

Strukturelle Anforderungen an Substrate und Inhibitoren
epithelialer H⁺/Peptidsymporter



Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Frau Diplom-Biochemikerin **Ilka Knütter**
geb. am: 15.11.1972 in: Bad Segeberg

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 20. Mai 2003.

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Klaus Neubert.

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Neubert, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Hannelore Daniel, Technische Universität München
3. Prof. Dr. Frederick H. Leibach, Medical College of Georgia, USA

Tag der öffentlichen Verteidigung in Halle (Saale): 18. September 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005742

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005742>]

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung und Zielstellung | 1 |
| 2 | Grundlagen des Peptidtransports | 3 |
| 2.1 | Allgemeine Aspekte | 3 |
| 2.2 | Methoden zur Untersuchung des epithelialen Peptidtransports | 5 |
| 2.3 | Historische Aspekte..... | 6 |
| 2.4 | Mechanismus der epithelialen Peptidtranslokation..... | 8 |
| 2.5 | Molekularer Aufbau der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2..... | 9 |
| 2.6 | Lokalisation der Peptidtransporter | 12 |
| 2.7 | Substratspezifität | 14 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion..... | 17 |
| 3.1 | Substratspezifität von PEPT1 | 17 |
| 3.2 | Inhibitoren von PEPT1 und PEPT2 | 28 |
| 3.2.1 | <i>Charakterisierung von Lys-Pro Derivaten als neuartige Inhibitoren des intestinalen Peptidtransporters PEPT1</i> | <i>29</i> |
| 3.2.2 | <i>Charakterisierung hoch affiner Inhibitoren für PEPT2</i> | <i>31</i> |
| 3.2.3 | <i>Systematische Analyse der Transporteigenschaften seitenkettenmodifizierter Dipeptide an PEPT1</i> | <i>34</i> |
| 3.3 | Expression, Mechanismus und Substratspezifität von PEPT1 am extrahepatischen Gallengang | 41 |
| 4 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 45 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 49 |
| 6 | Veröffentlichte Originalarbeiten | 62 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------------------|---|
| Abu | 4-Aminobuttersäure |
| Ac | Acetyl |
| ACE | Angiotensin Converting Enzyme |
| Ahp | 7-Aminoheptansäure |
| Ahx | 6-Aminohexansäure |
| Aib | α -Aminoisobuttersäure |
| Aoc | 8-Aminooktansäure |
| Apt | 5-Aminopentansäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BBMV | Brush-Border-Membrane Vesicles |
| Boc | tert.-Butyloxycarbonyl |
| Bu | Butyryl |
| But | Butyl |
| Bz | Benzoyl |
| Bzl | Benzyl |
| CCCP | Carbonyl Cyanid p-(trichloromethoxy)phenylhydrazon |
| Da | Dalton |
| Dab | L- α,γ -Diaminobuttersäure |
| FCCP | Carbonyl Cyanid p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon |
| Hp | Heptanoyl |
| HPCE | High Pressure Capillary Electrophoresis |
| HPLC | High Pressure Liquid Chromatography |
| IC ₅₀ | Konzentration eines Inhibitors, die nötig ist, um 50 % der spezifischen Aufnahme eines Standardsubstrates zu hemmen |
| K _i | Inhibitor konstante |
| K _{i corr} | um den <i>trans</i> -Gehalt korrigierte Inhibitor konstante |
| K _t | Affinitätskonstante des Transports (Michaelis-Menten-Konstante) |
| Nle | Norleucin |
| Orn | Ornithin |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| Pac | Phenylacetyl |
| Pbu | 4-Phenylbutyryl |

| | |
|---------------------|---|
| PEPT1 | “ <i>low affinity, high capacity</i> ” H ⁺ /Di- und Tripeptidsymporter |
| PEPT2 | “ <i>high affinity, low capacity</i> ” H ⁺ /Di- und Tripeptidsymporter |
| Phx | 6-Phenylhexanoyl |
| Ppr | 3-Phenylpropionyl |
| R | Rest |
| RP-HPLC | Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography |
| RT-PCR | Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction |
| Spezies: | r = Ratte |
| | rb = Kaninchen |
| | h = Mensch |
| TMD | Transmembrandomäne |
| V _{max} | Maximalgeschwindigkeit des Transports |
| Xaa | proteinogene oder nicht proteinogene Aminosäure |
| Z | Benzyloxycarbonyl |
| Z(NO ₂) | 4-Nitrobenzyloxycarbonyl |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1 *Einleitung und Zielstellung*

Schon Anfang des 20. Jahrhunderts vermutete Emil Abderhalden, dass die Abbauprodukte der luminalen Proteinsverdauung nicht nur als Aminosäuren, sondern auch als Di- und Tripeptide am Darmepithel absorbiert werden. Aber erst Anfang der 1960er Jahre gelang der Nachweis der aktiven Aufnahme von Gly-Gly in intestinale Epithelzellen (Newey & Smyth 1962). Später zeigte sich, dass Peptidtransporter auch in anderen Organen wie z.B. in der Niere vorkommen. Die Suche nach der Antriebskraft der Peptidtransporter führte Anfang der 1980er Jahre zu einem zu diesem Zeitpunkt für Säuger überraschenden Ergebnis: Der Carrier ist nicht, wie z.B. der Glucose-Transporter von einem transmembranen Na^+ -Gradienten, sondern von einem zelleinwärts gerichteten H^+ -Gradienten abhängig (Ganapathy & Leibach 1985). Er wird vom Membranpotential stimuliert, ist sättigbar und elektrogen. Durch Expressionsklonierung in *Xenopus laevis* Oocyten gelang es Mitte der 1990er Jahre, die Primärstruktur zunächst für den intestinalen Peptidtransporter (PEPT1) und kurz darauf für die renale Isoform (PEPT2) aufzuklären (Fei *et al.* 1994; Boll *et al.* 1996). Aus der großen Anzahl seiner strukturell diversen natürlichen Substrate (8400 Di- oder Tripeptide) resultiert, dass die Substratspezifität der Peptidtransporter nicht stark ausgeprägt ist. So zeigten schon Anfang der 1970er Jahre einige Arbeiten, dass der Transporter neben seinen natürlichen Substraten auch β -Lactamantibiotika, die eine tripeptidähnliche Struktur besitzen, erkennt (Quay 1972). Somit wird das Peptidtransportsystem für die pharmazeutische Industrie interessant, da mit dessen Hilfe die orale Applikation von Peptidpharmaka ermöglicht werden kann.

Aus den bisherigen Untersuchungen über die Substratspezifität des intestinalen H^+ /Peptidsymporters konnten bisher wenige und zum Teil auch widersprüchliche Aussagen über die Faktoren für eine optimale Erkennung durch den Transporter abgeleitet werden. Lange Zeit wurde die Peptidbindung und ein freier N- und C-Terminus für eine optimale Interaktion zwischen Substrat und Transporter als notwendig erachtet. Neuere Erkenntnisse geben Anlass zur Revision dieser Ansicht. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass der Peptidtransporter eine Ketomethylengruppierung (Döring *et al.* 1998a) oder eine Esterbindung (Ganapathy, M. E. *et al.* 1998) anstatt einer Peptidbindung mit ähnlicher Affinität erkennt.

Ein zentrales Anliegen dieser Arbeit war daher, die Auswirkungen von Strukturmodifikationen an Dipeptiden an Caco-2 Zellen, die PEPT1 exprimieren, zu untersuchen. Auf diese Weise sollten weitere Erkenntnisse über die *strukturellen Anforderungen eines Substrates am intestinalen Peptidtransporter* gewonnen werden. Die K_i -Werte von ca. 150 selbst vermessenen

Substanzen und von ca. 200 Substanzen aus der Arbeitsgruppe werden mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen und diskutiert.

Zur Aufklärung der Struktur der Bindungsdomäne des Transportproteins ist die Untersuchung der Substratspezifität des Peptidtransporters eine von mehreren Möglichkeiten. Eine weitere ist die Verwendung von hoch affinen Inhibitoren. In der Literatur über Inhibitoren des Peptidtransporters wurden bisher entweder widersprüchliche Ergebnisse (seitenkettengeschützte Dipeptide) publiziert (Taub *et al.* 1997b; Abe *et al.* 1999; Yang *et al.* 2002) oder der beschriebene Inhibitor zeigte nur eine geringe Affinität zum Transporter (4-Aminomethylbenzoesäure: Meredith *et al.* 1998). Außerdem zeigten Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe, dass sich die Affinität von Dipeptidderivaten mit trifunktionellen Aminosäuren erhöhte, wenn deren Seitenketten mit bestimmten Schutzgruppen blockiert wurden. Darüber hinaus werden vom Transporter zum Teil auch voluminöse Blockierungsgruppen mit relativ geringer Affinitätsniedrigung toleriert. Neben der Identifizierung von Inhibitoren ergibt sich auch die Möglichkeit, Prodrugs zu entwickeln, in dem z.B. oral nicht verfügbare Medikamente an die Seitenkette des Dipeptids gekoppelt werden.

Daher war der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit die *Charakterisierung der Transporteigenschaften von seitenkettengeschützten Dipeptiden* am intestinalen Peptidtransporter PEPT1 und am renalen Peptidtransporter PEPT2 im Hinblick auf deren Eignung als Inhibitoren oder aber als Targetstrukturen für Prodrugs.

Ein weiteres Anliegen war das *Auffinden von Peptidtransportern in anderen Geweben*. Bis Anfang der 1990er Jahre konnte der Peptidtransporter funktionell nur im Dünndarm (PEPT1) und in der Niere (PEPT1 und PEPT2) nachgewiesen werden. Nach der Klonierung 1994 zeigte sich, dass die Expression der Peptidtransporter nicht nur auf diese zwei Organe beschränkt ist. Mit molekularbiologischen oder immunohistochemischen Methoden konnten sie in vielen anderen identifiziert werden, so ist z.B. PEPT2 auch im Gehirn oder in der Lunge lokalisiert (Übersicht bei Rubio-Aliaga & Daniel 2002). Bei der Untersuchung von verschiedenen Zell-Linien konnte zunächst in SK-ChA-1 - einer kanzerogenen Zell-Linie des extrahepatischen Gallengangs - ein Peptidtransportsystem funktionell nachgewiesen werden. Dies sollte mit funktionellen, molekularbiologischen und immunohistochemischen Methoden in der oben genannten Zell-Linie und im extrahepatischen Gallengang des Säugers weiter charakterisiert werden.

2 Grundlagen des Peptidtransports

2.1 Allgemeine Aspekte

Epithelialer Membrantransport

Der Stoffaustausch mit der Umgebung und eine annähernde Konstanz der spezifischen Zusammensetzung der physiologischen Flüssigkeiten wird auf zellulärer Ebene durch die Zellmembran, für den Gesamtorganismus durch Trennepithelien gewährleistet. Epithelien gestatten oder verhindern selektiv die Passage von Substanzen, d.h. ihre Hauptaufgaben sind die Barrierefunktion und der Transport. Die Zellen von Trennepithelien besitzen eine polare Struktur und sind miteinander über Schlussleisten (tight junctions) verbunden. Die Schlussleisten sind frei durchgängig für Substanzen bis zu einem Durchmesser von 0,8 nm, jedoch weniger- oder undurchlässig für hochmolekulare Stoffe. Das Epithel besitzt demnach für solche Substanzen die Eigenschaften einer semipermeablen Membran. Die apikale Zellmembran ist definitionsgemäß der funktionellen Außenseite zugewandt und bildet fingerartige Ausstülpungen (Mikrovilli). Sie wird daher als Bürstensaummembran bezeichnet. Die basolaterale Membran besteht aus der basalen Zellmembran, die direkt der Blutseite zugewandt ist, und den lateralen Zellmembranen. Beide Membranen sind strukturell und funktionell identisch.

Die Aufnahme von Substanzen über epitheliale Barrieren erfolgt entweder parazellulär (eingeschränkt durch die tight junctions) oder transzellulär. Beim transzellulären Transport wird zwischen aktiven und passiven Transportmechanismen unterschieden. Antriebskräfte von aktiven Transportern können zum einen die ATP-Hydrolyse und zum anderen elektrochemische Gradienten sein. Beim passiven transzellulären Transport diffundieren Substanzen immer in Richtung des Konzentrationsgradienten entweder direkt durch die Phospholipidmembran (hydrophobe Substanzen, einfache Diffusion) oder bei hydrophileren Substanzen mit Hilfe von Kanälen oder Transportproteinen (erleichterte Diffusion). Dagegen kann ein aktiver Transport auch gegen einen Konzentrationsgradienten verlaufen, d.h. es kommt zu einer Anreicherung der transportierten Substanz in der Zelle. Man unterscheidet zwischen primär, sekundär und tertiär aktivem Transport. Primär aktiver Transport erfolgt immer unter direktem Verbrauch von ATP. Ein Beispiel hierfür ist die Na^+/K^+ -ATPase, die bei Epithelien in der basolateralen Membran lokalisiert ist und pro ATP-Molekül drei Na^+ nach außen und zwei K^+ in die Zelle transportiert. Auf diese Weise wird ein Na^+ -Gradient erzeugt, der z.B. vom Na^+/H^+ -Austauscher oder vom Na^+ -abhängigen Glucose-Transporter als treibende Kraft genutzt wird. Diese Transporter arbeiten daher sekundär aktiv, da sie vom aufgebauten

Na^+ -Gradienten der Na^+/K^+ -ATPase abhängig sind. Der Na^+/H^+ -Austauscher baut mit Hilfe des Na^+ -Gradienten einen H^+ -Gradienten auf, der z.B. vom H^+ /Peptidsymporter oder vom H^+ -abhängigen Aminosäure-Transporter genutzt wird. Diese Transporter sind also tertiär aktiv. Des Weiteren kann der Transport von Substanzen oder Flüssigkeiten auch über rezeptorvermittelte Endozytose, Transzytose, Pinozytose oder Potozytose erfolgen.

Das Epithel des Darms

Der Gastrointestinaltrakt dient der Verdauung und Aufnahme von Nährstoffen. Die Resorption im Dünndarm wird insbesondere durch spezielle morphologische Strukturen (zirkuläre Kerckringfalten, Darmzotten und Mikrovilli des Darmepithels) zur Vergrößerung der Oberfläche (Faktor 600) erhöht. Jede Darmzotte ist mit einer einfachen Schicht von zylindrischem Epithelgewebe bedeckt, das mit schleimbildenden Becherzellen durchsetzt ist. Ab der Mitte der Zotte ist die Differenzierung der Epithelzellen abgeschlossen, d.h. die Mikrovilli sind ausgebildet und alle für die Resorption spezifischen Enzyme und Transportsysteme sind exprimiert. Die Epithelschicht ist außerdem von einer Schleimschicht (Mucus) bedeckt, in der ein Mikroklima mit einem pH-Wert von 6,1 bis 6,8 herrscht. Sie kann von Substanzen mittels einfacher Diffusion überwunden werden.

Die Spaltung von Proteinen beginnt im Magen (Pepsin). Der Großteil der hydrolytischen Spaltungen erfolgt im Jejunum und Duodenum durch Pankreaspeptidasen (Endo- und Exopeptidasen) zu Oligopeptiden und Aminosäuren. Die Oligopeptide werden durch membranständige Peptidasen weiter zu Tri- und Dipeptiden und Aminosäuren abgebaut. Diese werden in die Epithelzellen mittels epithelialer Transporter aufgenommen, wo die meisten Tri- und Dipeptide weiter zu Aminosäuren gespalten werden. Die Aminosäuren und die restlichen Dipeptide werden mittels anderer Transporter über die basolaterale Membran in den extrazellulären Raum und letztendlich ins Blut transportiert.

Das Epithel der Niere

In den Nieren erfolgt die Reinigung des Blutes mittels glomerulärer Ultrafiltration. Die Blutgefäße in den Glomeruli sind mit einem sehr durchlässigen Epithel (Endothel) ausgestattet, so dass alle Substanzen aus dem Blut herausgefiltert werden, deren Molekulargewicht kleiner als 65 kDa ist. Dies sind neben Stoffwechselendprodukten wie z.B. Harnstoff auch andere Fremdstoffe wie Medikamente und Gifte. Bei einer solchen Filtration werden auch Nährstoffe

wie z.B. Aminosäuren, Peptide und Glucose aus dem Blut gefiltert. Diese werden in den darauffolgenden Abschnitten des proximalen Tubulus der Niere mittels epithelialer Transporter wieder rückresorbiert. Der renalen Reabsorption von kurzkettigen Peptiden, die entweder glomerulär filtriert werden oder im Tubuluslumen bei der Hydrolyse von größeren Polypeptiden durch Peptidasen entstehen, wird eine bedeutende Rolle in der Konservierung von peptidgebundenem Aminostickstoff zugeschrieben. Auch in der Niere herrscht an der apikalen Membran ein Mikroklima mit einem pH-Wert von 5,5 bis 6,0.

Das Epithel des extrahepatischen Gallengangs

Die Leber hat neben der Regulation der chemischen Zusammensetzung des Blutes auch die Aufgabe, die Inhaltsstoffe der Galle zu produzieren und zu sekretieren. Die Galle wird in der Leber in den Gallenkanälchen gesammelt. Diese münden in die intrahepatischen, mit Epithel ausgekleideten Gallengänge ein, die sich kurz vor der Leberpforte zum Lebergang (Ductus hepaticus) vereinigen. Außerhalb der Leber wird dieser als extrahepatischer Gallengang bezeichnet. Das Epithel des Gallengangs hat die Aufgabe, Substanzen in die Galle zu sezernieren, aber auch bestimmte Substanzen zu absorbieren (Rückresorption).

2.2 Methoden zur Untersuchung des epithelialen Peptidtransports

Anfang des vorigen Jahrhunderts wurde mit Fütterungsversuchen und Perfusionsexperimenten *in vivo*, *in situ* und *in vitro* begonnen. Die Technik der Inkubation von Bürstensaumvesikeln (BBMV), mit der die energetischen und funktionellen Aspekte des Peptidtransports besser untersucht werden konnten, wurde Ende der 1970er Jahre eingeführt. Seit Anfang der 1990er Jahre sind die heute gebräuchlichsten Techniken vor allem Experimente mit Zell-Linien (insbesondere Caco-2), die Inkubation von BBMV und die Expression der Transporter in heterologen Systemen. Die Einführung der Expressionsklonierung mit *Xenopus laevis* Oocyten ermöglichte die Aufklärung der Primärstruktur der Peptidtransporter.

Die Methoden lassen sich wie folgt gruppieren:

- Perfusionsexperimente *in vivo* und *in situ* (loops, Dual-Infusionstechnik; Übersichten bei Kararli 1989; Chesney *et al.* 1993);
- Gewebe- und Zellinkubationen („everted sacs“, USSING-Technik, Inkubation von Schnitten, isolierten Zellen, Primärkulturen, Karzinomzellen; Übersichten bei Hidalgo *et al.* 1989; Kimmich 1990; Chesney *et al.* 1993; Delie & Rubas 1997);

- Inkubation von Membranvesikeln (apikale oder basolaterale Membran; Übersichten bei Murer *et al.* 1989; Berteloot & Semenza 1990);
- Expression von PEPT1 oder PEPT2 in heterologen Systemen (*Xenopus laevis* Oocyten, Hefe- oder Säugerzellen; Übersichten bei Hediger *et al.* 1987; Fei *et al.* 1994; Döring *et al.* 1997).

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit selbst durchgeführten Experimente wurden überwiegend an den Zell-Linien Caco-2 (Darmepithel, isoliert aus Dickdarmtumor, *Homo sapiens*, Fogh *et al.* 1977), SKPT-0193 Cl.2 (Nierenepithel, proximaler Tubulus, *Rattus norvegicus*, Brandsch *et al.* 1995) und SK-ChA-1 (Gallengangepithel, isoliert aus Gallengangtumor, *Homo sapiens*, Knuth *et al.* 1985) erzielt.

2.3 Historische Aspekte

Vor ca. 140 Jahren gab es erste Hinweise dafür, dass bei der Absorption von Proteinabbauprodukten nicht nur Aminosäuren, sondern auch Dipeptide in die Epithelzellen aufgenommen werden (Übersichten bei Matthews & Laster 1965; Matthews 1975). Diese Hypothese bestand noch Anfang des 20. Jahrhunderts. Neben anderen Autoren war vor allem Emil Abderhalden der Ansicht, dass Proteine im Darmlumen einem nicht vollständigen Abbau zu Aminosäuren unterliegen (Cohnheim 1901; Abderhalden 1905; Starling 1906). Es wurde vermutet, dass ein Teil der Hydrolyse im Epithel der Darmwand stattfinden könnte. In späteren Arbeiten gab es weitere Hinweise auf eine limitierte Hydrolyseaktivität im Darmlumen (z.B. Cajori 1933). Da zunächst nur Aminosäuren im Blut der Pfortader nachgewiesen wurden, hielt sich die klassische Hypothese, dass Proteine im Darmlumen vollständig zu Aminosäuren hydrolysiert werden, vor allem durch die Arbeiten von van Slyke und Meyer bis Ende der 1950er Jahre (z.B. Van Slyke & Meyer 1912).

1959 fanden Newey und Smyth (1959) erstmals auch Gly-Gly auf der serosalen Seite des Darmes. Diese Autoren wiesen 1962 direkt den sättigbaren Transport von Gly-Gly in die Epithelzelle mit anschließender Hydrolyse nach (Newey & Smyth 1962). 1968 wurde von zwei unabhängigen Laboratorien berichtet, dass Aminosäuren schneller absorbiert werden, wenn sie statt in Form freier Aminosäuren als Peptide gegeben werden (Craft *et al.* 1968; Adibi & Phillips 1968; später auch Steinhardt & Adibi 1986). Unterstützt wurden diese Befunde dadurch, dass bei Patienten mit Defekten an Aminosäuretransportsystemen (Hartnup-Krankheit, Tarlow *et al.* 1970; Cystinurie, Hellier *et al.* 1972) eine normale Absorption von Aminosäuren erfolgt, wenn sie in Form von Dipeptiden verabreicht werden.

Der aktive Transport der Dipeptide war zunächst schwer nachzuweisen, da die Dipeptide in der Darmzelle sofort hydrolysiert werden. Die Situation änderte sich mit dem Einsatz von abbaustabilen Dipeptiden wie z.B. Gly-Sar und Carnosin (β -Ala-His). 1972 konnten Addison *et al.* (1972) so erstmals die Anreicherung von Gly-Sar in den Epithelzellen des Darmes nachweisen. 1973 gelang dieser Nachweis auch für Carnosin, wobei der Transport von Carnosin durch Di- und Tripeptide hemmbar war (Addison *et al.* 1973).

Ende der 1960er Jahre gab es erste Hinweise, dass der Peptidtransport nicht nur auf den Dünndarm beschränkt ist, sondern auch in der Niere vorkommt (Übersicht bei Ganapathy & Leibach 1986). Benoit und Watten (1968) wiesen die Reabsorption von hydroxyprolinhaltigen Dipeptiden, die aus dem Abbau von Kollagen stammten, in der Niere nach. 1977 zeigten Adibi *et al.* (1977) anhand von hydrolysestabilen Dipeptiden den aktiven Transport von Dipeptiden gegen einen Konzentrationsgradienten. Eine nähere Charakterisierung erfolgte Anfang der 1980er Jahre vor allem durch Ganapathy *et al.* (1981; 1982). Silbernagel *et al.* (1987) zeigten, dass ein niedrig affiner Transporter mit hoher Kapazität und ein hoch affiner Transporter mit niedriger Kapazität im proximalen Tubulus der Niere exprimiert wird.

Mit der Einführung der Technik der Inkubation von Bürstensaumvesikeln begann Anfang der 1980er Jahre eine neue Ära auf dem Gebiet des Peptidtransports. Durch diesen Versuchsansatz konnten die energetischen und funktionellen Aspekte des Peptidtransports aufgeklärt werden. So führte die Suche nach der treibenden Kraft des Peptidtransports zu einem zu diesem Zeitpunkt für Säuger überraschendem Ergebnis. Im Gegensatz zu dem für andere Transportprozesse in Säugetieren bedeutenden transmembranen Na^+ -Gradienten wurde hier neben dem Membranpotential erstmals ein zelleinwärts gerichteter Protonengradient als treibende Kraft für den Transport von Dipeptiden in intestinale und renale BBMV identifiziert (Ganapathy & Leibach 1985).

Durch Expressionsklonierung in *Xenopus laevis* Oocyten ist es 1994 gelungen, mit der cDNA die genetische Information zunächst für den intestinalen Peptidtransporter (PEPT1; Fei *et al.* 1994) und kurz darauf auch für die renale Isoform (PEPT2; Boll *et al.* 1996) des Kaninchens zu identifizieren und zu isolieren. Nachfolgend wurden die cDNA's der orthologen Transporter von Mensch (Liang *et al.* 1995; Liu *et al.* 1995), Ratte (Saito *et al.* 1995; Saito *et al.* 1996) und Maus (Rubio-Aliaga *et al.* 2000; Fei *et al.* 2000b) kloniert.

