAKA, T.; XU, Y.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Characterisation of Adenosine Desaminase binding to human CD26 on T cells and its biological role in immune response. *J Immunol.* 156 (1996) 1349-1355.
 77. DONG, R.P.; TACHIBANA, K.; HEGEN, M.; MUNAKATA, Y.; CHO, D.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Determination of Adenosine Desaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J Immunol.* 159 (1997) 6070-6076.
 78. DREXHAGE, K.H.: Structure and properties of laser dyes. In: Topics in applied physics, Vol. 1, Dye Lasers. (1990), F.P. Schäfer (Ed), 3. Aufl., Springer-Verlag Berlin.
 79. DUKE-COHAN, I.; MORIMOTO, C.; ROCKER, J.A.; SCHLOSSMANN, S.F.: A novel form of Dipeptidyl Peptidase IV found in human serum. *J Biol Chem.* 270 (1995) 14107-14114.
 80. DUKE-COHAN, I.; MORIMOTO, C.; ROCKER, J.A.; SCHLOSSMANN, S.F.: Serum high molecular weight Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) is similar to a novel antigen DPPT-L released from activated T cells. *J Immunol.* 156 (1996) 1714-1721.

81. EMAUS, R.K.; GRUNWALD, R.; LE MASTER, J.J.: Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: Spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta*. 850 (1986) 436-448.
82. ENGELHARD, H.H.: Flow cytometric applications of Sulforhodamine 101 as a fluorescent stain for total cellular protein. *Biotech Histochem*. 72 (1997) 1-9.
83. ERICKSON, R.H.; KIM, Y.: Interaction of purified brush border membrane Aminopeptidase N and Dipeptidyl Peptidase IV with lectin-sepharose derivatives. *Biochim Biophys Acta*. 743 (1983) 37-42.
84. FAN, H.; MENG, W.; KILIAN, C.; GRAMS, S.; REUTTER, W.: Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *FEBS Lett*. 246 (1997) 243-251.
85. FELLER, A.C.; PARWARESCH, M.R.: Specificity and polymorphism of Diaminopeptidase IV in normal and neoplastic T μ lymphocytes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 101 (1981) 59-63.
86. FERLINI, C.; BISELLI, R.; NISINI, R.; FATTOROSI, A.: Rhodamine 123: A useful probe for monitoring T cell activation. *Cytometry*. 21 (1995) 284-293.
87. FISCHER, G.; HEINS, J.; BARTH, A.: The conformation around the peptide bond between the P1- and P2-position is important for catalytic activity of some proline-specific-proteases. *Biochim Biophys Acta*. 742 (1983a) 452-462.
88. FISCHER, G.; DEMUTH, H.-U.; BARTH, A.: N,O-Diacylhydroxylamines as enzyme-activated inhibitors of serine proteases. *Pharmazie*. 38 (1983b) H4.
89. FLEISCHER, B.: CD26: A surface protease involved in T cell activation. *Immunol Today*. 15 (1994) 180-183.
90. FÖRSTER, T.: Fluoreszenz organischer Verbindungen. (1982), 1. Auflage (Nachdruck), Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen.
91. FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LLUSIS, L.; BLANCO, J.: Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-Adenosine Desaminase in lymphocytes. *Immunol Rev*. 161 (1998) 27-42.
92. FÜLÖP, V.; BÖCSKEI, Z.; POLGAR, L.: Prolyl oligopeptidase: An unusual β -propeller domain regulates proteolysis. *Cell*. 94 (1998) 161-170.
93. GAETANIELLO, L.; FIORE, M.; DEFILIPPO, S.; POZZI, N.; TAMASI, S.; PIGNATA, C.: Occupancy of Dipeptidyl Peptidase IV activates an associated tyrosine kinase and triggers an apoptotic signal in human hepatocarcinoma cells. *Hepatology*. 27 (1998) 934-942.
94. GALLAGHER, S.P.; O'LEARY, R.M.; O'CONNOR, B.: The development of two fluorimetric assays for the determination of Pyroglutamyl Aminopeptidase Type II activity. *Anal Biochem*. 250 (1997) 1-9.
95. GHOMASHCHI, E.; GHANADZADEH, A.; MAHJANI, M.G.: On the aggregative properties of Rhodamine 6G in ethanolic solutions. *Spectrochim Acta Part A*. 47 (1991) 211-217.

96. GILMARTIN, L.: The complementary actions of proline specific enzymes of *Guinea Pig* brain. *Biochem Soc Trans.* 23 (1995) 353S.
97. GOSSRAU, R.: Cytochemistry of membrane proteases. *Histochem J.* 17 (1985) 737-771.
98. GUILBAUT, G.G.; KRAMER, D.N.: A substrate for the fluorimetric determination of lipase activity. *Anal Chem.* 35 (1963) 588-589.
99. GUTHEIL, W.G.; BACHOVCHIN, W.W.: Separation of L-Pro-D,L-boro-Pro into its component diastereomers and kinetic analysis of their inhibition by Dipeptidyl Peptidase IV. A new method for the analysis of slow, tight-binding inhibitors. *Biochemistry.* 31 (1993) 8723-8731.
100. GUTHEIL, W.G.; SUBRAMANYAM, M.; FLENTKE, G.R.; SANFORD, D.G.; MUNOZ, E.; HUBER, B.T.; BACHOVCHIN, W.W.: Human Immunodeficiency Virus 1 Tat binds to Dipeptidyl Aminopeptidase IV (CD26): A possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91 (1994) 6594-6598.
101. HA, T.; ENDERLE, T.; OGLETREE, D.F.; CHEMLA, D.S.; SELVIN, P.R.; WEISS, S.: Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93 (1996) 6264-6268.
102. HAGIHARA, M.; OHHASHI, M.; NAGATSU, T.: Activities of Dipeptidyl Peptidase II and Dipeptidyl Peptidase IV in mice with Lupus Erythematosus-like syndrome and patients with Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *Clin Chem.* 33 (1987) 1463-1465.
103. HANSKI, C.; HUHLE, T.; GOSSRAU, R.; REUTTER, W.: Direct evidence for the binding of rat liver Dipeptidyl Peptidase IV to collagen *in vitro*. *Exp Cell Res.* 178 (1988) 64-72.
104. HARADA, M.; FUKASAWA, K.M.; FUKASAWA, M.; NAGATSU, T.: Inhibitory action of proline-containing peptides on Xaa-Pro-Dipeptidylaminopeptidase. *Biochim Biophys Acta.* 705 (1982) 288-290.
105. HARADA, M.; HIRAOKA, B.H.; FUKASAWA, K.M.; FUKASAWA, K.: Chemical modification of Dipeptidyl Peptidase IV: Involvement of an essential tryptophan residue at the substrate binding site. *Arch Biochem Biophys.* 234 (1984) 622-628.
106. HARADA, M.; FUKASAWA, K.; HIRAOKA, B.Y.; MOGI, M.; BARTH, A.; NEUBERT, K.: Depth of side-chain pocket in the S2 subsite of Dipeptidyl Peptidase IV. *Biochim Biophys Acta.* 830 (1985) 341-344.
107. HARDRODT, B.; NEUBERT, K.; FISCHER, G.; SCHULZ, H.; BARTH, A.: Synthese und enzymatischer Abbau von β -Casomorphin-5. *Pharmazie.* 37 (1982) 165-169.
108. HEGEN, M.; NIEDOBITEK, G.; KLEIN, C.E.; STEIN, H.; FLEISCHER, B.: The T cell triggering molecule Tp103 is associated with Dipeptidyl Peptidase IV activity. *J Immunol.* 144 (1990) 2908-2914.
109. HEGEN, M.; MITTRÜCKER, H.W.; HUG, R.; DEMUTH, H.-U.; NEUBERT, K.; BARTH, A.; FLEISCHER, B.: Enzymatic activity of CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV)

- is not required for its signalling function in T cells. *Immunobiology*. 189 (1993) 483-493.
110. HEGEN, M.; KAMEOKA, J.; DONG, R.P.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology*. 90 (1997) 257-264.
 111. HEINS, J.; NEUBERT, K.; BARTH, A.; CANIZARO, P.C.; BEHAL, F.J.: Kinetic investigations of the hydrolysis of aminoacyl-p-nitroanilides by Dipeptidyl Peptidase IV from human and pig kidney. *Biochim Biophys Acta*. 785 (1984) 30-35.
 112. HEINS, J.; WELKER, P.; SCHÖNLEIN, C.; BORN, I.; HARDRODT, B.; NEUBERT, K.; TSURU, D.; BARTH, A.: 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 (1988) 161-169.
 113. HERMANN, U.: Synthese fluorogener Substrate und Inhibitoren zum Nachweis der DP IV-Aktivität auf Immunzellen. Diplomarbeit, MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG (1995)
 114. HOFFMANN, T.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; ANSORGE, S.: Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) and Aminopeptidase N (CD13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS Lett*. 366 (1993) 61-64.
 115. HOFFMANN, T.; REINHOLD, D.; KÄHNE, T.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; FRANK, R.; ANSORGE, S.: Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) by anti-DP IV antibodies and non-substrate oligopeptides ascertained by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 716 (1995) 355-362.
 116. HOFFMANN, T.; ROSCHE, F.; WERMANN, M.; KÜHN-WACHE, K.; BALSCHUN, D.; DEMUTH, H.-U.: Prolyl Endopeptidases from *flavobacterium meningosepticum* and porcine kidney exhibit different cleavage specificities towards biological active peptides. *Biol Chem Hoppe-Seyler*. 379 (1998) S79.
 117. HONG, W.; DOYLE, D.: Membrane orientation of rat gp110 as studied by *in vitro* translation. *J Biol Chem*. 263 (1988) 16892-16898.
 118. HONG, W.; DOYLE, D.: Molecular dissection of the N-terminal signal/anchor sequence of rat Dipeptidyl Peptidase IV. *J Cell Biol*. 111 (1990) 323-328.
 119. HONG, W.; PIAZZA, G.A.; HIXSON, D.C.; DOYLE, D.: Expression of enzymatically active rat Dipeptidyl Peptidase IV in Chinese Hamster Ovary cells after transfection. *Biochemistry*. 28 (1989) 8474-8479.
 120. HOPUSU-HAVU, V.K.; GLENNER, G.G.: A new dipeptide naphthylamidase hydrolysing Glycyl-prolyl- β -naphthylamidase. *Histochemie*. 7 (1966) 197-201.
 121. HUANG, K.; TAKAGAKI, M.; KANI, K.; OHKUBO, I.: Dipeptidyl Peptidase II from porcine seminal plasma: Purification, characterisation and its homology to granzymes, cytotoxic cell proteinases (CCP 1-4). *Biochim Biophys Acta*. 1290 (1996) 149-156.