2.4 Mechanismus der epithelialen Peptidtranslokation

Nahrungsproteine werden im Darmlumen enzymatisch unter Einwirkung der im Pankreassekret enthaltenen Endo- und Exopeptidasen und der Amino- und Oligopeptidasen der Bürstensaummembran abgebaut (Abschnitt 2.1). Im Lumen des proximalen Tubulus der Niere gelangen Di- und Tripeptide entweder durch deren glomeruläre Filtration aus dem Blut oder sie entstehen lokal durch die Hydrolyse von Polypeptiden (Abschnitt 2.1). Die Aufnahme über die apikale Membran der Darm- und Nierenepithelzellen erfolgt über die tertiär aktiven H^+ /Peptidsymporter. Der zelleinwärts gerichtete Protonengradient wird durch das Zusammenspiel des Na^+/H^+ -Austauschers an der apikalen Membran der Epithelzellen und der basolateral lokalisierten Na^+/K^+ -ATPase generiert (Abbildung 1; Abschnitt 2.1; Ganapathy & Leibach 1985). Durch den Protonengradienten und das Membranpotential kommt es zu einer Stimulierung der Symporter. Das pH-Optimum liegt zwischen 4,5 – 6,5 in Abhängigkeit von der Nettoladung des Substrats. Die Transporter sind sättigbar, multispezifisch und elektrogen. Die Hypothese, dass die extrazellulären Protonen den intestinalen Peptidtransporter nicht nur stimulieren, sondern tatsächlich mit dem Substrat in die Zellen hinein transportiert werden, konnte durch Thwaites *et al.* (1993b) bestätigt werden. Nach Mackenzie *et al.* (1996) verläuft der Transport nach einem geordneten, simultanen Modell, d.h. das Proton bindet vor dem Substrat und es erfolgt ein simultaner Transport von beiden ins Cytosol.

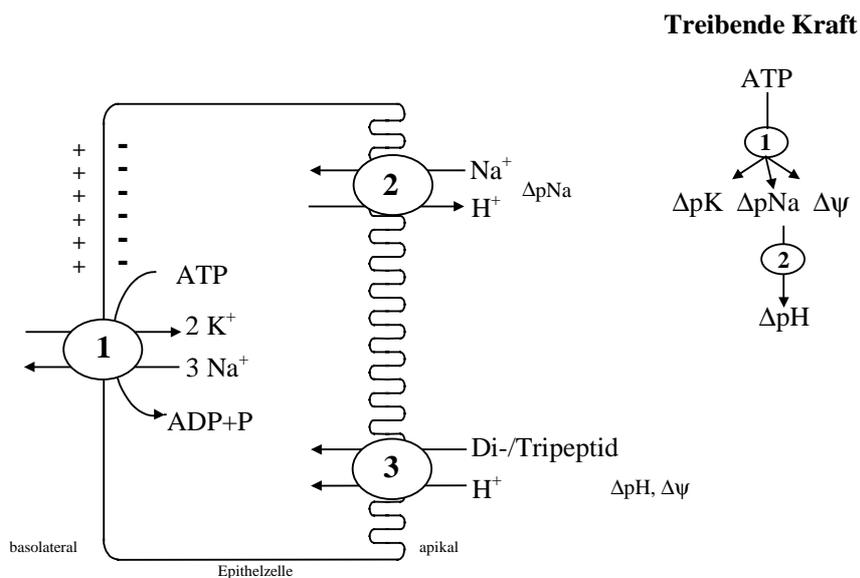


Abbildung 1. Peptidtransport (3) an der epithelialen Bürstensaummembran und dessen Beziehung zu dem Na^+/H^+ -Austauscher (2) und der Na^+/K^+ -ATPase (1). ΔpNa , ΔpH und ΔpK beschreiben die chemischen Transmembrangradienten für Na^+ , H^+ und K^+ ; $\Delta\psi$ stellt das Membranpotential dar. (nach: Ganapathy *et al.* 1994)

Die Stöchiometrie von Proton zu Substrat ist umstritten (Amasheh *et al.* 1997; Steel *et al.* 1997). Nach neuesten Erkenntnissen hängt das Verhältnis bei PEPT1 (1:1 oder 2:1) von der Ladung des Substrats und von der Position der Ladung im Dipeptid ab (Kottra *et al.* 2002). Dies hat einen Einfluss auf die K_i -Werte von geladenen Dipeptiden, da bei verschiedenen pH-Werten verschieden große Anteile von den unterschiedlichen ionischen Spezies vorliegen. Es wird spekuliert, dass nur die zwitterionische Spezies vom Transporter transportiert wird. Für PEPT2 wurden andere Proton/Substrat Verhältnisse bestimmt (Verhältnis H^+ /neutrale Dipeptide: 2:1; H^+ /anionische Dipeptide: 3:1; H^+ /kationische Dipeptide: 1,4:1; Chen *et al.* 1999).

Nach der apikalen Aufnahme der Di- und Tripeptide in die Epithelzellen werden diese in den meisten Fällen durch cytoplasmatische Aminopeptidasen zu Aminosäuren gespalten, die von basolateralen Aminosäuretransportern aus den Zellen ins Blut transportiert werden. Die Existenz eines Dipeptidtransportsystems in der basolateralen Membran ist umstritten. Es könnte sich um einen aktiven Transporter (im Symport mit Protonen) oder nur um erleichterte Diffusion handeln (Dyer *et al.* 1990; Saito & Inui 1993; Thwaites *et al.* 1993a; Terada *et al.* 1999; Terada *et al.* 2000c; Shepherd *et al.* 2002).

2.5 Molekularer Aufbau der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2

Peptidtransportproteine wurden mittlerweile in vielen Spezies u.a. unter den Säugetieren, Pflanzen, Bakterien und Hefen, funktionell und molekularbiologisch nachgewiesen (Übersicht bei Fei *et al.* 1998b). Sie werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Funktion und Struktur der Familie der Protonen-gekoppelten Oligopeptid-Transporter (POT-Familie; Paulsen & Skurray 1994; Fei *et al.* 1998b) bzw. der Peptidtransporterfamilie (PTR-Familie; Steiner *et al.* 1995) zugeordnet. Allen Transportern gemeinsam sind die 12 Transmembrandomänen (TMD), zwei charakteristische „Proteinsignaturen“, die große, hydrophile, extrazelluläre Schleife zwischen den TMD 9 und 10 sowie die intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini (Abbildung 2). Die Identität bzw. Ähnlichkeit ist im Bereich der Transmembrandomänen größer als in den extra- oder intrazellulären Schleifen. Weiterhin befinden sich konservierte Aminosäuren vermehrt in den ersten sechs TMD und die größten Unterschiede sind am N- und C-Terminus der Proteine (Fei *et al.* 1998b). Alle Peptidtransportproteine weisen mögliche N-Glykosylierungsstellen sowie Erkennungsstellen für Proteinkinasen auf, was auf eine mögliche Regulation durch reversible Phosphorylierung hindeutet (Brandsch *et al.* 1994; Daniel 1996).

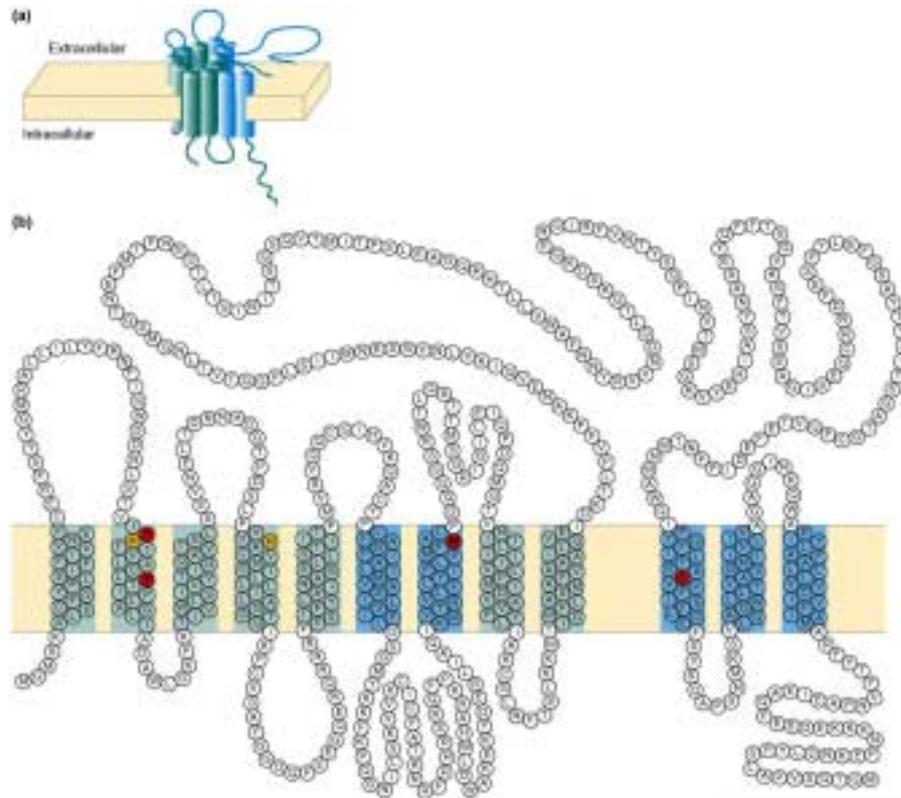


Abbildung 2. Modell der Membran-Topologie von PEPT1. a) Postulierte Anordnung als Pore der 12 Transmembrandomänen, wobei das N-terminale und C-terminale Ende ins Cytosol ragen b) Hellblaue Domänen formen die Substratbindungsregion (Basierend auf Analysen von Chimären hergestellt von PEPT1 und PEPT2). Farbige markierte Aminosäuren sind essentiell für die Funktion. (nach Rubio-Aliaga & Daniel 2002)

Der humane intestinale Peptidtransporter PEPT1, hPEPT1, besteht aus 708 Aminosäuren (~79 kDa), kodiert auf Chromosom 13, während der humane renale Peptidtransporter PEPT2, hPEPT2, aus 729 Aminosäuren (~82 kDa; Chromosom 3) aufgebaut ist (Fei *et al.* 1998b). Bei einem Vergleich beider auf der Ebene der Aminosäuren erhält man eine Homologie von ca. 70 % und eine Identität von ca. 50 %. Die dreidimensionale Struktur konnte bisher nicht aufgeklärt werden, da die Kristallisation des Proteins nicht gelungen ist. Teile der mit Hydrophobizitätsanalysen vorhergesagten Topologie von 12 TMD des hPEPT1 Proteins sind experimentell mittels Epitop-Insertion in unterschiedliche Proteinbereiche bestätigt worden (Covitz *et al.* 1998).

Die Bedeutung der Aminosäure Histidin (Abbildung 2) für die Transportfunktion von Peptidtransportern wurde erstmals 1986 an renalen BBMV und 1989 an intestinalen BBMV mit Hilfe des modifizierenden Agens DEPC gezeigt (Miyamoto *et al.* 1986; Kato *et al.* 1989). Der blockierende Effekt dieser Substanz konnte durch Zugabe von Dipeptiden wieder aufgehoben werden. Diese Ergebnisse wurden später auch in renalen und intestinalen Zell-Linien bestätigt (Brandsch *et al.* 1997). Auch konnte gezeigt werden, dass die Aufhebung der Inhibierung nur mit Substanzen gelang, die eine N-terminale α -Aminogruppe enthielten (Terada *et al.* 1998).

Mehrere Gruppen wiesen mittels ortsgerichteter Mutagenese nach, dass His-57 bei PEPT1 und His-87 bei PEPT2 eine essentielle Rolle bei der Bindung des Protons spielen (Terada *et al.* 1996; Fei *et al.* 1997; Chen *et al.* 2000). Dies wurde unterstützt durch die Ergebnisse einer ortsgerichteten Mutagenese der Tyrosin-Reste an Position 56 und 64 von PEPT1, da diese Reste bei der Stabilisierung der Bindung des Protons behilflich sein könnten (Abbildung 2; Chen *et al.* 2000). Die Rolle von His-121 für PEPT1 (His-142 für PEPT2) in TMD 4 ist umstritten (Terada *et al.* 1996; Fei *et al.* 1997; Chen *et al.* 2000), da Fei *et al.* (1997) bei der Mutagenese von His-121 im Gegensatz zu den anderen Arbeitsgruppen keinen Effekt feststellen konnten. Terada *et al.* (1996) und Chen *et al.* (2000) spekulierten, dass dieses Histidin zur Substraterkennung beitragen könnte.

Neben der Bedeutung von Histidinen für die Transportfunktion konnte durch Computersimulation und ortsgerichtete Mutagenese auch das Tyrosin in Position 167 in der TMD 5 des humanen PEPT1-Proteins als essentiell für die Transportfunktion identifiziert werden (Abbildung 2; Yeung *et al.* 1998). Über dessen Rolle wird spekuliert, dass der Phenolrest der Seitenkette des Tyrosins an der Bindung der α -Aminogruppe beteiligt sein könnte. Dies wurde auch für andere Proteine gezeigt. Mit dem gleichen Versuchsansatz wurde für hPEPT1 auch eine funktionelle Rolle der Aminosäuren Trp-294 (TMD 7) und Glu-595 (TMD 10) postuliert (Bolger *et al.* 1998; Abbildung 2). Alle hier genannten Aminosäuren sind hoch konserviert für viele Spezies.

Ein anderer Ansatz zur Aufklärung der Substraterkennungsstelle ist die Konstruktion von chimären Transportproteinen aus PEPT1 und PEPT2. Zunächst wurde gezeigt, dass die N-terminale Region bis zur TMD 9 (ohne die große extrazelluläre Schleife) für die phänotypischen Eigenschaften der Peptidtransporter verantwortlich ist (Döring *et al.* 1996). In den ersten sechs TMD befinden sich Bereiche, die für die pH-Abhängigkeit zuständig sind und den größten Teil der Substraterkennung ausmachen (Terada *et al.* 2000a), während die TMD 7 - 9 die Substrataffinität definieren (Fei *et al.* 1998c). Die N-terminalen TMD könnten eine Art Pore bilden, bei der die TMD 7 - 9 eine Substratbindungstasche bilden (Rubio-Aliaga & Daniel 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Aminosäureabschnitt 1 - 59 mit den Seitenketten von Dipeptiden interagiert und ein Bereich zwischen den TMD 2 und 3 (Reste 60 - 91) signifikant zur pH-Abhängigkeit des Transports beiträgt (Döring *et al.* 2002).

Saito *et al.* (1997) klonierten und charakterisierten 1997 ein Regulatorprotein für PEPT1 (PEPT1-RF), welches das pH-Optimum im *Xenopus laevis* Oocyten von pH 5,5 zu pH 6,0 verschiebt, aber selbst keine Peptide transportiert. Die Autoren zeigten auch, dass PEPT1-RF in Caco-2 Zellen exprimiert wird und dass diese Zellen ein ähnliches pH-Optimum aufweisen

wie die Oocyten mit PEPT1-RF. PEPT1-RF ist eine Splice-Variante von PEPT1, wobei die Aminosäuren 18 - 195 von PEPT1-RF mit den Aminosäuren 8 - 185 von PEPT1 übereinstimmen, während die Aminosäuren 1 - 17 und 196 - 208 nur bei der Splice-Variante gefunden werden (Urtti *et al.* 2001). Das Regulatorprotein ähnelt also in den ersten sechs TMD PEPT1. Dies könnte die Ergebnisse aus Experimenten mit PEPT1-PEPT2 Chimären bestätigen, in denen gezeigt wurde, dass die pH-Abhängigkeit im N-terminalen Bereich (TMD 1 - 6) des Proteins bestimmt wird und dass die Domänen 7 - 9 zur Substraterkennung nötig sind. Es erklärt ebenfalls, warum PEPT1-RF keine Dipeptide transportieren kann.

Wenn man diese Ergebnisse miteinander vergleicht, fällt auf, dass nicht alle als essentiell identifizierten Aminosäuren auch in den als entscheidend für die Transportfunktion vermuteten Transmembrandomänen lokalisiert sind (Meredith & Boyd 2000). Also kann man davon ausgehen, dass sich die Substratbindungsstelle aus Aminosäureresten zusammensetzt, die über die gesamte Länge des Proteins verteilt sind. Diese müssen dann noch in eine geeignete Anordnung in der dreidimensionalen Struktur des Proteins gebracht werden. Eine umfassende und detaillierte Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehungen wird aber letztendlich nur durch die Kristallisation des Transportproteins und durch eine dreidimensionale Röntgen-Strukturanalyse möglich sein.

2.6 Lokalisation der Peptidtransporter

Verteilung von PEPT1 und PEPT2 in Organen

Zunächst wurden die Peptidtransporter nur funktionell in Dünndarm und Niere nachgewiesen. Erst ab 1994 nach der Klonierung der Peptidtransporter konnte deren Expression auch in anderen Organen vor allem mittels molekularbiologischer Methoden gezeigt werden (Tabelle 1). In der basolateralen Membran von Dünndarm und Niere wurde ein Peptidtransporter bisher nur funktionell nachgewiesen, wobei sich dieser von PEPT1 oder PEPT2 unterscheidet. Bisher liegen in der Literatur verschiedene Ergebnisse vor, um was für ein System es sich dabei handelt (Abschnitt 2.4). In der Plazenta konnte mit Hilfe von Vesikelpräparationen ein Peptidtransporter funktionell nachgewiesen werden, wobei aber vermutet wird, dass es sich hier um erleichterte Diffusion handelt (Ganapathy M. E. *et al.* 1985; Meredith & Laynes 1996).

Tabelle 1. Verteilung der H⁺-abhängigen Peptidtransporter in Organen, Zellen und subzellulären Kompartimenten. Die Lokalisation wurde nachgewiesen mit RT-PCR, Northern Blot, Immunohistochemie und durch den Nachweis der Funktion.

| Transporter | Organ | Lokalisation | Referenz |
|-------------|------------|---|--|
| PEPT1 | Dünndarm | Apikale Membran der Enterocyten | Ogihara <i>et al.</i> 1996 |
| | Niere | - Apikale Membran der epithelialen Zellen des S1-Segments des proximalen Tubulus; - Membran von Lysosomen | - Shen <i>et al.</i> 1999; - Zhou <i>et al.</i> 2000 |
| | Pankreas | Kernmembran von vaskulären, glatten Muskelzellen und Schwannschen Zellen und Lysosomen der askinaren Zellen | Bockman <i>et al.</i> 1997 |
| | Gallengang | Apikale Membran der Cholangiozyten | Anlage 6.5 |
| ? | Leber | Lysosomen von Leberzellen | Thamotharan <i>et al.</i> 1997 |
| PEPT2 | Niere | Apikale Membran der epithelialen Zellen des proximalen Tubulus (S2- und S3-Segment) | Shen <i>et al.</i> 1999 |
| | ZNS | - Membran und Cytoplasma von Gliazellen; - Astrocyten; - Epitheliale Zellen des Choroid Plexus, der ependymalen Zellen und der Astrocyten; - Astroglia | - Groneberg <i>et al.</i> 2001b; - Dieck <i>et al.</i> 1999; - Berger & Hediger 1999; - Novotny <i>et al.</i> 2000; - Dringen <i>et al.</i> 1998 |
| | Lunge | Apikale Membran von bronchialen und trachealen epithelialen Zellen, Membran und Cytoplasma von Typ II-Pneumocyten | Groneberg <i>et al.</i> 2001c |
| | Milchdrüse | Epitheliale Zellen der Drüsen und Gänge | Groneberg <i>et al.</i> 2002 |

Vorkommen in anderen Organismen

In der POT-Familie (Paulsen & Skurray 1994; oder PTR-Familie, Steiner *et al.* 1995) werden Peptidtransporter zusammengefasst, die zwei charakteristische „Proteinsignaturen“ besitzen. Proteine, in denen diese bestimmten Konsensussequenzen identifiziert werden konnten, sind von den Prokaryoten bis zu den Eukaryoten nachgewiesen worden. Das zeigt, dass diese Proteinfamilie während der Evolution hoch konserviert wurde.

Als Beispiele sind zu nennen:

- *Bakterien*: Di- und Tripeptidtransporter (DtpT) in *Lactococcus lactis* (Hagting *et al.* 1994) oder in *Lactobacillus helveticus* (Nakajima *et al.* 1997);
- *Hefen*: Di- und Tripeptidtransporter (PTR2) in *Saccharomyces cerevisiae* (Perry *et al.* 1994);

- *Pflanzen*: z.B. Peptidtransporter (ATPTR2) in *Arabidopsis thaliana* (Steiner *et al.* 1994);
- *Wirbellose*: z.B. Dipeptidtransporter (OPT1) in *Drosophila melanogaster* (Roman *et al.* 1998); Peptidtransporter (OPT1, OPT2, OPT3) in *Caenorhabditis elegans* (Fei *et al.* 1998a; Fei *et al.* 2000a);
- *Wirbeltiere*: Di- und Tripeptidtransporter: z.B. Knochenfisch (Thamotharan *et al.* 1996; Verri *et al.* 2000; Maffia *et al.* 2003) oder Säuger (u.a. Fei *et al.* 1994; Boll *et al.* 1996); Peptid-/Histidin-Transporter (PHT): Säuger (Yamashita *et al.* 1997; Sakata *et al.* 2001).

2.7 Substratspezifität

Die Substratspezifität der Peptidtransporter (Abschnitt 3.1) in Darm und Niere ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Schon Mitte der 1970er Jahre führten Addison *et al.* (1975) erste umfangreiche Studien zur Substratspezifität des intestinalen Peptidtransporters durch. Damals wie heute wird die Interaktion der Transporter mit ihren Substraten hauptsächlich über Kompetitionassays bestimmt. Die Experimente wurden anfangs als Perfusionsstudien durchgeführt, später dann primär mit BBMV oder Zell-Linien. Daraus resultiert das Problem, dass die dabei erhaltenen Inhibierungskonstanten mit unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden und somit nur schwer vergleichbar sind. Die K_i -Werte einer Substanz können bis um den Faktor 100 variieren, z.B. sind für Cyclacillin K_i -Werte zwischen 0,2 – 20 mM publiziert worden (Brandsch *et al.* 2003). Daher ist es schwierig, ein einheitliches Bild der Substratspezifität der Peptidtransporter abzuleiten.

Die intestinalen und renalen Peptidtransporter (PEPT1 bzw. PEPT2) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Affinität zu den Substraten, während beide Transporter bezüglich ihrer Spezifität sehr ähnlich aber nicht vollkommen gleich sind (Ganapathy *et al.* 1995). In kinetischen Untersuchungen mit Di- und Tripeptiden wurden für PEPT2 für die meisten Verbindungen 10 bis 20-fach höhere apparente Affinitäten (K_t bzw. K_i -Werte) ermittelt als für PEPT1 (Leibach & Ganapathy 1996). Die beiden Peptidtransporter zählen zu den multispezifischen Transportern, da sie ein sehr breites Substratspektrum aufweisen. Sie transportieren Di- und Tripeptide, aber keine Aminosäuren oder Tetrapeptide. Daher umfasst allein die Zahl ihrer physiologischen Substrate ausgehend von den 20 proteinogenen Aminosäuren mehr als 8000 Verbindungen. Die Transporter akzeptieren also Substrate von sehr unterschiedlichen Größen (Brandsch *et al.* 2003). Als essentielle Strukturelemente wurden bis Mitte der 1990er Jahre die Peptidbindung, ein freier N-Terminus, ein freier C-Terminus und die natürliche L-Konfiguration der Aminosäuren angesehen. Diese Ansicht musste nach neueren Erkennt-

nissen revidiert werden (z.B. Börner *et al.* 1998; Döring *et al.* 1998b). Auch andere strukturelle Parameter haben einen Einfluss auf die Substraterkennung wie Molekülgröße, Ladung, Polarität und Hydrophobizität (Übersichten bei: Matthews 1975; Walter *et al.* 1996; Leibach & Ganapathy 1996; Adibi 1997; Daniel & Herget 1997; Yang *et al.* 1999; Inui & Terada 1999; Meredith & Boyd 2000; Brodin *et al.* 2002; Rubio-Aliaga & Daniel 2002, Brandsch *et al.* 2003).

Tabelle 2. Übersicht über apparente Affinitätskonstanten von hPEPT1-Substraten und -Inhibitoren in Caco-2 Zellen.

| Kategorie K_i oder K_t | Substrat/Inhibitor | K_i oder K_t (mM) | Referenz |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| hohe Affinität < 0,5 mM | Lys[Z(NO ₂)]-Val | 0,002 ± 0,001 | Anlage 6.4 |
| | Ala-Ala | 0,08 ± 0,01 | Anlage 6.1 |
| | Ala-4-nitroanilid | 0,08 ± 0,01 | Börner <i>et al.</i> 1998 |
| | Fosinopril | 0,11 ± 0,01 | Moore <i>et al.</i> 2000b |
| | Ala-ψ[CS-N]-Pro | 0,30 ± 0,02 | Brandsch <i>et al.</i> 1998 |
| | Bestatin | 0,34* | Saito & Inui 1993 |
| | Valacyclovir | 0,49 ± 0,04 | Ganapathy, M. E. <i>et al.</i> 1998 |
| | Cyclacillin | 0,50 ± 0,05 | Bretschneider <i>et al.</i> 1999 |
| mittlere Affinität 0,5 – 5 mM | Loracarbef | 0,70 ± 0,14 | Wenzel <i>et al.</i> 1995 |
| | Quinapril | 0,94 ± 0,23 | Moore <i>et al.</i> 2000b |
| | Gly-Sar | 1,1 ± 0,1 | Brandsch <i>et al.</i> 1994 |
| | Asp-Asp | 1,2 ± 0,2 | Moore <i>et al.</i> 2000a |
| | δ-Aminolävulinsäure | 1,5 ± 0,1 | Irie <i>et al.</i> 2001 |
| | Pro-Arg | 2,5 ± 0,1 | Anlage 6.1 |
| | 8-Aminooctansäure | 3,1 ± 0,2 | Irie <i>et al.</i> 2001 |
| | Lys-Lys | 3,4 ± 0,7 | Eddy <i>et al.</i> 1995 |
| D-Ala-Pro | 5,0 ± 0,6 | Hartrodt <i>et al.</i> 2000 | |
| niedrige Affinität 5 – 15 mM | Ile-thiazolidid | 6,3 ± 1,6 | Anlage 6.1 |
| | Cephradin | 9,8 ± 1,2 | Bretschneider <i>et al.</i> 1999 |
| | Enalapril | 12 ± 1 | Knütter 1998 |
| | Pro-Ser | 14 ± 2 | Anlage 6.1 |
| | 4-Aminophenyllessigsäure | 14 ± 1 | Börner <i>et al.</i> 1998 |
| | Ala-D-Pro | 15 ± 2 | Hartrodt <i>et al.</i> 2000 |

*kein Fehler angegeben

Ein wichtiger Aspekt bei der Betrachtung der Substratspezifität von PEPT1 ist die Einordnung der Affinitäten der Substrate. Die meisten Dipeptide, d.h. die natürlichen Substrate des Transporters, haben K_i -Werte unter 0,5 mM. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass Cephalosporine und Penicilline mit einem K_i -Wert > 14 mM nicht oral verfügbar sind (Bretschneider *et al.* 1999).

Daher erfolgt eine Einteilung der K_i -Werte wie folgt:

- $< 0,5$ mM: hohe Affinität;
- $0,5 - 5$ mM: mittlere Affinität;
- $5 - 15$ mM: niedrige Affinität;
- > 15 mM: keine Affinität.

In Tabelle 2 sind - geordnet nach ihrer Affinität - verschiedene Substanzgruppen, die als Substrate oder Inhibitoren von PEPT1 in Caco-2 Zellen erkannt werden, zusammengestellt.

Diese breite Substratspezifität der Peptidtransporter ist auch unter pharmakologisch-klinischen Aspekten sehr interessant. Die Transporter erkennen neben den physiologischen Substraten auch verschiedene pharmakologisch aktive Peptidomimetika aufgrund deren peptidähnlicher Grundstruktur. Dazu gehören neben den β -Lactam-Antibiotika (Aminocephalosporine und Aminopenicilline) auch Peptidaseinhibitoren (z.B. Bestatin) und ACE-Inhibitoren (Inui *et al.* 1992; Daniel & Adibi 1993; Dantzig 1997; Bretschneider *et al.* 1999; Moore *et al.* 2000b). Dadurch erhöht sich die Zahl möglicher Substrate unter Einbeziehung von Aminosäure- und Peptidderivaten, β -Lactamantibiotika und Peptidomimetika selbst bei konservativer Schätzung auf ca. 50000. Die orale Verfügbarkeit vieler Pharmaka kann so mit der Aktivität der Peptidtransporter erklärt werden. Dieser Umstand wird auch beim Design von Prodrugs bereits berücksichtigt. Als Beispiele sind zu nennen: das Dipeptidomimetikum L-Dopa-L-Phe (Tamai *et al.* 1998), ein Therapeutikum für die Parkinson-Krankheit, und das Aminosäure-Derivat Valacyclovir, die Prodrugform des antiviral wirkenden Acyclovir (Lee *et al.* 1996; Ganapathy, M.E. *et al.* 1998 u.a.).

Aufgrund der hohen pharmazeutischen Relevanz der Peptidtransportsysteme wurden mittels Computer gestützter Modeling-Studien (Pharmakophorsuche) die strukturellen Anforderungen der Substrat-Transporter-Interaktion untersucht (Li & Hidalgo 1996; Swaan *et al.* 1998). Die Aussagekraft dieser Studien ist aber dadurch begrenzt, dass zum einem nur eine geringe Anzahl von Verbindungen (β -Lactam-Antibiotika und/oder ACE-Inhibitoren) verwendet wurden und zum anderen die natürlichen Substrate der Transporter nicht mit einbezogen wurden. Bei dem kürzlich publizierten „PEPT1-Template“ von Bailey *et al.* (2000) ist anzumerken, dass die K_i -Werte, die in diese theoretischen Untersuchungen eingegangen sind, mit unterschiedlichen Methoden bestimmt worden sind und auch Werte von PEPT2 enthalten.

3 *Ergebnisse und Diskussion*

3.1 **Substratspezifität von PEPT1 (u.a. Anlage 6.1: Brandsch *et al.* 1999)**

Der Peptidtransporter PEPT1 besitzt eine breite Substratspezifität (Abschnitt 2.7), wodurch das Transportprotein in der Lage ist, neben Di- und Tripeptiden auch therapeutisch relevante Peptidomimetika, u.a. β -Lactamantibiotika, zu transportieren. Die Interaktion der Transporter mit ihren Substraten wird hauptsächlich über Wettbewerbsassays bestimmt. Zu berücksichtigen ist, dass auf diese Weise eine Aussage über die Affinität der Substanz zum Transporter getroffen werden kann, jedoch nicht über ihren tatsächlichen Transport. Der Transport der Substanzen wird entweder direkt über analytische Methoden (z.B. radioaktive Markierung oder HPLC) oder mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen an *Xenopus laevis* Oocyten (PEPT1) nachgewiesen.

Wie bereits oben erwähnt (Abschnitt 2.7) mussten Ende der 1990er Jahre einige Ansichten hinsichtlich der Substratspezifität von PEPT1 revidiert werden. Daher sollten die Auswirkungen von Strukturmodifikationen in bestimmten Molekülbereichen von Dipeptiden auf deren Affinität untersucht werden. Die K_i -Werte der resultierenden Verbindungen wurden an dem intestinalen Zellkulturmodell Caco-2 bestimmt. Es folgt ein Vergleich und eine Diskussion der eigenen Daten (150 Substanzen) und der Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe (200 Substanzen) mit den Daten anderer Arbeitsgruppen aus der Literatur.

N-Terminus

Bei einer Blockierung des N-Terminus' eines Dipeptids mit den Schutzgruppen Ac, Boc und Z erhöhen sich die K_i -Werte im Vergleich zum unsubstituierten Dipeptid, wobei die Stärke der Abnahme der Affinität von der Struktur der Schutzgruppe abhängt (Tabelle 3; Knütter 1998; Hartrodt *et al.* 2000; Börner 2002). Je hydrophober die Schutzgruppe desto geringer ist der Effekt der Blockierung auf die Affinität. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der Literatur beschrieben (Addison *et al.* 1975; Meredith *et al.* 2000; Terada *et al.* 2000b). Durch die Blockierung des N-Terminus' wird die zwitterionische Struktur des Dipeptids aufgehoben. Der Stickstoff der N-terminalen Aminogruppe ist dadurch sogar partiell negativ geladen (Sabine Gebauer, persönliche Mitteilung). Dies könnte ionische Wechselwirkungen (z.B. Salzbrücken) der Aminogruppe mit dem Transportprotein erschweren oder sogar völlig verhindern, wodurch möglicherweise eine wichtige Bindungsstelle verloren geht. Es wird spekuliert,

dass diese Aminogruppe an das His-121 des PEPT1-Proteins bindet (Terada *et al.* 1998; Chen *et al.* 2000). Ferner wird bei einer Alkylierung des N-Terminus' (Sar-Pro, Pro-Xaa) ein negativer Einfluss auf die Affinität beobachtet (Tabelle 3; **Anlage 6.1**).

Tabelle 3. K_i -Werte am N-Terminus modifizierter Peptidderivate gemessen an Caco-2 Zellen.

| Substanz | K_i (mM) | Substanz | K_i (mM) |
|--------------------------|------------|-------------------------|------------|
| Ac-Ala-Ala ¹ | > 30 | Gly-Gly | 1,0 ± 0,1 |
| Boc-Ala-Ala ¹ | > 30 | Ac-Gly | >30 |
| Z-Ala-Ala ¹ | 5,6 ± 0,3 | Bestatin ³ | 0,34 |
| Sar-Pro ² | 2,5 ± 0,1 | Cefamandol ⁴ | 8,1 ± 0,8 |
| Pro-Ala ² | 9,5 ± 0,4 | Captopril ⁵ | > 20 |

¹(Börner 2002); ²**Anlage 6.1**; ³(Saito & Inui 1993); ⁴(Bretschneider *et al.* 1999); ⁵(Knütter 1998)

Die Substitution der Aminogruppe des N-Terminus' durch ein Proton führt zum totalen Verlust der Affinität der resultierenden Verbindung zu PEPT1 (Gly-Gly zu Ac-Gly, Tabelle 3). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Meredith *et al.* (2000). Hier weist Ac-Phe eine Affinität von 1,8 mM an mit PEPT1 injizierten Oocyten auf. Demgegenüber steht ein K_i -Wert über 10 mM (Jana Neumann, persönliche Mitteilung). Auch bei der Untersuchung von verschiedenen Cephalosporinen und Penicillinen ohne N-terminale Aminogruppe wie z.B. Cephalothin oder Cephapirin wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Raeissi *et al.* 1999; Bretschneider *et al.* 1999). Dagegen haben Snyder *et al.* (1997) bei der Untersuchung von 47 Analoga von Cephalosporinen an Caco-2 keinen Unterschied zwischen Analoga mit und ohne N-terminaler Aminogruppe gefunden.

Vom Transporter wird anstelle einer α -ständigen Aminogruppe auch eine α -Hydroxylgruppe am N-Terminus erkannt, wie z.B. bei Bestatin (Saito & Inui 1993) oder Cefamandol (Bretschneider *et al.* 1999), wobei es zu einem geringen Abfall der Affinität kommt (Tabelle 3; Saito & Inui 1993). Die Substitution der α -Aminogruppe (-NH₂) durch eine β -ständige Mercaptogruppe (-CH₂-SH) wie bei Captopril führt zu einem Affinitätsverlust (Tabelle 3; Terada *et al.* 1997; Knütter 1998; Moore *et al.* 2000b), der u.a. durch die β -Stellung der funktionellen Gruppe bedingt ist. Analoge Ergebnisse wurden auch für β -Ala-Ala erzielt (Abschnitt Verlängerung des Peptidrückgrats, S. 22). Im Gegensatz dazu konnten mehrere Arbeitsgruppen höhere Affinitäten von Captopril zu PEPT1 nachweisen (Hu & Amidon 1988; Thwaites *et al.*

1995; Temple & Boyd 1998a). Beispielsweise bestimmten Temple und Boyd (1998a) für Captopril mit 8,7 mM einen K_i -Wert im niedrigen Affinitätsbereich.

C-Terminus

Bei einer strukturellen Modifizierung des C-Terminus' eines Dipeptids wurden ähnliche Effekte wie beim N-Terminus beobachtet. Die Blockierung des C-Terminus' (Dipeptid-Alkylester oder Dipeptid-Amide) führt zur Abnahme der Affinität gegenüber freien Dipeptiden (Tabelle 4; Hartrodt *et al.* 1998; Börner 2002). Dies bestätigen Ergebnisse aus der Literatur (Addison *et al.* 1975; Hidalgo *et al.* 1995; Meredith *et al.* 2000).

Tabelle 4. K_i -Werte am C-Terminus modifizierter Peptidderivate gemessen an Caco-2 Zellen.

| Substanz | K_i (mM) | Substanz | K_i (mM) |
|--------------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| Ala-Ala ² | 0,08 ± 0,01 | Ala-Pro ² | 0,15 ± 0,02 |
| Ala-Ala-NH ₂ ¹ | 2,7 ± 0,4 | Ala-pyrrolidid ² | >30 |
| Ala-Ala-OBu ¹ | 3,1 ± 0,3 | Ala-piperidid ² | 13 ± 2 |
| Gly-Gly | 1,0 ± 0,1 | Ala-pipecolinsäure ² | 0,06 ± 0,01 |
| Ala-Ethylamid | > 30 | Ala-thiazolidid ² | 11 ± 2 |
| | | Ala-4-nitroanilid ³ | 0,08 ± 0,01 |

¹(Börner 2002); ²Anlage 6.1; ³(Börner *et al.* 1998)

Bei Ersatz der COOH-Gruppe durch eine CH₃-Gruppe (Gly-Gly zu Ala-Ethylamid) oder ein Proton (Ala-Pro zu Ala-pyrrolidid) geht die Affinität vollständig verloren (Tabelle 4; **Anlage 6.1**). Dieser Verlust kann einerseits durch Erhöhung der Hydrophobizität bedingt wieder aufgehoben werden (Ala-piperidid und Ile-piperidid), wobei die Affinität von Ala-piperidid jedoch 370-fach niedriger als die von Ala-pipecolinsäure ist (Tabelle 4; **Anlage 6.1**). Andererseits bewirkt die Einführung eines Schwefelatoms in den Pyrrolidinring ebenfalls eine Erhöhung der Affinität (Ala-thiazolidid und Ile-thiazolidid; Tabelle 4; **Anlage 6.1**). Auch hier scheint es wieder möglich zu sein, dass durch den Verlust der Carboxylgruppe eine Bindungsstelle am Substrat fehlt und eine Erhöhung der Hydrophobizität die Affinität verbessern kann (Abschnitt N-Terminus). Wahrscheinlich geht die Carboxylgruppe des C-Terminus' ähnlich wie die Aminogruppe des N-Terminus' ionische Wechselwirkungen zum Transportprotein ein. Wenn die C-terminale Aminosäure eines Dipeptids z.B. durch Arylamidreste

(Ala-4-nitroanilid) ersetzt worden ist, werden die resultierenden Aminosäurederivate teilweise mit Affinitäten von PEPT1 akzeptiert, die mit denen von Dipeptiden vergleichbar sind (Tabelle 4; Börner *et al.* 1998). Daneben werden teilweise auch Aminosäureester vom Transporter erkannt, wobei zusätzlich die Hydrophobizität der N-terminalen Aminosäure einen Einfluss hat. So werden z.B. Valinester besser gebunden als Alaninester (Börner *et al.* 1998; Sawada *et al.* 1999).

Analog dem N-Terminus ist es auch am C-Terminus möglich, die funktionelle Gruppe (Carboxylfunktion) zu ersetzen. So zeigt Ala-fosfalin ein K_i -Wert von $0,26 \pm 0,03$ mM (Jana Neumann, persönliche Mitteilung). Im Ala-fosfalin ist die Carboxylgruppe durch eine Phosphonogruppe ausgetauscht.

Peptidbindung

Die Carbonylfunktion der Peptidbindung kann durch eine Thioxofunktion ersetzt werden (Brandsch *et al.* 1998). Ihr Fehlen führt jedoch zu einer drastischen Erhöhung des K_i -Wertes, wie am Beispiel von β -Aminoethylglycin ($K_i > 30$ mM; Tabelle 5) ersichtlich ist. Derselbe Effekt kann beobachtet werden, wenn die Peptidbindung vollständig fehlt, wie beispielsweise bei der 5-Aminopentansäure und der 6-Aminohexansäure (Tabelle 5). Dagegen zeigt 8-Aminooctansäure interessanterweise einen K_i -Wert von 7,9 mM (Tabelle 5). Vermutlich spielen Flexibilität und/oder Hydrophobizität der Verbindungen hier eine Rolle. Irie *et al.* (2001) haben für 8-Aminooctansäure an Caco-2 Zellen (hPEPT1) eine ähnliche Affinität bestimmt ($K_i = 3,1$ mM). Im Gegensatz dazu haben Döring *et al.* (1998b) für verschiedene ω -Aminofettsäuren am heterologen System *Pichia pastoris* (rbPEPT1) K_i -Werte unter 1 mM gemessen. Für PEPT2 dagegen konnten Theis *et al.* (2002a) auch an *Pichia pastoris* (rbPEPT2) keine Affinität der ω -Aminofettsäuren beobachten. Terada *et al.* (2000b) stellten an rPEPT1 oder rPEPT2 exprimierenden LLC-PK₁ Zellen ebenfalls fest, dass die 8-Aminooctansäure eine höhere Affinität zu PEPT1 im Vergleich zu PEPT2 zeigt. Bezüglich der Spezifität zur Peptidbindung scheinen PEPT1 und PEPT2 somit unterschiedlich zu reagieren. Interessanterweise zeigt 4-Aminophenylelessigsäure eine bedingte Affinität zu PEPT1 (Tabelle 5; Temple *et al.* 1998b). Eine Ursache hierfür könnte eine erhöhte Hydrophobizität durch den Aromaten sein.

Die Peptidbindung kann weiterhin durch eine Ketomethylengruppierung wie bei der δ -Aminolävulinsäure ($K_i = 0,79$ mM; Tabelle 5) ersetzt werden. Die NH-Gruppe der Peptidbindung scheint damit nicht essentiell für die Bindung eines Substrates zu sein, wie Ergebnis-

se in der Literatur für PEPT1 und PEPT2 bestätigen (Daniel & Adibi 1994; Döring *et al.* 1998a). Auch zeigt sich, dass eine Methylgruppe am Amidstickstoffatom der Peptidbindung (Ala-Sar) besser toleriert wird als am benachbarten C-terminalen C_α-Atom (Ala-Aib).

Tabelle 5. K_i-Werte von backbonemodifizierten Peptidderivaten gemessen an Caco-2 Zellen.

| Substanz | K _i (mM) | Substanz | K _i (mM) |
|--------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|
| β-Aminoethylglycin | > 30 | 4-Aminophenyllessigsäure ² | 14,1 ± 1,0 |
| 5-Aminopentansäure | 25 ± 1 | δ-Aminolävulinsäure | 0,79 ± 0,02 |
| 6-Aminohexansäure | >30 | Ala-Sar ³ | 0,15 ± 0,01 |
| 8-Aminooktansäure ¹ | 7,9 ± 0,8 | Ala-Aib | 1,15 ± 0,11 |

¹(Börner 2002); ²(Börner *et al.* 1998); ³Anlage 6.1

Der Ersatz der Peptidbindung durch eine Esterbindung ist bedingt möglich, wie die Aminosäurederivate Valacyclovir (Ganapathy, M.E. *et al.* 1998) und Valganciclovir (Sugawara *et al.* 2000) zeigen. Die Hydrophobizität der N-terminalen Aminosäure scheint einen großen Einfluss zu haben, da Aminosäureester mit Valin als N-terminale Aminosäure akzeptiert werden, während Esterderivate mit anderen Aminosäuren wie z.B. Alanin oder Serin keine Affinität zu PEPT1 aufweisen (Börner *et al.* 1998; Sawada *et al.* 1999).

1998 wiesen Brandsch *et al.* (1998) an Thioxodipeptiden nach, dass PEPT1 nur Dipeptide in der *trans*-Konformation erkennt. Die Ursache dafür ist in der veränderten räumlichen Anordnung des N- und C-Terminus' in der *cis*-Konformation und dem davon abhängigen Abstand der Termini zueinander zu suchen. Die Peptidbindung besitzt partiellen Doppelbindungscharakter, so dass Peptide und Proteine eine *cis/trans*-Isomerie aufweisen. Bei der Imidbindung der Xaa-Pro Peptide ist die Energiedifferenz zwischen den *cis*- und *trans*-Konformeren niedriger als bei der Amidbindung, daher findet man bei diesen Dipeptiden einen signifikant höheren *cis*-Anteil. Die Konformere liegen in einem Gleichgewicht vor, das abhängig ist von der Struktur des Dipeptids und von den experimentellen Versuchsbedingungen. Bei den Xaa-Pro Dipeptiden sind *trans*-Gehalte von 24 – 70 % (im Gleichgewicht, bei physiologischem pH) messbar (Anlage 6.1). Es konnte eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) zwischen den K_i-Werten der Xaa-Pro Dipeptide und deren *trans*-Gehalten gezeigt werden, wobei die Substrate mit einem hohen *trans*-Gehalt eine hohe Affinität aufwiesen. Erfolgt eine Korrektur der K_i-Werte bezogen auf den *trans*-Gehalt, um den wahren K_i-Wert zu ermitteln, erhält man Affinitäten im Bereich von 0,1 bis 0,15 mM für die Xaa-Pro Dipeptide (außer für Pro-Pro und die kationischen Dipeptide Lys-Pro und Arg-Pro). Die Größe und die Hydrophobizität der

N-terminalen Aminosäure scheinen hier keinen großen Einfluss zu haben. Stattdessen fällt vor allem die Alkylierung des N-Terminus' (Pro-Pro, Abschnitt Backbone- und Seitenkettencyclisierung) und der Einbau einer kationischen Aminosäure ins Gewicht. Dies unterstreicht die Bedeutung der Ladung des Peptids bezüglich der Substraterkennung (Abschnitt Einfluss der Aminosäure-Seitenketten). Vergleicht man die korrigierten Affinitäten der Xaa-Pro Dipeptide mit den Affinitäten der entsprechenden Xaa-Ala Dipeptide (nur in *trans*-Konformation), findet man weitgehend sowohl relativ als auch absolut eine Übereinstimmung in den K_i -Werten (**Anlage 6.1**). Prolin selbst scheint also die Affinität nicht zu erniedrigen.

Verlängerung des Peptidrückgrats

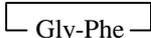
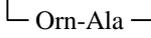
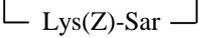
Eine Veränderung des Abstands der Peptidbindung entweder zum N-Terminus oder zum C-Terminus ist ohne nennenswerten Affinitätsverlust nur vom C-terminalen Ende her möglich. So zeigt Alanyl-Aminododekansäure (Ala-Adk) einen K_i -Wert von $0,54 \pm 0,02$ (Börner 2002). Veränderungen des Abstands der Aminogruppe des N-Terminus' zur Peptidbindung sind immer mit einer Erniedrigung der Affinität verbunden. Während β -Ala-Ala, Apt-Ala und Ahx-Ala noch K_i -Werte im Bereich von 4,8 - 7,9 mM aufweisen, werden Carbamoyl- β -Ala, Abu-Ala, Ahp-Ala und Aoc-Ala von PEPT1 nicht erkannt. Das zeigt, dass am N-Terminus die Aminogruppe nicht nur frei, sondern auch in der α -Position lokalisiert sein muss, während der Abstand der Carboxylgruppe zur Peptidbindung variabel sein kann. Warum wird aber Ala-Adk erkannt und Gly-Gly-Gly-Gly nicht? Die Ursache dafür könnte in der geringeren Flexibilität von Tetra-Gly infolge der Peptidbindungen liegen. Die mögliche C-terminale Verlängerung könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass bei Tripeptiden die zweite Peptidbindung nicht essentiell ist. Jedoch sollte sich keine weitere funktionelle Gruppe, wie z.B. eine Aminogruppe, am C_α -Atom der C-terminalen Aminosäure befinden, wie dies beim Isopeptid Ala- ϵ -Lys ($K_i > 10$ mM, entspricht Ala-Ahx, $K_i = 0,27 \pm 0,02$) der Fall ist.

Backbone- und Seitenkettencyclisierung

Cyclisierungen im Bereich des Peptidrückgrats oder mit Seitenketten der Aminosäuren beeinflussen die Affinität der Derivate zum Transportprotein PEPT1 unterschiedlich. Bei Prolin-Derivaten liegt eine „natürliche Cyclisierung“ innerhalb der Aminosäurestruktur vor, d.h. hier ist die Seitenkette mit der α -Aminogruppe verbunden. Der Einbau von Prolin am C-Terminus des Dipeptids bewirkt einen geringen Abfall der Affinität zu PEPT1, der durch die bereits

oben diskutierte *cis/trans*-Isomerie bedingt ist (**Anlage 6.1**). Auch hat die NH-Gruppe der Peptidbindung, wie bereits erwähnt, keinen großen Einfluss auf die Substraterkennung. Liegt dagegen Prolin in N-terminaler Stellung vor, erhöhen sich die K_i -Werte (**Anlage 6.1**; Addison *et al.* 1975; Thwaites *et al.* 1994), da hier durch die Prolinstruktur eine Alkylierung des N-Terminus vorliegt (Abschnitt N-Terminus). Die K_i -Werte der Pro-Xaa Derivate erstrecken sich über einen großen Bereich (0,5 bis > 20 mM). Dabei ist die Affinität von der Aminosäure am C-Terminus abhängig. Es zeigt sich, dass eine Steigerung der Hydrophobizität (Leu, Tyr, Phe) und/oder der Rigidität (Pro) die Affinität erhöhen kann.

Tabelle 6. K_i -Werte von cyclisierten Peptidderivaten gemessen an Caco-2 Zellen.

| Substanz | K_i (mM) | Substanz | K_i (mM) |
|---|---------------|---|------------|
|  | >30 |  | >10 |
|  * | >30 |  | >30 |
|  * | $5,4 \pm 0,4$ |  | 21 ± 3 |
|  | $2,3 \pm 0,6$ |  * | 22 ± 1 |
|  * | >30 | | |

*(Börner 2002)

Die Dipeptidcyclisierung zwischen N- und C-Terminus (Diketopiperazinbildung) führt zu einem Verlust der Affinität, außer wenn sich Lysin oder Ornithin in N-terminaler Stellung befinden (Tabelle 6; Knütter 1998; Börner 2002). Für diese zwei Substanzen wurden Affinitäten im mittleren Affinitätsbereich gemessen. Durch die Cyclisierung entsteht ein Diketopiperazin, dessen Peptidbindung in der *cis*-Konformation vorliegt, die, wie bereits erwähnt, vom Transporter nicht akzeptiert wird. Ferner gehen durch die Cyclisierung zwei wichtige Bindungsstellen verloren (N- und C-Terminus). Beim Lys-Ala- oder Orn-Ala-Diketopiperazin kann die Aminogruppe der Seitenkette anscheinend als N-Terminus fungieren. Ähnliche Resultate wurden durch andere Arbeitsgruppen an PEPT1 gezeigt (Tamura *et al.* 1996b; Mizuma *et al.* 1997). Weitere cyclische Substrate des Peptidtransporters sind β -Lactam-Antibiotika, die vom Transportprotein in der Regel gut toleriert werden (Bretschneider *et al.* 1999).