122. HUNG, S.-C.; MATHIES, R.A.; GLAZER, A.N.: Comparison of fluorescence energy transfer primers with different donor-acceptor dye combinations. *Anal Biochem.* 255 (1998) 32-38.
123. HÜHN, J.; OLEK, S.; FLEISCHER, B.; VON BONIN, A.: The adenosine deaminase-binding region is distinct from major anti-CD26 mAb epitopes on the human Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) molecule. *Cell Immunol.* 192 (1999) 33-40.
124. IKEHARA, Y.; OGATA, S.; MISUMI, Y.: Dipeptidyl Peptidase IV from rat liver. *Meth Enzymol.* 244 (1994) 215-227.
125. ILICH, P.; MISHRA, P.K.; MACURA, S.; BURGHARDT, T.P.: Direct observation of rhodamine dimer structures in water. *Spectrochim Acta Part A.* 52 (1996) 1323-1330.
126. ISAK, S.; EYRING, E.: Cresyl Violet chemistry and photophysics in various solvents and micelles. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 64 (1992) 343-358.
127. IWAKI-EGAWA, S.; WATANABE, Y.; FUJIMOTO, Y.: Is CD26/Dipeptidyl Peptidase IV a really important molecule in T cell activation of certain rat strains? *Immunobiology.* 194 (1995) 429-442.
128. IWAKI-EGAWA, S.; WATANABE, Y.; FUJIMOTO, Y.: CD26/Dipeptidyl Peptidase IV does not work as a Adenosine Desaminase binding protein in rat cells. *Cell Immunol.* 178 (1997) 180-186.
129. IWAKI-EGAWA, S.; WATANABE, Y.; KIKUYA, Y.; FUJIMOTO, Y.: Dipeptidyl Peptidase IV from human serum: Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem.* 124 (1998) 428-433.
130. JACOTOT, E.; CALLEBAUT, C.; BLANCO, J.; KRUST, B.; NEUBERT, K.; BARTH, A.; HOVANESSIAN, A.G.: Dipeptidyl Peptidase IV- β a novel form of cell surface expressed protein with Dipeptidyl Peptidase IV activity. *Eur J Biochem.* 239 (1996a) 248-258.
131. JACOTOT, E.; CALLEBAUT, C.; BLANCO, J.; RIVIERE, Y.; KRUST, B.; HOVANESSIAN, A.G.: HIV Envelope Glycoprotein-induced cell killing by apoptosis is enhanced with increased expression of CD26 in CD4⁺ cells. *Virology.* 223 (1996b) 318-330.
132. JEANFAVRE, D.D.; WOSKA, J.R.; PARGELLIS, C.A.; KENNEDY, C.A.; PRENDERGAST, J.; STEARNS, C.; REILLY, P.; BARTON, R.W.; BORMANN, B.-J.: Effect of Deoxycoformycin and Val-boro-Pro on the associated catalytic activities of lymphocyte CD26 and ecto-Adenosine-Desaminase. *Biochem Pharmacol.* 52 (1996) 1757-1765.
133. JEANNOT, V.; SALMON, J.-M.; DEUMIE, M.; VIALLET, P.: Intracellular accumulation of Rhodamine 110 in single living cells. *J Histochem Cytochem.* 45 (1997) 403-412.
134. JIANG, J.D.; WILK, S.; LI, J.; ZHANG, H.; BEKESI, J.G.: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection in a T cell line (CEM) by new Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) inhibitors. *Res Virol.* 148 (1997) 255-266.

135. JINGRONG, L.; WILK, E.; WILK, S.: Aminoacylpyrrolidine-2-nitriles: Potent and stable inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26). *Arch Biochem Biophys.* 323 (1995) 148-154.
136. JOHNSON, R.C.; ZHU, D.; AUGUSTIN-VOSS, H.G.; PAULI, B.: Lung endothelial Dipeptidyl Peptidase IV is an adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells. *J Cell Biol.* 121 (1993) 1423-1432.
137. KABASHIMA, T.; YOSHIDA, T.; ITO, K.; YOSHIMOTO, T.: Cloning, sequencing and expression of the Dipeptidyl Peptidase IV gene from *Flavobacterium meningosepticum* in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 320 (1995) 123-128.
138. KABASHIMA, T.; ITO, K.; YOSHIMOTO, T.: Dipeptidyl peptidase IV from *Xanthomonas maltophilia*: Sequencing and expression of the enzyme gene and characterisation of the expressed enzyme. *J Biochem.* 120 (1996) 1111-1117.
139. KÄHNE, T.: Untersuchungen zur Feinstruktur und Funktion der lymphozytären Dipeptidylpeptidase IV (CD26). Dissertation, OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG (1995).
140. KÄHNE, T.; KRÖNING, H.; THIEL, U.; ULMER, A.J.; FLAD, H.-D.; Ansorge, S.: Alterations in structure and cellular localisation of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation. *Cell Immunol.* 170 (1996) 63-70.
141. KAMEOKA, J.; TANAKA, T.; NOJIMA, Y.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Direct association of Adenosine Desaminase with a T cell activation antigen CD26. *Science.* 261 (1993) 466-469.
142. KASPARI, A.; DIEFENTHAL, T.; GROSCHE, G.; SCHIERHORN, A.; DEMUTH, H.-U.: Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease the cleavage by proline-specific peptidases. *Biochim Biophys Acta.* 1293 (1996) 147-153.
143. KATO, T.; IWASE, K.; NAGATSU, T.; HINO, M.; TAKEMOTO, T.; SAKAKIBARA, S.: A new assay of X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase activity in human serum with Glycylproline-p-phenylazoanilide as substrate. *Mol Cell Biochem.* 24 (1979) 9-13.
144. KELKAR, V.K.; VALAULIKAR, B.S.; KUNJAPPU, J.T.; MANOHAR, C.: Aggregation characteristics of laser dye Rhodamine 6G in aqueous surfactant solutions. *Photochem Photobiol.* 52 (1990) 717-721.
145. KENNET, C.N.; COX, S.W.; ELEY, B.M.: Histochemical and immunocytochemical localisation of Dipeptidyl Peptidases II and IV in human gingivia. *J Periodontol.* 67 (1996) 846-852.
146. KENNY, J.; BOOTH, A.G.; GEORGE, S.G.; INGRAM, J.; KERSHAW, D.; WOOD, E.J.; Young, A.R.: Dipeptidyl Peptidase IV, a kidney brush border serine peptidase. *Biochem J.* 155 (1976) 169-182.
147. KENNY, J.; BOOTH, A.G.; MC NAIR, R.D.C.: Peptidases of the kidney microvillus membrane. *Acta Biol Med Ger.* 36 (1977) 1575-1585.
148. KIEFFER, T.J.; MC INTOSH, C.H.S.; PEDERSON, R.A.: Degradation of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide and truncated Glucagon-Like Peptide-1 *in vitro* and *in vivo* by Dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 136 (1995) 3585-3596.

149. KIYAMA, M.; HAYAKAWA, M.; SHIROZA, T.; NAKAMURA, S.; TAKEUCHI, A.; MASAMOTO, Y.; ABIKO, Y.: Sequence analysis of the *Porphyromonas gingivalis* Dipeptidyl Peptidase IV gene. *Biochim Biophys Acta*. 1396 (1998) 39-46.
150. KLAPPE, K.; WILSCHUT, J.; NIR, S.; HOEKSTRA, D.: Parameters affecting fusion between Sendai Virus and liposomes. Role of viral proteins, liposome composition and pH. *Biochemistry*. 25 (1986) 8252-8260.
151. KLEIN, U.K.A.; HÖNES, G.; HAFNER, F.W.: Rotational diffusion of rhodamine 6G in human blood serum. *Photochem Photobiol*. 40 (1984) 569-574.
152. KNIGHT, C.G.: Fluorimetric assays of proteolytic enzymes. *Meth Enzymol*. 218 (1993) 18-34.
153. KÖNIG, W.; GEIGER, R.: Razemisierung bei Peptidsynthesen. *Chem Ber*. 103 (1970) 2024-2033.
154. KOJIMA, K.; KINOSHITA, H.; KATO, T.; NAGATSU, T.; TAKADA, K.; SAKAKIBARA, S.: A new and highly sensitive fluorescence assay for collagenase-like peptidase activity. *Anal Biochem*. 100 (1979a) 43-50.
155. KOJIMA, J.; KANATANI, M.; KATO, M.; TOJOH, F.; NAKAMURA, N.: Serum Glycylproline Dipeptidyl Aminopeptidase activity in human hepatic cancer. *Clin Chim Acta*. 93 (1979b) 181-187.
156. KOJIMA, J.; UENO, Y.; KASUAGAI, H.; OKUDA, S.; AKEDO, H.: Glycylproline Dipeptidyl Aminopeptidase and γ -Glutamyl Transpeptidase in human hepatic cancer and embryonal tissues. *Clin Chim Acta*. 167 (1987) 285-291.
157. KOROM, S.; DE MEESTER, I.; STADLBAUER, T.H.W.; CHANDRAKER, A.; SCHAUB, M.; SAYEGH, M.; BELYAEV, A.; HAEMERS, A.; SCHARPE, S.; KUPIEC-WEGLINSKI, J.W.: Inhibition of CD26/Dipeptidyl Peptidase IV activity *in vivo* prolongs cardiac allograft survival in rat recipients. *Transplantation*. 63 (1997) 1495-1500.
158. KREIL, G.; HAIML, L.; SUCHANE, K.G.: Stepwise cleavage of the Pro-Part of Promelittin by Dipeptidyl Peptidase IV. Evidence for a new type of precursor-product conversion. *Eur J Biochem*. 111 (1980) 49-58.
159. KUBOTA, T.; FLENTKE, G.R.; BACHOVCHIN, W.W.; STOLLAR, B.D.: Involvement of Dipeptidyl Peptidase IV in an *in vivo* immune response. *Clin Exp Immunol*. 89 (1992) 192-197.
160. KÜLLERTZ, G.; FISCHER, G.; BARTH, A.: Beiträge zum Katalysemechanismus der Dipeptidyl Peptidase IV. *Acta Biol Med Ger*. 37 (1978) 559-567.
161. KÜLLERTZ, G.; BARTH, A.; FISCHER, G.: Möglichkeiten zur Bestimmung von DP IV-Aktivitäten in biologischen Materialien. In: Beiträge zur Wirkstoffforschung: Dipeptidyl Peptidase IV. Biochemie, Physiologie und Pathobiochemie. Heft 27 (1986) 44-60.
162. KUPRIYANOVA, G.S.: Concentration effects on the $^1\text{H-NMR}$ parameters of Rhodamine 6G. *J Struct Chem*. 36 (1995) 687-690.
163. LAMBEIR, A.-M.; BORLOO, M.; DE MEESTER, I.; BELYAEV, A.; AUGUSTYNS, K.; HENDRIKS, D.; SCHARPE, S.; HAEMERS, A.: Dipeptide-

- derived diphenyl phosphonate esters: Mechanism-based inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV. *Biochim Biophys Acta*. 1290 (1996) 76-82.
164. LAMBERTS, J.J.M.; NECKERS, D.C.: Rose bengal and non-polar derivatives: The birth of dye sensitizers for photooxidation. *Z Naturforsch.* 39b (1984) 474-484.
165. LANCET, D.; PECH, I.: Spectroscopic and immunochemical studies with Nitrobenzoxadiazolealanine, a fluorescent dinitrophenyl analogue. *Biochemistry*. 16 (1977) 5150-5157.
166. LAZARO, I.; NANICHE, D.; SIGNORET, N.; BERNARD, A.-M.; MARGUET, D.; KLATZMANN, D.; DRAGIC, T.; ALIZON, M.; SATTENTAU, Q.: Factors involved in entry of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 into permissive cells: Lack of evidence of a role for CD26. *J Virol*. 68 (1994) 6535-6546.
167. LEFEVRE, C.; KANG, H.C.; HAUGLAND, R.P.; MALEKZADEH, N.; ARTTAMANGKUL, S.; HAUGLAND, R.P.: Texas Red-X and Rhodamine Red-X, new derivatives of Sulforhodamine 101 and Lissamine Rhodamine B with improved labeling and fluorescence properties. *Bioconjug Chem*. 7 (1996) 482-489.
168. LEYTUS, S.P.; MELHADO, L.L.; MANGEL, W.F.: Rhodamine-based compounds as fluorogenic substrates for serine proteinases. *Biochem J*. 209 (1983a) 299-307.
169. LEYTUS, S.P.; PETERSON, W.L.; MANGEL, W.F.: New class of sensitive and selective fluorogenic substrates for serine proteinases. Amino acid and dipeptide derivatives of rhodamine. *Biochem J*. 215 (1983b) 253-260.
170. LEYTUS, S.P.; TOLEDO, D.L.; MANGEL, W.F.: Theory and experimental method for determining individual kinetic constants of fast-acting, irreversible proteinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 788 (1984) 74-86.
171. LI, J.; WILK, E.; WILK, S.: Aminoacylpyrrolidine-2-nitriles: Potent and stable inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26). *Arch Biochem Biophys*. 323 (1995) 148-154.
172. LOCH, N.; TAUBER, R.; BECKER, A.; HARTEL-SCHENK, S.; REUTTER, W.: Biosynthesis and metabolism of Dipeptidyl Peptidase IV in primary cultured rat hepatocytes and Morris Hepatoma 7777 cells. *Eur J Biochem*. 210 (1992) 161-168.
173. LÖSTER, K.; ZEILINGER, K.; SCHUPPAN, D.; REUTTER, W.: The cysteine-rich-region of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) is the collagen-binding site. *Biochem Biophys Res Comm*. 217 (1995) 341-348.
174. LOJDA, Z.: Studies on Glycylproline Naphtylamidase. I. Lymphocytes. *Histochemistry*. 54 (1977) 299-309.
175. LOJDA, Z.: The use of substrates with 7-Amino-3-trifluoromethylcoumarine (AFC) leaving group in the localization of protease activities in situ. *Acta Histochem*. 98 (1996) 215-228.
176. MAES, M.; DE MEESTER I.; VERKERK, R.; DE MEDTS, P.; WAUTERS, A.; VANHOOF, G.; VANDOOOLAEGHE, E.; NEELS, H.; SCHARPE, S.: Lower serum Dipeptidyl Peptidase IV activity in treatment resistant major depression: Relationships with immune-inflammatory markers. *Psychoneuroendocrinology*. 22 (1997) 65-78.