Einfluss der Aminosäure-Seitenketten

In Tabelle 7 sind K_i -Werte verschiedener Gruppen von Dipeptiden (Ala-Xaa; Xaa-Ala; Gly-Xaa; Xaa-Gly und Xaa-Xaa) zusammengefasst. Bei einer näheren Betrachtung der Affinitäten lassen sich diese in zwei Bereiche einteilen (K_i -Werte von 0,07 bis 0,16 mM und von 0,2 bis 9,5 mM). Auffällig ist, dass im letztgenannten Bereich ausschließlich Dipeptide zu finden sind, die a) Glycin, b) Prolin in N-terminaler Stellung und c) geladene Aminosäuren enthalten. Das Fehlen der Seitenkette bei Glycin könnte die Ursache für die höheren K_i -Werte von Dipeptiden mit Glycin sein. Prolin in N-terminaler Stellung bedingt eine Alkylierung des N-Terminus', die, wie schon oben diskutiert, zu einer Erniedrigung der Affinität führt.

Tabelle 7. K_i -Werte verschiedener Dipeptide gemessen an Caco-2 Zellen.

| Dipeptid | K_i (mM) | Dipeptid | K_i (mM) | Dipeptid | K_i (mM) |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Ala-Gly | 0,14 ± 0,01 | Gly-Ala² | 0,38 ± 0,02 | Gly-Gly | 1,0 ± 0,1 |
| Ala-Ala² | 0,08 ± 0,01 | Ala-Ala² | 0,08 ± 0,01 | Gly-Sar¹ | 0,51 ± 0,02 |
| Ala-α-Abu | 0,07 ± 0,01 | | | Gly-Asp | 0,35 ± 0,03 |
| Ala-Nle | 0,09 ± 0,01 | Nle-Ala² | 0,14 ± 0,01 | Gly-Gln | 0,26 ± 0,01 |
| Ala-Pro¹ | 0,10 ± 0,01 | Pro-Ala² | 9,5 ± 0,4 | Gly-His | 1,0 ± 0,1 |
| Ala-Tyr | 0,15 ± 0,01 | Tyr-Ala² | 0,09 ± 0,01 | Gly-Lys | 2,5 ± 0,1 |
| Ala-Ser | 0,14 ± 0,01 | Ser-Ala² | 0,14 ± 0,01 | Lys-Gly | 0,62 ± 0,07 |
| Ala-Orn | 0,97 ± 0,15 | Orn-Ala | 0,48 ± 0,06 | Asp-Gly | 0,56 ± 0,03 |
| Ala-Lys | 0,21 ± 0,02 | Lys-Ala² | 0,34 ± 0,02 | Glu-Lys | 0,51 ± 0,05 |
| Ala-His | 0,33 ± 0,04 | His-Ala | 0,48 ± 0,05 | Lys-Glu | 1,3 ± 0,1 |
| Ala-Asp | 0,26 ± 0,02 | Asp-Ala | 0,32 ± 0,02 | Lys-Asp | 0,33 ± 0,04 |
| Ala-Glu | 0,32 ± 0,01 | Glu-Ala² | 0,25 ± 0,02 | Asp-Lys | 0,86 ± 0,11 |
| | | Leu-Ala² | 0,12 ± 0,01 | Lys-Lys | 6,7 ± 0,4 |
| | | Trp-Ala² | 0,16 ± 0,02 | Asp-Asp | 0,41 ± 0,02 |
| | | Phe-Ala² | 0,11 ± 0,02 | Phe-Phe | 0,11 ± 0,01 |
| | | Arg-Ala² | 0,28 ± 0,01 | | |

¹trans korrigierte Werte (Anlage 6.1); ²Anlage 6.1

Die niedrigen Affinitäten von Dipeptiden mit polar geladenen Aminosäuren zu PEPT1 bestätigen Ergebnisse aus der Literatur (Eddy *et al.* 1995; Terada *et al.* 2000b; Kottra *et al.* 2002). Die Ursache dafür könnte zum einem sein, dass geladene Dipeptide hydrophiler sind und zum anderen der Transporter wahrscheinlich eine Präferenz für zwitterionische Dipeptide besitzt (Kottra *et al.* 2002; auch für PEPT1 Amasheh *et al.* 1997 und für PEPT2 Fei *et al.* 1999). Dabei ist der pH-Wert zu berücksichtigen, da sich bei unterschiedlichen pH-Werten die Anteile der ionischen Spezies ändern können. Kottra *et al.* (2002) wiesen nach, dass bei pH 6,0 weniger als 10 % der Dipeptide (Asp-Gly, Gly-Asp, Lys-Gly, Gly-Lys) als Zwitterion vorliegen. Außerdem wurde in der oben genannten Arbeit gezeigt, dass der Transporter asymmetrische Bindungstaschen vor allem für kationische Dipeptide besitzt, d.h. eine positive Ladung in der C-terminalen Bindungstasche (Gly-Lys) schlechter erkannt wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der ϵ -Aminogruppe wie bei Nle-Ala oder Ala-Nle (Tabelle 7) oder eine Blockierung der funktionellen Gruppe in der Seitenkette mit hydrophoben Schutzgruppen (Abschnitt 3.2.3) wieder zu einer Erhöhung der Affinität führt. Für doppelt geladene Dipeptide konnten K_i -Werte bestimmt werden, die mit den in der Literatur beschriebenen vergleichbar sind (Tabelle 7; Eddy *et al.* 1995; Terada *et al.* 2000b), wobei für doppelt positiv geladene Dipeptide (Lys-Lys) niedrigere Affinitäten gemessen wurden als für doppelt negativ geladene Peptide (Asp-Asp).

Einfluss der Hydrophobizität

Wie bereits an einigen Beispielen gezeigt werden konnte, kann eine erhöhte Hydrophobizität solche Eigenschaften ausgleichen, die sich negativ auf die Erkennung des Substrats durch den Transporter auswirken. Daher wurde geprüft, ob eine Abhängigkeit zwischen den Affinitäten zu PEPT1 und der Hydrophobizität der Substanzen besteht. Auch in der Literatur wurde beschrieben, dass die Steigerung der Hydrophobizität der Substanzen deren Affinität erhöhen kann (Daniel *et al.* 1992; Fei *et al.* 1994; Hidalgo *et al.* 1995). Daniel *et al.* (1992) konnten die Affinitäten von Dipeptiden zu PEPT2 mit deren Hydrophobizität korrelieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die K_i -Werte der Dipeptide aus Tabelle 7 und die $K_{i\text{ corr}}$ -Werte von Xaa-Pro Dipeptiden (**Anlage 6.1**) herangezogen. Die Hydrophobizitäten der Dipeptide wurden nach der Fauchère Skala berechnet (von Heijne 1987; Daniel *et al.* 1992). Diese wurden gegen den Logarithmus der K_i -Werte aufgetragen. Es zeigt sich, dass eine zunehmende Hydrophobizität mit einer Erhöhung der Affinität hoch signifikant korreliert ($p < 0,0001$;

Abbildung 3). Regressionsanalysen mit Werten der Hydrophobizität, die nach Eisenberg oder Kyte-Doolittle berechnet wurden (von Heijne 1987), ergaben ähnlich signifikante Werte.

Warum konnte bei Xaa-Pro Dipeptiden kein Effekt der Hydrophobizität festgestellt werden? Die Ursache dafür könnte sein, dass die Affinität eines Substrats bzw. Inhibitors immer durch mehrere Faktoren bestimmt wird. Wie bereits oben diskutiert, erkennt der Transporter Dipeptide, die Glycin oder geladene Aminosäuren enthalten, mit geringerer Affinität. So führt die zusätzliche Ladung bei den anionischen bzw. kationischen Dipeptiden zur Erhöhung der Hydrophilie. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei dem in Abbildung 3 gezeigten Zusammenhang um eine Scheinkorrelation handelt.

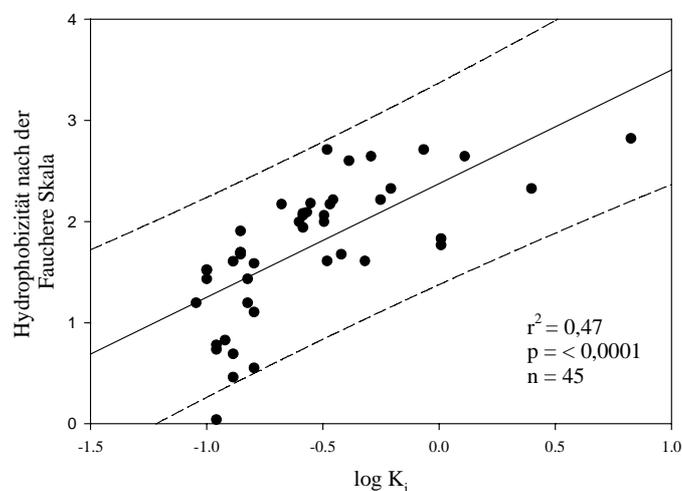


Abbildung 3. Abhängigkeit der K_i-Werte von der Hydrophobizität. Es wurden die K_i-Werte von den Dipeptiden aus der Tabelle 7 und von den Xaa-Pro Dipeptiden aus der **Anlage 6.1** entnommen. Die Hydrophobizitäten der einzelnen Dipeptide wurden berechnet nach der Fauchère Skala (von Heijne 1987). Die gestrichelte Linie stellt das 95 % Prognose-Intervall dar.

Stereoisomerie

In der Literatur wird bereits die stereospezifische Substraterkennung von PEPT1 beschrieben (Lister *et al.* 1995; Tamura *et al.* 1996a; Li *et al.* 1998; Meredith *et al.* 2000). Diese Ergebnisse konnten anhand der Stereoisomere von Ala-Ala, Ala-Lys und Ala-Pro bestätigt werden. Bezüglich der K_i-Werte ergibt sich die Reihenfolge: LL < DL < LD < DD (Tabelle 8; Hartrodt *et al.* 2000). D-Aminosäuren in der N-terminalen Position werden in Abhängigkeit von den jeweiligen Aminosäuren besser toleriert. Der Transporter PEPT1 scheint für die Bindung der Aminogruppe hinsichtlich ihrer räumlichen Stellung einen größeren Toleranzbereich zu besitzen als für die Bindung der Carboxylgruppe. Es zeigt sich wiederum, dass durch zunehmende Hydrophobizität negative Auswirkungen auf die Bindung kompensiert werden

können. So wurden DD-Dipeptide, deren Seitenkettenfunktionen mit hydrophoben Resten blockiert wurden, durch PEPT1 erkannt (z.B. D-Ala-D-Lys(Z); Tabelle 8). Diese Derivate sind die ersten DD-konfigurierten Dipeptide, die mit dem Peptidtransporter PEPT1 mit Affinitäten im niedrigen Affinitätsbereich interagieren. Dagegen konnte für hydrophile Schutzgruppen (D-Ala-D-Lys(Ac)) dieser Effekt nicht festgestellt werden. Auch bei den β -Lactam-Antibiotika zeigt PEPT1 eine Präferenz für die L-Konfiguration (Wenzel *et al.* 1995; Snyder *et al.* 1997).

Tabelle 8. K_i -Werte der Stereoisomere von Peptiden und Peptidderivaten gemessen an Caco-2 Zellen.

| Substanz | | K_i (mM) | Substanz | | K_i (mM) |
|----------|-----|-----------------|---------------|-----|-----------------|
| Ala-Ala | LL | 0,10 \pm 0,01 | Ala-Lys(Z) | LL | 0,18 \pm 0,01 |
| | DL | 2,1 \pm 0,2 | | DL | 2,3 \pm 0,1 |
| | LD | 4,2 \pm 0,2 | | LD | 2,4 \pm 0,1 |
| | DD | > 30 | | DD | 5,5 \pm 0,6 |
| Ala-Lys | LL | 0,21 \pm 0,02 | Ala-Lys(Ac) | LL | 0,20 \pm 0,01 |
| | DL* | 6,9 \pm 0,69 | | DD | > 30 |
| | LD* | > 30 | Lys(Z)-Ala | LL | 0,11 \pm 0,01 |
| | DD* | > 30 | | DL | 9,3 \pm 1,6 |
| Ala-Pro | LL | 0,15 \pm 0,01 | | LD* | 27 \pm 4 |
| | DL | 4,9 \pm 0,6 | | DD | 13 \pm 1 |
| | LD* | 15 \pm 2 | Ala-Orn(Z) | LL | 0,52 \pm 0,05 |
| | DD | > 30 | | DL | 1,9 \pm 0,1 |
| Phe-Ala | LL | 0,11 \pm 0,02 | | LD | 6,6 \pm 0,4 |
| | DL | 7,0 \pm 0,5 | | DD | 5,5 \pm 0,9 |
| | | | Ala-Asp(OBzl) | LL | 0,11 \pm 0,01 |
| | | | | DD | 7,9 \pm 0,5 |

*Werte aus Börner 2002

3.2 Inhibitoren von PEPT1 und PEPT2

In der Literatur gibt es widersprüchliche Informationen bezüglich des Effekts der Blockierung der Seitenketten von trifunktionellen Aminosäuren in Dipeptiden auf die Transporteigenschaften. Einerseits wurden solche Dipeptidderivate als Substrate, andererseits als Inhibitoren beschrieben. Dies ist für die pharmazeutische Industrie von Interesse, da an die Seitenketten eines Dipeptids oral nicht verfügbare Medikamente gekoppelt werden könnten und auf diese Weise als Prodrug möglicherweise vom Peptidtransporter aufgenommen werden. Andererseits stellen Inhibitoren Werkzeuge zur Aufklärung von zellphysiologischen und proteinchemischen Parametern der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 dar. So ist z.B. für den Na⁺/Glukose Kotransporter seit längerer Zeit ein Inhibitor (Phlorizin) bekannt, der zur Aufklärung verschiedenster Fragestellungen eingesetzt wurde (Hirayama *et al.* 2001; Novakova *et al.* 2001).

Taub *et al.* (1997a; 1997b) beschrieben erstmals die Möglichkeit der Blockierung der Seitenkette von Asparaginsäure und eine damit einhergehende erhöhte Affinität entsprechender Dipeptidderivate zu PEPT1. Über den Transport der Asp(OBzl)-Xaa Derivate erhielten sie unterschiedliche Ergebnisse. Während D-Asp(OBzl)-Ala transportiert wird, wurde Asp(OBzl)-Sar als Inhibitor des intestinalen Peptidtransporters beschrieben. In weiteren Arbeiten konnte auch der Transport von D-Glu(OBzl)-Ala und D-Ser(Bzl)-Ala mittels HPLC nachgewiesen werden (Taub *et al.* 1998; Nielsen *et al.* 2001). Auch über Lysin-Dipeptidderivate sind widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur zu finden. Abe *et al.* (1999) synthetisierten z.B. Val-Lys(Flu), dessen ε-Aminogruppe mit Fluorescein Isothiocyanat konjugiert ist. Dieses Dipeptidderivat hat zwar eine hohe Affinität an PEPT1 ($K_i = 5 \mu\text{M}$ im Dixon-Plot), aber es konnte nur eine Aufnahme der Substanz mittels passiver Diffusion in die Caco-2 Zellen nachgewiesen werden. Die Bindung von Val-Lys(Flu) an PEPT1 war dagegen nicht mit Gly-Sar und dem Protonophor CCCP hemmbar. In Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Yang *et al.* (2002), die die Aufnahme von seitenkettenmodifizierten, fluorescein markierten Xaa-Lys Dipeptiden in alveolare Makrophagen der Ratte über PEPT1 zeigen konnten. Neben den seitenkettengeschützten Dipeptiden wurde als möglicher Inhibitor des Peptidtransports 4-Aminomethylelessigsäure beschrieben, wobei aber dessen Affinität zu PEPT1 mit 1,8 bzw. 3,1 mM niedrig ist (Meredith *et al.* 1998). Außerdem zeigten Voruntersuchungen in unserer Arbeitsgruppe, dass sich die Affinität von Dipeptidderivaten mit trifunktionellen Aminosäuren erhöht, wenn deren Seitenketten mit bestimmten Schutzgruppen (z.B. Z oder Z(NO₂)) blockiert wurden. Darüber hinaus werden vom Transporter auch voluminöse „Blockierungsgruppen“

(u.a. Lys(D-Ala-Ala-D-Ala-Ala-Z)-Ala, $K_i = 2,9 \text{ mM}$; Börner 2002) mit relativ geringer Affinitätsniedrigung toleriert.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Seitenkettenblockierungen auf die Transporteigenschaften wurde eine breite Palette von Dipeptiden mit unterschiedlichen trifunktionellen Aminosäuren und verschiedenen Blockierungsgruppen eingesetzt. Zunächst wurden zwei Lys-Pro Derivate am intestinalen Peptidtransporter PEPT1 hinsichtlich ihrer Transporteigenschaften untersucht (Abschnitt 3.2.1; **Anlage 0**). Im Abschnitt 3.2.3 (**Anlage 6.4**) folgt eine Erweiterung dieser Studie mit der Zielstellung, die strukturellen Parameter für die Transformation eines Substrats in einen Inhibitor von PEPT1 zu erfassen. Analoge Untersuchungen wurden auch am renalen Peptidtransporter PEPT2 durchgeführt (Abschnitt 3.2.2; **Anlage 6.3**). Die Untersuchungen an Caco-2 Zellen (hPEPT1) und an SKPT-Zellen (rPEPT2) waren Gegenstand dieser Arbeit. In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. H. Daniel an der Technischen Universität München wurden die Kompetitionsassays an der methylotropen Hefe *Pichia pastoris* (rbPEPT1 und rbPEPT2) und die elektrophysiologischen Messungen an den Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* (rbPEPT1 und rbPEPT2) durchgeführt.

3.2.1 Charakterisierung von Lys-Pro Derivaten als neuartige Inhibitoren des intestinalen Peptidtransporters PEPT1 (Anlage 0: Knütter *et al.* 2001)

Das Ziel dieser Untersuchungen war, die Auswirkungen der Blockierung der ϵ -Aminogruppe von Lys-Pro mit den Schutzgruppen Z und Z(NO₂) auf dessen Transporteigenschaften an PEPT1 zu charakterisieren (Abbildung 4). Zur Bestimmung der Affinität wurden Kompetitionsassays mit [¹⁴C]Gly-Sar bzw. [³H]D-Phe-Ala als Referenzsubstrate an Caco-2 Zellen bzw. an *Pichia pastoris* Zellen durchgeführt. Zur Aufklärung der Translokation der Substanzen wurde die Elektrophysiologie an *Xenopus laevis* Oocyten angewendet.

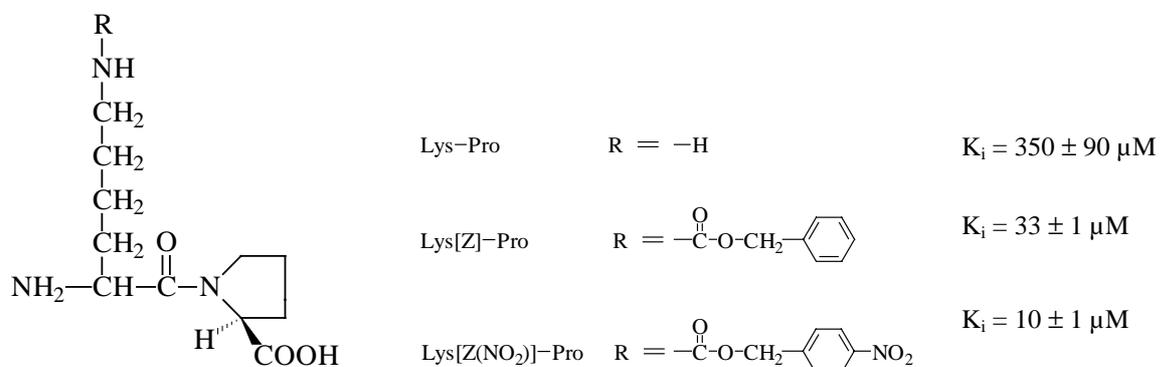


Abbildung 4. Struktur von Lys-Pro und seinen Derivaten Lys(Z)-Pro und Lys[Z(NO₂)]-Pro.

Zunächst wurde die Interaktion des Dipeptids Lys-Pro und seiner Derivate mit PEPT1 an Caco-2 Zellen bestimmt. Lys(Z)-Pro und Lys[Z(NO₂)]-Pro wurden von PEPT1 mit den K_i-Werten von 33 ± 1 μM bzw. 10 ± 1 μM erkannt. Bei einem Vergleich dieser K_i-Werte mit dem von Lys-Pro (350 ± 90 μM) ist eine signifikante Erhöhung der Affinität (11-fach bzw. 35-fach) durch die Einführung der Schutzgruppe zu erkennen. Diese Unterschiede sind nicht mit verschiedenen *trans*-Gehalten erklärbar, da für alle drei Substanzen mit Hilfe von HPCE ähnliche Werte bestimmt wurden. Die erhöhte Hydrophobizität der Derivate könnte dafür eher verantwortlich sein. Im System *Pichia pastoris* wurden im Wettbewerbsassay ähnliche Ergebnisse erzielt, d.h. Lys-Pro und dessen Derivate interagieren auch mit der Substratbindungsstelle von PEPT1, wenn der Transporter heterolog in Hefezellen exprimiert wird.

Die Wettbewerbsassays lassen keine Aussage über die Art der Inhibierung zu. Daher wurde eine Sättigungskinetik von Gly-Sar mit und ohne Lys[Z(NO₂)]-Pro in Caco-2 Zellen aufgenommen. Es zeigt sich, dass sich in Anwesenheit des Inhibitors der K_t-Wert von Gly-Sar um das 2-fache erhöht, während sich der V_{max}-Wert nicht ändert. Dies deutet darauf hin, dass der Gly-Sar Transport durch PEPT1 in Caco-2 Zellen durch Lys[Z(NO₂)]-Pro kompetitiv gehemmt wird, d.h. der Inhibitor konkurriert mit Gly-Sar um die gleiche Bindungsstelle. Auch bei der Bestimmung des K_i-Wertes mit Hilfe des Dixon-Plots (K_i = 19 μM) konnte gezeigt werden, dass Lys[Z(NO₂)]-Pro als kompetitiver Inhibitor des Gly-Sar Transports fungiert.

Als erster Ansatz zur Bestimmung des tatsächlichen Transports von Lys[Z(NO₂)]-Pro diente eine Serie von Fluxexperimenten an Caco-2 Zellen. Mittels HPLC-Analyse konnte keine carriervermittelte Aufnahme von Lys(Z(NO₂))-Pro in die Zelle und kein transepithelialer Flux von Lys[Z(NO₂)]-Pro durch den Caco-2 Monolayer gemessen werden.

Für weitere Untersuchungen der Transporteigenschaften von Lys-Pro und den zwei N^ε-geschützten Derivaten wurde die Elektrophysiologie an PEPT1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oocyten angewandt. Lys-Pro induziert vergleichbare Einwärtsströme durch elektrogeneren Transport über PEPT1 wie das Standardsubstrat Gly-Gln. Dagegen waren die Derivate Lys(Z)-Pro und Lys[Z(NO₂)]-Pro nicht in der Lage Einwärtsströme hervorzurufen, d.h. beide Derivate wurden nicht elektrogener transportiert. Lys[Z(NO₂)]-Pro reduzierte aber den Gly-Gln-Strom konzentrationsabhängig auf 10 % des Ausgangswertes. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des Peptidtransports durch Lys[Z(NO₂)]-Pro reversibel ist. Die Einführung der Schutzgruppe könnte den Wechsel der Konformation des Transporters für die Translokation des Substrats zu behindern. Dies könnte auf eine räumliche Behinderung und/oder auf hydrophobe Wechselwirkungen des aromatischen Ringsystems der Schutzgruppe mit dem Transportprotein zurückgeführt werden. Die Ergebnisse eines Dixon-Plots an

Xenopus laevis Oocyten bestätigen, dass Lys[Z(NO₂)]-Pro ein kompetitiver Inhibitor ($K_i = 29 \pm 4 \mu\text{M}$) des elektrogenen Peptidtransports ist. Es konnte außerdem die Bindung von Lys[Z(NO₂)]-Pro an der cytosolischen Seite von PEPT1 nachgewiesen werden.

3.2.2 Charakterisierung hoch affiner Inhibitoren für PEPT2 (Anlage 6.3: Theis *et al.* 2002b)

Im vorangegangenen Abschnitt (3.2.1) wurde Lys[Z(NO₂)]-Pro als hoch affiner Inhibitor des intestinalen Peptidtransporters PEPT1 beschrieben. Es ergibt sich nun die Frage, ob dieses Derivat auch ein Inhibitor des renalen Peptidtransporters PEPT2 darstellt? Darüber hinaus sollten anhand weiterer seitenkettenmodifizierter Dipeptide auch für PEPT2 die strukturellen Voraussetzungen für die Transformation eines Substrats in einem Inhibitor untersucht werden. Die Durchführung der Kompetitionsassays mit radioaktiven Referenzsubstraten erfolgte an renalen SKPT Zellen, die natürlicherweise nur rPEPT2 exprimieren, und an *Pichia pastoris* Zellen (rbPEPT2). Die Bestimmung des tatsächlichen Transports der Substanzen erfolgte mittels der Elektrophysiologie an *Xenopus laevis* Oocyten (rbPEPT2).

Interaktion von verschiedenen Lys[Z(NO₂)]-Derivaten mit PEPT2

Zunächst erfolgte eine Bestimmung der K_i -Werte des PEPT1 Inhibitors Lys[Z(NO₂)]-Pro ($K_i = 0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$) und der verwandten Derivate Lys[Z(NO₂)]-Ala ($K_i = 0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$), Lys[Z(NO₂)]-Val ($K_i = 0,1 \pm 0,01 \mu\text{M}$), Lys[Z(NO₂)]-Sar ($K_i = 0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Vergleichbare K_i -Werte konnten an den *Pichia pastoris* Zellen ermittelt werden. Alle vier Derivate zeigten zu PEPT2 eine Affinität im nanomolaren Bereich, aber werden sie auch transportiert? Die Untersuchung an PEPT2-exprimierenden *Xenopus laevis* Oocyten ergab, dass keines der vier Derivate Einwärtsströme induzierte. Sie waren aber in der Lage, die durch das Referenzsubstrat Gly-Gln an PEPT2-Oocyten hervorgerufenen Ströme zu inhibieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung des Gly-Gln-Stroms durch z.B. Lys[Z(NO₂)]-Val dosisabhängig und reversibel war. Dass die Interaktion mit der Substratbindungsstelle kompetitiver Natur ist, zeigten die Ergebnisse einer Sättigungskinetik der Gly-Sar Aufnahme in Gegenwart von Lys[Z(NO₂)]-Val an SKPT Zellen. Der K_i -Werts von Gly-Sar erhöhte sich von $108 \mu\text{M}$ auf $168 \mu\text{M}$, während die Maximalgeschwindigkeit unverändert blieb. Ein entsprechendes Experiment wurde an PEPT2-Oocyten durchgeführt und führte zu ähnlichen Ergebnissen. Bei der Bestimmung des K_i -Wertes ($2,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$) mittels eines Dixon-Plots an PEPT2 exprimie-

renden Oocyten konnte nachgewiesen werden, dass Lys[Z(NO₂)]-Val ein kompetitiver Inhibitor ist.

Welche Auswirkungen hat der Lys[Z(NO₂)]-Rest in der C-terminalen Position? Die Verbindungen (Ala-Lys[Z(NO₂))] und Val-Lys[Z(NO₂))] interagierten mit hohen Affinitäten mit PEPT2 in SKPT Zellen ($K_i = 3,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ bzw. $0,5 \pm 0,02 \mu\text{M}$) bzw. mit vergleichbaren K_i -Werten mit PEPT2 in *Pichia pastoris* Zellen. Im Gegensatz zu Lys[Z(NO₂)]-Ala induzierte die umgekehrte Sequenz, also Ala-Lys[Z(NO₂)], noch 46 % des Einwärtsstromes des Referenzsubstrats Gly-Gln am PEPT2-Oocyten. Dagegen konnte dieses Derivat nicht die durch Gly-Gln induzierten Transportströme inhibieren. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Lys[Z(NO₂)]-Rest ein Dipeptid nur dann zum Inhibitor transformiert, wenn dieser in der N-terminalen Position lokalisiert ist. Dies deutet auf einen unterschiedlichen Aufbau der N- und C-terminalen Bindungstasche des Peptidtransportproteins hin. Diese Asymmetrie konnte ebenfalls bei der Untersuchung der Interaktion von geladenen Dipeptiden mit PEPT1 nachgewiesen werden (Kotra *et al.* 2002).

Einfluss der Struktur und der Position der Schutzgruppe

Zur Charakterisierung der strukturellen Parameter, die die Transformation eines Dipeptidderivats vom Substrat zum Inhibitor bewirken können, wurden weitere Derivate untersucht. Diese unterschieden sich in der Struktur der ω -Amino-Schutzgruppe und/oder dem Abstand der Z- oder Z(NO₂)-Schutzgruppe zum C _{α} -Atom der betreffenden Aminosäure (Tabelle 9). Für die Dipeptidderivate Lys(Z)-Ala, Lys(Boc)-Ala und Lys(Ac)-Ala wurden an SKPT-Zellen K_i -Werte von $0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $3,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ bzw. $16 \pm 2 \mu\text{M}$ gemessen. Während Lys(Z)-Ala bzw. Lys(Boc)-Ala keine Einwärtsströme am PEPT2 Oocyten induzierten, inhibierten sie den von Gly-Gln produzierten Transportstrom fast vollständig. Dagegen wurde Lys(Ac)-Ala mit annähernd gleichen Einwärtsströmen wie die des Referenzsubstrats Gly-Gln (102 %) transportiert. Dieses Derivat konnte jedoch nicht die Gly-Gln Ströme inhibieren. Die eher hydrophoben Gruppen Z und Boc können also - im Gegensatz zu der hydrophilen Acetyl-Gruppe - das natürliche Dipeptid Lys-Ala in einen Inhibitor verwandeln. Auch konnte bestätigt werden, dass sich die Seitenketten-Schutzgruppe in der N-terminalen Position befinden muss, da Ala-Lys(Z), ähnlich wie Xaa-Lys[Z(NO₂)], von PEPT2 mit hoher Affinität erkannt (SKPT: $K_i = 1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$) und transportiert wurde.

Tabelle 9. Transporteigenschaften von Dipeptidderivaten an PEPT2 (modifiziert aus Anlage 6.3).

| Substanz | K_i (μM) SKPT | % $I_{\text{Gly-Gln}}$ <i>X. laevis</i> Oocyten | Inhibierung von % $I_{\text{Gly-Gln}}$ |
|------------------------------|---------------------------------|--|---|
| Lys(Z)-Ala | $0,9 \pm 0,1$ | 0 | + |
| Lys(Boc)-Ala | $3,2 \pm 0,2$ | 0 | + |
| Lys(Ac)-Ala | 16 ± 2 | 102 | - |
| Ala-Lys(Z) | $1,7 \pm 0,3$ | 82 | - |
| Orn(Z)-Ala | $1,9 \pm 0,2$ | 65 | - |
| Orn[Z(NO ₂)]-Ala | $1,5 \pm 0,04$ | 0 | + |
| Dab(Z)-Ala | $4,4 \pm 0,2$ | 97 | - |
| Dab[Z(NO ₂)]-Ala | $4,2 \pm 0,1$ | 0 | + |

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die hydrophobe Schutzgruppe (R = Z oder Z(NO₂)) für die inhibitorische Wirkung in der ϵ -Position der Aminosäureseitenkette lokalisiert sein muss. Dazu wurden Orn(R)-Ala und Dab(R)-Ala eingesetzt, bei denen die Seitenkette um eine bzw. zwei CH₂-Gruppen im Vergleich zu Lys(R)-Ala verkürzt ist (Tabelle 9). Die K_i -Werte dieser Verbindungen lagen in einem Bereich von 1,9 bis 4,4 μM im Verdrängungsexperiment an SKPT, d.h. durch die Verkürzung der Aminosäure-Seitenkette kommt es zu einer leichten Erhöhung der K_i -Werte im Vergleich zu den entsprechenden Lys-Ala Derivaten (Bereich der K_i -Werte: 0,7 - 0,9 μM). Sie unterschieden sich auch in ihren Transporteigenschaften. Im Gegensatz zu Lys(Z)-Ala wurden Orn(Z)-Ala und Dab(Z)-Ala transportiert. Der Abstand zwischen der Schutzgruppe und dem C $_{\alpha}$ -Atom scheint also für den Transporter eine kritische Größe zu sein. In der N-terminalen Bindungstasche interagiert möglicherweise eine spezifische Aminosäure-Seitenkettenfunktion des Transportproteins PEPT2 mit der modifizierten Seitenkette des Dipeptids, wodurch die Translokation des Dipeptidderivats verhindert wird. Diese anscheinend starke Interaktion kann durch eine Änderung des Abstands der Schutzgruppe zum C $_{\alpha}$ -Atom der Aminosäure aufgehoben werden. Darüber hinaus scheinen auch elektronische Effekte eine Rolle für die Transformation von einem Substrat in einen Inhibitor zu spielen. Durch Einführung einer Nitrogruppe in para-Position des aromatischen Ringes der Z-Schutzgruppe werden die resultierenden Orn[Z(NO₂)]-Ala und Dab[Z(NO₂)]-Ala Derivate wieder zu Inhibitoren.

Optimierung der Lysin-Dipeptidderivate für die Inhibierung von PEPT2

Durch eine Blockierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins mit hydrophoben Schutzgruppen wird die Affinität von Lys-Xaa-Peptiden erhöht, diese Derivate werden aber nicht mehr transportiert. Daher wurden vier verschiedene Lys-Lys-Derivate mit den Schutzgruppen Z und/oder Z(NO₂) synthetisiert und die Transporteigenschaften studiert. Die durch die Einführung der Schutzgruppen erhöhte Hydrophobizität führt in beiden Assaysystemen zu einer signifikanten Erhöhung (bis zu 4000-fach) der Affinität zu PEPT2 im Vergleich zum ungeschützten Dipeptid. Dabei konnte mit dem K_i-Wert von 10 nM für Lys[Z(NO₂)]-Lys[Z(NO₂)] an SKPT und *Pichia pastoris* die höchste jemals für PEPT2 gemessene Affinität bestimmt werden. Bei der Analyse der Transporteigenschaften der Derivate an PEPT2 exprimierenden *Xenopus laevis* Oocyten konnte keines der vier Derivate Einwärtsströme induzieren. Alle Derivate waren in der Lage den Gly-Gln Einwärtsstrom vollständig, aber reversibel zu inhibieren. Zum Beweis der kompetitiven Natur der Transportinhibierung durch Lys(Z)-Lys[Z(NO₂)] wurde eine Untersuchung der Sättigungskinetik der Gly-Sar Aufnahme in Anwesenheit des Inhibitors in SKPT-Zellen durchgeführt. Auch hier erhöht sich der K_i-Wert von Gly-Sar (91 μ M zu 250 μ M) während V_{max} konstant bleibt. Die Ergebnisse der Dixon Plots am Modellsystem SKPT und an PEPT2-Oocyten bestätigen ebenfalls die kompetitive Inhibierung des von PEPT2 vermittelten Peptidtransports durch Lys(Z)-Lys[Z(NO₂)].

3.2.3 Systematische Analyse der Transporteigenschaften seitenkettenmodifizierter Dipeptide an PEPT1 (Anlage 6.4: Knütter *et al.* 2003)

Im vorangegangenen Abschnitt konnte bei der Untersuchung von hoch affinen PEPT2 Inhibitoren gezeigt werden, welche Strukturparameter ein Substrat in einen Inhibitor überführen (Abschnitt 3.2.2). Es sollte nun geprüft werden, ob bei PEPT1 ähnliche strukturelle Modifikationen für eine Transformation eines Substrats in einen Inhibitor verantwortlich sind. Zur Charakterisierung von Affinität und Transport der seitenkettenmodifizierten Dipeptide an PEPT1 wurden wiederum drei verschiedene Methoden angewandt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Derivate vom Typ Ala-Xaa(R), Xaa(R)-Ala, wobei R für eine aromatische Schutzgruppe steht, eingesetzt. Außerdem erfolgte eine Charakterisierung verschiedener Lys-Ala Derivate mit aromatischen bzw. aliphatischen Urethanschutzgruppen, Alkylacyl- oder Arylacylresten und den entsprechenden Verbindungen mit einer para-ständigen Nitrogruppe.

Dabei wurden Amid-, Ester-, Ether- oder Urethanbindungen zwischen Schutzgruppe und Seitenkette der entsprechenden trifunktionellen Aminosäure gebildet.

Transport von Ala-Xaa(R) Dipeptidderivaten

Zunächst wurden die Affinitätskonstanten einer Reihe von Ala-Xaa Dipeptiden und den entsprechenden Derivaten mit aromatischen Schutzgruppen mittels des Caco-2 Wettbewerbsassays bestimmt. Die freien Dipeptide wurden von PEPT1 mit K_i -Werten in einem Bereich von 0,14 bis 0,97 mM erkannt, während die K_i -Werte der modifizierten Dipeptide in einem Bereich von 0,11 bis 0,51 mM lagen (Tabelle 10). Vergleichbare Ergebnisse konnten in Wettbewerbsassays an *Pichia pastoris* Zellen (rbPEPT1) erzielt werden. Bei den K_i -Werten der modifizierten Dipeptide ist eine geringfügige Erhöhung der Affinität zu erkennen. Dies könnte auf eine Erhöhung der Hydrophobizität durch die Einführung der aromatischen Blockierungsgruppe zurückzuführen sein. Der Einfluss der erhöhten Hydrophobizität auf die K_i -Werte konnte auch von Tateoka *et al.* (2001) durch die Anknüpfung von aliphatischen Resten unterschiedlicher Länge an Val-Lys Dipeptide nachgewiesen werden.

Tabelle 10. Transporteigenschaften von Ala-Xaa(R) Dipeptidderivaten an PEPT1 (modifiziert aus Anlage 6.4).

| Substanz | K_i (mM) Caco-2 | % $I_{Gly-Gln}$ <i>X. laevis</i> Oocyten |
|---------------|----------------------|---|
| Ala-Lys | 0,21 ± 0,02 | 152 |
| Ala-Lys(Z) | 0,18 ± 0,01 | 68 |
| Ala-Orn | 0,97 ± 0,15 | 99 |
| Ala-Orn(Z) | 0,52 ± 0,05 | 59 |
| Ala-Tyr | 0,15 ± 0,01 | 101 |
| Ala-Tyr(Bzl) | 0,13 ± 0,01 | * |
| Ala-Ser | 0,14 ± 0,01 | 109 |
| Ala-Ser(Bzl) | 0,11 ± 0,01 | 84 |
| Ala-Asp | 0,26 ± 0,02 | 261 |
| Ala-Asp(OBzl) | 0,11 ± 0,01 | 74 |

* 5 mM nicht löslich

Es stellt sich nun die Frage, ob diese modifizierten Dipeptide analog zu den Xaa-Lys(R) Verbindungen, die als Substrate an PEPT2 charakterisiert wurden (Abschnitt 3.2.2), als Substrate oder als Inhibitoren von PEPT1 fungieren. Bei der Untersuchung der Transporteigenschaften der Ala-Xaa(R) Derivate mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen an *Xenopus laevis* Oocyten (rbPEPT1) konnte für alle Derivate ein elektrogener Transport gezeigt werden (Tabelle 10). Dabei war die Art der C-terminalen Aminosäure, die Blockierungsgruppe und die Bindung zwischen der funktionellen Gruppe der Seitenkette und der Schutzgruppe ohne Bedeutung. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit denen von Tateoka *et al.* (2001) und Yang *et al.* (2002), stehen aber im Gegensatz zu denen von Abe *et al.* (1999), die Val-Lys(Flu) als einen Inhibitor von PEPT1 beschrieben. Dagegen konnte Yang *et al.* (2002) für ähnliche Strukturen z.B. Arg-Lys(Flu) den Transport über PEPT1 in Makrophagen zeigen.

Transport von Xaa(R)-Ala Dipeptidderivaten

Bei der Analyse von Xaa(R)-Ala Derivaten mit aromatischen Resten konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der [¹⁴C]Gly-Sar Aufnahme in Caco-2 Zellen beobachtet werden (Tabelle 11, Bereich der K_i-Werte: freie Dipeptide: 0,09 - 0,48 mM, Dipeptidderivate: 0,01 - 0,17 mM). Ähnliche Ergebnisse wurden an den *Pichia pastoris* Zellen erzielt. Die Einführung der Blockierungsgruppe bewirkt demnach eine Erhöhung der Affinität zu PEPT1. Bei der Bestimmung des Transports mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen an *Xenopus laevis* Oocyten (PEPT1) konnten für die meisten der Xaa(R)-Ala Derivate niedrigere Einwärtsströme als bei den Ala-Xaa(R) Verbindungen beobachtet werden (Tabelle 11). Der elektrogene Transport von Asp(OBzl)-Ala und Ser(Bzl)-Ala (79 % und 76 % von I_{Gly-Gln}) bestätigt die Ergebnisse der Frokjaer Arbeitsgruppe (Taub *et al.* 1998; Nielsen *et al.* 2001), die diese mit den proteolysestabilen Diastereomeren D-Asp(OBzl)-Ala und D-Ser(Bzl)-Ala erhalten haben. Demgegenüber induzierten die modifizierten Dipeptide Tyr(Bzl)-Ala, Lys(Z)-Ala, Orn(Z)-Ala und Dab(Z)-Ala Einwärtsströme von 16 bis 37 % im Vergleich zum Standardsubstrat Gly-Gln. Orn(Z)-Ala und Dab(Z)-Ala können als „Lysin Derivate“ betrachtet werden, deren aliphatische Seitenkette um eine bzw. zwei CH₂-Gruppen verkürzt wurde. Von PEPT2 werden beide Derivate transportiert, während Lys(Z)-Ala eindeutig als Inhibitor identifiziert wurde (Abschnitt 3.2.2). Einen ähnlichen aber nicht so stark ausgeprägten Effekt konnte für diese Derivate an PEPT1 beobachtet werden, d.h. bei Verkürzung der Seitenkette der N⁰-geschützten Aminosäure können die Transporteigenschaften nur partiell wieder hergestellt werden. Der intramolekulare Abstand der Schutzgruppe zum C_α-Atom und die Position der

seitenkettenmodifizierten Aminosäure in der N-terminalen Bindungstasche scheinen wichtige Faktoren zu sein, die ein Substrat von einem Inhibitor unterscheiden. Darüber hinaus deutet der Unterschied in den Transporteigenschaften der Xaa(R)-Ala und der Ala-Xaa(R) Derivate auf eine Asymmetrie zwischen der N- und C-terminalen Bindungstasche hin. Unterschiede in den Bindungstaschen wurden bereits für geladene Substrate von PEPT1 (Kotra *et al.* 2002) und für hoch affine Inhibitoren von PEPT2 festgestellt (Abschnitt 3.2.2).

Tabelle 11. Transporteigenschaften von Xaa(R)-Ala Dipeptidderivaten an PEPT1 (modifiziert aus Anlage 6.4).

| Substanz | K _i (mM) Caco-2 | % I _{Gly-Gln} <i>X. laevis</i> Oocyten |
|-------------------------|-------------------------------|--|
| Lys-Ala | 0,34 ± 0,02 | 207 |
| Lys(Z)-Ala | 0,11 ± 0,01 | 16 |
| Orn-Ala | 0,48 ± 0,06 | 134 |
| Orn(Z)-Ala | 0,17 ± 0,02 | 22 |
| Dab-Ala | 0,25 ± 0,03 | 140 |
| Dab(Z)-Ala | 0,08 ± 0,01 | 37 |
| Tyr-Ala | 0,09 ± 0,01 | 103 |
| Tyr(Bzl)-Ala | 0,01 ± 0,002 | 24 |
| Ser-Ala | 0,14 ± 0,01 | 125 |
| Ser(Bzl)-Ala | 0,10 ± 0,01 | 79 |
| Asp-Ala | 0,32 ± 0,02 | 92 |
| Asp(OBzl)-Ala | 0,10 ± 0,01 | 76 |
| Asp(Ala-D-Ala)-Ala | 2,7 ± 0,2 | 60 |
| Asp(Ala-D-Ala-OBzl)-Ala | 0,65 ± 0,06 | 17 |

Interessante Resultate wurden mit zwei weiteren Asp-Ala Derivaten erzielt. Hier wurden Ala-D-Ala und Ala-D-Ala-OBzl an die β-Carboxylgruppe der N-terminalen Asparaginsäure geknüpft (Tabelle 11). Wie erwartet hatte das hydrophobere Derivat Asp(Ala-D-Ala-OBzl)-Ala eine höhere Affinität gegenüber Asp(Ala-D-Ala)-Ala. Nur für das letztere Konjugat konnte ein elektrogener Transport nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis könnte für die Entwicklung von Prodrugs von Bedeutung sein.

Transport von Lys(R)-Ala Derivaten

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde auf strukturelle Parameter verwiesen, durch die sich ein Substrat von einem Inhibitor unterscheidet. Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses struktureller Parameter - u.a. Größe (sterische Aspekte) und Hydrophobizität des Restes R - auf den Transport wurden verschiedene Schutzgruppen (R = Acyl, Phenylacyl, Alkyloxycarbonyl und Benzyloxycarbonyl) zur Blockierung des N^ε-Aminogruppe von Lys-Ala eingesetzt. Mit Hilfe der Kompetitionsassays an Caco-2 Zellen und *Pichia pastoris* Zellen konnten K_i-Werte in dem engen Bereich von 0,11 bis 0,65 mM (Tabelle 12) bzw. 0,02 bis 0,26 mM bestimmt werden. Bei Überprüfung der Transporteigenschaften der verschiedenen Lys(R)-Ala Derivate (Tabelle 12) mit Hilfe der *Xenopus laevis* Oocyten (PEPT1) zeigte sich, dass nur Lys(Bu)-Ala und das relativ hydrophile Lys(Ac)-Ala transportiert wurden. Dagegen führte die weitere Verlängerung der Alkylkette (Butyryl zu Heptanoyl), die Substitution des Acylrestes mit einem Phenylacylrest (Acetyl zu Benzoyl und Butyryl zu 3-Phenylpropionyl) oder die Einführung einer Urethangruppierung (Butyryl zu Butyloxycarbonyl) zu Inhibitoren von PEPT1. Diese Strukturmodifikationen scheinen den Transporter PEPT1 in der Translokation dieser Verbindungen zu behindern. Die Ursache dafür könnte in einer erhöhten hydrophoben Wechselwirkung der Schutzgruppe bzw. in sterischen und/oder elektronischen Effekten der Schutzgruppe mit dem Transportprotein liegen.

Auffallend ist, dass bei den Derivaten, die mit Benzoyl bzw. Phenylacylresten (R = Bz, Pac, Ppr, Pbu und Phx) modifiziert wurden, im *P. pastoris* Assay generell höhere Affinitäten (K_i = 0,02 – 0,13 mM) als beim Caco-2 Assay gemessen wurden. Über die Ursachen für diese Diskrepanzen lässt sich nur spekulieren. Einerseits könnten Unterschiede in der Aminosäuresequenz (hPEPT1 in Caco-2 Zellen und rbPEPT1 in *P. pastoris*, 81 % Identität) verantwortlich sein, andererseits könnten unterschiedliche Interaktionen mit Membranproteinen in den beiden Zellsystemen die Transportkinetik beeinflussen. Aber trotz dieser Unterschiede in den Affinitätsbereichen bleibt die Rangfolge der Affinitäten gleich, wobei für Lys(Ppr)-Ala der höchste K_i-Wert (Caco-2 = 0,65 und *P. pastoris* = 0,13 mM) gemessen wurde. Der Abstand zwischen dem Aromaten und der Amidbindung, d.h. die Position des Phenylrings in der Bindungstasche, könnte entscheidend sein in Bezug auf eine effektive Interaktion dieses Derivats mit der Substratbindungsstelle des PEPT1-Proteins.

Tabelle 12. Transporteigenschaften von Lys(R)-Ala Dipeptidderivaten an PEPT1 (modifiziert aus Anlage 6.4).

| R | Struktur von R | K _i (mM) Caco-2 | % I _{Gly-Gln} <i>X. laevis</i> Oocyten |
|----------|--|-------------------------------|--|
| H | H | 0,34 ± 0,02 | 207 |
| Ac | -CO-CH ₃ | 0,26 ± 0,01 | 85 |
| Bu | -CO-(CH ₂) ₂ -CH ₃ | 0,47 ± 0,06 | 77 |
| Hp | -CO-(CH ₂) ₅ -CH ₃ | 0,27 ± 0,03 | 4 |
| Bz | -CO-C ₆ H ₅ | 0,26 ± 0,02 | 20 |
| Pac | -CO-CH ₂ -C ₆ H ₅ | 0,41 ± 0,04 | 15 |
| Ppr | -CO-(CH ₂) ₂ -C ₆ H ₅ | 0,65 ± 0,06 | 4 |
| Pbu | -CO-(CH ₂) ₃ -C ₆ H ₅ | 0,20 ± 0,04 | 0 |
| Phx | -CO-(CH ₂) ₅ -C ₆ H ₅ | 0,28 ± 0,02 | 7 |
| Z | -CO-O-CH ₂ -C ₆ H ₅ | 0,11 ± 0,01 | 16 |
| Boc | -CO-O-C(CH ₃) ₃ | 0,56 ± 0,02 | 15 |
| CO-O-But | -CO-O-(CH ₂) ₃ -CH ₃ | 0,32 ± 0,02 | 18 |
| CO-O-Hex | -CO-O-(CH ₂) ₅ -CH ₃ | 0,17 ± 0,02 | 0 |

Auswirkung einer p-ständigen NO₂-Gruppe im Phenylring der Schutzgruppe

In den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Einführung einer NO₂-Gruppe in para-Stellung des Phenylrings der N^ε-Benzyloxycarbonylschutzgruppe bestimmter Lysin-Dipeptidderivate die Affinität zu PEPT1 bzw. PEPT2 erhöht wird. Zunächst erfolgten Untersuchungen an Lys-Ala-Dipeptiden mit unterschiedlichen Phenylacetylresten an der N^ε-Aminogruppe des Lysins (Tabelle 13, Lys[Bz(NO₂)]-Ala, Lys[Pac(NO₂)]-Ala und Lys[Pbu(NO₂)]-Ala). Dies führte zu einer Erhöhung der Affinität im Vergleich zu den entsprechenden NO₂-freien Verbindungen (Caco-2 Assay: 0,10 - 0,21 mM; *P. pastoris* Assay: jeweils ein K_i-Wert von 0,01 mM). Alle drei Verbindungen wurden nicht transportiert. Auch für Dab[Z(NO₂)]-Ala, Orn[Z(NO₂)]-Ala und Lys[Z(NO₂)]-Ala wurden niedrigere K_i-Werte (für beide Systeme: 0,02 - 0,07 mM) als für die entsprechenden Xaa(Z)-Ala Dipeptidderivate erhalten. In diesem Fall unterschieden sich auch die Transporteigenschaften der drei N^ε-Z-geschützten Dipeptidderivate von denen mit einer N^ε-Z(NO₂)-Schutzgruppe. Die

Xaa(Z)-Ala Derivate weisen - wenn auch niedrige - Einwärtsströme auf, dagegen konnte keines der Xaa[Z(NO₂)]-Ala Peptide Einwärtsströme induzieren (Tabelle 13). Also werden die Z-Derivate noch in geringem Maße elektrogen transportiert, während die Z(NO₂)-Derivate kompetitive Inhibitoren darstellen. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf elektronische Effekte der NO₂-Gruppe zurückzuführen. Analoge Ergebnisse wurden auch für PEPT2 erhalten (Abschnitt 3.2.2). Auch konnte bestätigt werden, dass sich die Seitenketten-Schutzgruppe in der N-terminalen Position befinden muss, da Ala-Lys[Z(NO₂)] und Val-Lys[Z(NO₂)], ähnlich wie die Ala-Xaa(R) Derivate, von PEPT1 mit hoher Affinität erkannt und transportiert wurden (Tabelle 13).