177. MARGUET, D.; BERNARD, A.-M.; VIVIER, J.; DARMOUL, D.; NAQUET, P.; PIERRES, M.: C-DNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule. *J Biol Chem.* 267 (1992) 2200-2208.
178. MARGUET, D.; DAVID, F.; VIVIER, I.; BERNARD, A.-M.; NAQUET, P.; PIERRES, M.: Dipeptidyl Peptidase IV (CD26): Expression, structure and functions in lymphocytes. *Adv Neuroimmunol.* 3 (1993) 209-215.
179. MARTIN, R.A.; CLEARY, D.L.; GUIDO, D.M.; ZURCHER-NEELY, H.A.; KUBIAK, T.M.: 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 (1993) 252-260.
180. MATTERN, T.; REICH, C.; DUCHROW, M.; ANSORGE, S.; ULMER, A.J.; FLAD, H.-D.: Antibody-induced modulation of CD26 surface expression. *Immunology.* 84 (1995) 595-600.
181. MATTERN, T.; REICH, C.; SCHÖNBECK, U.; ANSORGE, S.; DEMUTH, H.-U.; LOPPNOW, H.; ULMER, A.J.; FLAD, H.-D.: CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV) on human T lymphocytes does not mediate adhesion of these cells to endothelial cells or fibroblasts. *Immunobiology.* 198 (1998) 465-475.
182. MEDEIROS, M.D.S.; TURNER, A.J.: Processing and metabolism of Peptide YY: Pivotal roles of Dipeptidyl Peptidase IV, Aminopeptidase P and Endopeptidase 24.11. *Endocrinology.* 134 (1994) 2088-2094.
183. MENTLEIN, R.; HEYMANN, E.: Dipeptidyl Peptidase IV inhibits the polymerisation of fibrin monomers. *Arch Biochem Biophys.* 217 (1982) 748-750.
184. MENTLEIN, R.; HEYMANN, E.; SCHOLZ, W.; FELLER, A.C.; FLAD, H.-D.: Dipeptidyl Peptidase IV as a new surface marker for a subpopulation of human T lymphocytes. *Cell Immunol.* 89 (1984) 11-15.
185. MENTLEIN, R.: Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett.* 234 (1988) 251-256.
186. MENTLEIN, R.; DAHMS, P.; GRANDT, D.; KRÜGER, R.: Proteolytic processing of Neuropeptide Y and Peptide YY by Dipeptidyl Peptidase IV. *Regul Pept.* 49 (1993a) 133-144.
187. MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W.E.: 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 (1993b) 829-835.
188. MIALOCQ, J.C.; HEBERT, P.; ARMAND, X.; BONNEAU, R.; MORAND, J.P.: Photophysical and photochemical properties of Rhodamine 6G in alcoholic and aqueous sodium-dodecylsulphate micellar solutions. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 56 (1991) 323-338.
189. MILLOT, J.-M.; SHARONOV, S.; MANFAIT, M.: Scanning microspectrofluorometry of Rhodamine 123 in Multidrug-Resistant Cells. *Cytometry.* 17 (1994) 50-58.

190. MISUMI, Y.; HAYASHI, Y.; ARAKAWA, F.; IKEHARA, Y.: Molecular cloning and sequence analysis of human Dipeptidyl Peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta*. 1131 (1992) 333-336.
191. MITTRÜCKER, H.-W.; STEEG, C.; MALISSEN, B.; FLEISCHER, B.: The cytoplasmic tail of the T cell receptor ζ chain is required for signaling via CD26. *Eur J Immunol*. 25 (1995) 295-297.
192. MODICA-NAPOLITANO, J.S.; WEISS, M.J.; CHEN, L.B.; APRILLE, J.R.: Rhodamine 123 inhibits bioenergetic function in isolated rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Comm*. 118 (1984) 717-723.
193. MOGI, M.; HARADA, M.; HIRAOKA, B.Y.; FUKASAWA, K.; KOMATSU, M.; NAGATSU, T.: Sandwich enzyme-immunoassay for Dipeptidyl Aminopeptidase IV in the serum of people with oral cancer. *Arch Oral Biol*. 31 (1986) 505-507.
194. MOON, J.B.; COLEMAN, R.S.; HANZLIK, R.P.: Reversible covalent inhibition of Papain by a peptide nitrile. ^{13}C -NMR evidence for a thioimidate ester adduct. *J Am Chem Soc*. 108 (1986) 1350-1351.
195. MOORE, W.: Grundlagen der physikalischen Chemie. (1990), 1. Auflage, De Gruyter Verlag, Berlin.
196. MORIMOTO, C.; TORIMOTO, Y.; LEVINSON, G.; RUDD, C.E.; SCHRIEBER, M.; DANG, N.H.; LETVIN, N.L.; SCHLOSSMANN, S.F.: 1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells. *J Immunol*. 143 (1989) 3430-3439.
197. MORIMOTO, C.; LORD, I.; ZHANG, C.; DUKE-COHAN, J.S.; LETVIN, N.L.; SCHLOSSMANN, S.F.: Role of CD26/Dipeptidyl Peptidase IV in human Immunodeficiency Virus Type 1 infection and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91 (1994) 9960-9964.
198. MORLIERE, P.; SANTUS, R.; BAZIN, M.; KOHEN, E.; CARILLET, V.; BON, F.; RAINASSE, J.; DUBERTRET, L.: Is Rhodamin 123 a photosensitizer? *Photochem Photobiol*. 52 (1990) 703-710.
199. MRESTANI-KLAUS, C.; BRANDT, W.; FAUST, J.; HERMANNNS, U.; LOREY, S.; NEUBERT, K.: Structural studies of Rhodamine 110 peptide derivatives representing a new class of fluorogenic substrates for Dipeptidyl Peptidase IV (CD26). Poster 24th Eur. Peptide Symp. (1996) Edinburgh.
200. MRESTANI-KLAUS, C.; BRANDT, W.; FAUST, J.; HERMANNNS, U.; LOREY, S.; NEUBERT, K.: Structural studies of Rhodamine 110 peptide derivatives representing a new class of fluorogenic substrates for Dipeptidyl Peptidase IV (CD26). In: RAMAGE, R. and EPTON, R. (Eds). *Peptides*. (Proc. 24th Eur. Peptide Symp.). Mayflower Scientific Ltd. England (1998) 663-664.
201. MULLINS, J.M.: Overview of fluorophores. *Meth Mol Biol*. 34, Immunocytochemical Methods and Protocols. (1994), Javois, L.C. (Ed), Humana Press inc., Totowa, NJ.
202. MUNOZ, E.; BLAQUEZ, M.V.; MADUENO, J.A.; RUBIO, G.; PENA, J.: CD26 induces T-cell proliferation by tyrosine protein phosphorylation. *Immunology*. 77 (1992) 43-50.

203. NAGATSU, T.; HINO, M.; FUYAMADA, H.; HAYAKAWA, T.; SAKAKIBARA, S.; NAKAGAWA, Y.; TAKEMOTO, T.: New chromogenic substrates for X-Prolyl-Dipeptidyl-Aminopeptidase. *Anal Biochem.* 74 (1976) 466-476.
204. NGUYEN, C.; BLANCO, J.; MAZALEYRAT, J.-P.; KRUST, B.; CALLEBAUT, C.; JACOTOT, E.; HOVANESSIAN, A.; WAKSELMAN, M.: Specific and irreversible cyclopeptide inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV activity of the T-cell activation antigen CD26. *J Med Chem.* 41 (1998) 2100-2110.
205. NIEDERMEYER, J.; ENENKEL, B.; PARK, J.E.; LENTER, M.; RETTIG, W.J.; DAMM, K.; SCHNAPP, A.: Mouse fibroblast-activation protein-conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur J Biochem.* 254 (1998) 650-654.
206. NONAKA, N.; ASAI, Y.; NISHIO, M.; TAKAHASHI, K.; OKUDA, T.; TANAKA, S.; SUGITA, T.; OHNUKI, T.; KOMATSUBARA, S.: TMC-2A, -2B and -2C, novel Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV/CD26) inhibitors produced by *Aspergillus oryzae* A374. I. Taxonomy of producing strain, fermentation and biochemical properties. *J Antibiot.* 50 (1997) 646-652.
207. NOULA, C.; KOKOTOS, G.; BARTH, T.; TZOUGRAKI, C.: New fluorogenic substrates for the study of secondary specificity of Prolyl Oligopeptidase. *J Peptide Res.* 49 (1997) 46-51.
208. OGATA, S.; MISUMI, Y.; IKEHARA, Y.: Primary structure of rat liver Dipeptidyl Peptidase IV deduced from its c-DNA and identification of the NH₂-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *J Biol Chem.* 264 (1989) 3596-3601.
209. OGATA, S.; MISUMI, Y.; TSURU, E.; TAKAMI, N.; ODA, K.; IKEHARA, Y.: Identification of the active site in Dipeptidyl Peptidase IV by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* 31 (1992) 2582-2587.
210. OHTSUKI, T.; HOSONO, O.; KOBAYASHI, H.; MUNAKATA, Y.; SOUTA, A.; SHIODA, T.; MORIMOTO, C.: Negative regulation of the anti-Human Immunodeficiency Virus and chemotactic activity of human Stromal Cell-Derived Factor 1 α by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV. *FEBS Lett.* 431 (1998) 236-240.
211. ORAVECZ, T.; RODERIQUEZ, G.; GORRELL, M.D.; DITTO, M.; NGUYEN, N.Y.; BOYKINS, R.; UNSWORTH, E.; NORCROSS, A.: 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 (1997) 1865-1872.
212. PACKARD, B.Z.; TOPTYGIN, D.D.; KOMORIJA, A.; BRAND, L.: Profluorescent protease substrates: Intramolecular dimers described by the exciton model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93 (1996) 11640-11645.
213. PACKARD, B.Z.; TOPTYGIN, D.D.; KOMORIJA, A.; BRAND, L.: Structural characteristics of fluorophores that form intramolecular H-type dimers in a protease substrate. *J Phys Chem B.* 101 (1997a) 5070-5074.