Tabelle 13. Transporteigenschaften von Dipeptidderivaten mit einer para-ständigen NO₂-Gruppe im Phenylring der Schutzgruppe an PEPT1 (modifiziert aus Anlage 6.4).

| Substanz | K _i (mM) Caco-2 | % I _{Gly-Gln} <i>X. laevis</i> Oocyten |
|--------------------------------|-------------------------------|--|
| Lys[Bz(NO ₂)]-Ala | 0,21 ± 0,01 | 0 |
| Lys[Pac(NO ₂)]-Ala | 0,21 ± 0,03 | 3 |
| Lys[Pbu(NO ₂)]-Ala | 0,10 ± 0,01 | 0 |
| Lys[Z(NO ₂)]-Ala | 0,04 ± 0,003 | 0 |
| Orn[Z(NO ₂)]-Ala | 0,02 ± 0,002 | 0 |
| Dab[Z(NO ₂)]-Ala | 0,05 ± 0,005 | 0 |
| Lys[Z(NO ₂)]-Lys | 0,28 ± 0,02 | 0 |
| Lys[Z(NO ₂)]-Sar | 0,08 ± 0,02 | 0 |
| Lys[Z(NO ₂)]-Pro | 0,007 ± 0,001* | 0 |
| Lys[Z(NO ₂)]-Val | 0,002 ± 0,001 | 0 |
| Ala-Lys[Z(NO ₂)] | 0,09 ± 0,01 | 48 |
| Val-Lys[Z(NO ₂)] | 0,07 ± 0,01 | 35 |

*korrigiert um den *trans* Gehalt (Anlage 6.2)

Darüber hinaus wurden in diese Untersuchungen Lys[Z(NO₂)]-Dipeptide mit variiertem C-terminaler Aminosäure (Ala, Lys, Sar, Pro, Val) einbezogen. Erwartungsgemäß werden alle Dipeptidderivate trotz ihrer hohen Affinitäten nicht elektrogen transportiert (Tabelle 13). Für Lys[Z(NO₂)]-Val wurde mit 2 µM in beiden Wettbewerbsassays die bisher höchste an PEPT1 gemessene Affinität erhalten.

3.3 Expression, Mechanismus und Substratspezifität von PEPT1 am extrahepatischen Gallengang (Anlage 6.5: Knütter *et al.* 2002)

Mit funktionellen Methoden konnten Peptidtransporter zunächst nur im Darm und in der Niere nachgewiesen werden. Erst nach der Klonierung von PEPT1 und PEPT2 Mitte der 1990er Jahre gelang mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken die Identifizierung auch in anderen Organen. Bisher wurde die spezifische mRNA von H⁺-abhängigen Peptidtransportern in Darm, Niere, Gehirn, Lunge, Pankreas und Leber gefunden (Fei *et al.* 1994; Ganapathy *et al.* 2001). Zahlreiche Zell-Linien wie z.B. Caco-2 (Darm, Brandsch *et al.* 1994), SKPT (Niere, Brandsch *et al.* 1995) und LLC-PK₁ (Niere, Wenzel *et al.* 1998) werden bereits als *in vitro* Modell für die Untersuchung von mechanistischen, strukturellen und regulativen Aspekten des Peptidtransports genutzt. In dieser Studie wurden zunächst einige Zell-Linien (Darm, Niere, Muskel, Gehirn, Gallengang, Blutzellen, Brustdrüse) funktionell auf die Existenz eines H⁺/Peptidtransportsystems untersucht. Wie in der Abbildung 5 zu erkennen ist, konnte nur in den Zell-Linien Caco-2, LLC-PK₁ und SK-ChA-1 eine Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar, die mit 10 mM Gly-Sar hemmbar war, gefunden werden. Für Caco-2 und LLC-PK₁ war dies in der Literatur schon bekannt (siehe oben).

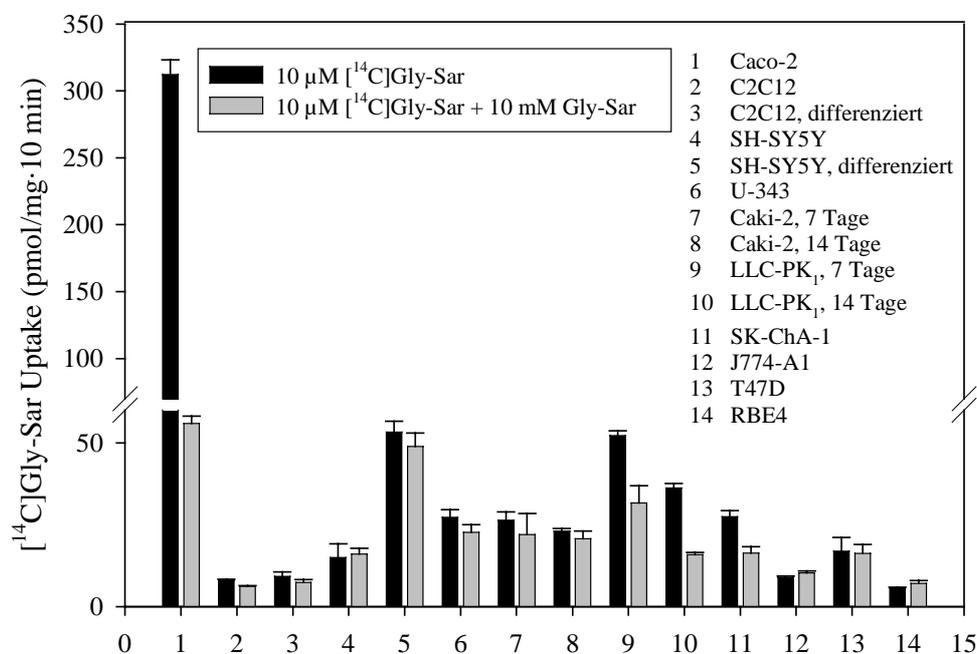


Abbildung 5. Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar an verschiedenen Zell-Linien. Aufnahme-Puffer pH 6,0 mit 10 μM [¹⁴C]Gly-Sar, n = 3, t = 10 min, Mittelwert ± SE. Caco-2: aus humanem Dickdarmtumor; C2C12: aus Myoblastom der Maus; SH-SY5Y: aus humanem Neuroblastom; U-343: aus humanem Gliom; Caki-2: aus humanem Nierentumor; SK-ChA-1: aus Tumor des humanen extrahepatischen Gallengangs; J774-A1: Monocyten-Makrophagen der Maus; T47D: humane Brustkrebszellen; RBE4: endotheliale Zellen des Rattenhirns.

Dagegen ist bisher keine Publikation über Peptidtransport am Gallengangsepithel veröffentlicht worden. Über die Physiologie und Pathophysiologie dieses Epithels ist in den letzten Jahren viel publiziert worden (Roberts *et al.* 1997; Alvaro 1999; Jansen 2000). Dazu gehörte auch die Charakterisierung verschiedener Transportsysteme, wie z.B. der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher, der cAMP-abhängige Cl^- Kanal CFTR, Aquaporin-1, ein Na^+ -abhängiger Glukose Transporter und der Na^+ -abhängige Gallensäure Transporter (Alvaro 1999; Jansen 2000). Im Folgenden sollte daher mit Hilfe funktioneller, molekularbiologischer und immunohistochemischer Methoden die Existenz eines Peptidtransportsystems in Cholangiocyten untersucht werden. Die immunohistochemischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. H. Daniel, Technische Universität München durchgeführt.

Zunächst sollte das Peptidtransportsystem in der Zell-Linie SK-ChA-1 (isoliert aus einem Tumor am extrahepatischen Gallengang, *Homo sapiens*, (Knuth *et al.* 1985)) funktionell charakterisiert werden. Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar blieb über 10 Minuten linear und die Transportaktivität war über 12 Tage (Tag 7 wurde für die Experimente ausgewählt) konstant. Eine Versuchstemperatur von 37°C und ein extrazellulärer pH-Wert von 6,0 stellt das Optimum für die [^{14}C]Gly-Sar Aufnahme dar. Demnach wird der Peptidtransport durch einen sauren extrazellulären pH-Wert stimuliert. Mit Hilfe der NH_4Cl -Prepulse Technik, die zu einer inneren Ansäuerung der Zelle führt, konnte eine Hemmung ($> 70\%$) des [^{14}C]Gly-Sar Transports erreicht werden. Demzufolge ist der Peptidtransport vom pH-Gradienten abhängig und nicht vom extrazellulären sauren pH-Wert per se. Diese Schlussfolgerung konnte durch Experimente mit dem Protonophor FCCP bestätigt werden. Anhand der kinetischen Parameter ($K_t = 1,1\text{ mM}$) kann der Transporter dem niedrig affinen System PEPT1 zugeordnet werden. Es gab keinen Hinweis auf eine zweite sättigbare Komponente (PEPT2) in den SK-ChA-1 Zellen. Verschiedene Peptide (Gly-Sar, Ala-Ala, Ala-Asp) und Peptidomimetika (Cefadroxil, δ -Aminolävulinsäure) waren in der Lage die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar in SK-ChA-1 Zellen konzentrationsabhängig zu inhibieren (Bereich der K_i -Werte 0,25 - 3,3 mM), während Glycin und Glutathion nicht erkannt wurden.

Der extrahepatische Gallengang ist mit einem polarisierten Epithel ausgekleidet. Mikroskopische Studien von Knuth *et al.* (1985) haben gezeigt, dass die SK-ChA-1 Zellen polarisieren. In dieser Arbeit wurden die Zellen auf permeablen Filtern in Transwellkammern gezüchtet und es erfolgte sowohl die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen als auch eine Untersuchung des transepithelialen Fluxes. Die elektronenmikroskopische Analyse beweist, dass die Zellen dichte und polarisierte Monolayer ausbilden. An der apikalen Membran sind

deutlich Mikrovilli und tight junctions zu erkennen. Der transepitheliale Widerstand betrug $856 \pm 29 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die transepithelialen Flux-Studien mit [^{14}C]Gly-Sar zeigen, dass die Gly-Sar Aufnahme und der Flux transportvermittelt und mit 10 mM Gly-Sar hemmbar sind. Der apikale zu basolaterale Flux übertraf den entgegengesetzten Flux 11-fach. Die Aufnahme in die Zelle war 20-mal höher von der apikalen als von der basolateralen Seite. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Peptidtransporter in der apikalen Membran lokalisiert ist.

Die bisherigen Analysen ergaben, dass wahrscheinlich der niedrig affine Peptidtransporter PEPT1 in den SK-ChA-1 Zellen exprimiert wird. Um die Existenz des hoch affinen Peptidtransporters PEPT2 auszuschließen, wurde eine RT-PCR Analyse mit spezifischen Primern für PEPT1 und PEPT2 durchgeführt. Es konnte nur die mRNA für PEPT1 und nicht die für PEPT2 in den SK-ChA-1 Zellen, im extrahepatischen Gallengang und in der Gallenblase des Kaninchens nachgewiesen werden.

Die Fluxexperimente zeigten die Lokalisation des Peptidtransporters in der apikalen Membran der Cholangiocyten. Dieses Resultat konnte mit immunohistochemischen Studien bestätigt werden. Mit einem polyklonalen Antikörper spezifisch für PEPT1 (Groneberg *et al.* 2001a) konnte der niedrig affine Peptidtransporter PEPT1 in der apikalen Membran von Cholangiocyten des extrahepatischen Gallengangs der Maus identifiziert werden.

Was ist nun die mögliche Funktion des Peptidtransporters im Gallengang? Bisher ist nur sehr wenig bekannt über eine Existenz von kleinen Peptiden in der Gallenflüssigkeit. Glutathion wird nach seiner Sekretion fast vollständig abgebaut (Ballatori *et al.* 1988). Die resultierenden Abbauprodukte könnten entweder als Peptide, Konjugate oder als Aminosäuren wieder reabsorbiert werden. Außerdem wurde die hepatobiliäre Exkretion von N-acylierten Di- und Tripeptiden beschrieben (Anderson *et al.* 1992). Glutathion und N-geschützte Di- und Tripeptide stellen jedoch keine Substrate für den H^+ /Peptidtransporter dar. Obwohl der Beleg für die Existenz von kleinen Peptiden in der Gallenflüssigkeit bisher noch fehlt, bedeutet das nicht, dass die Konzentration von potentiellen Substraten in der Galle vernachlässigbar ist. Mittels zahlreicher analytischer Methoden (RP-HPLC, Massenspektroskopie und Edman Abbau) gelang unerwartet der Nachweis von hydrophoben Polypeptiden in der Galle (Stark *et al.* 1999). Auch wurden biologisch aktive Peptide wie z.B. der atriale natriuretische Faktor in der Galle nachgewiesen (Oh *et al.* 1994). Auch für die Niere konnte lange nicht geklärt werden, ob dort die Peptidtransporter für die Reabsorption von Peptiden und damit für die Konservierung von in Aminosäuren gebundenem Stickstoff zuständig sind. Es wurde angenommen, dass die Konzentration von kleinen Peptiden im Blutkreislauf gering ist. Erst 1991 zeigten Seal und

Parker (1991), dass diese viel höher ist als bisher angenommen wurde (1 - 5 mM). Weitere Studien sind also nötig, um aufzuklären, wie hoch die Konzentration von Peptiden in der Gallenflüssigkeit ist und ob PEPT1 zur Rückgewinnung von Di- und Tripeptiden dient, die durch Sekretion aus Hepatocysten in die Galle gelangen oder durch den Abbau von größeren Peptiden in der Gallenflüssigkeit entstanden sind.

Die potentielle pharmazeutische Relevanz des Peptidtransporters wird dadurch verdeutlicht, dass viele Peptidomimetika, wie bestimmte β -Lactam Antibiotika, Substrate dieses Transporters sind. Beispielsweise wird Cefadroxil von PEPT1 in den SK-ChA-1 Zellen mit einem K_i -Wert von 3 mM erkannt. Von besonderem Interesse ist, dass δ -Aminolävulinsäure imstande ist, die Gly-Sar Aufnahme zu inhibieren. Diese Substanz, eine Vorstufe in der Porphyrinsynthese, wird als endogener Photosensitizer für die photodynamische Therapie von verschiedenen Tumoren genutzt (Peng *et al.* 1997). Döring *et al.* (1998a) wiesen nach, dass δ -Aminolävulinsäure ein Substrat der renalen und intestinalen Peptidtransporter ist, wodurch dessen hohe orale Verfügbarkeit erklärt wird. Die Anreicherung von δ -Aminolävulinsäure in den epithelialen Zellen des extrahepatischen Gallengangs über PEPT1 erlaubt die Nutzung dieser Substanz bei der Behandlung von Gallengangtumoren. Weitere Studien zur Charakterisierung des Transports von δ -Aminolävulinsäure am extrahepatischen Gallengang wurden in der Arbeitsgruppe durchgeführt (Neumann & Brandsch 2003).

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die H⁺/Di- und Tripeptidtransporter spielen nicht nur unter ernährungsphysiologischen, sondern auch unter pharmakologischen Gesichtspunkten eine wichtige Rolle. Aufgrund ihrer Multispezifität ermöglichen sie die Bioverfügbarkeit von Peptidpharmaka/Peptidomimetika bei oraler Gabe. Da bisher noch keine Informationen über den strukturellen Aufbau der Substratbindungsstelle vorliegen, kommt der Aufklärung der *Spezifität* der Transporter ein hoher Stellenwert zu.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit stand daher die Charakterisierung der strukturellen Anforderungen an Substrate des intestinalen Peptidtransporters PEPT1 im Vordergrund. Dazu konnten wesentliche Aspekte der Substraterkennung (Dipeptide) von PEPT1 auf molekularer Ebene (Abbildung 6) aufgezeigt werden:

1. Die Aminogruppe am N-Terminus ist essentiell. Sie muss frei und in der α -Position lokalisiert sein. Sie kann durch andere funktionelle Gruppen (z.B. Hydroxylgruppe) ersetzt werden. Liegt die Aminogruppe in D-Konfiguration vor, so führt dies zu einem leichten Abfall der Substrataffinität.
2. Am C-Terminus sollte eine Carboxylgruppe vorhanden sein. Sie kann durch eine Phosphonogruppe ersetzt sein. Die D-Konfiguration der C-terminalen Aminosäure bedingt einen stärkeren Abfall der Affinität im Vergleich zur N-terminalen Aminosäure. Der Abstand der Säurefunktion zur Peptidbindung kann flexibel sein. Ihr Fehlen kann zum Teil durch hydrophobe Gruppen kompensiert werden. Eine zusätzliche Methylgruppe am C $_{\alpha}$ -Atom (Ala-Aib) stört die Substraterkennung.
3. Die Carbonylgruppe der Peptidbindung ist essentiell, daher wird auch eine Ketomethylen- oder Esterbindung vom Transporter erkannt. Die Carbonylgruppe kann durch eine Thio-carbonylfunktion ersetzt werden. Die Peptidbindung muss in der *trans*-Konformation vorliegen. Die zweite Peptidbindung im Falle von Tripeptiden ist nicht essentiell.
4. Die Cyclisierung über den N- und C-Terminus eines Dipeptids (Backbonecyclisierung) führt in der Regel zum vollständigen Verlust der Affinität.
5. Prolin in N-terminaler Stellung bedingt infolge der N-Alkylierung des N-Terminus' Affinitätsverluste, die durch die Struktur der C-terminalen Aminosäure beeinflusst werden.
6. Das Fehlen der Seitenkette, wie z.B. bei Dipeptiden mit Glycin, verringert die Affinität.
7. Positive oder negative Ladungen in der Seitenkette erhöhen die K_i-Werte vor allem bei Lokalisation einer kationischen Seitenkette in der C-terminalen Bindungstasche.

8. Blockierungen der Seitenketten mit hydrophoben Schutzgruppen erhöhen die Substrataffinität.
9. Der Peptidtransporter ist stereoselektiv. LL-Dipeptide werden bevorzugt transportiert. DD-Dipeptide werden nur dann erkannt, wenn die Seitenkette einer trifunktionellen Aminosäure mit einer hydrophoben Schutzgruppe blockiert worden ist.
10. Die Steigerung der Molekülhydrophobizität führt zu einer Erhöhung der Affinität.

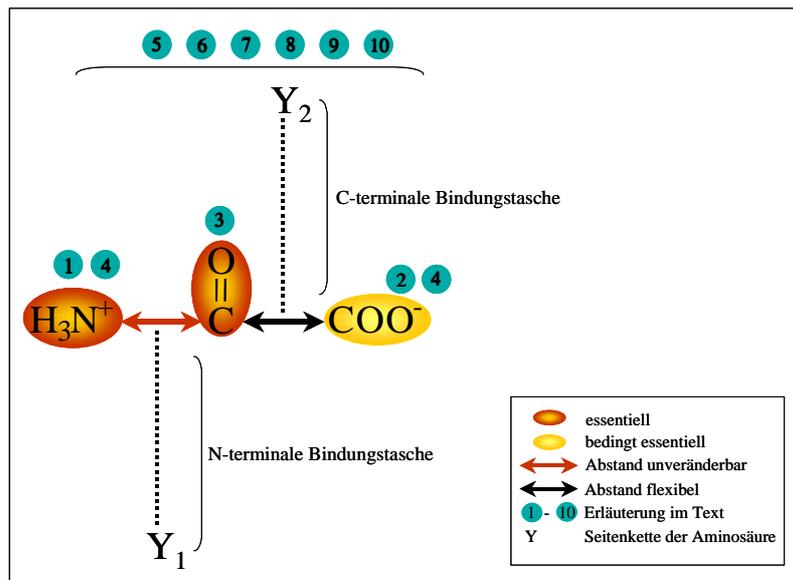


Abbildung 6. Strukturelle Anforderungen an Substrate von PEPT1.

Der umfangreiche Datensatz aus der Arbeitsgruppe fließt bereits in theoretische Untersuchungen (dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsanalyse: 3D-QSAR) ein, die eine vertiefende Auskunft über die strukturellen Anforderungen der Substrat-Transporter-Interaktion geben sollen. Ein Pharmakophormodell aus den 3D-QSAR Untersuchungen in Verbindung mit der Aufklärung der Substratspezifität hilft aber nur bedingt bei der Vorhersage des strukturellen Aufbaus der Substraterkennungsstelle. Daneben könnten hoch affine Inhibitoren weitere Hinweise zur Struktur der Bindungsstelle liefern. Eine umfassende und detaillierte Aufklärung wird letztendlich nur durch die Kristallisation des Transportproteins und durch eine dreidimensionale Röntgen-Strukturanalyse möglich sein.

Der zweite Teil der Arbeit betrifft die Suche nach hoch affinen Inhibitoren von PEPT1 und PEPT2 und die Charakterisierung ihrer strukturellen Anforderungen.

Mit Lys[Z(NO₂)]-Pro konnte erstmalig ein hoch affiner, kompetitiver und reversibler Inhibitor von PEPT1 identifiziert werden. Bei weiteren Untersuchungen zur Inhibitorspezifität der Pep-

tidtransporter PEPT1 und PEPT2 zeigte sich, dass folgende strukturelle Parameter die Transformation eines Substrates in einen Inhibitor beeinflussen können (Abbildung 7):

1. Einführung einer hydrophoben Seitenkettenschutzgruppe in die N-terminale Aminosäure; dagegen haben Schutzgruppen jeglicher Art in die Seitenkettenfunktion der C-terminalen Aminosäure keinen Einfluss auf den Transformationsprozess (Dies deutet auf eine Asymmetrie zwischen der N- und der C-terminalen Bindungstasche hin.);
2. Definierter Abstand der Seitenkettenschutzgruppe vom C_α-Atom der N-terminalen Aminosäure;
3. Einführung einer Urethangruppierung an die Seitenkettenfunktion (bisher nur für PEPT1 gezeigt);
4. Zusätzliche Einführung einer Nitrogruppe in die Seitenkettenschutzgruppe der N-terminalen Aminosäure.

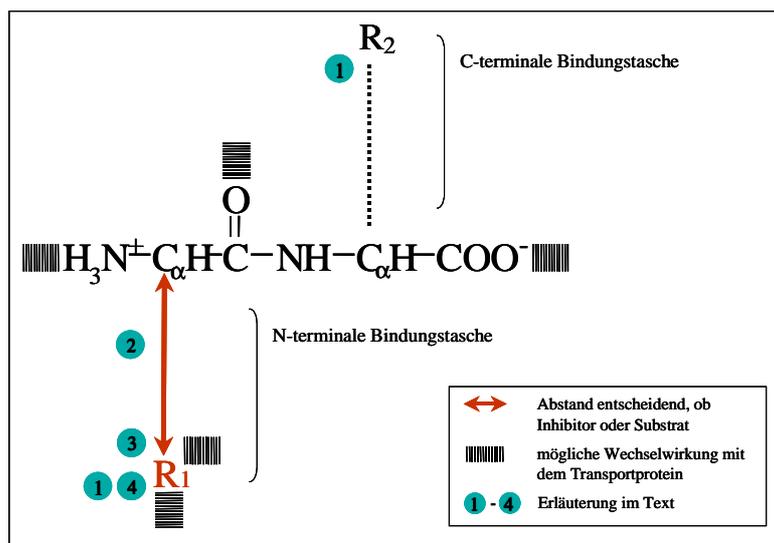


Abbildung 7. Strukturelle Anforderungen an Inhibitoren von PEPT1 und PEPT2.

Die Untersuchungen zeigten, dass Unterschiede in der Inhibitorspezifität zwischen PEPT1 und PEPT2 bestehen. PEPT2 ist hinsichtlich des Abstandes der Schutzgruppe zum C_α-Atom restriktiver. Durch Verkürzung um eine CH₂-Gruppe (Lys(Z)-Ala zu Orn(Z)-Ala) wird Orn(Z)-Ala bei PEPT2 wieder zum Substrat, während es bei PEPT1 ein Inhibitor bleibt. Mögliche Ursachen für die unterschiedliche Inhibitorspezifität könnten unterschiedlich starke Wechselwirkungen und/oder sterische Behinderungen der Schutzgruppe mit dem Transportprotein PEPT1 bzw. PEPT2 sein. Mit Lys[Z(NO₂)]-Val (K_i = 2 μM) bzw. Lys[Z(NO₂)]-Lys[Z(NO₂)] (K_i = 10 nM) wurden Verbindungen mit der bisher höchsten Affinität zu PEPT1 bzw. PEPT2 gefunden.

Die in dieser Arbeit identifizierten Inhibitoren können nach radioaktiver Markierung zur Charakterisierung der Bindungsdomäne von PEPT1 und PEPT2 beitragen. Das kann die bisherigen Erkenntnisse über die Substraterkennungsstelle, die über die Analyse von PEPT1/PEPT2 Chimären und über die ortsgerichtete Mutagenese gewonnen wurden, vertiefen. Des Weiteren kann ein markierter Inhibitor für Bindungsstudien genutzt werden und so Aufschluss über die Anzahl der Transporter pro Zelle geben. Außerdem lässt sich so die Anzahl der Moleküle, die der Transporter pro Sekunde transportiert, bestimmen. Die Unterschiede in der Inhibitorspezifität von PEPT1 und PEPT2 sollten ebenso wie die Unterschiede in der Substratspezifität weiter herausgearbeitet werden. Auf diese Weise wäre die organspezifische Verabreichung von Pharmaka denkbar.

Die Untersuchungen zur Inhibitorspezifität zeigten auch, dass bei der Entwicklung von Prodrugs die Kupplung des Pharmakons an die Seitenkette der C-terminalen Aminosäure des Dipeptids erfolgen sollte. Anderenfalls könnten Inhibitoren des Peptidtransports resultieren. Darüber hinaus könnte auch die Amidgruppe der Peptidbindung als Bindungsstelle für bisher nicht oral applizierbare Wirkstoffe in Betracht gezogen werden. Für die Entwicklung von Prodrugs sind jedoch noch umfangreiche Untersuchungen zur Ermittlung einer geeigneten Targetstruktur erforderlich.

Der dritte Teil der Arbeit beinhaltete die Suche nach Peptidtransportern in anderen Organen. Es gelang erstmals die Identifizierung eines Peptidtransporters in der apikalen Membran der Cholangiozyten des Säugers. Zunächst erfolgte eine funktionelle Untersuchung an der Zell-Linie des extrahepatischen Gallengangs SK-ChA-1. Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar ist protonenabhängig. Der K_t -Wert von 1,1 mM weist auf den niedrig affinen H^+ /Peptidtransporter PEPT1 hin. Ebenso werden verschiedene Dipeptide, Cefadroxil und δ -Aminolävulinsäure mit Affinitäten, die im Bereich von PEPT1 liegen, erkannt. Der transepitheliale Flux von [^{14}C]Gly-Sar in apikaler-zu-basolateraler Richtung übertraf den entgegengesetzten Flux 11-fach. Die Aufnahme in die Zelle war 20-mal höher von der apikalen Seite als von der basolateralen Seite. Mittels molekularbiologischer und immunohistochemischer Methoden konnte die Existenz des niedrig affinen H^+ /Dipeptidtransporters PEPT1 in der apikalen Membran von Cholangiozyten des Säugers verifiziert werden.

Die Zell-Linie SK-ChA-1 kann als Modell für den Transport von Prodrugs und Peptidmimetika und für mögliche klinische Anwendungen des Peptidtransporters im extrahepatischen Gallengang dienen.

5 Literaturverzeichnis

- ABDERHALDEN, E. Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 44, 2 - 52, **1905**.
- ABE, H.; SATOH, M.; MIYAUCHI, S.; SHUTO, S.; MATSUDA, A. & KAMO, N. Conjugation of dipeptide to fluorescent dyes enhances its affinity for a dipeptide transporter (PEPT1) in human intestinal Caco-2 cells. *Bioconjug. Chem.* 10, 24 - 31, **1999**.
- ADDISON, J. M.; BURSTON, D.; DALRYMPLE, J. A.; MATTHEWS, D. M.; PAYNE, J. W.; SLEISENGER, M. H. & WILKINSON, S. A common mechanism for transport of di- and tripeptides by hamster jejunum in vitro. *Clin. Sci. Mol. Med.* 49, 313 - 322, **1975**.
- ADDISON, J. M.; BURSTON, D. & MATTHEWS, D. M. Evidence for active transport of the dipeptide glycylsarcosine by hamster jejunum in vitro. *Clin. Sci.* 43, 907 - 911, **1972**.
- ADDISON, J. M.; BURSTON, D. & MATTHEWS, D. M. Carnosine transport by hamster jejunum in vitro and its inhibition by other di- and tripeptides. *Clin. Sci. Mol. Med.* 45, 3P - 4P, **1973**.
- ADIBI, S. A. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* 113, 332 - 340, **1997**.
- ADIBI, S. A.; KRZYSIK, B. A. & DRASH, A. L. Metabolism of intravenously administered dipeptides in rats: effects on amino acid pools, glucose concentration and insulin and glucagon secretion. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52, 193 - 204, **1977**.
- ADIBI, S. A. & PHILLIPS, E. Evidence for greater absorption of amino acids from peptide than from free form by human intestine. *Clin. Res.* 16, 446, **1968**.
- ALVARO, D. Biliary epithelium: a new chapter in cell biology. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 31, 78 - 83, **1999**.
- AMASHEH, S.; WENZEL, U.; BOLL, M.; DORN, D.; WEBER, W.; CLAUSS, W. & DANIEL, H. Transport of charged dipeptides by the intestinal H⁺/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membr. Biol.* 155, 247 - 256, **1997**.
- ANDERSON, R. P.; BUTT, T. J. & CHADWICK, V. S. Hepatobiliary excretion of bacterial formyl-methionyl peptides in rat. Structure activity studies. *Dig. Dis. Sci.* 37, 248 - 256, **1992**.
- BAILEY, P. D.; BOYD, C. A.; BRONK, J. R.; COLLIER, I. D.; MEREDITH, D.; MORGAN, K. M. & TEMPLE, C. S. How to make drugs orally active: a substrate template for peptide transporter PepT1. *Angw. Chem. Int. Ed.* 39, 505 - 508, **2000**.
- BALLATORI, N.; JACOB, R.; BARRETT, C. & BOYER, J. L. Biliary catabolism of glutathione and differential reabsorption of its amino acid constituents. *Am. J. Physiol.* 254, G1 - G7, **1988**.
- BENOIT, F. L. & WATTEN, R. H. Renal tubular transport of hydroxyproline peptides: Evidence for reabsorption and secretion. *Metabolism* 17, 20 - 33, **1968**.
- BERGER, U. V. & HEDIGER, M. A. Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system. *Anat. Embryol. (Berl)* 199, 439 - 449, **1999**.
- BERTELOOT, A. & SEMENZA, G. Advantages and limitations of vesicles for the characterization and the kinetic analysis of transport systems. *Methods Enzymol.* 192, 409 - 437, **1990**.

- BOCKMAN, D. E.; GANAPATHY, V.; OBLAK, T. G. & LEIBACH, F. H. Localization of peptide transporter in nuclei and lysosomes of the pancreas. *Int. J. Pancreatol.* 22, 221 - 225, **1997**.
- BOLGER, M. B.; HAWORTH, I. S.; YEUNG, A. K.; ANN, D.; VON GRAFENSTEIN, H.; HAMM-ALVAREZ, S.; OKAMOTO, C. T.; KIM, K. J.; BASU, S. K.; WU, S. & LEE, V. H. Structure, function, and molecular modeling approaches to the study of the intestinal dipeptide transporter PepT1. *J. Pharm. Sci.* 87, 1286 - 1291, **1998**.
- BOLL, M.; HERGET, M.; WAGENER, M.; WEBER, W. M.; MARKOVICH, D.; BIBER, J.; CLAUSS, W.; MURER, H. & DANIEL, H. Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 284 - 289, **1996**.
- BÖRNER, V. Einfluss von Strukturparametern auf die Interaktion von Aminosäure- und Peptidderivaten mit dem intestinalen H⁺/Peptidsymporter PEPT1. Dissertation am Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2002**.
- BÖRNER, V.; FEI, Y. J.; HARTRODT, B.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H.; NEUBERT, K. & BRANDSCH, M. Transport of amino acid aryl amides by the intestinal H⁺/peptide cotransport system, PEPT1. *Eur. J. Biochem.* 255, 698 - 702, **1998**.
- BRANDSCH, M.; BRANDSCH, C.; GANAPATHY, M. E.; CHEW, C. S.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H⁺/peptide cotransport systems in intestine (PEPT 1) and kidney (PEPT 2). *Biochim. Biophys. Acta* 1324, 251 - 262, **1997**.
- BRANDSCH, M.; BRANDSCH, C.; PRASAD, P. D.; GANAPATHY, V.; HOPFER, U. & LEIBACH, F. H. Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter. *FASEB J.* 9, 1489 - 1496, **1995**.
- BRANDSCH, M.; KNÜTTER, I. & LEIBACH, F. H. The intestinal H⁺/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships. *Eur. J. Pharm. Sci.* invited review, im Druck, **2003**.
- BRANDSCH, M., KNÜTTER, I., THUNECKE, F., HARTRODT, B., BORN, I., BÖRNER, V., HIRCHE, F., FISCHER, G., NEUBERT, K. Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H⁺/peptide symporter. *Eur. J. Biochem.* 266, 502-508, **1999**.
- BRANDSCH, M.; MIYAMOTO, Y.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H⁺ cotransport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem. J.* 299, 253 - 260, **1994**.
- BRANDSCH, M.; THUNECKE, F.; KÜLLERTZ, G.; SCHUTKOWSKI, M.; FISCHER, G. & NEUBERT, K. Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter, PEPT1. *J. Biol. Chem.* 273, 3861 - 3864, **1998**.
- BRETSCHNEIDER, B.; BRANDSCH, M. & NEUBERT, R. Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm. Res.* 16, 55 - 61, **1999**.
- BRODIN, B.; NIELSEN, C. U.; STEFFANSEN, B. & FROKJAER, S. Transport of peptidomimetic drugs by the intestinal di/tri-peptide transporter, PepT1. *Pharmacology & Toxicology* 90, 285 - 296, **2002**.
- CAJORI, F. A. The enzyme activity of dogs` intestinal juice and its relation to intestinal digestion. *Am. J. Physiol.* 104, 659 - 668, **1933**.

- CHEN, X. Z.; STEEL, A. & HEDIGER, M. A. Functional roles of histidine and tyrosine residues in the H⁺-peptide transporter PepT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 726 - 730, **2000**.
- CHEN, X. Z.; ZHU, T.; SMITH, D. E. & HEDIGER, M. A. Stoichiometry and kinetics of the high-affinity H⁺-coupled peptide transporter PepT2. *J. Biol. Chem.* 274, 2773 - 2779, **1999**.
- CHESNEY, R. W.; JONES, D. & ZELIKOVIC, I. Renal amino acid transport: cellular and molecular events from clearance studies to frog eggs. *Pediatr. Nephrol.* 7, 574 - 584, **1993**.
- COHNHEIM, O. Die Umwandlung des Eiweiss durch die Darmwand. *Z. Physiol. Chemie* 33, 451 - 465, **1901**.
- COVITZ, K. M.; AMIDON, G. L. & SADEE, W. Membrane topology of the human dipeptide transporter, hPEPT1, determined by epitope insertions. *Biochemistry* 37, 15214 - 15221, **1998**.
- CRAFT, I. L.; GEDDES, D.; HYDE, C. W.; WISE, I. J. & MATTHEWS, D. M. Absorption and malabsorption of glycine and glycine peptides in man. *Gut* 9, 425 - 437, **1968**.
- DANIEL, H. Function and molecular structure of brush border membrane peptide/H⁺ symporters. *J. Membr. Biol.* 154, 197 - 203, **1996**.
- DANIEL, H. & ADIBI, S. A. Transport of beta-lactam antibiotics in kidney brush border membrane. Determinants of their affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter. *J. Clin. Invest.* 92, 2215 - 2223, **1993**.
- DANIEL, H. & ADIBI, S. A. Functional separation of dipeptide transport and hydrolysis in kidney brush border membrane vesicles. *FASEB J.* 8, 753 - 759, **1994**.
- DANIEL, H. & HERGET, M. Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am. J. Physiol.* 273, F1 - F8, **1997**.
- DANIEL, H.; MORSE, E. L. & ADIBI, S. A. Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane. *J. Biol. Chem.* 267, 9565 - 9573, **1992**.
- DANTZIG, A. H. Oral absorption of β -lactam by intestinal peptide transport proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 63 - 76, **1997**.
- DELIE, F. & RUBAS, W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14, 221 - 286, **1997**.
- DIECK, S. T.; HEUER, H.; EHRCHEN, J.; OTTO, C. & BAUER, K. The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys- N-epsilon-AMCA in astrocytes. *Glia* 25, 10 - 20, **1999**.
- DÖRING, F.; DORN, D.; BACHFISCHER, U.; AMASHEH, S.; HERGET, M. & DANIEL, H. Functional analysis of a chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J. Physiol.* 497, 773 - 779, **1996**.
- DÖRING, F.; MARTINI, C.; WALTER, J. & DANIEL, H. Importance of a Small N-Terminal Region in Mammalian Peptide Transporters for Substrate Affinity and Function. *J. Membr. Biol.* 186, 55 - 62, **2002**.
- DÖRING, F.; THEIS, S. & DANIEL, H. Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PepT1 in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 656 - 662, **1997**.

- DÖRING, F.; WALTER, J.; WILL, J.; FOCKING, M.; BOLL, M.; AMASHEH, S.; CLAUSS, W. & DANIEL, H. Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J. Clin. Invest.* 101, 2761 - 2767, **1998a**.
- DÖRING, F.; WILL, J.; AMASHEH, S.; CLAUSS, W.; AHLBRECHT, H. & DANIEL, H. Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 273, 23211 - 23218, **1998b**.
- DRINGEN, R.; HAMPRECHT, B. & BROER, S. The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures. *J. Neurochem.* 71, 388 - 393, **1998**.
- DYER, J.; BEECHEY, R. B.; GORVEL, J. P.; SMITH, R. T.; WOOTTON, R. & SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Glycyl-L-proline transport in rabbit enterocyte basolateral-membrane vesicles. *Biochem. J.* 269, 565 - 571, **1990**.
- EDDY, E. P.; WOOD, C.; MILLER, J.; WILSON, G. & HIDALGO, I. J. A comparison of the affinities of dipeptides and antibiotics for the di-/tripeptide transporter in Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.* 115, 79 - 86, **1995**.
- FEI, Y. J.; FUJITA, T.; LAPP, D. F.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Two oligopeptide transporters from *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning and functional expression. *Biochem. J.* 332, 565 - 572, **1998a**.
- FEI, Y. J.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58, 239 - 261, **1998b**.
- FEI, Y. J.; KANAI, Y.; NUSSBERGER, S.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H.; ROMERO, M. F.; SINGH, S. K.; BORON, W. F. & HEDIGER, M. A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 368, 563 - 566, **1994**.
- FEI, Y. J.; LIU, J. C.; FUJITA, T.; LIANG, R.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporters PEPT1 and PEPT2 using PEPT1-PEPT2 and PEPT2-PEPT1 chimeras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 39 - 44, **1998c**.
- FEI, Y. J.; LIU, W.; PRASAD, P. D.; KEKUDA, R.; OBLAK, T. G.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H⁺/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry* 36, 452 - 460, **1997**.
- FEI, Y. J.; NARA, E.; LIU, J. C.; BOYD, C. A.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Preferential recognition of zwitterionic dipeptides as transportable substrates by the high-affinity peptide transporter PEPT2. *Biochim. Biophys. Acta* 1418, 344 - 351, **1999**.
- FEI, Y. J.; ROMERO, M. F.; KRAUSE, M.; LIU, J. C.; HUANG, W.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. A novel H⁺-coupled oligopeptide transporter (OPT3) from *Caenorhabditis elegans* with a predominant function as a H(+) channel and an exclusive expression in neurons. *J. Biol. Chem.* 275, 9563 - 9571, **2000a**.
- FEI, Y. J.; SUGAWARA, M.; LIU, J. C.; LI, H. W.; GANAPATHY, V.; GANAPATHY, M. E. & LEIBACH, F. H. cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 145 - 154, **2000b**.
- FOGH, J.; FOGH, J. M. & ORFEO, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221 - 226, **1977**.

- GANAPATHY, M. E.; BRANDSCH, M.; PRASAD, P. D.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Differential recognition of beta-lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J. Biol. Chem.* 270, 25672 - 25677, **1995**.
- GANAPATHY, M. E.; HUANG, W.; WANG, H.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 470 - 475, **1998**.
- GANAPATHY, M. E.; MAHESH, V. B.; DEVOE, L. D.; LEIBACH, F. H. & GANAPATHY, V. Dipeptide transport in brush-border membrane vesicles isolated from normal term human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 153, 83 - 86, **1985**.
- GANAPATHY, V.; BRANDSCH, M. & LEIBACH, F. H. Intestinal transport of amino acids and peptides. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Edited by L.R. Johnson. New York: Raven Press, 1773 - 1794, **1994**.
- GANAPATHY, V.; GANAPATHY, M. E. & LEIBACH, F. H. Intestinal Transport of Peptides and Amino Acids. In: *Gastrointestinal Transport. Molecular Physiology*. Edition: Current Topics in membranes. Edited by Barrett, K. E.; Donowitz, M., San Diego: Academic Press Inc. 50, 379 - 412, **2001**.
- GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Peptide transport in rabbit kidney. Studies with L-carnosine. *Biochim. Biophys. Acta* 691, 362 - 366, **1982**.
- GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient? *Am. J. Physiol.* 249, G153 - G160, **1985**.
- GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Carrier-mediated reabsorption of small peptides in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 251, F945 - F953, **1986**.
- GANAPATHY, V.; MENDICINO, J. F. & LEIBACH, F. H. Evidence for a dipeptide transport system in renal brush border membranes from rabbit. *Biochim. Biophys. Acta* 642, 381 - 391, **1981**.
- GRONEBERG, D. A.; DÖRING, F.; EYNOTT, P. R.; FISCHER, A. & DANIEL, H. Intestinal peptide transport: ex vivo uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1. *Am. J. Physiol.* 281, G697 - G704, **2001a**.
- GRONEBERG, D. A.; DÖRING, F.; NICKOLAUS, M.; DANIEL, H. & FISCHER, A. Expression of PEPT2 peptide transporter mRNA and protein in glial cells of rat dorsal root ganglia. *Neurosci. Lett.* 304, 181 - 184, **2001b**.
- GRONEBERG, D. A.; DÖRING, F.; THEIS, S.; NICKOLAUS, M.; FISCHER, A. & DANIEL, H. Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein. *Am. J. Physiol.* 282, E1172 - E1179, **2002**.
- GRONEBERG, D. A.; NICKOLAUS, M.; SPRINGER, J.; DÖRING, F.; DANIEL, H. & FISCHER, A. Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake. *Am. J. Pathol.* 158, 707 - 714, **2001c**.
- HAGTING, A.; KUNJI, E. R.; LEENHOUTS, K. J.; POOLMAN, B. & KONINGS, W. N. The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 269, 11391 - 11399, **1994**.
- HARTRODT, B.; BÖRNER, V.; KNÜTTER, I.; BORN, I.; BRANDSCH, M. & NEUBERT, K. Intestinal H⁺/peptide cotransport: Investigation of transporter-substrate interaction. In: *Peptides 1998 - Proc. 25th European Peptide Symposium*. Bajusz, S., Hudecz, F. (Eds.), Akademiai Kiado, Budapest, p. 586-587, **1998**.

- HARTRODT, B.; THEIS, S.; KNÜTTER, I.; BÖRNER, V.; BORN, I.; BRANDSCH, M.; DANIEL, H. & NEUBERT, K. New Insight into the Stereospecificity of the Intestinal H⁺/Peptide Symporter. In: *Peptides 2000 - Proc. 26th European Peptide Symposium*. Martinez, J., Fehrentz, J.-A. (Eds.), Editions EDK, Paris, p. 983-984, **2000**.
- HEDIGER, M. A.; COADY, M. J.; IKEDA, T. S. & WRIGHT, E. M. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330, 379 - 381, **1987**.
- HELLIER, M. D.; HOLDSWORTH, C. D.; PERRETT, D. & THIRUMALAI, C. Intestinal dipeptide transport in normal and cystinuric subjects. *Clin. Sci.* 43, 659 - 668, **1972**.
- HIDALGO, I. J.; BHATNAGAR, P.; LEE, C. P.; MILLER, J.; CUCULLINO, G. & SMITH, P. L. Structural requirements for interaction with the oligopeptide transporter in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 12, 317 - 319, **1995**.
- HIDALGO, I. J.; RAUB, T. J. & BORCHARDT, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736 - 749, **1989**.
- HIRAYAMA, B. A.; DIEZ-SAMPEDRO, A. & WRIGHT, E. M. Common mechanisms of inhibition for the Na⁺/glucose (hSGLT1) and Na⁺/Cl⁻/GABA (hGAT1) cotransporters. *Br. J. Pharmacol.* 134, 484 - 495, **2001**.
- HU, M. & AMIDON, G. L. Passive and carrier-mediated intestinal absorption components of captopril. *J. Pharm. Sci.* 77, 1007 - 1011, **1988**.
- INUI, K. & TERADA, T. Dipeptide transporters. *Pharm. Biotechnol.* 12, 269 - 288, **1999**.
- INUI, K.; TOMITA, Y.; KATSURA, T.; OKANO, T.; TAKANO, M. & HORI, R. H⁺ coupled active transport of bestatin via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 482 - 486, **1992**.
- IRIE, M.; TERADA, T.; SAWADA, K.; SAITO, H. & INUI, K. Recognition and transport characteristics of nonpeptidic compounds by basolateral peptide transporter in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 711 - 717, **2001**.
- JANSEN, P. L. Foreword: from classic bile physiology to cloned transporters. *Semin. Liver Dis.* 20, 245 - 250, **2000**.
- KARARLI, T. T. Gastrointestinal absorption of drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 39 - 86, **1989**.
- KATO, M.; MAEGAWA, H.; OKANO, T.; INUI, K. & HORI, R. Effect of various chemical modifiers on H⁺ coupled transport of cephradine via dipeptide carriers in rabbit intestinal brush-border membranes: role of histidine residues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251, 745 - 749, **1989**.
- KIMMICH, G. A. Isolation of intestinal epithelial cells and evaluation of transport functions. *Methods Enzymol.* 192, 324 - 340, **1990**.
- KNUTH, A.; GABBERT, H.; DIPPOLD, W.; KLEIN, O.; SACHSSE, W.; BITTERSUERMANN, D.; PRELLWITZ, W. & MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. Biliary adenocarcinoma. Characterisation of three new human tumor cell lines. *J. Hepatol.* 1, 579 - 596, **1985**.
- KNÜTTER, I. Einige Aspekte zu den strukturellen Anforderungen an den intestinalen PEPT1-Transporter. Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **1998**.

- KNÜTTER, I.; HARTRODT, B.; THEIS, S.; FOLTZ, M.; RASTETTER, M.; DANIEL, H.; NEUBERT, K. & BRANDSCH, M. Analysis of the transport properties of side chain modified dipeptides at the mammalian peptide transporter PEPT1. *Eur. J. Pharm. Sci.* Im Druck, **2003**.
- KNÜTTER, I.; RUBIO-ALIAGA, I.; BOLL, M.; HAUSE, G.; DANIEL, H.; NEUBERT, K. & BRANDSCH, M. H⁺-peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1. *Am. J. Physiol.* 283, G222 - G229, **2002**.
- KNÜTTER, I.; THEIS, S.; HARTRODT, B.; BORN, I.; BRANDSCH, M.; DANIEL, H. & NEUBERT, K. A novel inhibitor of the mammalian peptide transporter PEPT1. *Biochemistry* 40, 4454 - 4458, **2001**.
- KOTTRA, G.; STAMFORD, A. & DANIEL, H. PEPT1 as a paradigm for membrane carriers that mediate electrogenic bidirectional transport of anionic, cationic, and neutral substrates. *J. Biol. Chem.* 277, 32683 - 32691, **2002**.
- LEE, C. P.; DE VRUEH, R. L. & SMITH, P. L. Transport of a prodrug of acyclovir, L-Valacyclovir, via the oligopeptide transporter. *Proceed. Inter. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23, 47-48, **1996**.
- LEIBACH, F. H. & GANAPATHY, V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 99 - 119, **1996**.
- LI, J. & HIDALGO, I. J. Molecular modeling study of structural requirements for the oligopeptide transporter. *J. Drug Target* 4, 9 - 17, **1996**.
- LI, J.; TAMURA, K.; LEE, C. P.; SMITH, P. L.; BORCHARDT, R. T. & HIDALGO, I. J. Structure-affinity relationships of Val-Val and Val-Val-Val stereoisomers with the apical oligopeptide transporter in human intestinal Caco-2 cells. *J. Drug Target* 5, 317 - 327, **1998**.
- LIANG, R.; FEI, Y. J.; PRASAD, P. D.; RAMAMOORTHY, S.; HAN, H.; YANG-FENG, T.L.; HEDIGER, M. A.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* 270, 6456 - 6463, **1995**.
- LISTER, N.; SYKES, A. P.; BAILEY, P. D.; BOYD, C. A. & BRONK, J. R. Dipeptide transport and hydrolysis in isolated loops of rat small intestine: effects of stereospecificity. *J. Physiol.* 484, 173 - 182, **1995**.
- LIU, W.; LIANG, R.; RAMAMOORTHY, S.; FEI, Y. J.; GANAPATHY, M. E.; HEDIGER, M. A.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1235, 461 - 466, **1995**.
- MACKENZIE, B.; LOO, D. D.; FEI, Y.; LIU, W. J.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H. & WRIGHT, E. M. Mechanisms of the human intestinal H⁺-coupled oligopeptide transporter hPEPT1. *J. Biol. Chem.* 271, 5430 - 5437, **1996**.
- MAFFIA, M.; RIZZELLO, A.; ACIERNO, R.; VERRI, T.; ROLLO, M.; DANIELI, A.; DORING, F.; DANIEL, H.; STORELLI, C. Characterisation of intestinal peptide transporter of the Antarctic haemoglobinless teleost *Chionodraco hamatus*. *J. Exp. Biol.* 206, 705-714, **2003**.
- MATTHEWS, D. M. Intestinal absorption of peptides. *Physiol. Rev.* 55, 537 - 608, **1975**.
- MATTHEWS, D. M. & LASTER, L. Absorption of protein digestion products: a review. *Gut* 6, 411 - 426, **1965**.