214. PACKARD, B.Z.; TOPTYGIN, D.D.; KOMORIJA, A.; BRAND, L.: Characterization of fluorescence quenching in bifluorophoric protease substrates. *Biophys. Chem.* 67 (1997b) 167-176.
215. PARGELLIS, A.P.; CAMPBELL, S.J.; PAV, S.; GRAHAM, E.T.; PITNER, T.P.: Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) by peptide boronic acid dipeptides. *J Enzyme Inhib.* 11 (1997) 151-169.
216. PAULY, R.P.; ROSCHE, F.; WERMANN, M.; MC INTOSH, C.H.S.; PEDERSON, R.A.; DEMUTH, H.-U.: 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/ionisation-time of flight mass spectrometry. *J Biol Chem.* 271 (1996) 23222-23229.
217. PEDERSON, R.A.; KIEFFER, T.J.; PAULY, R.; KOFOD, H.; KWONG, J.; MC INTOSH, H.S.: The enteroinsular axis in Dipeptidyl Peptidase IV-negative rats. *Metabolism.* 45 (1996) 1335-1341.
218. PIAZZA, G.A.; CALLAHAN, H.M.; MOWERY, J.; HIXSON, D.C.: Evidence for a role of Dipeptidyl Peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. *Biochem J.* 262 (1989) 327-334.
219. POLGAR, L.: Structural relationship between lipases and peptides of the Prolyl Oligopeptidase family. *FEBS Lett.* 311 (1992) 281-284.
220. POLGAR, L.; SZABO, E.: Prolyl Endopeptidase and Dipeptidyl Peptidase IV are distantly related members of the same family of serine proteases. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 373 (1992) 361-366.
221. PROOST, P.; DE MEESTER, I.; SCHOLS, D.; STRUYF, S.; LAMBEIR, A.-M.; WUYTS, A.; OPDENAKKER, G.; DE CLERCQ, E.; SCHARPE, S.; VAN DAMME, J.: Aminoterminal truncation of chemokines by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV. *J Biol Chem.* 273 (1998a) 7222-7227.
222. PROOST, P.; STRUYF, S.; SCHOLS, D.; DURINX, C.; WUYTS, A.; LENAERTS, J.-P.; DE CLERCQ, E.; DE MEESTER, I.; VAN DAMME, J.: Processing by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of Stromal-Cell-Derived Factor 1 α . *FEBS Lett.* 432 (1998b) 73-76.
223. PÜSCHEL, G.; MENTLEIN, R.; HEYMANN, E.: Isolation and characterisation of Dipeptidyl Peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem.* 126 (1982) 359-365.
224. RAHFELD, J.: Beiträge zur kinetischen Charakterisierung der Dipeptidyl Peptidase IV. Dissertation, MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG (1989)
225. RAHFELD, J.; SCHUTKOWSKI, M.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; BARTH, A.; HEINS, J.: Extended investigations of the substrate specificity of Dipeptidyl Peptidase IV from pig kidney. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 372 (1991a) 313-318.
226. RAHFELD, J.; SCHIERHORN, M.; HARDRODT, B.; NEUBERT, K.; HEINS, J.: Are Diprotin A (Ile-Pro-Ile) and Diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of Dipeptidyl Peptidase IV? *Biochim Biophys Acta.* 1076 (1991b) 314-316.

227. RAWLINGS, N.D.; POLGAR, L.; BARRETT, A.J.: A new family of serine-type peptidases related to the Prolyloligopeptidase. *Biochem J.* 279 (1992) 907-911.
228. RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.: Evolutionary families of peptides. *Biochem J.* 290 (1993) 205-218.
229. REINHOLD, D.; BANK, U.; BÜHLING, F.; NEUBERT, K.; MATTERN, T.; ULMER, A.J.; FLAD, H.-D.; ANSORGE, S.: 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 (1993) 403-414.
230. REINHOLD, D.; BANK, U.; BÜHLING, F.; KÄHNE, T.; KUNT, D.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; ANSORGE, S.: Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV/CD26) specifically suppress proliferation and modulate cytokine production of strongly CD26 expressing U937 cells. *Immunobiology.* 192 (1994) 121-136.
231. REINHOLD, D.; WRENGER, S.; BANK, U.; BÜHLING, F.; HOFFMANN, T.; NEUBERT, K.; KRAFT, M.; FRANK, R.; ANSORGE, S.: CD26 mediates the action of HIV-1 Tat protein on DNA-synthesis and cytokine production in U937 cells. *Immunobiology.* 195 (1996) 119-128.
232. REINHOLD, D.; BANK, U.; BÜHLING, F.; LENDECKEL, U.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; ANSORGE, S.: Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV induce secretion of Transforming Growth Factor- β 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology.* 91 (1997a) 354-360.
233. REINHOLD, D.; BANK, U.; BÜHLING, F.; TÄGER, M.; BORN, I.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; ANSORGE, S.: Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV, CD26) induces secretion of Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes. *Immunol Lett.* 58 (1997b) 29-35.
234. REINHOLD, D.; HEMMER, B.; GRAN, B.; BORN, I.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; MC FARLAND, H.F.; MARTIN, R.; ANSORGE, S.: Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4⁺ T cell clones. *J Neuroimmunol.* 87 (1998a) 203-209.
235. REINHOLD, D.; VETTER, R.W.; MNICH, K.; BÜHLING, F.; LENDECKEL, U.; BORN, I.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; GOLLNICK, H.; ANSORGE, S.: Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV, CD26) is involved in regulation of DNA-synthesis in human keratinocytes. *FEBS Lett.* 428 (1998b) 100-104.
236. ROTHE, G.; KLINGEL, S.; ASSFALG-MACHLEIDT, J.; MACHLEIDT, W.; ZIRCKELBACH, C.; BANATI, R.B.; MANGEL, W.F.; VALET, G.: Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 373 (1992) 547-554.
237. RUIZ, P.; NASSIRI, M.; STEELE, B.; VICIANA, A.L.: Cytofluorographic evidence that thymocyte Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) activity is altered with stage of ontogeny and apoptotic status. *Cytometry.* 23 (1996) 322-329.

238. RUIZ, P.; HAO, L.; ZUCKER, K.; ZACHARIEVICH, N.; VICIANA, A.L.; SHENKIN, M.; MILLER, J.: Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) activity in human alloreactive T cell subsets varies with the stage of differentiation and activation status. *Transplant Immunol.* 5 (1997) 152-161.
239. RUIZ, P.; MAILHOT, S.; DELGADO, P.; AMADOR, A.; VICIANA, A.L.; FERRER, L.; ZACHARIEVICH, N.: CD26 expression and Dipeptidyl Peptidase IV activity in an aggressive hepatosplenic T-cell lymphoma. *Cytometry.* 34 (1998) 30-35.
240. RUSSEL, J.S.; CHI, H.; LANTRY, L.E.; STEPHENS, R.E.; WARD, P.E.: Substance P and Neurokinin A metabolism by cultured human skeletal muscle myocytes and fibroblasts. *Peptides.* 17 (1996) 1397-1403.
241. SAKANOUÉ, J.; ICHIKAWA, K.; NOMURA, Y.; TAMURA, M.: Rhodamine 800 as a probe of energization of cells and tissues in the near-infrared region: A study with isolated rat liver mitochondria and hepatocytes. *J Biochem.* 121 (1997) 29-37.
242. 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.: Molecular cloning of Fibroblast Activation Protein α , a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91 (1994) 5657-5661.
243. SCHARPE, S.; DE MEESTER, I.; VANHOOF, G.; HENDRIKS, D.; VAN SANDE, M.; VAN CAMP, K.; YARON, A.: Assay of Dipeptidyl Peptidase IV in serum by fluorometry of 4-Methoxy-2-naphtylamine. *Clin Chem.* 34 (1988) 2299-2301.
244. SCHECHTER, I.; BERGER, A.: On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 (1967) 157-162.
245. SCHÖN, E.; MANSFELD, H.-W.; DEMUTH, H.-U.; BARTH, A.; ANSORGE, S.: The Dipeptidyl Peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. *Biomed Biochim Acta.* 44 (1985) K9-K15.
246. SCHÖN, E.; ANSORGE, S.: Dipeptidyl Peptidase IV in the immune system. Cytofluorographic evidence for induction of the enzyme on activated T lymphocytes. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 371 (1990) 699-705.
247. SCHÖN, E.; BORN, I.; DEMUTH, H.-U.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; STEINMETZER, T.; BARTH, A.; ANSORGE, S.: Dipeptidyl Peptidase IV in the immune system. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 372 (1991) 305-311.
248. SCHUTKOWSKI, M.: Untersuchungen zur Substratspezifität prolinespezifischer Peptidasen. Dissertation, MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG (1991).
249. SCHUTKOWSKI, M.; NEUBERT, K.; FISCHER, G.: Influence on proline-specific enzymes of a substrate containing the thioxoaminoacyl-prolylpeptide bond. *Eur J Biochem.* 221 (1994) 455-461.
250. SHEA, C.R.; CHEN, N.; WIMBERLY, J.; HASAN, T.: Rhodamine dyes as potential agents for photochemotherapy of cancer in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res.* 49 (1989) 3961-3965.

251. SHEENAN, J.C.; HESS, G.P.: A new method of forming peptide bonds. *J Am Chem Soc.* 77 (1955) 1067-1068.
252. SHEENAN, J.C.; CRUICKSHANK, P.A.; BOSHART, G.L.: A convenient synthesis of water-soluble carbodiimides. *J Org Chem.* 26 (1961) 2525-2528.
253. SHEENAN, J.C.; PRESTON, J.: A rapid synthesis of oligopeptide derivatives without isolation of intermediates. *J Am Chem Soc.* 87 (1965) 2492-2493.
254. SHIBUYA-SARUTA, H.; SUGIYAMA, M.; KASHAHARA, Y.: Colorimetric rate assay for urinary Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) activity using a new substrate. *J Clin Lab Anal.* 9 (1995) 113-118.
255. SHNEIDER, B.L.; THEVANANTHER, S.; MOYER, M.S.; WALTERS, H.C.; RINALDO, P.; DEVARAJAN, P.; SUN, A.Q.; DAWSON, P.A.; ANANTHANARAYANAN, M.: Cloning and characterisation of a novel peptidase from rat and human ileum. *J Biol Chem.* 272 (1997) 31006-31015.
256. SJÖBACK, R.; NYGREN, J.; KUBISTA, M.: Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim Acta A.* 51 (1995) L7-L21.
257. 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.; KROLIKOWSKI, D.A.; LEONARD, D.A.; PARGELLIS, C.A.; ADAMS, J.: Studies on proline boronic acid dipeptide inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV: Identification of a cyclic species containing a B-N bond. *J Am Chem Soc.* 116 (1994) 10860-10869.
258. SONG, L.; HENNINK, E.J.; YOUNG, I.T.; TANKE, H.J.: Photobleaching kinetics of fluorescence in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J.* 68 (1995) 2588-2600.
259. SONG, L.; VARMA, C.A.G.O.; VERHOEVEN, J.W.; TANKE, H.J.: Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophys J.* 70 (1996) 2959-2968.
260. STANGE, T.; KETTMANN, U.; HOLZHAUSEN, H.-J.; RIEMANN, D.: Expression patterns of the ectopeptidases Aminopeptidase N/CD13 and Dipeptidyl Peptidase IV/CD26: Immunoultrastructural topographic localization on different types of cultured cells. *Acta Histochem.* 100 (1998) 157-169.
261. STANO, J.; KOVACS, P.; NEMEC, P.; NEUBERT, K.: Dipeptidyl Peptidase IV in gerkin seedlings *Cucumis sativus* L. cv. *Palava*. *Biologia.* 49 (1994) 905-910.
262. STANO, J.; KOVACS, P.; PSENAK, M.; GAJDOS, J.; Erdelsky, K.; KAKONIOVA, D.; NEUBERT, K.: Distribution of Dipeptidyl Peptidase IV in organs and cultures of poppy plants *Papaver somniferum* L. cv. *Amarin*. *Pharmazie.* 52 (1997) 319-321.
263. STECCA, B.; NARDO, B.; CHIECI, P.; MAZZIOTTI, A.; BOLONDI, L.; CAVALLARI, A.: Aberrant Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) expression in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatology.* 27 (1997) 337-345.
264. STEINMETZ A.C.U.; DEMUTH, H.-U.; RINGE, D.: Inactivation of Subtilisin Carlsberg by N-((tert-Butoxycarbonyl)alanylprolylphenylalanyl)-O-benzoylhydroxylamine: Formation of a covalent enzyme inhibitor linkage in the form of a carbamate derivative. *Biochemistry.* 33 (1994) 10535-10544.