- MEREDITH, D. & BOYD, C. A. Structure and function of eukaryotic peptide transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 754 - 778, **2000**.
- MEREDITH, D.; BOYD, C. A.; BRONK, J. R.; BAILEY, P. D.; MORGAN, K. M.; COLLIER, I. D. & TEMPLE, C. S. 4-Aminomethylbenzoic acid is a non-translocated competitive inhibitor of the epithelial peptide transporter PepT1. *J. Physiol.* 512, 629 - 634, **1998**.
- MEREDITH, D. & LAYNES, R. W. Dipeptide transport in brush-border membrane vesicles (BBMV) prepared from human full-term placentae. *Placenta* 17, 173 - 179, **1996**.
- MEREDITH, D.; TEMPLE, C. S.; GUHA, N.; SWORD, C. J.; BOYD, C. A.; COLLIER, I. D.; MORGAN, K. M. & BAILEY, P. D. Modified amino acids and peptides as substrates for the intestinal peptide transporter PepT1. *Eur. J. Biochem.* 267, 3723 - 3728, **2000**.
- MIYAMOTO, Y.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. Identification of histidyl and thiol groups at the active site of rabbit renal dipeptide transporter. *J. Biol. Chem.* 261, 16133 - 16140, **1986**.
- MIZUMA, T.; MASUBUCHI, S. & AWAZU, S. Intestinal absorption of stable cyclic glycyl-phenylalanine: comparison with the linear form. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 1067 - 1071, **1997**.
- MOORE, V. A.; IRWIN, W. J.; TIMMINS, P.; CHONG, S.; DANDO, S. A. & MORRISON, R. A. A rapid screening system to determine drug affinities for the intestinal dipeptide transporter 1: system characterisation. *Int. J. Pharm.* 210, 15 - 27, **2000a**.
- MOORE, V. A.; IRWIN, W. J.; TIMMINS, P.; LAMBERT, P. A.; CHONG, S.; DANDO, S. A. & MORRISON, R. A. A rapid screening system to determine drug affinities for the intestinal dipeptide transporter 2: affinities of ACE inhibitors. *Int. J. Pharm.* 210, 29 - 44, **2000b**.
- MURER, H.; GMAJ, P.; STEIGER, B. & HAGENBUCH, B. Transport studies with renal proximal tubular and small intestinal brush border and basolateral membrane vesicles: vesicle heterogeneity, coexistence of transport system. *Methods Enzymol.* 172, 346 - 364, **1989**.
- NAKAJIMA, H.; HAGTING, A.; KUNJI, E. R.; POOLMAN, B. & KONINGS, W. N. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the di- and tripeptide transport protein of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2213 - 2217, **1997**.
- NEUMANN, J. & BRANDSCH, M. Delta-aminolevulinic acid transport in cancer cells of the human extrahepatic biliary duct. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 219 - 224, **2003**.
- NEWAY, H. & SMYTH, D. H. The intestinal absorption of some dipeptides. *J. Physiol.* 135, 43P - 44P, **1959**.
- NEWAY, H. & SMYTH, D. H. Cellular mechanisms in intestinal transfer of amino acids. *J. Physiol.* 164, 527 - 551, **1962**.
- NIELSEN, C. U.; ANDERSEN, R.; BRODIN, B.; FROKJAER, S.; TAUB, M. E. & STEFFANSEN, B. Dipeptide model prodrugs for the intestinal oligopeptide transporter. Affinity for and transport via hPepT1 in the human intestinal Caco-2 cell line. *J. Control. Release* 76, 129 - 138, **2001**.
- NOVAKOVA, R.; HOMEROVA, D.; KINNE, R. K.; KINNE-SAFFRAN, E. & LIN, J. T. Identification of a region critically involved in the interaction of phlorizin with the rabbit sodium-D-glucose cotransporter SGLT1. *J. Membr. Biol.* 184, 55 - 60, **2001**.

- NOVOTNY, A.; XIANG, J.; STUMMER, W.; TEUSCHER, N. S.; SMITH, D. E. & KEEP, R. F. Mechanisms of 5-aminolevulinic acid uptake at the choroid plexus. *J. Neurochem.* 75, 321 - 328, **2000**.
- OGIHARA, H.; SAITO, H.; SHIN, B. C.; TERADO, T.; TAKENOSHITA, S.; NAGAMACHI, Y.; INUI, K. & TAKATA, K. Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 848 - 852, **1996**.
- OH, S. H.; CHO, K. W.; KIM, S. H.; JEONG, G. B.; KANG, C. W.; HWANG, Y. H.; SEUL, K. H. & CHO, B. H. Identification of immunoreactive atrial natriuretic peptide in the gallbladder and bile juice of rabbit, pig and human. *Regul. Pept.* 49, 217 - 223, **1994**.
- PAULSEN, I. T. & SKURRAY, R. A. The POT family of transport proteins. *Trends Biochem. Sci.* 19, 404, **1994**.
- PENG, Q.; WARLOE, T.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M.; GIERCKSKY, K. E. & NESLAND, J. M. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* 79, 2282 - 2308, **1997**.
- PERRY, J. R.; BASRAI, M. A.; STEINER, H. Y.; NAIDER, F. & BECKER, J. M. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol. Cell. Biol.* 14, 104 - 115, **1994**.
- QUAY, J. F. Transport interaction of glycine and cephalalexin in rat jejunum. *The Physiologist* 15, 241 - **1972**.
- RAEISSI, S. D.; LI, J. & HIDALGO, I. J. The role of an alpha-amino group on H⁺-dependent transepithelial transport of cephalosporins in Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 35 - 40, **1999**.
- ROBERTS, S. K.; LUDWIG, J. & LARUSSO, N. F. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 112, 269 - 279, **1997**.
- ROMAN, G.; MELLER, V.; WU, K. H. & DAVIS, R. L. The opt1 gene of *Drosophila melanogaster* encodes a proton-dependent dipeptide transporter. *Am. J. Physiol.* 275, C857 - C869, **1998**.
- RUBIO-ALIAGA, I.; BOLL, M. & DANIEL, H. Cloning and characterization of the gene encoding the mouse peptide transporter PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 734 - 741, **2000**.
- RUBIO-ALIAGA, I. & DANIEL, H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 434 - 440, **2002**.
- SAITO, H. & INUI, K. Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* 265, G289 - G294, **1993**.
- SAITO, H.; MOTOHASHI, H.; MUKAI, M. & INUI, K. Cloning and characterization of a pH-sensing regulatory factor that modulates transport activity of the human H⁺/peptide cotransporter, PEPT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 577 - 582, **1997**.
- SAITO, H.; OKUDA, M.; TERADA, T.; SASAKI, S. & INUI, K. Cloning and characterization of a rat H⁺/peptide cotransporter mediating absorption of beta-lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 1631 - 1637, **1995**.
- SAITO, H.; TERADA, T.; OKUDA, M.; SASAKI, S. & INUI, K. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim. Biophys. Acta* 1280, 173 - 177, **1996**.

- SAKATA, K.; YAMASHITA, T.; MAEDA, M.; MORIYAMA, Y.; SHIMADA, S. & TOHYAMA, M. Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochem. J.* 356, 53 - 60, **2001**.
- SAWADA, K.; TERADA, T.; SAITO, H.; HASHIMOTO, Y. & INUI, K. I. Recognition of L-amino acid ester compounds by rat peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 705 - 709, **1999**.
- SEAL, C. J. & PARKER, D. S. Isolation and characterization of circulating low molecular weight peptides in steer, sheep and rat portal and peripheral blood. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B, 679 - 685, **1991**.
- SHEN, H.; SMITH, D. E.; YANG, T.; HUANG, Y. G.; SCHNERMANN, J. B. & BROSIUS III, F. C. Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 276, F658 - F665, **1999**.
- SHEPHERD, E.; LISTER, N.; AFFLECK, J.; BRONK, J.; KELLETT, G.; COLLIER, I.; BAILEY, P. & BOYD, C. Identification of a candidate membrane protein for the basolateral peptide transporter of rat small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 918 - 922, **2002**.
- SILBERNAGL, S.; GANAPATHY, V. & LEIBACH, F. H. H^+ -gradient-driven dipeptide reabsorption in proximal tubule of rat kidney. Studies in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.* 253, F448 - F457, **1987**.
- SNYDER, N. J.; TABAS, L. B.; BERRY, D. M.; DUCKWORTH, D. C.; SPRY, D. O. & DANTZIG, A. H. Structure-activity relationship of carbacephalosporins and cephalosporins: antibacterial activity and interaction with the intestinal proton-dependent dipeptide transport carrier of Caco-2 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1649 - 1657, **1997**.
- STARK, M.; JORNVALL, H. & JOHANSSON, J. Isolation and characterization of hydrophobic polypeptides in human bile. *Eur. J. Biochem.* 266, 209 - 214, **1999**.
- STARLING, E. H. Recent advances in the physiology of digestion. London: *Constable*, 127, **1906**.
- STEEL, A.; NUSSBERGER, S.; ROMERO, M. F.; BORON, W. F.; BOYD, C. A. & HEDIGER, M. A. Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. *J. Physiol.* 498, 563 - 569, **1997**.
- STEINER, H. Y.; NAIDER, F. & BECKER, J. M. The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol. Microbiol.* 16, 825 - 834, **1995**.
- STEINER, H. Y.; SONG, W.; ZHANG, L.; NAIDER, F.; BECKER, J. M. & STACEY, G. An Arabidopsis peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *Plant Cell* 6, 1289 - 1299, **1994**.
- STEINHARDT, H. J.; ADIBI, S. A. Kinetics and characteristics of absorption from an equimolar mixture of 12 glycyL-dipeptides in human jejunum. *Gastroenterology* 90, 577 - 582, **1986**.
- SUGAWARA, M.; HUANG, W.; FEI, Y. J.; LEIBACH, F. H.; GANAPATHY, V. & GANAPATHY, M. E. Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J. Pharm. Sci.* 89, 781 - 789, **2000**.
- SWAAN, P. W.; KOOPS, B. C.; MORET, E. E. & TUKKER, J. J. Mapping the binding site of the small intestinal peptide carrier (PepT1) using comparative molecular field analysis. *Receptors and Channels* 6, 189 - 200, **1998**.

- TAMAI, I.; NAKANISHI, T.; NAKAHARA, H.; SAI, Y.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H. & TSUJI, A. Improvement of L-dopa absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PepT1. *J. Pharm. Sci.* 87, 1542 - 1546, **1998**.
- TAMURA, K.; BHATNAGAR, P. K.; TAKATA, J. S.; LEE, C. P.; SMITH, P. L. & BORCHARDT, R. T. Metabolism, uptake, and transepithelial transport of the diastereomers of Val-Val in the human intestinal cell line, Caco-2. *Pharm. Res.* 13, 1213 - 1218, **1996a**.
- TAMURA, K.; LEE, C. P.; SMITH, P. L. & BORCHARDT, R. T. Effect of charge on oligopeptide transporter-mediated permeation of cyclic dipeptides across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* 13, 1752 - 1754, **1996b**.
- TARLOW, M. J.; SEAKINS, J. W.; LLOYD, J. K.; MATTHEWS, D. M.; CHENG, B. & THOMAS, A. J. Intestinal absorption and biopsy transport of peptides and amino acids in Hartnup disease. *Clin. Sci.* 39, 18P - 19P, **1970**.
- TATEOKA, R.; ABE, H.; MIYAUCHI, S.; SHUTO, S.; MATSUDA, A.; KOBAYASHI, M.; MIYAZAKI, K. & KAMO, N. Significance of substrate hydrophobicity for recognition by an oligopeptide transporter (PEPT1). *Bioconjug. Chem.* 12, 485 - 492, **2001**.
- TAUB, M. E.; LARSEN, B. D.; STEFFANSEN, B. & FROKJAER, S. β -carboxylic acid esterified D-Asp-Ala retains a high affinity for the oligopeptide transporter in Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.* 146, 205 - 212, **1997a**.
- TAUB, M. E.; MOSS, B. A.; STEFFANSEN, B. & FROKJAER, S. Influence of oligopeptide transporter binding affinity upon uptake and transport of D-Asp(OBzl)-Ala and Asp(OBzl)-Sar in filtergrown Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.* 156, 219 - 228, **1997b**.
- TAUB, M. E.; MOSS, B. A.; STEFFANSEN, B. & FROKJAER, S. Oligopeptide transporter mediated uptake and transport of D-Asp(OBzl)-Ala, D-Glu(OBzl)-Ala and D-Ser(Bzl)-Ala in filter-grown Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.* 174, 223 - 232, **1998**.
- TEMPLE, C. S. & BOYD, C. A. Proton-coupled oligopeptide transport by rat renal cortical brush border membrane vesicles: a functional analysis using ACE inhibitors to determine the isoform of the transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1373, 277 - 281, **1998a**.
- TEMPLE, C. S.; STEWART, A. K.; MEREDITH, D.; LISTER, N. A.; MORGAN, K. M.; COLLIER, I. D.; VAUGHAN-JONES, R. D.; BOYD, C. A.; BAILEY, P. D. & BRONK, J. R. Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 273, 20 - 22, **1998b**.
- TERADA, T.; SAITO, H. & INUI, K. Interaction of beta-lactam antibiotics with histidine residue of rat H⁺/peptide cotransporters, PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem.* 273, 5582 - 5585, **1998**.
- TERADA, T.; SAITO, H.; MUKAI, M. & INUI, K. Characterization of stably transfected kidney epithelial cell line expressing rat H⁺/peptide cotransporter PEPT1: localization of PEPT1 and transport of beta-lactam antibiotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 1415 - 1421, **1997**.
- TERADA, T.; SAITO, H.; MUKAI, M. & INUI, K. I. Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H⁺/peptide cotransporter, PEPT1. *FEBS Lett.* 394, 196 - 200, **1996**.
- TERADA, T.; SAITO, H.; SAWADA, K.; HASHIMOTO, Y. & INUI, K. N-terminal halves of rat H⁺/peptide transporters are responsible for their substrate recognition. *Pharm. Res.* 17, 15 - 20, **2000a**.

- TERADA, T.; SAWADA, K.; IRIE, M.; SAITO, H.; HASHIMOTO, Y. & INUI, K. Structural requirements for determining the substrate affinity of peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Pflügers Arch.* 440, 679 - 684, **2000b**.
- TERADA, T.; SAWADA, K.; ITO, T.; SAITO, H.; HASHIMOTO, Y. & INUI, K. Functional expression of novel peptide transporter in renal basolateral membranes. *Am. J. Physiol.* 279, F851 - F857, **2000c**.
- TERADA, T.; SAWADA, K.; SAITO, H.; HASHIMOTO, Y. & INUI, K. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* 276, G1435 - G1441, **1999**.
- THAMOTHARAN, M.; GOMME, J.; ZONNO, V.; MAFFIA, M.; STORELLI, C.; AHEARN, G. A. Electrogenic, proton-coupled, intestinal dipeptide transport in herbivorous and carnivorous teleosts. *Am. J. Physiol.* 270, R939-R947, **1996**.
- THAMOTHARAN, M.; LOMBARDO, Y. B.; BAWANI, S. Z. & ADIBI, S. A. An active mechanism for completion of the final stage of protein degradation in the liver, lysosomal transport of dipeptides. *J. Biol. Chem.* 272, 11786 - 11790, **1997**.
- THEIS, S.; HARTRODT, B.; KOTTRA, G.; NEUBERT, K. & DANIEL, H. Defining Minimal Structural Features in Substrates of the H⁺/Peptide Cotransporter PEPT2 Using Novel Amino Acid and Dipeptide Derivatives. *Mol. Pharmacol.* 61, 214 - 221, **2002a**.
- THEIS, S.; KNÜTTER, I.; HARTRODT, B.; BRANDSCH, M.; KOTTRA, G.; NEUBERT, K. & DANIEL, H. Synthesis and characterization of high-affinity inhibitors of the H⁺/peptide transporter PEPT2. *J. Biol. Chem.* 277, 7287 - 7292, **2002b**.
- THWAITES, D. T.; BROWN, C. D.; HIRST, B. H. & SIMMONS, N. L. H⁺-coupled dipeptide (glycylsarcosine) transport across apical and basal borders of human intestinal Caco-2 cell monolayers display distinctive characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* 1151, 237 - 245, **1993a**.
- THWAITES, D. T.; CAVET, M.; HIRST, B. H. & SIMMONS, N. L. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br. J. Pharmacol.* 114, 981 - 986, **1995**.
- THWAITES, D. T.; HIRST, B. H. & SIMMONS, N. L. Direct assessment of dipeptide/H⁺ symport in intact human intestinal (Caco-2) epithelium: a novel method utilising continuous intracellular pH measurement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 432 - 438, **1993b**.
- THWAITES, D. T.; HIRST, B. H. & SIMMONS, N. L. Substrate specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (Caco-2): identification of substrates that undergo H⁺-coupled absorption. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1050 - 1056, **1994**.
- URTTI, A.; JOHNS, S. J. & SADEE, W. Genomic structure of proton-coupled oligopeptide transporter hPEPT1 and pH-sensing regulatory splice variant. *AAPS Pharmsci.* 3, E6, **2001**.
- VAN SLYKE, D. D. & MEYER, G. M. The amino-acid nitrogen of the blood. Preliminary experiments on protein assimilation. *J. Biol. Chem.* 12, 399 - 410, **1912**.
- VERRI, T.; MAFFIA, M.; DANIELI, A.; HERGET, M.; WENZEL, U.; DANIEL, H.; STORELLI, C. Characterisation of the H⁺/peptide cotransporter of eel intestinal brush-border membranes. *J. Exp. Biol.* 203, 2991-3001, **2000**.

- VON HEIJNE, G. Sequence analysis in molecular biology. Treasure trove or trivial pursuit. In: *Protein Sequences: What you can do with your sequence once you have it*. Edited by Harcourt, Brace, Jovanovich. San Diego: Academic Press Inc. 5, 81 - 113, **1987**.
- WALTER, E.; KISSEL, T. & AMIDON, G. L. The intestinal peptide carrier: a potential transport system for small peptide derived drugs. *Adv. Drug. Deliv.* 20, 33 - 58, **1996**.
- WENZEL, U.; DIEHL, D.; HERGET, M. & DANIEL, H. Endogenous expression of the renal high-affinity H⁺-peptide cotransporter in LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* 275, C1573 - C1579, **1998**.
- WENZEL, U.; THWAITES, D. T. & DANIEL, H. Stereoselective uptake of beta-lactam antibiotics by the intestinal peptide transporter. *Br. J. Pharmacol.* 116, 3021 - 3027, **1995**.
- YAMASHITA, T.; SHIMADA, S.; GUO, W.; SATO, K.; KOHMURA, E.; HAYAKAWA, T.; TAKAGI, T. & TOHYAMA, M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J. Biol. Chem.* 272, 10205 - 10211, **1997**.
- YANG, C. Y.; DANTZIG, A. H. & PIDGEON, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.* 16, 1331 - 1343, **1999**.
- YANG, X. D.; MA, J. Y.; BARGER, M. W. & MA, J. K. Transport and utilization of arginine and arginine-containing peptides by rat alveolar macrophages. *Pharm. Res.* 19, 825 - 831, **2002**.
- YEUNG, A. K.; BASU, S. K.; WU, S. K.; CHU, C.; OKAMOTO, C. T.; HAMM-ALVAREZ, S. F.; VON GRAFENSTEIN, H.; SHEN, W. C.; KIM, K. J.; BOLGER, M. B.; HAWORTH, I. S.; ANN, D. K. & LEE, V. H. Molecular identification of a role for tyrosine 167 in the function of the human intestinal proton-coupled dipeptide transporter (hPEPT1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 103 - 107, **1998**.
- ZHOU, X.; THAMOTHARAN, M.; GANGOPADHYAY, A.; SERDIKOFF, C. & ADIBI, S. A. Characterization of an oligopeptide transporter in renal lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1466, 372 - 378, **2000**.

6 Veröffentlichte Originalarbeiten

BRANDSCH, M., **KNÜTTER, I.**, THUNECKE, F., HARTRODT, B., BORN, I., BÖRNER, V., HIRCHE, F., FISCHER, G., NEUBERT, K. Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H⁺/peptide symporter. *Eur. J. Biochem.* 266, 502 - 508, **1999**

KNÜTTER, I., THEIS, S., HARTRODT, B., BORN, I., BRANDSCH, M., DANIEL, H., NEUBERT, K. A novel inhibitor of the mammalian peptide transporter PEPT1. *Biochemistry* 40, 4454 - 4458, **2001**

THEIS, S., **KNÜTTER, I.**, HARTRODT, B., BRANDSCH, M., KOTTRA, G., NEUBERT, K., DANIEL, H. Synthesis and characterization of high affinity inhibitors of the H⁺/peptide transporter PEPT2. *J. Biol. Chem.* 277, 7287 - 7292, **2002**

KNÜTTER, I., HARTRODT, B., THEIS, S., FOLTZ, M., RASTETTER, M., DANIEL, H., NEUBERT, K., BRANDSCH, M. Analysis of the transport properties of side chain modified dipeptides at the mammalian peptide transporter PEPT1. *Eur. J. Pharm. Sci.* im Druck, **2003**

KNÜTTER, I., RUBIO-ALIAGA, I., BOLL, M., HAUSE, G., DANIEL, H., NEUBERT, K., BRANDSCH, M. H⁺-peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1. *Am. J. Physiol.* 283, G222 - G229, **2002**

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Personen bedanken, die wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben oder mich in den letzten Jahren unterstützt haben:

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Neubert für die Vergabe dieses interessanten Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt vor allem PD Dr. Matthias Brandsch, der nicht nur für Fragen und Probleme zu praktischen und theoretischen Aspekten der Arbeit immer ein offenes Ohr hatte.

Dr. Bianka Hartrodt danke ich für ihre Hilfe bei der Auswahl der Dipeptide und Dipeptidderivate und für deren Synthese.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Membrantransport des Biozentrums, bei den Mitarbeitern des Biozentrums und bei der Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie von Prof. Dr. Klaus Neubert möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Neben allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel an der Technischen Universität München möchte ich mich insbesondere bei Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel selbst für die anregenden Diskussionen und bei Stephan Theis, Isabel Rubio-Aliaga, Michael Boll und Martin Foltz für ihre Zusammenarbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Koautoren der beigelegten Veröffentlichungen für ihre Mitarbeit.

Dem Land Sachsen-Anhalt danke ich für die finanzielle Unterstützung (Projekt 2880A/0028L, Graduiertenförderung).

Meiner Familie möchte ich danken für ihre Unterstützung auf meinem Lebensweg.

Mein besonderer Dank gilt Martina, ohne dich hätte ich so manche „Krisen“ nicht gemeistert.

LEBENS LAUF

Name Knütter
Vorname Ilka
Geburtsdatum 15.11.1972
Geburtsort Bad Segeberg, Deutschland
Eltern Klaus Knütter, Lehrer; Gisela Knütter, geb. Mikolajewski, Hausfrau
Familienstand ledig
Anschrift Wielandstr. 23, 06114 Halle/Saale, Deutschland

Ausbildung

1979 - 1983 Grundschule (Heinrich Rantzau Schule, Bad Segeberg)
 1983 - 1992 Gymnasium (Städtisches Gymnasium, Bad Segeberg) mit Abschluss
 Abitur
 1992 - 1993 Studium der Biologie und Chemie am DANA-College in Blair, Nebras-
 ka, USA
 1993 - 1998 Studium der Biochemie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie,
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Hochschulabschluss Diplombiochemiker
 Diplomarbeit: „*Einige Aspekte zu den strukturellen Anforderungen an
 den intestinalen PEPT1-Transporter*“ am Institut für Biochemie, Mar-
 tin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Betreuer: Prof. Dr. K. Neubert und PD Dr. M. Brandsch
 Seit 10.1998 Doktorandin am Institut für Biochemie, Fachbereich Biochemie/Bio-
 technologie und am Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-
 Wittenberg,
 Betreuer: Prof. Dr. K. Neubert und PD Dr. M. Brandsch
 10/1998 - 12/2000 Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt
 6/2000 - 7/2000 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. H. Da-
 niel, Institut für Ernährungswissenschaften, Technische Universität
 München

Ilka Knütter

Halle, den 20.05.2003

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ilka Knütter

Halle (Saale), den 20.05.2003