265. STEINMETZER, T.; SILBERRING, J.; MRESTANI-KLAUS, C.; FITTKAU, S.; BARTH, A.; DEMUTH, H.-U.: Peptidyl ammonium methylketones as substrate analog inhibitors of proline specific proteases. *J Enzyme Inhib.* 7 (1993) 77-85.
266. STÖCKEL, A.: Synthese und Charakterisierung von Thioxoaminosäureamiden und bestatinanalogen Verbindungen als Inhibitoren prolinspezifischer Proteasen. Dissertation, MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG (1997).
267. SUBRAMANYAM, M.; GUTHEIL, G.W.; BACHOVCHIN, W.W.; HUBER, B.: Mechanism of HIV-1 Tat induced inhibition of antigen-specific T cell responsiveness. *J Immunol.* 150 (1993) 2544-2553.
268. SUDMEIER, J.L.; GÜNTHER, U.L.; GUTHEIL, W.G.; COUTTS, S.J.; SNOW, J.R.; BARTON, R.W.; BACHOVCHIN, W.W.: Solution structures of active and inactive forms of the DP IV (CD26) inhibitor Pro-boroPro determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 33 (1994) 12427-12438.
269. SUNDSTROM, C.; NILSSON, K.: Establishment and characterisation of human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 17 (1976) 565-577.
270. TÄGER, M.; KRÖNING, H.; THIEL, U.; ANSORGE, S.: Membrane-bound Proteindisulfide-Isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. *Exp Hematol.* 25 (1997) 601-607.
271. TANAKA, T.; CAMERINI, D.; SEED, B.; TORIMOTO, Y.; DANG, N.H.; KAMEOKA, J.; DAHLBERG, H.N.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Cloning and functional expression of the T-cell activation antigen CD26. *J Immunol.* 149 (1992) 481-486.
272. TANAKA, T.; KAMEOKA, J.; YARON, A.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: The costimulatory activity of the CD26 antigen requires Dipeptidyl Peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90 (1993) 4586-4590.
273. TANAKA, T.; DUKE-COHAN, J.S.; KAMEOKA, J.; YARON, A.; LEE, I.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/Dipeptidyl Peptidase IV. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91 (1994) 3082-3086.
274. TANAKA, T.; UMEKI, K.; YAMAMOTO, I.; SAKAMOTO, F.; NOGUCHI, S.; OHTAKI, S.: CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV/DPP IV) as a novel molecular marker for differentiated thyroid carcinoma. *Int J Cancer.* 64 (1995) 326-331.
275. TANAKA, S.; MURAKAMI, T.; HOROKAWA, H.; SUGIURA, M.; KAWASHIMA, K.; SUGITA, T.: Suppression of Arthritis by the inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV. *Int J Immunopharmac.* 19 (1997) 15-24.
276. TANAKA, S.; MURAKAMI, T.; NONAKA, N.; OHNUKI, T.; YAMADA, M.; SUGITA, T.: Anti-arthritic effects of the novel Dipeptidyl Peptidase IV inhibitors TMC-2A and TSL-225. *Immunopharmacology.* 40 (1998) 21-26.
277. THIEL, E.R.: Eigenschaften angeregter Rhodamin-Farbstoffe und deren Wirkung im Farbstofflaser. Habilitation, UNIVERSITÄT-GH SIEGEN (1997).

278. TILAK, M.A.: New non solid phase method for quick, quantitative synthesis of analytically pure peptides without intermediate or final purifications: I. Synthesis of a nonapeptide. *Tetrahedron Lett.* 11 (1970) 849-854.
279. TIRUPPATHI, C.; MIYAMOTO, Y.; GANAPATHY, V.; ROESEL, R.A.; WITHFORD, G.M.; LEIBACH, H.: 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 (1990) 1476-1483.
280. TORIMOTO, Y.; DANG, N.H.; VIVIER, E.; TANAKA, T.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Coassociation of CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J Immunol.* 147 (1991) 2514-2517.
281. TORIMOTO, Y.; DANG, N.H.; TANAKA, T.; PRADO, C.; SCHLOSSMANN, S.F.; MORIMOTO, C.: Biochemical characterisation of CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV): Functional comparison of distinct epitopes recognized by various anti-CD26 monoclonal antibodies. *Mol Immunol.* 29 (1992) 183-192.
282. TREDWELL, C.J.: Viscosity dependent internal conversion in the rhodamine dye, Fast Acid Violet 2R. *J C S Faraday II.* 76 (1980) 1627-1637.
283. TSAKALIDOU, E.; ANASTASIOU, R.; PAPADIMITRIOU, K.; MANOLOPOULOU, E.; KALANTZOPOULOS, G.: Purification and characterisation of an intracellular X-Prolyl-Dipeptidyl Aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. *J Biotechnol.* 59 (1998) 203-211.
284. TSUJI, E.; MISUMI, Y.; FUJIWARA, T.; TAKAMI, N.; OGATA, S.; IKEHARA, Y.: An active-site mutation (Gly633-Arg) of Dipeptidyl Peptidase IV causes its retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry.* 31 (1992) 11921-11927.
285. ULBRICHT, B.; SPIESS, E.; SCHWARTZ-ALBIEZ, R.; EBERT, W.: Quantification of intracellular Cathepsin activities in human lung tumor cell lines by flow cytometry. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 376 (1995) 407-414.
286. UMEZAWA, H.; AOYAGI, T.; OGAWA, K.; NAGANAWA, H.; HAMAD, M.; TAKEUCHI, T.: Diprotins A and B, inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV, produced by bacteria. *J Antibiot.* 37 (1984) 422-425.
287. VANHOOF, G.; DE MEESTER, I.; VAN SANDE, M.; SCHARPE, S.; YARON, A.: Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluids. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 30 (1992) 333-338.
288. VANHOOF, G.; GOOSSENS, F.; DE MEESTER, I.; HENDRIKS, D.; SCHARPE, S.: Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9 (1995) 736-744.
289. VAN NOORDEN, C.J.F.; BOONACKER, E.; BISSELL, E.R.; MEJER, A.J.; VAN MARLE, J.; SMITH, R.E.: Ala-Pro-Cresyl Violet, a fluorogenic substrate for the analysis of kinetic parameters of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in individual living rat hepatocytes. *Anal Biochem.* 252 (1997) 71-77.

290. VAN ZON, A.; BEYERMAN, H.C.: Repetitive excess mixed anhydride (REMA) synthesis of peptides. The protected C-terminal hexadecapeptide of Secretin. *Helv Chim Acta*. 56 (1973) 1729-1740.
291. VAUGHAN, J.R.: Acylalkylcarbonates as acylating agents for the synthesis of peptides. *J Am Chem Soc*. 73 (1951) 3547.
292. VISCIDI, R.; MAYUR, K.; LEDERMAN, H.M.; FRANKEL, A.D.: Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science*. 246 (1989) 1606-1608.
293. VIVIER, J.; MARGUET, D.; NAQUET, P.; BONICEL, J.; BLACK, D.; LI, C.X.-Y.; BERNARD A.-M.; GORREL, J.-P.; PIERRES, M.: Evidence that Thymocyte Activating Molecule is mouse CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV). *J Immunol*. 147 (1991) 447-454.
294. VLASAK, R.; VILAS, U.; STROBE, B.; KREIL, G.: c-DNA cloning and expression of secreted *Xenopus laevis* Dipeptidyl Aminopeptidase IV. *Eur J Biochem*. 247 (1997) 107-113.
295. VOLZ, B.; ORBERGER, G.; PORWOLL, S.; HAURI, H.-P.; TAUBER, R.: Selective reentry of recycling cell surface glycoproteins to the biosynthetic pathway in human hepatocarcinoma HepG2 cells. *J Cell Biol*. 130 (1995) 537-551.
296. VON BONIN, A.; STEEG, C.; MITTRÜCKER, H.-W.; FLEISCHER, B.: The T-cell receptor ζ -chain is required but not sufficient for CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV) mediated signaling. *Immunol Lett*. 55 (1997) 179-182.
297. VON BONIN, A.; HÜHN, J.; FLEISCHER, B.: Dipeptidyl Peptidase IV/CD26 on T cells: Analysis of an alternative T cell activation pathway. *Immunol Rev*. 161 (1998) 43-53.
298. VON STEYERN, F.V.; JOSEFSSON, J.-O.; TAGERUD, S.: Rhodamine B, a fluorescent probe for acidic organelles in denervated skeletal muscle. *J Histochem Cytochem*. 44 (1996) 267-274.
299. WATSON, J.V.: Flow cytometry in biomedical sciences. *Nature*. 325 (1987) 741-742.
300. WEYGAND, F.; PROX, A.; KÖNIG, W.: Razemisierung bei Peptidsynthesen. *Chem Ber*. 99 (1966) 1451-1460.
301. WILLHEIM, M.; EBNER, C.; BAIER, K.; KERN, W.; SCHRATTBAUER, K.; THIEN, R.; KRAFT, D.; BREITENEDER, H.; REINISCH, W.; SCHEINER, O.: Cell surface characterisation of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: Correlation of CD26 expression with T_{H1} subsets. *J Allergy Clin Immunol*. 100 (1997) 348-355.
302. WILLIAMS, K.A.; DEBER, C.M.: Proline residues in transmembrane helices: Structural or dynamic role? *Biochemistry*. 30 (1991) 8919-8923.
303. WILLIAMSON, M.P.: The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J*. 297 (1994) 249-260.
304. WOLF, B.; FISCHER, G.; BARTH, A.: Kinetische Untersuchungen an der Dipeptidyl Peptidase IV. *Acta Biol Med Ger*. 37 (1978) 409-420.

305. WRENGER, S.; REINHOLD, D.; HOFFMANN, T.; KRAFT, M.; FRANK, R.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; ANSORGE, S.: The N-terminal X-X-Pro sequence of the HIV-1 Tat protein is important for the inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV/CD26) and the suppression of mitogen-induced proliferation of human T cells. *FEBS Lett.* 383 (1996) 145-149.
306. WRENGER, S.; HOFFMANN, T.; FAUST, J.; MRESTANI-KLAUS, C.; BRANDT, W.; NEUBERT, K.; KRAFT, M.; OLEK, S.; FRANK, R.; ANSORGE, S.; REINHOLD, D.: The N-terminal structure of HIV-1 Tat is required for suppression of CD26-dependent T cell growth. *J Biol Chem.* 272 (1997) 30283-30288.
307. WU, P.; BRAND, L.: Resonance-energy-transfer: Methods and applications. *Anal Biochem.* 218 (1994) 1-13.
308. XU, D.; NECKERS, D.C.: Aggregation of rose bengal molecules in solution. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 40 (1987) 361-370.
309. YAGINUMA, N.; HIROSE, S.; INADA, Y.: Spectral change of Rhodamine 6G caused by the energization of mitochondria, in relation to charge separation. *J Biochem.* 74 (1973) 811-815.
310. YAJIMA, H.; MIZOKAMI, N.; OKADA, Y.; KAWASAKI, K.: Studies on peptides. XXIV. Some observations on the urethan formation during mixed anhydride procedure in peptide synthesis. *Chem Pharm Bull.* 17 (1969a) 1985-1992.
311. YAJIMA, H.; OKADA, Y.; KAWATANI, H.; MIZOKAMI, N.: Studies on peptides. XXII. Synthesis of the partially protected pentadecapeptide related to monkey and human β -Melanocyte-stimulating Hormones. *Chem Pharm Bull.* 17 (1969b) 1229-1236.
312. YAMABE, K.T.; SUGIE, K.; KITAOKA, Y.; TAKEDA, S.; OKUBO, Y.; TESHIGAWARA, K.; YODOI, J.; HORI, T.: Induction of the 2B9 antigen/Dipeptidyl Peptidase IV on human natural killer cells by IL-2, IL-12 or IL-15. *Immunology.* 91 (1997) 151-158.
313. YAMASHITA, K.; TACHIBANA, Y.; MATSUDA, Y.; KATUNUMA, N.; KOCHIBE, N.; KOBALA, A.: Comparative studies of the sugar chains of Aminopeptidase N and Dipeptidyl Peptidase IV from rat kidney brush border membrane. *Biochemistry.* 27 (1988) 5565-5573.
314. YARON, A.; CARMEL, A.; KATCHALSKI-KATZIR, E.: Intramolecularly quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes. *Anal Biochem.* 95 (1979) 228-235.
315. YARON, A.; NAIDER, F.: Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 28 (1993) 31-81.
316. YOSHIMOTO, T.; TSURU, D.: Proline-specific Dipeptidyl Aminopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *J Biochem.* 91 (1982) 1899-1906.
317. YOUNG, R.M.; ARNETTE, K.; ROESS, D.A.; BARISA, B.G.: Quantitation of fluorescence energy transfer between cell surface proteins via fluorescence donor photobleaching kinetics. *Biophys J.* 67 (1998) 881-888.

318. ZUZEL, K.A.; GRAHAM, J.G.; HRYSZKO, J.; BILLINGTON, D.; TURNER, A.J.:
Peptidase content of the bile canalicular membrane. *Biochem Soc Trans.* 23 (1995)
306S.

Anhang

A1 Spezifität der Hydrolyse der Substrate $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ mit $\text{Xaa} = \text{Leu, Ser und Cha}$ durch DP IV der myeloischen Zelllinie U-937 und deren Zellysat

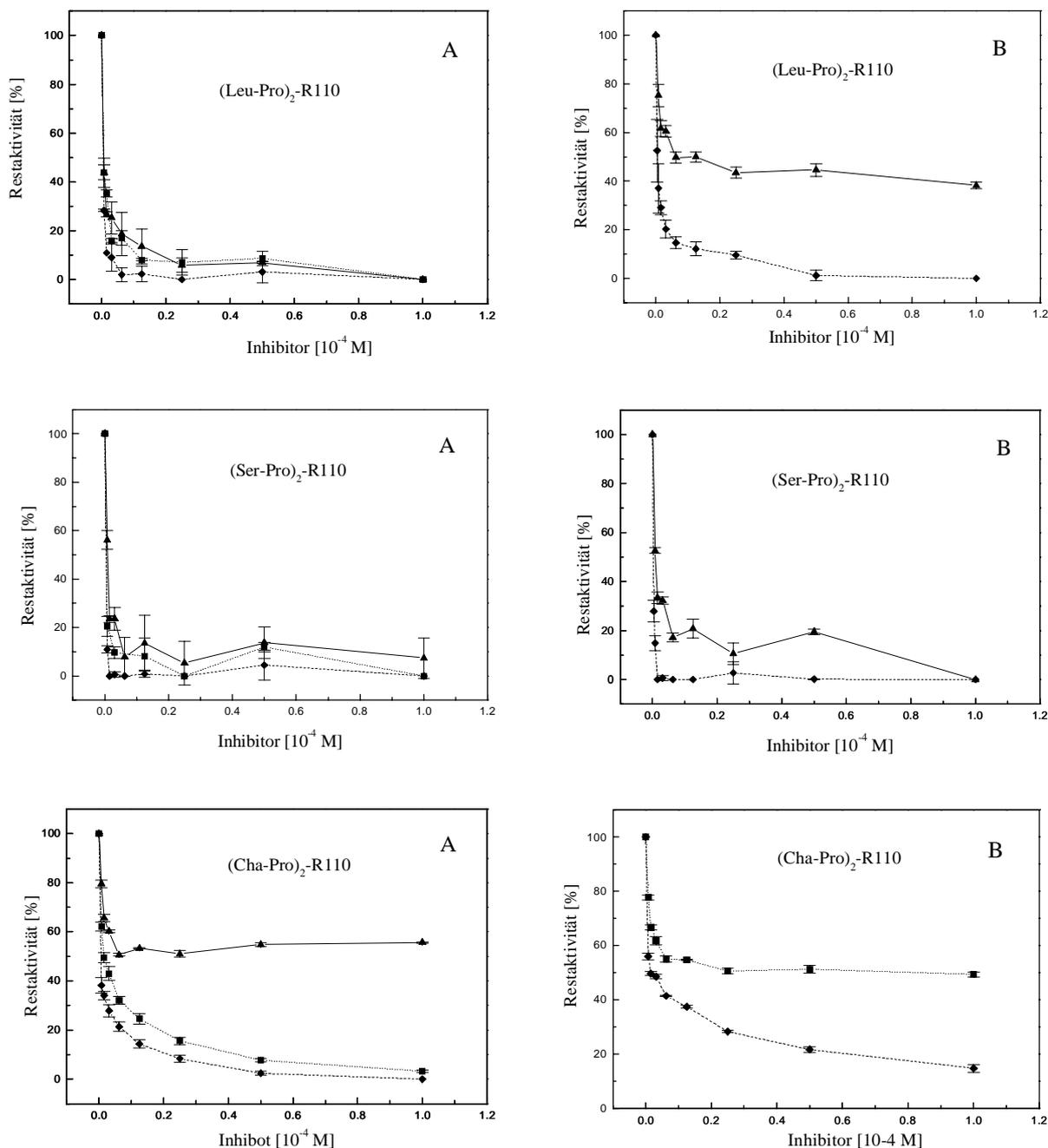


Abb. A1 Darstellung der Spezifität der Hydrolyse von $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ mit $\text{Xaa} = \text{Leu, Ser und Cha}$ durch DP IV intakter U-937-Zellen (A) und des U-937-Zellysats (B) mittels DP IV-spezifischer Inhibitoren: Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid (◆), Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid (▲) und Lys[Z(NO₂)]-piperidid (■) (Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, U-937-Zellen 10⁶ Zellen/ml, Inkubation 30 min, 37°C; Fluoreszenzplattemesler, $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 525$ nm, Lampenspannung 1.8 V bis 2.0 V)

Auf die Spezifität der Hydrolyse von $(\text{Gly-Pro})_2\text{-R110}$ und $(\text{Ala-Pro})_2\text{-R110}$ durch DP IV intakter U-937-Zellen und des U-937-Zellysats wurde unter HERMANN'S [1995] eingegangen.

A2 Hydrolyse der Substrate Xaa-Pro-R110-Y mit Xaa = Gly und Ala und Y = Y₁ bis Y₉

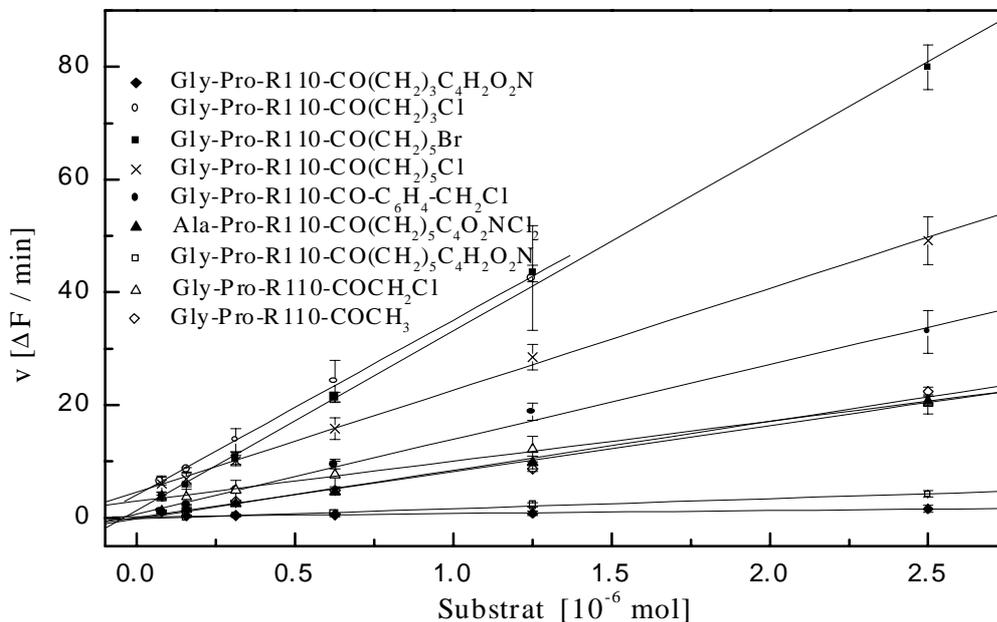
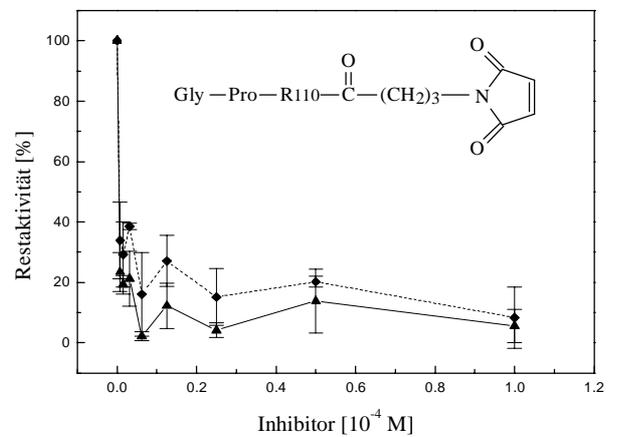
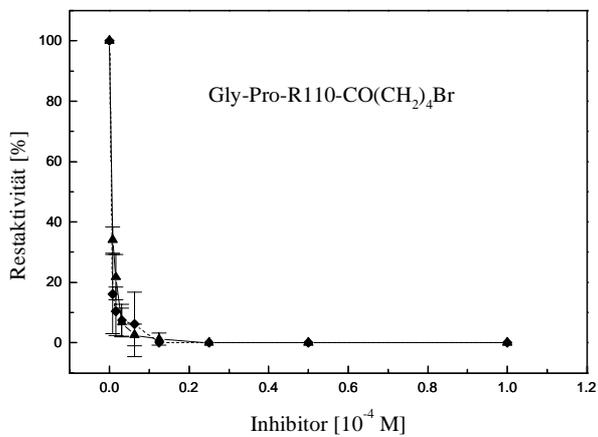
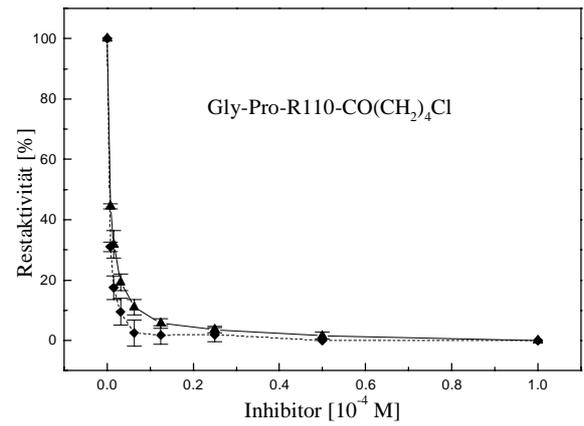
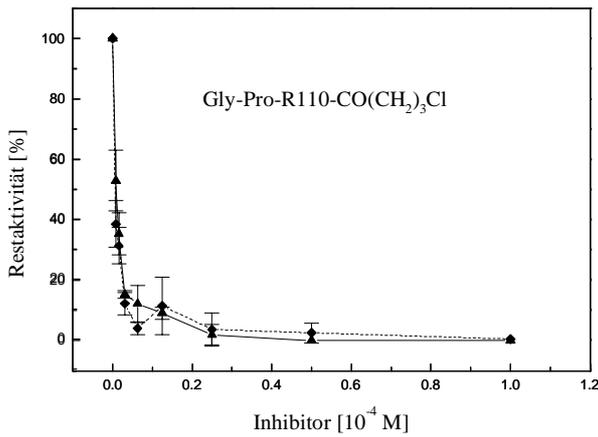
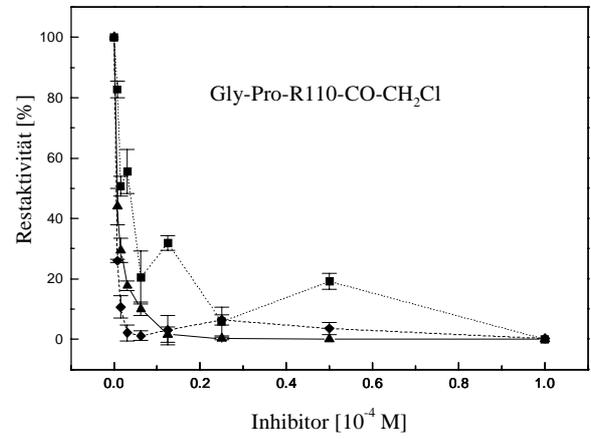
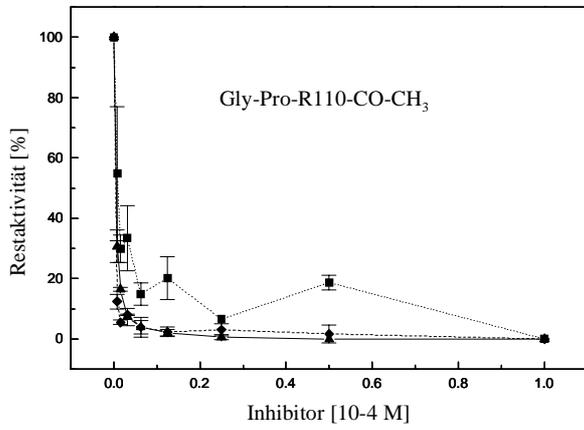


Abb. A2 Hydrolyse der Substrate Xaa-Pro-R110-Y mit Xaa = Gly und Ala und Y = Y₁ bis Y₉

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7,2, U-937-Zellen einer Aktivität von 25 pkat/ml Ansatz; Inkubation 30 min, 37°C; Fluoreszenzplattenleser: $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$; Lampenspannung 2.0 V)

A3 Spezifität der Hydrolyse der Substrate Xaa-Pro-R110-Y mit Xaa = Gly und Ala und Y = Y₁ bis Y₉ durch DP IV der myeloischen Zelllinie U-937



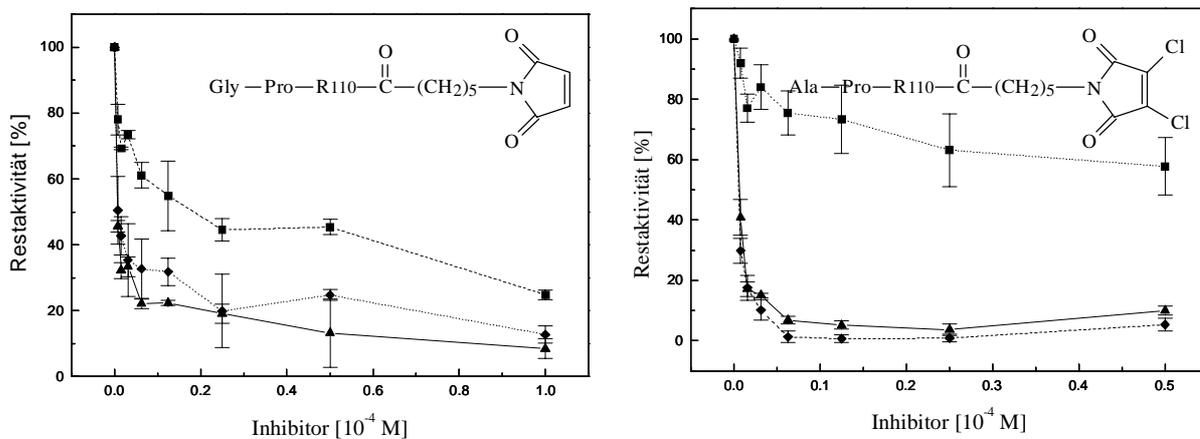
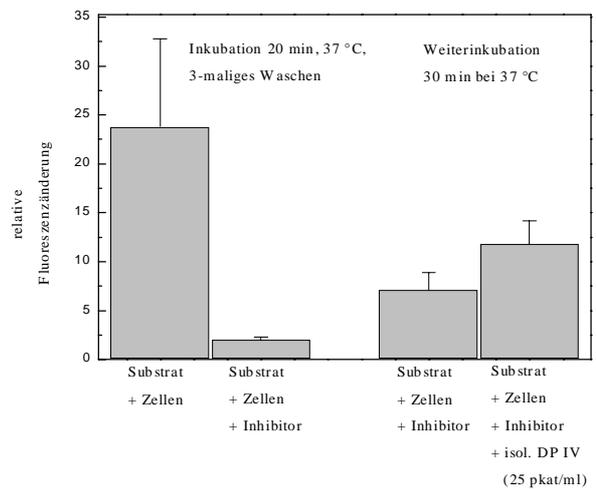
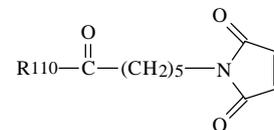
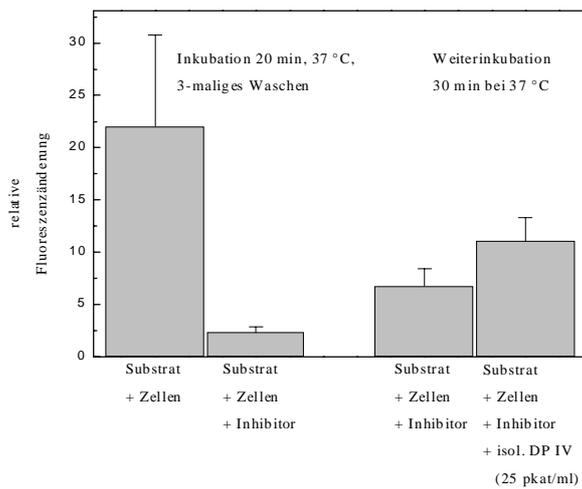
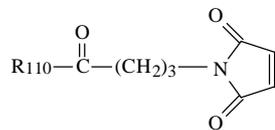
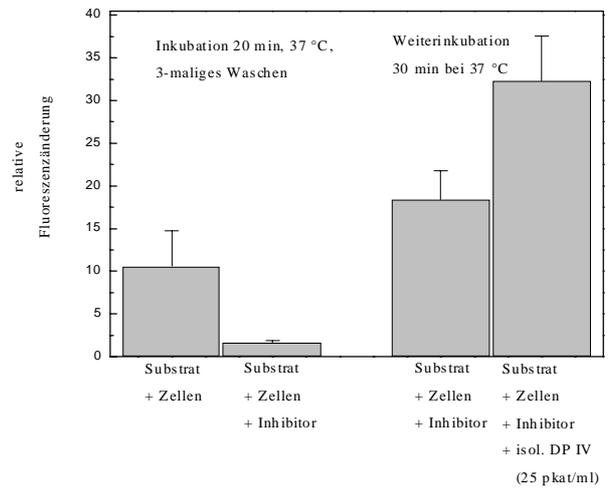
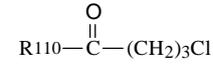
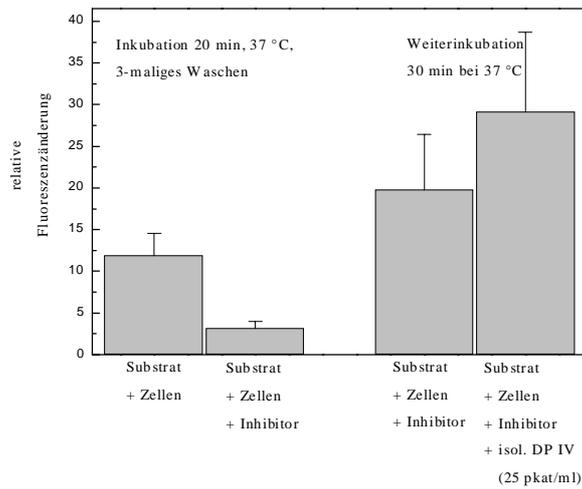
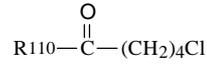


Abb. A3 Darstellung der Spezifität der Hydrolyse von Xaa-Pro-R110-Y mit Xaa = Gly und Ala und Y = Y₁ bis Y₉ durch DP IV intakter U-937-Zellen mittels DP IV-spezifischer Inhibitoren: Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid (◆), Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid (▲) und Lys[Z(NO₂)]-piperidid (■) (Meßbedingungen: : PBS, pH = 7.2, U-937-Zellen 10⁶ Zellen/ml, Inkubation 30 min, 37°C; Fluoreszenzplattensleser: λ_{Ex} = 488 nm, λ_{Em} = 525 nm, Lampenspannung 1.8 V bis 2.5 V)

A4 Beeinflussung der Hydrolyse zellulär gebundenen Substrates durch isolierte DP IV



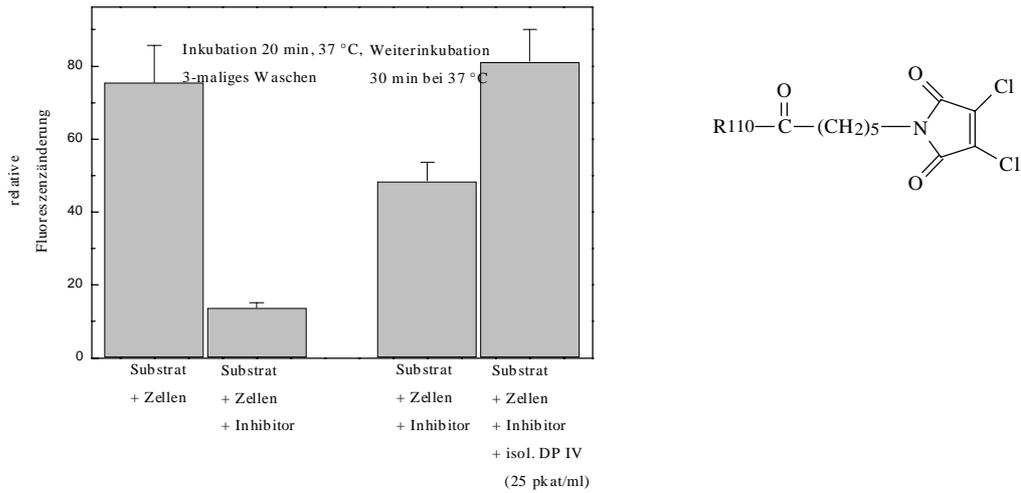


Abb. A4 Beeinflussung der Hydrolyse zellulär gebundenen Substrates durch isolierte DP IV

(Meßbedingungen: PBS, pH = 7.2, Zellen 10^6 MNZ/ml Ansatz, [Xaa-Pro-R110-Y] = $5 \cdot 10^{-6}$ M, [Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid] = 10^{-4} M; Durchflußzytometer: λ_{Ex} = 488 nm, λ_{Em} = FL1 = 530/30 nm)

A5 $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Verbindungen $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ (Xaa = Abu, Leu, Ser, Lys, Cha), der Verbindungen und Xaa-Pro-R110-Y (Xaa = Gly und Y = Y₁ bis Y₆) und von N^ε-Biotin- bzw. 4(5)-Carboxyfluorescein-markiertem Lys-2-cyano-pyrrolidid

Tab. A5.1: $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindungen der Struktur $(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$ (Xaa = Abu, Leu, Ser, Lys und Cha)

$(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$	Xaa • [ppm]		C'	C'	C'	C'
	NH ₂	C' H (trans)				
$(\text{Abu-Pro})_2\text{-R110}$	8.03	4.17	1.78 (C' H ₂)	0.98 (C' H ₃)	-	-
$(\text{Leu-Pro})_2\text{-R110}$	8.03	4.13	1.56 (C ^β H ₂)	1.81 (C ^γ H)	0.96 (C ^δ H ₃ , C ^{δ'} H ₃)	-
$(\text{Ser-Pro})_2\text{-R110}$	8.03	4.20	3.84 3.59 (C' H ₂)	5.53 (C' OH)	-	-
$(\text{Lys-Pro})_2\text{-R110}$	8.04	4.14	1.72 (C' H ₂)	1.44 (C' H ₂)	1.56 (C' H ₂)	2.77 (C' H ₂)
$(\text{Cha-Pro})_2\text{-R110}$	8.19	4.17	1.67 (C ^β H)	0.89 1.67 (2C ^γ H ₂)	1.20 1.67 (2C ^δ H ₂)	1.90 1.67 (C ^ε H ₂)

$(\text{Xaa-Pro})_2\text{-R110}$	Pro • [ppm]					cis/trans [%]
	C' H	C' H ₂	C' H ₂	C' H ₂	CONH	
$(\text{Abu-Pro})_2\text{-R110}$	4.50 (trans) 4.64 (cis)	2.24 1.89	2.02 1.89	3.76 3.57	10.52 (trans) 10.67 (cis)	93.0/ 7.0
$(\text{Leu-Pro})_2\text{-R110}$	4.50 (trans)	2.24 1.90	2.05 1.90	3.79 3.48	10.47 (trans) 10.75 (cis)	93.0/7.0
$(\text{Ser-Pro})_2\text{-R110}$	4.49 (trans) 4.77 (cis)	2.24 1.91	2.02 1.91	3.77 3.59	10.35 (trans) 10.62 (cis)	88.0/12.0
$(\text{Lys-Pro})_2\text{-R110}$	4.50 (trans) 4.64 (cis)	2.24 1.90	2.03 1.90	3.75 3.53	10.52 (trans) 10.73 (cis)	93.5/6.5
$(\text{Cha-Pro})_2\text{-R110}$	4.54 (trans)	2.24 1.90	2.04 1.90	3.80 3.46	10.57 (trans) 10.62 (cis)	93.0/7.0

Als Lösungsmittel wurde DMSO-*d*₆ verwendet. Die cis/trans-Verhältnisse beziehen sich auf die Xaa-Pro-Bindung. Die chemischen Verschiebungen der aromatischen Protonen des Rhodamin 110 liegen in einem Bereich zwischen 6.7 ppm und 8.1 ppm und wurden nicht zugeordnet. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle chemischen Verschiebungen auf die trans-Isomeren.

Tab. A5.2: ¹H-NMR Daten der Verbindungen der Struktur Gly-Pro-R110-Y (Y = -COCH₃, -COCH₂Cl, -CO(CH₂)₃Cl, -CO(CH₂)₄Cl, -CO(CH₂)₄Br, -CO-C₆H₆-CH₂Cl)

Gly-Pro-R110-R	Gly • [ppm]		Pro • [ppm]				
	NH ₂	C' H ₂	C' H	C' H ₂	C' H ₂	C' H ₂ CONH	
R = -COCH ₃	8.03	3.85 (<i>cis</i> , <i>trans</i>)	4.48 (<i>trans</i>) 4.60 (<i>cis</i>)	2.20 1.95	2.02 1.95	3.61 3.53	10.43 10.44 (<i>trans</i> , R und S) 10.27 (<i>cis</i> , R und S)
R = COCH ₂ Cl	7.96	3.87 (<i>cis</i> , <i>trans</i>)	4.49 (<i>trans</i>) 4.61 (<i>cis</i>)	2.20 1.94	2.02 1.94	3.62 3.53	10.45 10.44 (<i>trans</i> R und S) 10.65 (<i>cis</i> , R und S)
R = CO(CH ₂) ₃ Cl	8.10	3.88 (<i>cis</i> , <i>trans</i>)	4.50 (<i>trans</i>) 4.62 (<i>cis</i>)	2.20 1.91	2.04 1.91	3.62 2.04	10.45 10.44 (<i>trans</i> , R und S) 10.32 (<i>cis</i> , R und S)
R = CO(CH ₂) ₄ Cl	8.17	3.82 (<i>cis</i> , <i>trans</i>)	4.49 (<i>trans</i>) 4.59 (<i>cis</i>)	2.19 1.94	1.99 1.94	3.61 3.52	10.42 10.43 (<i>trans</i> , R und S) 10.24 (<i>cis</i> , R und S)
R = CO(CH ₂) ₄ Br	8.14	3.88 (<i>cis</i> , <i>trans</i>)	4.49 (<i>trans</i>) 4.61 (<i>cis</i>)	2.20 1.96	2.02 1.96	3.63 3.56	10.44 10.45 (<i>trans</i> , R und S) 10.25 (<i>cis</i> , R und S)
R = CO-C ₆ H ₆ -CH ₂ Cl	8.15	3.88 (<i>cis</i> , <i>trans</i>)	4.55 (<i>trans</i>) 4.60 (<i>cis</i>)	2.20 1.94	2.02 1.94	3.62 3.53	10.45 10.46 (<i>trans</i> , R und S) 10.56 (<i>cis</i> , R und S)

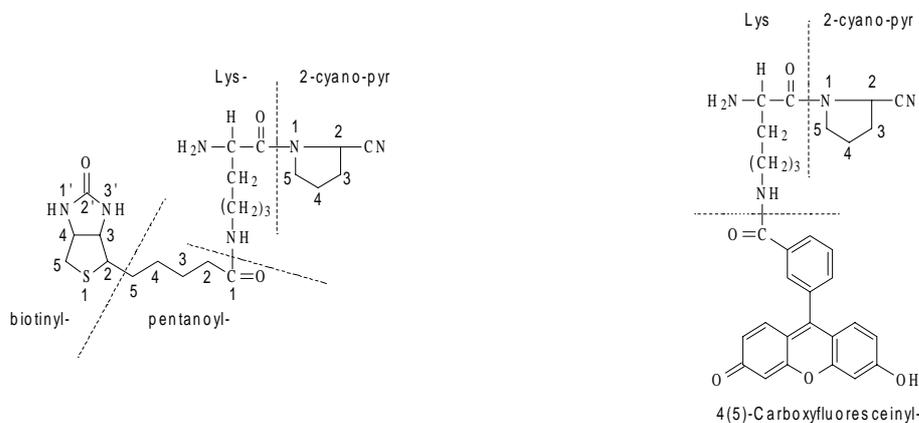
Gly-Pro-R110-R	Y • [ppm]					<i>trans</i> (R und S), [%]	<i>cis</i> (R und S), [%]
	CONH	C ²	C ³	C ⁴	C ⁵		
R = -COCH ₃	10.27	2.07 (C ² H ₃)	-	-	-	60.1/25.9	14
R = COCH ₂ Cl	10.65	4.29 (C ² H ₂)	-	-	-	47.3/39.2	13.5
R = CO(CH ₂) ₃ Cl	10.32	2.50 (C ² H ₂)	2.04 (C ³ H ₂)	3.70 (C ⁴ H ₂)	-	43.5/42.5	14
R = CO(CH ₂) ₄ Cl	10.24	2.37 (C ² H ₂)	1.73 (C ³ H ₂)	1.73 (C ⁴ H ₂)	3.67 (C ⁵ H ₂)	44.0/41.0	15.0
R = CO(CH ₂) ₄ Br	10.25	2.38 (C ² H ₂)	1.86 (C ³ H ₂)	1.72 (C ⁴ H ₂)	3.56 (C ⁵ H ₂)	44.7/41.3	14.0
R = CO-C ₆ H ₆ -CH ₂ Cl	10.56	<u>Aromat</u> 7.10-8.10	<u>CH₂Cl</u> 4.86			40.9/40.1	19.0

Die ¹H-Spektren wurden in DMSO-d₆ aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der aromatischen Protonen des Rhodamin 110 wurden nicht zugeordnet. Die Angabe der *cis/trans*-Verhältnisse bezieht sich auf die Xaa-Pro-Bindung. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle chemischen Verschiebungen auf die *trans*-Isomeren.

Tab. A5.3: $^1\text{H-NMR}$ Daten des N^ϵ -Biotin- und 4(5)-Carboxyfluorescein-markierten Lys-2-cyano-pyrrolidids

Verbindung	Lys- δ [ppm]	2-Cyano-pyr δ [ppm]	Marker δ [ppm]
Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid	3.69 (C^αH); 1.49 (C^βH_2); 1.75 ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$); 1.37 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$); 3.00 ($\text{C}^\epsilon\text{H}_2$); 7.70 ($\text{N}^\epsilon\text{H}$)	4.01 (C^2H); 2.33, 1.62 (C^3H_2); 1.90, 1.75 (C^4H_2); 3.56, 3.41 (C^5H_2)	<u>Biotinyl-</u> 3.10 (C^2H); 4.13 (C^3H); 4.30 (C^4H); 2.82, 2.58 (C^5H_2); 6.76 (N^1H); 6.65 (N^3H) <u>Pentanoyl-</u> 2.03 (C^2H_2); 1.30 (C^3H_2); 1.49 (C^4H_2); 1.62, 1.49 (C^5H_2)
Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid	3.72 (C^αH); 1.36 (C^βH_2); n.b. ($\text{C}^\gamma\text{H}_2$); 1.54 ($\text{C}^\delta\text{H}_2$); 3.31 ($\text{C}^\epsilon\text{H}_2$); 8.77 ($\text{N}^\epsilon\text{H}$)	4.01 (C^2H); 2.34, 1.54 (C^3H_2); 1.90, 1.75 (C^4H_2); 3.56, 3.41 (C^5H_2)	4(5)-Carboxyfluoresceinyl-n.b.

Die ^1H -Spektren wurden in $\text{DMSO-}d_6$ aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der aromatischen Protonen des 4(5)-Carboxyfluoresceins und von $\text{Lys-C}^\gamma\text{H}_2$ wurden nicht zugeordnet.



Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid

Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid

Lys-(biotinyl)-2-cyano-pyrrolidid liegt in einem Verhältnis von ca. 90%/10% als Isomerengemisch vor. Lys-(4(5)-carboxyfluoresceinyl)-2-cyano-pyrrolidid liegt in einem Verhältnis von ca. 64%/36% als Isomerengemisch vor. Möglicherweise handelt es sich dabei um cis/trans-Isomere bezüglich der Lys-Pyr-Amidbindung, die genaue Art der Isomerie wurde zum gegebenen Zeitpunkt nicht genauer charakterisiert.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Susan Lorey, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle (Saale), den 17.05.1999

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Neubert für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die ausgezeichneten materiellen Bedingungen.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. S. Ansorge für die Gewährung mehrmonatiger Arbeitsaufenthalte in seiner Arbeitsgruppe, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und anregende Diskussionen. Herrn Dr. F. Bühling danke ich herzlichst für die Unterstützung bei Fragestellungen hinsichtlich der zellulären Untersuchungen sowie für zahlreiche anregende und kritische Hinweise. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Ansorge danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Diskussion theoretischer und praktischer Probleme sowie für das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Dr. J. Faust danke ich für die Bereitstellung einiger von mir verwendeten Verbindungen. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. J. Rahfeld für die Bereitstellung der Dipeptidylpeptidase IV aus Schweineniere sowie für zahlreiche fachliche Diskussionen. Außerdem danke ich Herrn Dr. T. Kähne für die Dipeptidylpeptidase IV aus humaner Niere sowie für die rekombinante humane Dipeptidylpeptidase IV.

Frau Dr. C. Mrestani-Klaus danke ich für die Durchführung zahlreicher NMR-spektroskopischer Experimente sowie für die Auswertung der Spektren. Frau Dr. A. Schierhorn danke ich für die Durchführung der massenspektroskopischen Untersuchungen. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Y. Mrestani und Frau Dr. A. Stöckel-Maschek für die Anleitung bei einigen Experimenten und fachliche Diskussionen. Herrn PD Dr. W. Brandt danke ich für umfangreiche Molecular Modeling Experimente.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Neubert für die gute Zusammenarbeit.

Angaben zur Person

Name: Susan Lorey
Geburtsdatum: 30.03.1972
Geburtsort: Ilmenau
Familienstand: ledig

Schulbildung

1978-1980 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule "Erich Mäder" in Eisenach
1980-1988 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule "Liselotte Herrmann" in Eisenach
1988-1990 Erweiterte Oberschule "Ernst Abbe" in Eisenach
Abschluß: Abitur

Studium

1990-1992 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluß: Vordiplom Biologie
1992-1995 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluß: Diplom Biochemie
1994-1995 Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle
Thema: "Isolierung und Strukturaufklärung der Steroidalkaloidglykoside aus *Solanum coccineum* Jacq."
1995-1999 Anfertigung der Dissertation
Thema: "Fluorogene Substrate und Inhibitoren zur Detektion von DP IV-Aktivität auf Immunzellen"
1995-1998 Stipendiatin im Rahmen des Graduiertenförderungsgesetzes des Landes Sachsen-Anhalt
1998-1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie