

**Transport von Aminosäuren und Peptiden an Epithelzellen:
Untersuchungen zu Mechanismus, Spezifität und Regulation**

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der

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

von

Herrn Dr. rer. nat. Matthias Brandsch

geb. am: 10. Februar 1961

in: Halle (Saale)

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. G. Fischer, Halle
2. Frau Prof. Dr. H. Daniel, München
3. Herr Prof. Dr. G. Burckhardt, Göttingen

Halle (Saale), 13. Juni 2000

Veröffentlichte Originalarbeiten

1. Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines (HT-29 and Caco-2) by protein kinase C
Brandsch et al. (1993) *Am. J. Physiol.* 264, G939-G946
2. Regulation of taurine transport by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin in human intestinal cell lines
Brandsch et al. (1995d) *J. Clin. Invest.* 96, 361-369
3. Calmodulin-dependent modulation of pH sensitivity of the amino acid transport system L in human placental choriocarcinoma cells
Brandsch et al. (1994a) *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 177-184
4. Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H⁺ co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line
Brandsch et al. (1994b) *Biochem. J.* 299, 253-260
5. H⁺-peptide cotransport in Madin-Darby canine kidney cells: expression and calmodulin-dependent regulation
Brandsch et al. (1995b) *Am. J. Physiol.* 268, F391-F397
6. Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter
Brandsch et al. (1995a) *FASEB J.* 9, 1489-1496
7. 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)
Brandsch et al. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1324, 251-262
8. Inhibition of the H⁺/peptide cotransporter in the human intestinal cell line Caco-2 by cyclic AMP
Müller et al. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 461-465
9. Transport of amino acid aryl amides by the intestinal H⁺/peptide cotransport system, PEPT1
Börner et al. (1998) *Eur. J. Biochem.* 255, 698-702
10. Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2
Ganapathy et al. (1995a) *J. Biol. Chem.* 270, 25672-25677
11. Intestinal transport of β -lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux
Bretschneider et al. (1999) *Pharm. Res.* 16, 55-61
12. Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter, PEPT1
Brandsch et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 3861-3864
13. Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H⁺/peptide symporter
Brandsch et al. (1999) *Eur. J. Biochem.* 266, 502-508

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einführung.....	1
2	Transport von Taurin am Epithel des Darmes	4
2.1	Allgemeine Aspekte	4
2.2	Charakterisierung des Taurin-Transporters an kultivierten Darmzellen.....	5
2.3	Regulation des intestinalen Taurintransportes.....	5
3	Transport von Leucin am Epithel der Placenta.....	10
3.1	Allgemeine Aspekte	10
3.2	Regulation des placentalen Leucintransportes.....	10
4	Transport von Peptiden und Peptidomimetika an den Epithelien von Darm und Niere	12
4.1	Allgemeine Aspekte	12
4.2	Charakterisierung der Peptid-Transporter an kultivierten Epithelzellen	16
4.3	Regulation des intestinalen und renalen Peptidtransportes	19
4.4	Spezifität des Peptidtransportes	23
4.4.1	Allgemeine Aspekte.....	23
4.4.2	Intestinaler Transport von Aminosäurederivaten.....	25
4.4.3	Intestinaler und renaler Transport von β -Lactam-Antibiotika.....	26
4.4.4	<i>Cis/trans</i> -Konformations-Spezifität des intestinalen H^+ /Peptid-Symporters.....	29
4.5	Ausblick.....	34
5	Zusammenfassung.....	36
6	Literaturverzeichnis	38
7	Veröffentlichte Originalarbeiten	
7.1	Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines (HT-29 and Caco-2) by protein kinase C Brandsch, M. , Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Leibach, F.H. <i>American Journal of Physiology</i> 264: G939-G946, 1993	
7.2	Regulation of taurine transport by <i>Escherichia coli</i> heat-stable enterotoxin and guanylin in human intestinal cell lines Brandsch, M. , Ramamoorthy, S., Marczin, N., Catravas, J.D., Leibach, J.W., Ganapathy, V., Leibach, F.H. <i>Journal of Clinical Investigation</i> 96: 361-369, 1995	
7.3	Calmodulin-dependent modulation of pH sensitivity of the amino acid transport system L in human placental choriocarcinoma cells Brandsch, M. , Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Ganapathy, V. <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> 1192: 177-184, 1994	
7.4	Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/ H^+ co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line Brandsch, M. , Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Leibach, F.H. <i>Biochemical Journal</i> 299: 253-260, 1994	

- 7.5 H⁺-peptide cotransport in Madin-Darby canine kidney cells: expression and calmodulin-dependent regulation
Brandsch, M., Ganapathy, V., Leibach, F.H.
American Journal of Physiology 268: F391-F397, 1995
- 7.6 Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter
Brandsch, M., Brandsch, C., Prasad, P.D., Ganapathy, V., Hopfer, U., Leibach, F.H.
FASEB Journal 9: 1489-1496, 1995
- 7.7 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)
Brandsch, M., Brandsch, C., Ganapathy, M.E., Chew, C.S., Ganapathy, V., Leibach, F.H.
Biochimica et Biophysica Acta 1324: 251-262, 1997
- 7.8 Inhibition of the H⁺/peptide cotransporter in the human intestinal cell line Caco-2 by cyclic AMP
Müller, U., **Brandsch, M.**, Prasad, P.D., Fei, Y.-J., Ganapathy, V., Leibach, F.H.
Biochemical and Biophysical Research Communications 218: 461-465, 1996
- 7.9 Transport of amino acid aryl amides by the intestinal H⁺/peptide cotransport system, PEPT1
Börner, V., Fei, Y.-L., Hartrodt, B., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Neubert, K., **Brandsch, M.**
European Journal of Biochemistry 255: 698-702, 1998
- 7.10 Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2
Ganapathy, M.E., **Brandsch, M.**, Prasad, P.D., Ganapathy, V., Leibach, F.H.
Journal of Biological Chemistry 270: 25672-25677, 1995
- 7.11 Intestinal transport of β -lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux
Bretschneider, B., **Brandsch, M.**, Neubert, R.
Pharmaceutical Research 16: 55-61, 1999
- 7.12 Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter, PEPT1
Brandsch, M., Thunecke, F., Küllertz, G., Schutkowski, M., Fischer, G., Neubert, K.
Journal of Biological Chemistry 273: 3861-3864, 1998
- 7.13 Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H⁺/peptide symporter
Brandsch, M., Knütter, I., Thunecke, F., Hartrodt, B., Born, I., Börner, V., Hirche, F., Fischer, G., Neubert, K.
European Journal of Biochemistry 266: 502-508, 1999

1 Einführung

Eine Grundvoraussetzung für die Evolution lebender Systeme ist ihre Kompartimentierung, insbesondere das Abgrenzen von der Außenwelt. Metazoen haben in der Phylogenese Epithelgewebe entwickelt, die als flächenförmige Zellverbände zum einen die äußere Körperoberfläche bedecken und zum anderen die inneren Hohlräume auskleiden. Ursprünglich grenzen (Deck-) Epithelien Flüssigkeiten unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander ab. Sie gewährleisten eine weitgehende – nicht vollständige – Konstanz der spezifischen Zusammensetzung der Flüssigkeiten, indem sie selektiv die Passage von Substanzen (Solute, Wasser) durch sich hindurch erlauben bzw. verhindern. Die Zellen der Epithelien verfügen dazu über verschiedene **Mechanismen** zur Translokation von Substanzen. Diese Mechanismen weisen eine mehr oder weniger ausgeprägte **Spezifität** gegenüber den zu transportierenden Substanzen auf. Stoffaustausch den veränderlichen externen und internen Bedingungen entsprechend verändern zu können, setzt zusätzlich die Fähigkeit zur **Regulation** von Transportprozessen voraus.

Mit solchen Zell-Leistungen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Im Mittelpunkt stehen drei verschiedene Transportprozesse an drei verschiedenen epithelialen Barrieren:

1. **der Taurintransport am Epithel des Darmes**
2. **der Leucintransport am Epithel der Placenta**
3. **der Peptidtransport an den Epithelien von Darm und Niere**

Der epitheliale Transport von Aminosäuren und Di- und Tripeptiden erfolgt unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich *transzellulär*. Die *parazelluläre* Diffusion ist durch Zonulae occludentes stark eingeschränkt. Der Transport der Substanzen an den Zellmembranen wird durch spezielle Proteine, die *Translokatoren* realisiert. Membranverlagernde Mechanismen wie rezeptorvermittelte Endocytose, Transcytose, Pinocytose oder Potocytose sind für den Transport genannter Substanzen physiologisch von geringer Bedeutung. Dementsprechend bildeten Fragen zum *Translokator-vermittelten Transport* den Schwerpunkt der Untersuchungen. Die Zielstellungen der Arbeiten waren folgende:

- Charakterisierung des Transportes von Aminosäuren und Peptiden an kultivierten Epithelzellen
- Aufklärung von strukturellen Erfordernissen, die an Substrate¹ zu stellen sind

¹Selten wird für „Substrat“ auch der Begriff „Transportat“ verwendet (Møllgaard & Rostgaard 1978). Diese Bezeichnung hat sich nicht durchgesetzt, wurde allerdings durch H. Ussing und andere Gruppen kürzlich wieder aufgegriffen (Nedergaard et al. 1999).

- Identifizierung extra- und intrazellulärer Signale für die Regulation der Transportsysteme

Die in den beigelegten Veröffentlichungen (**Anlagen 7.1 bis 7.13**) behandelten Fragen zu epithelialen Transportprozessen waren neu. Sie wurden primär unter *biochemischen* und *zellphysiologischen* Gesichtspunkten gestellt. So gab es vor der Veröffentlichung der Ergebnisse z.B. keine Befunde zur Regulation des intestinalen Taurintransportes, keine Angaben zum Transport von Di- und Tripeptiden an kultivierten Darm- oder Nierenzell-Linien, keine Daten zur Regulation des Peptidtransportes durch spezifische Signale, keine Untersuchungen zur *cis/trans*-Konformations-Spezifität von Peptid-Transportern und keine systematischen Untersuchungen zur Interaktion prolinhaltiger Dipeptide mit Peptid-Transportern. *Praxisrelevante Aspekte* solcher Experimente werden zum einen dann deutlich, wenn man bedenkt, dass eine ganze Reihe von pathologischen Situationen durch gestörte Transportprozesse an Epithelien verursacht werden, wie z.B. Glucose-Galactose-Malabsorption, Cystinurie und die Hartnup-Krankheit. Zum anderen werden große Bemühungen unternommen, neue Wirkstoffe durch die Ausnutzung physiologischer Transportsysteme oral verfügbar zu machen.

Es sind verschiedene Techniken entwickelt worden, um den Transport von Substanzen an epithelialen Schranken zu messen, z.B.:

- Perfusionsexperimente *in vivo* und *in situ* (loops, Dual-Infusions-Technik; Übersichten bei Kararli 1989, Chesney et al. 1993)
- Gewebe- und Zellinkubationen („everted sacs“, USSING-Technik, Inkubation von Schnitten, isolierten Zellen, Primärkulturen, Carcinomzellen; Übersichten bei Munck 1981, Hidalgo et al. 1989, Delie & Rubas 1997, Kimmich 1990, Chesney et al. 1993)
- Inkubation von Membranvesikeln (luminale oder abluminale Membran; Übersichten bei Hopfer 1989, Murer et al. 1989, Berteloot & Semenza 1990, Chesney et al. 1993)
- Expression der Transportproteine in heterologen Systemen (*Xenopus laevis*-Oocyten, Insekten-, Hefe- oder Säugerzellen; Übersichten bei Van Winkle 1993, Hediger & Rhoads 1994, Romero et al. 1998)

In den frühen 70er Jahren wurden Perfusionsexperimente und Gewebeinkubationen weitgehend von Studien mit isolierten Membranvesikeln abgelöst. Seit Anfang der 90er Jahre werden sehr viele Transportstudien an Zell-Linien durchgeführt. Mit der erfolgreichen Expressionsklonierung des Na⁺/Glucose-Symporters SGLT1 (Hediger et al. 1987) begann *die* Periode, in der die

Primärstrukturen der Translokatorproteine aufgeklärt werden. Bei Säugern kennt man derzeit bereits die Sequenzen von > 150 verschiedenen Translokatoren (für eine derzeit weitgehend akzeptierte Nomenklatur und Einteilung siehe Peng & Hediger 1999).

Die Mehrzahl der in dieser Arbeit zusammengefassten Experimente erfolgte an Zell-Linien, d.h. an permanent kultivierten Epithelzellen, meist Carcinomzellen. Dafür gab es folgende Gründe:

1. Studien zur Regulation von Transportprozessen lassen sich mit isolierten Membranvesikeln - von wenigen Ausnahmen abgesehen - nicht durchführen. Für solche Untersuchungen bedarf es intakter Epithelzellen. Organperfusionen und Gewebeinkubationen wiederum haben den Nachteil, dass eine gegebene Zell-Leistung nur sehr schwer *einem* Zelltyp zuzuordnen ist. In Darmgewebe lassen sich z.B. über 20 verschiedene Zellpopulationen nachweisen.
2. An intakten, polarisierten Zellen mit korrekt ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten in epithelialer Organisation lassen sich gleichzeitig Influx und para- und transzellulärer transepithelialer Transport einer Substanz messen.

Die Wahl der Zell-Linie (**Tab. 1**) richtete sich nach dem zu untersuchenden Epithel, nach der Präsenz von Translokatoren, Rezeptoren, sekundären Botenstoffen und regulatorischen Proteinen, aber auch nach der Spezies und der „allgemeinen Akzeptanz“ der Linie als Modell für das jeweilige Epithel: So boten sich für die Untersuchung intestinaler Transportprozesse insbesondere die Zell-Linien Caco-2 und, mit Einschränkungen, HT-29 an. Beide Linien sind hinsichtlich ihrer Proliferation und Differenzierung, ihrer Ultrastruktur, ihrer Enzymausstattung, ihrer Transportsysteme und ihrer Tauglichkeit als Modell für humanes Darmepithel gut charakterisiert.

Tab. 1: Bezeichnung und Herkunft der in dieser Arbeit hauptsächlich genutzten Zell-Linien. Es handelt sich dabei um permanente Monolayer-Kulturen².

Zell-Linie	Epithel	Spezies	Herkunft
HT-29	Darmepithel (Colon, Carcinom)	<i>Homo sapiens</i>	ATCC HTB-38
Caco-2	Darmepithel (Colon, Carcinom)	<i>Homo sapiens</i>	ATCC HTB-37
MDCK	Nierenepithel (distaler Tubulus)	<i>Canis familiaris</i>	ATCC CCL-34
SKPT-0193 Cl.2	Nierenepithel (proximaler Tubulus)	<i>Rattus norvegicus</i>	U. Hopfer (Woost et al. 1996)
JAR	Placentaepithel (Trophoblast, Carcinom)	<i>Homo sapiens</i>	ATCC HTB-144

²Die Bezeichnung der Zell-Linien und die primäre Wahl der Kulturmedien folgt den Angaben der American Type Culture Collection (ATCC) bzw. den Festlegungen der Depositoren. In der vorliegenden Arbeit wird an einigen Beispielen gezeigt, welchen Einfluss die Wahl des Mediums auf die Proliferation der Zellen und auf den Transport von Peptiden und Aminosäuren haben kann (**Anlage 7.5**).

2 Transport von Taurin am Epithel des Darmes

2.1 Allgemeine Aspekte

Taurin wurde erstmals 1824 aus der Galle von *Bos taurus* isoliert. Die moderne Ära der Taurinforschung begann 1968 mit der sich durchsetzenden Erkenntnis, dass die Funktion von Taurin nicht auf seine Rolle bei der Synthese von Taurocholsäure und die Osmoregulation mariner Invertebraten beschränkt ist (Jacobsen & Smith 1968). Taurin wird heute mit außergewöhnlich vielen physiologischen und pathologischen Aspekten in Verbindung gebracht (Übersichten bei Huxtable 1992, Sturman 1993, Huxtable 1996, O'Flaherty et al. 1997a, Pasantes-Morales et al. 1998)³. Es gilt als wichtigster organischer Osmolyt und hat als solcher eine gewebe-unabhängige Schlüsselfunktion (Huxtable 1992).

Zwei Befunde zum Metabolismus von Taurin lösten starkes Interesse an seinem Transport aus:

1. In tierischen Geweben ist Taurin *die* Aminosäure, die in freier Form in den höchsten Konzentrationen vorkommt. In Zellen von Herzmuskel, Gehirn u.a. wurden z.T. 50 mmol/l Taurin gemessen (Huxtable 1992). Extrazellulär liegen die Konzentrationen im Bereich von 0,01 bis 0,1 mM. Nur spezifische, aktive Transportprozesse können derartige Gradienten zwischen intra- und extrazellulären Kompartimenten aufbauen.
2. Die Versorgung mit Taurin wird zum einen durch Biosynthese aus Methionin und Cystein und zum anderen durch die Nahrung sichergestellt. Für Säuger mit geringer Cysteinsulfonat-Decarboxylase-Aktivität, wie z.B. Katzen, stellt Taurin eine essentielle Aminosäure dar; für Menschen ist Taurin konditionell-essentiell: Die Versorgung mit Taurin erfolgt bei Föten aus dem mütterlichen Blut über die Placenta und bei Neugeborenen durch die Muttermilch. Die Fähigkeit, Taurin zu synthetisieren, steigt mit zunehmenden Alter, während die Transportkapazität am Darmepithel sinkt (Moyer et al. 1988). Im weiteren Sinne ist Taurin nicht nur für Neugeborene essentiell; auch bei Adulten reicht die Biosynthese nicht immer aus (Sturman 1993).

Die Existenz eines aktiven Taurin-Transporters am Darmepithel war lange Zeit umstritten. Mittels isolierter Bürstensaum-Membranvesikel konnte der Transporter schließlich bei vielen Spezies zweifelsfrei nachgewiesen werden (Übersichten bei **Ganapathy et al. 1994a**, O'Flaherty et al. 1997a).

³Das landläufig bekannteste Phänomen ist, dass bei Katzen Taurinmangel in der Nahrung zur Degeneration der Retina und zur Erblindung führen kann (Hayes et al. 1975, Militante & Lombardini 1998, 1999).

2.2 Charakterisierung des Taurin-Transporters an kultivierten Darmzellen

Vgl. Anlagen 7.1 (Brandsch et al. 1993) und 7.2 (Brandsch et al. 1995d)

HT-29- und Caco-2-Zellen konnten durch uns als Zell-Linien identifiziert werden, die über ein Transportsystem für Taurin verfügen (Tiruppathi et al. 1992, Anlage 7.1). Der Taurintransport ist in beiden Zell-Linien sättigbar, akkumulativ und von nach innen gerichteten Na^+ - und Cl^- -Gradienten abhängig. Die Stoichiometrie $\text{Na}^+:\text{Cl}^-:\text{Taurin}$ beträgt 2:1:1. Das System ist für Taurin, Hypotaurin und β -Alanin spezifisch. Seine Aktivität wird in Anpassung an das extrazelluläre Substratangebot (adaptiv) reguliert. Die Charakteristika entsprechen damit *den* funktionellen Merkmalen, die für System β der luminalen Membran von Epithelzellen des humanen Jejunums beschrieben waren. Satsu et al. (1997) wiederholten die Charakterisierung des Taurin-Transporters in Caco-2-Zellen und kamen zu den gleichen Schlussfolgerungen. Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass Caco-2-Zellen, die auf permeablen Filtern kultiviert werden, Taurin sowohl von der apikalen Seite ($J_{m \rightarrow c}$) als auch von der basolateralen Seite ($J_{s \rightarrow c}$) her aufnehmen, wobei der Transport von der apikalen Seite überwiegt (Anlage 7.2).

2.3 Regulation des intestinalen Taurintransportes

Vgl. Anlagen 7.1 (Brandsch et al. 1993) und 7.2 (Brandsch et al. 1995d)

HT-29- und Caco-2-Zellen wurden für Untersuchungen zur Regulation des Taurintransportes eingesetzt. Über die Regulation⁴ des intestinalen Taurin-Transporters war zu Beginn der vorliegenden Arbeiten noch nichts bekannt. In der ersten Studie (Anlage 7.1) stand Protein-Kinase C im Mittelpunkt. Dieses Enzym spielt bei der Transduktion vieler extra- und intrazellulärer Signale eine zentrale Rolle (Nishizuka 1986, Mellor & Parker 1998), so auch bei Signalen, die Modulationen von Transportprozessen auslösen, z.B. dem K^+ -, Glucose- und Glutamattransport

⁴Für durch Signale ausgelöste Transportveränderungen haben sich in der Literatur die Bezeichnungen „Modulation“ und (häufiger) „Regulation“ eingebürgert. Die Bezeichnungen werden oft gleichsinnig, dabei aber nicht einheitlich gebraucht. Unter Regulation versteht man die Konstanzhaltung (Halte-regulation, stationary-state regulation) oder gezielte Führung (Folgeregulation) einer Regelgröße zur Ausbildung oder Aufrechterhaltung eines stabilen inneren Milieus (Homöostase) (Wolf 1988). Im Zusammenhang mit Transportprozessen an der Blut-Hirn-Schranke definieren Crone et al. (1988) die Modulation als die „durch Substanzen (Hormone, Transmitter, sekundäre Botenstoffe) ausgelöste rasche Veränderung der Permeabilität von Endothelien. In der vorliegenden Arbeit wird eine kontrollierte Veränderung der kinetischen Parameter eines Transportproteins als Modulation bezeichnet (induzierter Wechsel von Status A zu B). Für die übergeordneten Systeme Zelle, Gewebe, Organ und Organismus wird dagegen der Begriff Regulation gebraucht. Ebenso wird der Begriff Regulation bevorzugt, wenn die Veränderung indirekt erfolgt.

(Busch et al. 1992, Longo et al. 1992, Casado et al. 1993). Von Protein-Kinase C existieren mindestens 11 Isoformen – eingeteilt in klassische, neue und atypische (Mellor & Parker 1998); Enterocyten verfügen über die Isoformen α , ϵ und ζ (Hyun et al. 1994). Unter experimentellen Bedingungen lässt sich Protein-Kinase C *in vivo* und *in vitro* mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als einem funktionellen Analogon des physiologischen Protein-Kinase-C-Aktivators Diacylglycerol in nanomolarer Konzentration aktivieren (Kontny et al. 1992). Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt (**Anlage 7.1**): Die Inkubation von HT-29-Zellen mit PMA senkt den Taurintransport um 65-70%. Eine signifikante Hemmung setzt bereits nach 5 min ein. PMA-Behandlung senkt sowohl die Affinität als auch die Maximalgeschwindigkeit des Taurin-Transporters.

Die Frage, ob die durch PMA ausgelösten Veränderungen spezifisch sind, betrifft fünf verschiedene Aspekte:

1. **Das Substrat:** PMA hemmt auch den Transport von β -Alanin um $> 50\%$. Sein Effekt ist daher nicht auf Taurin beschränkt.
2. **Den Transporter:** Unter identischen Bedingungen wird der Transport von Leucin und Lysin durch PMA nicht beeinflusst, der Transport von Aspartat stimuliert und der Transport von Prolin gehemmt. Bei den untersuchten Verbindungen handelt es sich um Substrate für verschiedene Transportsysteme (β , B, $B^{0,+}$, γ^+ , IMINO, X_{AG}^- , Übersichten bei **Ganapathy et al. 1994a**, Tsuji & Tamai 1996, Palacin et al. 1998). Damit ist der Effekt von PMA zwar nicht auf System β beschränkt, er ist aber auch nicht unspezifisch.
3. **Die Zelle:** Der Effekt von PMA lässt sich nicht nur an HT-29-Zellen nachweisen. In Caco-2-Zellen verringert PMA-Vorbehandlung den Transport von Taurin gleichermaßen.
4. **Das Signal:** Der Phorbol-ester 4α -Phorbol-12,13-didecanoat (PDD), der die Protein-Kinase C *nicht* zu aktivieren vermag, löst keine Veränderungen des Taurintransportes aus.
5. **Die Kinase:** Inhibitoren der Protein-Kinase C stimulieren den Taurintransport und heben den PMA-Effekt vollständig auf (**Anlage 7.1**).

Um von einer spezifischen Regulation des Taurintransportes sprechen zu können, musste zunächst ein unspezifischer Effekt von PMA auf die Zellmembran ausgeschlossen werden. Dies erfolgte durch den Nachweis, dass die nichtsättigbare Komponente des Taurintransportes durch PMA nicht verändert wird und dass PMA den Transport von Lysin und Leucin nicht beeinflusst.

Zur Regulation von Transportprozessen an Zellmembranen gibt es grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten, u.a.:

- 1. Veränderung der Ionengradienten (indirekte Regulation, nur bei Symportern und Antiportern):** In **Anlage 7.1** dokumentieren wir, dass auch der Transport von Aspartat strikt von Na^+ - und Cl^- -Ionengradienten abhängt. Er wird jedoch durch PMA *stimuliert* und nicht, wie der des Taurins, *inhibiert*. Ergebnisse aus Studien zum Taurintransport an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durch Mollerup & Lambert (1996) belegen analog, dass die dort gemessenen Effekte von PMA auf den Taurintransport nicht durch Änderungen der Ionengradienten oder des Membranpotentials verursacht werden.
- 2. Veränderung der Zahl der Translokatoren pro Zelle auf den Stufen der Transkription oder der Translation:** Wir führten Experimente mit Actinomycin D als Hemmer der Transkription und mit Cycloheximid als Hemmer der Translation durch. Keine der beiden Substanzen kann den Effekt von PMA auf den Taurintransport aufheben.
- 3. Überführung von Transportproteinen aus intrazellulären Vesikeln in die Zellmembran und umgekehrt („Trafficking“, posttranslationale Rekrutierung):** Experimente mit Colchicin als Hemmer der Mikrotubulifunktion und mit Cytochalasin D als Hemmer der Mikrofilamente ergaben, dass beide Substanzen keine hemmende Wirkung auf den PMA-Effekt haben.
- 4.** Aus diesen Ergebnissen wird geschlussfolgert, dass der Taurin-Transporter durch **posttranslationale Modifizierung in der Zellmembran** reguliert wird, z.B. durch einen Mechanismus, bei dem Protein-Kinase C das System β selbst oder ein regulatorisches Protein phosphoryliert.

Nach der Klonierung eines Taurin-Transporters und der Herstellung spezifischer Antikörper ist der Nachweis, dass der Transporter direkt durch Phosphorylierung moduliert wird, technisch möglich geworden⁵. Han et al. (1996b) exprimierten den renalen Taurin-Transporter in *Xenopus*-Oocyten und inhibierten den Taurintransport durch PMA-Injektion. Präinjizierte Antikörper

⁵Die erste Klonierung eines Taurin-Transporters (aus MDCK-Zellen) gelang der Arbeitsgruppe Handler (Uchida et al. 1992). Es folgten die Taurin-Transporter aus dem Gehirn von Ratte und Maus, humanen Thyroidzellen, der humanen Placenta, dem Pigmentepithel der Retina von Mensch und Maus und der LLC-PK₁-Zell-Linie (Han et al. 1998, Übersicht bei Palacin et al. 1998). Die Transporter (TAUT, pNCT, etc.) gehören neben den GABA-Transportern GAT-1-3, den Glycin-Transportern GLYT1 und GLYT2, dem Prolin-Transporter PROT und dem Betain-Transporter BGT-1 zu der Superfamilie der Na^+ - Cl^- -abhängigen Neurotransmitter-Transporter. Taurin-Transporter sind Proteine aus 590-655 (meist 620) Aminosäureresten, kodiert auf Chromosom und weisen 12 Membrandurchgänge auf (Übersicht bei Palacin et al. 1998). Der intestinale Taurin-Transporter wurde bis heute noch nicht kloniert. Die erste Herstellung von Antikörpern gegen einen Taurin-Transporter gelang 1996 (Han et al. 1996b).

gegen das vierte intrazelluläre Segment des Transportproteins blockierten den PMA-Effekt zu 100 %. In einer zweiten Arbeit konnten die Autoren kürzlich zeigen (Han et al. 1999), dass die PMA-Behandlung zu einer Phosphorylierung des Serin-322 und *dadurch* zur Hemmung des Taurintransportes führt. Ser-322 befindet sich im vierten intrazellulären Segment.

Mit Guanylin und dem hitze-stabilen *E. coli*-Enterotoxin (STa) konnten, gemäß der Zielstellung der vorgelegten Arbeiten, die ersten extrazellulären Signale für die Regulation des intestinalen Taurintransportes identifiziert werden (**Anlage 7.2**). Von STa war bekannt, dass es von pathogenen *E. coli* Stämmen produziert wird und dass seine Interaktion mit einem intestinalen Rezeptor, der luminalen, membranständigen Guanylat-Cyclase C, eine starke Diarrhöe auslösen kann (Übersichten zum Mechanismus bei Farthing 1994, Giannella 1995, Ericsson 1998). Das 1992 entdeckte Peptid Guanylin ist ein endogener, physiologischer Ligand dieses Rezeptors (Übersichten bei Forte & Currie 1995, Krause et al. 1997). Im Zusammenhang mit unseren Studien waren diese Peptide von Interesse, weil ihre Bindung an die Rezeptoren einen starken Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration auslöst.

Nach unseren Untersuchungen (**Anlage 7.2**) hemmt eine Vorbehandlung von Caco-2-Zellen mit STa oder Guanylin den Taurintransport. An Zellen, die in Transwells kultiviert werden, wirkt STa nur von der apikalen Seite her und beeinflusst nur den Transport in apikal-zu-basolateraler Richtung⁶. Der IC₅₀-Wert von STa beträgt bei 30-minütiger Vorbehandlung 21 nM. STa hemmt auch den Transport von β -Alanin und Prolin, nicht aber den von Leucin, Phenylalanin, Glycylsarcosin (Gly-Sar) und Glucose. Die Messung der kinetischen Parameter ergab, dass STa sowohl die Maximalgeschwindigkeit des Transporters als auch seine Affinität zu Taurin verringert. Das Signal hat keinen Einfluss auf die Menge an spezifischer Taurin-Transporter-mRNA. STa stimuliert die Bildung von cGMP, nicht aber die von cAMP⁷. Experimente mit spezifischen Inhibitoren der Protein-Kinasen A, C und G ergaben, dass nur Protein-Kinase A in die Regulation des Taurintransportes durch STa involviert ist. Behandlung der Zellen mit Cholera-Toxin, das den cAMP-Gehalt 118fach erhöht (nicht jedoch den cGMP-Gehalt), inhibiert den Taurintransport

⁶Bei Zellen des Nierenepithels gibt es Hinweise auf die Existenz molekular und funktionell verschiedener Taurin-Transporter an luminalen und basolateralen Membranen (Jones et al. 1993). Am Darmepithel ist diese Frage noch ungeklärt.

⁷Diese Messungen führten wir auch an HT-29-Zellen durch: Weder die cAMP- noch die cGMP-Konzentration war in diesen Zellen durch STa zu beeinflussen. Auch der Effekt von STa und Guanylin auf den Taurintransport tritt nur bei Caco-2-Zellen und nicht bei HT-29-Zellen auf. Wahrscheinlich besitzen HT-29-Zellen unter den gewählten Bedingungen keine membranständige Guanylat-Cyclase C. Für Caco-2-Zellen war die Existenz dieses membranständigen Rezeptors/Enzyms und der Anstieg von cGMP nach Inkubation der Zellen mit STa bereits beschrieben worden (Cohen et al. 1993).

um 50%. Als Mechanismus, durch den STa und Guanylin den Taurintransport regulieren, postulieren wir eine schnelle, posttranskriptionale Modulation des Taurin-Transporters durch cGMP-aktivierte Protein-Kinase A.

O'Flaherty et al. (1997a) fassen unsere Ergebnisse zu Mechanismus und Regulation des intestinalen Taurintransportes (**Anlagen 7.1 und 7.2**) in einer Übersichtsarbeit zusammen. Die Autoren empfehlen, dieser Strategie folgend, an Caco-2-Zellen *die* Hormone und intrazellulären Botenstoffe zu identifizieren, die den intestinalen Taurintransport unter physiologischen Bedingungen regulieren. **Tab. 2** zeigt eine Übersicht über die *bisher* identifizierten Signale zur Regulation des Taurintransportes an *verschiedenen* Zelltypen. Dabei blieben adaptive Regulation (Anpassung an extrazelluläre Taurinkonzentration) und Volumenregulation unberücksichtigt (Huxtable 1992, Satsu et al. 1997, Han et al. 1998).

Tab. 2: Regulation des Taurintransportes durch extra- und intrazelluläre Signale

Signal	Parameter	Gewebe/Zelltyp	Referenz
PMA STa, Guanylin, Dexamethason	↓ Influx ³ ↓ Influx ³ ↓ Influx ¹	Darmepithel	Anlage 7.1 Anlage 7.2 O'Flaherty et al. 1997b
PMA, Caliculin A dbcAMP	↓ Influx ³ ↑ Influx ³	Ehrlich Ascites Tumorzellen	Mollerup & Lambert 1996, 1998
Erythropoietin	↑ Influx ³	Erythrocyten	Musch et al. 1996
PMA, dbcAMP PMA, Substanz P PMA, Okadasäure	↓ Influx ↑ Efflux ↓ Influx ³	Glia	Philibert & Dutton 1988 Lee et al. 1992 Tchoumkeu-Nzouessa & Rebel 1996a,b
Vasopressin	↓ Influx	Hippocampus (Glia?)	Brust et al. 1992
Cyclosporin A Dexamethason	↓ Influx ↓ Influx	Makrophagen	Kim et al. 1996
PMA A23187 PMA, R59022 PMA	↓ Influx ↑ Influx ³ ↓ Influx ↓ Influx ³	Nierenepithel	Jessen & Jacobsen 1997 Jones et al. 1991 Han et al. 1996a,b, 1998, 1999
PMA Cyclosporin A	↓ Influx ³ ↓ Influx ³	Placentaepithel	Kulanthaivel et al. 1991 Ramamoorthy et al. 1992b
Trifluoperazin, W-7	↓ Influx	Plexus chorioideus	Keep & Xiang 1996
Chelerythrin PMA, 8-Br-cAMP Caliculin A, PMA	↓ Influx ↓ I _{max} ² ↓ Influx	Retina	Militante & Lombardini 1999 Loo et al. 1996 Vinnakota et al. 1997
Cholera-Toxin CGS 9343B, W7 Insulin	↑ Influx ¹ ↓ Influx ³ ↑ Influx	Pigmentepithel der Retina	Ganapathy et al. 1995b Ramamoorthy et al. 1994 Salceda 1999

Postulierte Stufe der Regulation: ¹Transkription/Translation, ²Rekrutierung, „Trafficking“, ³direkte Phosphorylierung/Dephosphorylierung

3 Transport von Leucin am Epithel der Placenta

3.1 Allgemeine Aspekte

Wachstum und Entwicklung des Föten hängen bei Placentaliern strikt von der Versorgung mit Nährstoffen und Signalen aus dem mütterlichen Blut ab. Dabei fungiert die Placenta als Exkretions-, Resorptions- und Respirationsorgan. Der Transfer essentieller Substanzen aus dem Blut der Mutter in den Kreislauf des Föten erfolgt über mehrere Membransysteme - im Fall der *Placenta haemo-chorialis* des Menschen über die Membranen des Syncytiotrophoblasten und des Cytotrophoblasten, die Basalmembran, das fötale Bindegewebe und das fenestrierte fötale Kapillarendothel. Sowohl in der luminalen als auch in der abluminalen Membran des Syncytiotrophoblasten existieren spezifische Transportsysteme für Aminosäuren, nach Moe (1995) 9-12 verschiedene. Von besonderem Interesse in unseren Arbeiten ist System L, ein Na^+ -unabhängiges Transportsystem für neutrale Aminosäuren (Christensen et al. 1974, Christensen 1990, Smith et al. 1992, Moe 1995, Palacin et al. 1998). Spezielle Merkmale dieses Systems sind *trans*-Stimulation und H^+ -abhängige Modulation; das System arbeitet bei $\text{pH}_o < 7.5$ mit erhöhter Aktivität (Christensen et al. 1974, Mitumoto et al. 1986).

1998/99 isolierten verschiedene Arbeitsgruppen mittels Expressionsklonierung zwei cDNA, die System L kodieren (LAT1: Mastroberardino et al. 1998, Kanai et al. 1998, Prasad et al. 1999, Pfeiffer et al. 1999; LAT2: Segawa et al. 1999, Pineda et al. 1999). Für eine funktionelle Expression erfordern beide die Coexpression der schweren Kette des Typ II Glycoproteins 4F2 in der Membran⁸.

3.2 Regulation des placentalen Leucintransportes

Vgl. Anlage 7.3 (Brandsch et al. 1994a)

Seit 1991 werden JAR-Zellen als Zellkultur-Modell für Transportstudien am humanen Placentaepithel genutzt (Kulanthaivel et al. 1991). System L wurde in diesen Zellen durch Ramamoorthy et al. (1992a) funktionell charakterisiert. Dabei führten die Autoren auch erste Untersuchungen zur Regulation des Systems durch. Ein Anliegen der vorliegenden Arbeit

⁸Bertran et al. (1992a,b) konnten zeigen, dass die Membranproteine rBAT („related to $\text{b}^{0,+}$ amino acid transport activity“) und 4F2hc in den Transport von Aminosäuren (System $\text{b}^{0,+}$ bzw. y^+L) als Komponenten oder als Aktivatoren involviert sind (Übersicht bei Palacin et al. 1998). Inzwischen ist bekannt, dass dies nicht nur für Aminosäure-Transporter gilt (Yao et al. 1999).

(Anlage 7.3) war es, den Zusammenhang zwischen der Wirkung von Calmodulin-Antagonisten und Protonen auf den placentalen Leucintransport aufzuzeigen. Dazu wurden CGS 9343B, W-7 und Calmidazolium eingesetzt. CGS 9343B ist ein sehr spezifischer und potenter Calmodulin-Antagonist, der sich gegenwärtig in der klinischen Testung befindet (Norman et al. 1987, Ericsson 1998). Behandelt man JAR-Zellen mit dieser Substanz, wird der Leucintransport um 75 – 100% stimuliert. Hinsichtlich der kinetischen Parameter war festzustellen, dass die Behandlung mit CGS 9343B fast nur die Maximalgeschwindigkeit des Transportprozesses verändert. Eine Erklärung wäre in einer erhöhten Zahl von Transportproteinen in der Zellmembran zu sehen. Jedoch konnte auch hier- analog zu unseren Experimenten zur Regulation des Taurintransportes durch Protein-Kinase C - ein Effekt von CGS 9343B auf die *de novo* Synthese von System L ausgeschlossen werden. Eine Blockierung der Funktion von Mikrotubuli und Mikrofilamenten war ebenfalls nicht in der Lage, die von CGS 9343B ausgelöste Transportstimulation zu beeinflussen. Interessanterweise ähneln die durch diese Substanzen erzielten Ergebnisse denen, die durch eine erhöhte extrazelluläre H^+ -Konzentration erreicht werden. Ein nach innen gerichteter H^+ -Gradient stimuliert den Transport von Leucin in JAR-Zellen **(Anlage 7.3)**. Eine Beziehung zwischen der H^+ -abhängigen und der Calmodulin-abhängigen Modulation des Transportsystems ist wahrscheinlich:

1. Die Stimulation des Leucintransportes durch Protonen erfolgt in ähnlicher Stärke wie die durch CGS 9343B ausgelöste.
2. Die Stimulation des Leucintransportes durch Protonen beruht ebenfalls auf einer Erhöhung des V_{max} -Wertes.
3. Beide Signale heben sich gegenseitig in ihrer Wirkung fast vollständig auf.

Wir postulieren, dass Calmodulin-abhängige posttranslationale Prozesse die Sensitivität des Transportsystems gegenüber einem extrazellulär niedrigeren pH-Wert modulieren **(Anlage 7.3)**. Dies könnte durch Phosphorylierungen des Transportproteins selbst oder regulativer Proteine, z.B. durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Protein-Kinasen erfolgen.

Es kann inzwischen kein Zweifel mehr daran bestehen, dass das System L der Placenta durch verschiedene Hormone in seiner Aktivität reguliert wird (Shotwell et al. 1983, Moe 1995). Da die Bürstensaummembran das mütterliche und die basolaterale Membran das fötale Blut kontaktieren, und da beide Membranen unterschiedlich mit Enzymen, Translokatoren und Rezeptoren ausgestattet sind, können der Hormonstatus des Föten und der der Mutter unterschiedliche Effekte auf Transportprozesse am Syncytiotrophoblasten haben.

4 Transport von Peptiden und Peptidomimetika an den Epithelien von Darm und Niere

4.1 Allgemeine Aspekte

Experimentelle Hinweise auf einen spezifischen Transport von Dipeptiden aus dem Darmlumen in die intestinalen Epithelzellen wurden bereits vor 40 Jahren publiziert (Newey & Smyth 1960, 1962; Addison et al. 1972). Schon in frühen Arbeiten insbesondere der Arbeitsgruppen um D.M. Matthews (Matthews & Laster 1965), S.A. Adibi (Adibi 1971), A.M. Ugolev (Ugolev 1971) und A.N. Radhakrishnan (Das & Radhakrishnan 1974) wurde die damals vorherrschende These vom ausschließlichen Transport von Aminosäuren als den alleinigen Endprodukten der luminalen Proteinverdauung widerlegt (Übersichten bei Matthews 1975, Matthews & Adibi 1976, Hoshi 1985, Ganapathy & Leibach 1986a,b, Matthews 1991). Fortschritte bei präparativen und analytischen Methoden erlaubten sukzessive die Aufklärung von Mechanismus, Spezifität und Lokalisation spezifischer Peptid-Transporter in Darm und Niere. Die Fragen, ob kleinere Peptide überhaupt intakt in Epithelzellen aufgenommen werden und wo die hydrolytische Spaltung stattfindet, waren erst mit abbaustabilen Peptiden, wie Glycylsarcosin (Gly-Sar, Addison et al. 1972) und sensitiven analytischen Methoden (HPLC, Einsatz radioaktiv-markierter Peptide) zu beantworten. Die lange und sehr kontrovers diskutierte Frage nach der treibenden Kraft des Peptid-Transporters konnte erst zu Beginn der 80er Jahre in Transportstudien mit isolierten Vesikeln der luminalen Membran von Darm- und Nieren-Epithelzellen geklärt werden (Ganapathy et al. 1984, Übersichten bei Hoshi 1985, Ganapathy & Leibach 1986a,b). 1994 wurde der erste Peptid-Transporter auf molekularer Ebene (Primärstruktur) aufgeklärt (Fei et al. 1994, Boll et al. 1994).

Heute besteht kein Zweifel mehr an der Existenz spezifischer Transportmechanismen für Di- und Tripeptide an den Epithelien von Darm, Niere u.a. Geweben. Die wesentlichen Informationen der jüngeren Vergangenheit zu Mechanismus, Struktur, Topologie, Energetik und Lokalisation von Peptid-Transportern stammen dabei aus Untersuchungen der Gruppen um F.H. Leibach, H. Daniel, M.A. Hediger, A. Tsuji und K.-I. Inui.

Im *Darmlumen* entstehen Di- und Tripeptide durch enzymatischen Abbau von Nahrungsproteinen unter Einwirkung der im Pankreassekret enthaltenen Endo- und Exopeptidasen und der Amino- und Oligopeptidasen der Bürstensaummembran. In das Lumen des proximalen *Nierentubulus* gelangen Di- und Tripeptide über die glomeruläre Filtration aus dem Blut und durch katalytische Spaltung größerer Oligopeptide unter Einwirkung der Peptidasen der *renalen*

Bürstensaummembran. Man geht inzwischen sogar davon aus, dass Aminosäuren an beiden Epithelien weniger in freier Form, sondern *überwiegend* in Form von Di- und Tripeptiden aufgenommen werden (Steinhardt & Adibi 1986, Übersichten bei Matthews 1991, Leibach & Ganapathy 1996, Adibi 1997a,b). Der apikale Influx der Di- und Tripeptide an Darm- und Nieren-Epithelzellen wird von *tertiär aktiv* arbeitenden H^+ /Peptid-Symportern vermittelt (Ganapathy et al. 1984, **Abb. 1**). Die Symporter sind sättigbar, multi-spezifisch, elektrogen und werden durch einen nach innen gerichteten H^+ -Gradienten und das Membranpotential stimuliert. Der extrazelluläre pH_o -Wert dicht an der apikalen Zellmembran (Mikroklima) beträgt im Jejunum der Ratte etwa 6,1 bis 6,8 (Lucas 1983, McEwan et al. 1988, Daniel et al. 1989). Thwaites et al. (1993a,b) bestätigten die Hypothese, dass die extrazellulären Protonen den intestinalen Peptid-Transporter nicht nur stimulieren, sondern tatsächlich mit dem Substrat *in die Zellen hinein* cotransportiert werden. Der H^+ -Gradient entsteht durch die Aktivität der ebenfalls apikal lokalisierten *sekundär aktiven* Na^+/H^+ -Antiporter, die dafür den von basolateralen *primär aktiven* Na^+/K^+ -ATPasen aufgebauten Na^+ -Gradienten als treibende Kraft benötigen.

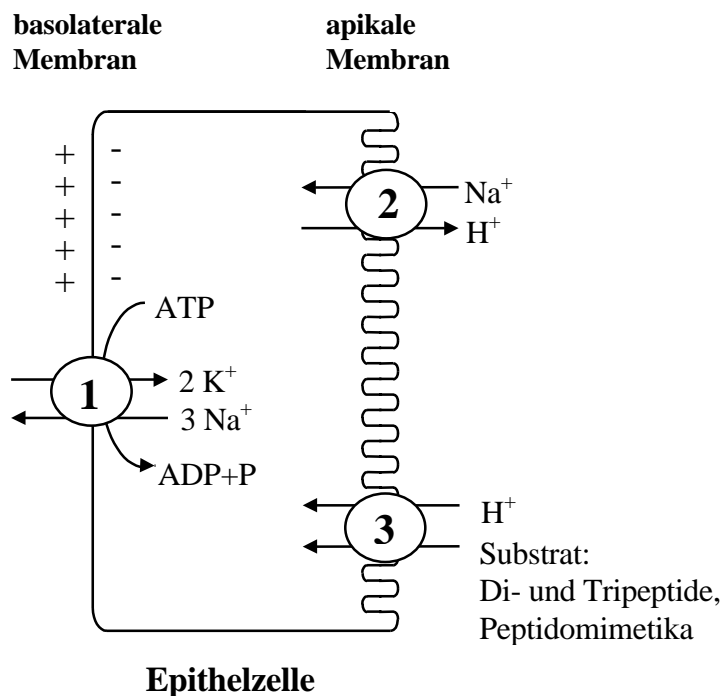


Abb. 1: Peptidtransport an einer intestinalen bzw. renalen Epithelzelle

- 1: Na^+/K^+ -ATPase
- 2: Na^+/H^+ -Antiporter
- 3: H^+ /Peptid-Symporter

Nach dem Transport der Di- und Tripeptide in die Zellen erfolgt in den meisten Fällen ihre enzymatische Hydrolyse durch cytoplasmatische Aminopeptidasen zu Aminosäuren, die von basolateralen Aminosäure-Transportern aus den Zellen transportiert werden. Von der extra-

zellulären Oberfläche der basolateralen Membranen aus erfolgt die Bewegung der Aminosäuren durch die Basalmembranen und das Endothel hindurch in die ableitenden Blutgefäße durch einfache Diffusion ohne Überwindung weiterer zellulärer Schranken.

Seit zehn Jahren konzentrieren sich die Arbeiten zum Peptidtransport auf:

- **Aufklärung der Primärstruktur der Transportproteine** (Boll et al. 1994, Fei et al. 1994, Liang et al. 1995, Liu et al. 1995, Saito et al. 1995, Boll et al. 1996, Saito et al. 1996, Yamashita et al. 1997, Fei et al. 1998a, Wang et al. 1998)
- **Expression in heterologen Zellsystemen** (Döring et al. 1997, 1998a,b, Terada et al. 1998)
- **Aufklärung von Funktion und Topologie der Transportproteine** (Boll & Daniel 1995, Temple et al. 1995, Döring et al. 1996, Mackenzie et al. 1996, Amasheh et al. 1997, **Anlage 7.7**, Nussberger et al. 1997b, Steel et al. 1997, Bolger et al. 1998, Covitz et al. 1998, Fei et al. 1998c, Kramer et al. 1998, Chen et al. 1999, Fei et al. 1999)
- **Lokalisierung von Peptid-Transportern in Organismen und Geweben** (Freeman et al. 1995, Fei et al. 1998a, Smith et al. 1998, Wang et al. 1998, Shen et al. 1999)
- **Interaktion von Substrat und Transportprotein** (Minami et al. 1992, Daniel et al. 1992, Daniel & Adibi 1993, Thwaites et al. 1994, Li & Hidalgo 1996, Taub et al. 1997a,b, **Anlage 7.9**, **Anlage 7.12**, Döring et al. 1998c,d, **Anlage 7.11**, Taub et al. 1997a,b, Schoenmakers et al. 1999, **Anlage 7.13**),
- **Identifizierung bzw. Synthese neuer Substrate und Prodrugs für therapeutische Anwendungen** (Döring et al. 1998c, Ganapathy et al. 1998, Merlin et al. 1998, Sinko & Balimane 1998, Tamai et al. 1998)
- **Neue analytische Verfahren** (Fei et al. 1994, Nussberger et al. 1996, Dieck et al. 1998, Döring et al. 1998b, **Anlage 7.12**, Abe et al. 1999)
- **Regulation der Transportprozesse** (**Anlage 7.4**, **Anlage 7.5**, **Anlage 7.8**, Thamocharan et al. 1998, Walker et al. 1998, Thamocharan et al. 1999a,b, Wenzel et al. 1999)

Sicher beschrieben wurden bei *Homo sapiens* bisher nur PEPT1 und PEPT2. hPEPT1 besteht aus 708 Aminosäureresten (codiert auf Chromosom 13) und hPEPT2 aus 729 Aminosäureresten (codiert auf Chromosom 3). Beide Proteine weisen hypothetisch 12 Membrandurchgänge auf. Während das Darmepithel nur über den niedrig-affinen Peptid-Transporter PEPT1 verfügt, existieren in den Epithelzellen des Nierentubulus sowohl der hoch-affine, nierenspezifische

Peptid-Transporter PEPT2 als auch der „intestinale Typ“ PEPT1. Es gibt darüber hinaus Hinweise für die Expression dieser Transportsysteme bei Säugern in Zellen des Gehirns (Neuronen, Glia, Plexus choroideus, Adenohypophyse), der Lunge (Pneumozyten Typ II), der Bindehaut des Auges, der Milchdrüse, des Pankreas, in Makrophagen von Hoden und Eierstock und in Lysosomen des Pankreas und der Leber. Als phylogenetische Vorläufer bzw. Verwandte dieser Transporter werden die Mitglieder der POT-(proton-coupled oligopeptide transporter)-Superfamilie bei Bakterien (z.B. *Lactococcus lactis*), Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*), Pflanzen (z.B. *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*), Wirbellosen (z.B. *Caenorhabditis elegans*, *Homarus americanus*), Fischen, Amphibien und Vögeln angesehen. Insgesamt umfasst die POT-Superfamilie derzeit 40 Mitglieder (Übersicht bei Fei et al. 1998b).

Das Interesse an H⁺/Peptid-Symportern rührt nicht nur von ihren physiologischen Funktionen oder ihren faszinierenden biochemischen und molekularen Eigenschaften her, sondern auch von ihrem pharmakologisch-klinischen Potential als „Wirkstoff“-Transporter. Der Transport vieler β -Lactam-Antibiotika ist dabei das bekannteste Beispiel. Peptid-Transporter erkennen viele β -Lactam-Antibiotika aufgrund ihrer tripeptid-ähnlichen Struktur als Substrate und transportieren sie gegen einen Konzentrationsgradienten in die Epithelzellen von Darm und Niere. Das ermöglicht die orale Applikation von Antibiotika dieser Gruppe bei der Therapie bakterieller Infektionen. Basierend auf der breiten Substratspezifität, wird sich der Transport über PEPT1 sehr wahrscheinlich als praktikabler Weg zur oralen Applikation neuer pharmakologisch-aktiver Verbindungen erweisen.

Umfassende Übersichtsartikel zu diesen und weiteren Themen finden sich bei Smith 1990, Ganapathy & Leibach 1991, **Ganapathy et al. 1994a,b**, **Brandsch et al. 1995c**, Hediger et al. 1995, Meredith & Boyd 1995, Steiner et al. 1995, Taylor & Amidon 1995, Daniel 1996, Ganapathy & Leibach 1996, Leibach & Ganapathy 1996, Tsuji & Tamai 1996, Walter et al. 1996, Adibi 1997a,b, Daniel 1997, Daniel & Herget 1997, Nussberger et al. 1997a, Fei et al. 1998b, Lee et al. 1999, Tsuji 1999 und Yang et al. 1999. In den folgenden Abschnitten beschränkt sich die Diskussion auf die für die eigenen Arbeiten relevanten Befunde.

4.2 Charakterisierung der Peptid-Transporter an kultivierten Epithelzellen

Vgl. Anlagen 7.4 (Brandsch et al. 1994b), 7.5 (Brandsch et al. 1995b), 7.6 (Brandsch et al. 1995a), 7.7 (Brandsch et al. 1997) und 7.10 (Ganapathy et al. 1995a)

Es gab in der Literatur Hinweise auf einen spezifischen, H^+ -abhängigen Transport verschiedener Cephalosporine in Caco-2-Zellen (Dantzig & Bergin 1990, Dantzig et al. 1992, Inui et al. 1992). Diese Befunde waren Anlass, den Transport von Dipeptiden in Caco-2-Zellen mit der Zielstellung zu untersuchen (**Anlage 7.4**), an diesem Zellmodell Beiträge zu Mechanismus, Spezifität und Regulation des Peptid-Transporters zu leisten.

Caco-2-Zellen akkumulieren [^{14}C]Gly-Sar gegen einen Konzentrationsgradienten. Der Gly-Sar-Transport wird durch einen nach innen gerichteten H^+ -Gradienten stimuliert und durch einen nach außen gerichteten Gradienten gehemmt. Neben verschiedenen Di- und Tripeptiden akzeptiert der Transporter z.B. Cephalixin, nicht aber freie Aminosäuren. Kinetisch kann er als Transporter vom „low-affinity, high-capacity“-Typ eingeordnet werden (K_t von Gly-Sar = 1,1 mM). Die wesentlichen Charakteristika entsprechen denen, die von dem intestinalen H^+ /Peptid-Symporter beschrieben worden waren. Inzwischen wurde das System auch molekularbiologisch (RT-PCR, Northern-Blotting) zweifelsfrei als hPEPT1 identifiziert (Liang et al. 1995, **Anlage 7.10**, Merlin et al. 1998). Derzeit stellt die Caco-2-Zell-Linie das Standardmodell für Untersuchungen von PEPT1 an intakten intestinalen Epithelzellen dar⁹.

Für Experimente hinsichtlich des renalen Peptidtransportes war zu Beginn unserer Arbeiten noch kein Zellkultur-Modell verfügbar. Wir begannen die Suche danach zunächst mit den in vielen Labors etablierten Nierenzell-Linien OK, LLC-PK₁ und MDCK (**Anlage 7.5**). Im Gegensatz zu OK- und LLC-PK₁-, erfolgt in MDCK-Zellen ein akkumulativer, H^+ -abhängiger Transport von Di- und Tripeptiden¹⁰. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_i von Gly-Sar = 1,3 mM) ergab, dass es sich sehr wahrscheinlich nicht um PEPT2, sondern um PEPT1

⁹Ebenso sind diese Zellen, auf permeablen Filtern kultiviert, auch für Experimente bezüglich des basolateralen Peptidtransportes geeignet, zu dessen Mechanismus relativ wenig bekannt war (Dyer et al. 1990). Thwaites et al. (1993a,b) führten solche Studien durch und kamen zu dem Ergebnis, dass auch die basolaterale Membran einen H^+ -abhängigen Transporter für Gly-Sar und Val-Val besitzt. Der basolaterale Influx von Gly-Sar ist von einem H^+ -Influx begleitet. Die Ergebnisse stehen zum Teil in Widerspruch zu Studien, nach denen der Transport an der basolateralen Membran von Caco-2-Zellen nicht durch einen aktiven Transportmechanismus, sondern durch ein H^+ -unabhängiges System vermittelt wird, welches die Diffusion beschleunigt (facilitatives System: Saito & Inui 1993, Terada et al. 1999).

¹⁰Wenzel et al. (1998, 1999) gelang es inzwischen, Kulturbedingungen zu finden, bei denen die Zell-Linie LLC-PK₁ PEPT2 exprimiert.

handelt. Ein weiteres System für den Transport von Gly-Sar, insbesondere PEPT2, konnte in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden (**Anlage 7.5**).

Im Weiteren wurde der Gly-Sar-Transport in der Linie SKPT-0193 Cl.2 untersucht (**Anlage 7.6**). Diese Zell-Linie war aus Epithelzellen des proximalen Nierentubulus spontan-hypertensiver Ratten etabliert worden (Woost et al. 1996). Histochemisch und elektronenmikroskopisch sowie hinsichtlich ausgewählter biochemischer Parameter handelt es sich bei diesen Zellen um typische Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere. Die Zellen bilden auf Plastikflächen wie auch auf permeablen Filtern konfluente, differenzierte und polarisierte Epithelien. SKPT-Zellen exprimieren den nierenspezifischen, hoch-affinen H^+ /Peptid-Symporter PEPT2 (**Anlage 7.6**). Damit konnte in unseren Untersuchungen das erste permanente Zellkultur-Modell für Untersuchungen dieses Transportsystems beschrieben werden. **Anlage 7.6** dokumentiert am Beispiel des Gly-Sar-Transportes die zur funktionellen Charakterisierung eines Transportsystems in Zellen notwendigen Experimente. Es gibt in SKPT-Zellen keinen Hinweis auf eine zweite sättigbare Transportkomponente. Sowohl die kinetischen Daten (Regressionsmodelle der Michaelis-Menten-Auftragung) als auch die molekularbiologischen Analysen (RT-PCR, Northern-Blotting, **Anlage 7.10**) zeigen, dass die Zellen nur PEPT2 und nicht PEPT1 exprimieren. Die an SKPT-Zellen ermittelten Affinitätskonstanten verschiedener Di- und Tripeptide bestätigen den vielfach beschriebenen Befund, dass PEPT2 zu vergleichbaren Dipeptiden häufig eine 10-20fach höhere Affinität als PEPT1 aufweist. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_i) des Gly-Sar-Transportes beträgt $67 \mu M$.

PEPT2 in SKPT-Zellen erkennt auch das Dipeptid Tyr-Arg (Kyotorphin) mit hoher Affinität ($K_i = 18 \mu M$). Nachdem PEPT2 in Zellen des Hirngewebes identifiziert werden konnte (Dieck et al. 1998, Döring et al. 1998c, Wang et al. 1998), griffen andere Autoren dieses Ergebnis auf. Fujita et al. (1999a) charakterisierten den Transport von Tyr-Arg durch PEPT2 an Synaptosomen des Cerebellums der Ratte. Da Kyotorphin ein Dipeptid mit Signalfunktion ist, das auch als „kleinstes opioides Peptid“ bezeichnet wird (Ueda 1999), könnte man dem Transporter PEPT2 als weitere Funktion die eines Signaltransporters zuordnen. Für diese „Funktion“ gibt es noch ein zweites Beispiel: Das endogene Peptidderivat N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamat, ein Neurotransmitter, der mit hoher Spezifität und Affinität den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor besetzt, wird von PEPT2 transportiert (Wang et al. 1999).

In **Anlage 7.6** wurde eine Hypothese zur differenzierten Verteilung von PEPT1 und PEPT2 in der Niere diskutiert, die sich später als nicht zutreffend erwiesen hat. Die Spekulation bestand

darin, dass entlang des Nephrons zuerst PEPT2 in proximalen, gefolgt von PEPT1 in distalen Teilen lokalisiert sein könnte. Inzwischen zeigten Smith et al. (1998) und Shen et al. (1999) eindeutig, dass PEPT1 im S1-Segment (Pars convoluta) und PEPT2 im S3-Segment (Pars recta) des proximalen Tubulus exprimiert wird.

An Caco-2-, MDCK- und SKPT-Zellen wurde der jeweilige H^+ /Peptid-Symporter soweit charakterisiert, dass die Modelle für weitere Untersuchungen, insbesondere zu Regulation und Spezifität der Systeme, hinreichend definiert waren. Caco-2-Zellen wurden als Modell für hPEPT1 und SKPT-Zellen als solches für rPEPT2 gewählt. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich bei vergleichenden Untersuchungen die Speziesunterschiede als nachteilig erweisen (Mensch bzw. Ratte) (**Anlage 7.10**); die Suche nach *humanen* Nierenepithel-Zell-Linien, die PEPT2 exprimieren, blieb jedoch bislang erfolglos.

Hinsichtlich des Mechanismus dieser Transporter war eine Frage von Interesse, die aus sich widersprechenden Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen resultierte: Welche kinetischen Parameter werden durch die Bindung von H^+ an das Transportprotein moduliert? Analoge Fragen stehen hinsichtlich der bei Säugern häufiger vorkommenden Na^+ -abhängigen Symportern zur Diskussion. In den meisten Fällen erhöht die Bindung der Na^+ -Ionen an das Transportprotein die *Affinität* des Transporters zu seinem Substrat, z.B. bei den Na^+ /Glucose-Symportern, dem Na^+ /Prolin-Symporter, dem Na^+ /Carnitin-Symporter und dem Na^+ /Cl⁻/Serotonin-Symporter (Literatur in **Anlage 7.7**). Die Frage, ob Protonen die Affinität (K_t) oder die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) der H^+ /Peptid-Symporter PEPT1 und PEPT2 erhöhen, war umstritten. Da mit Caco-2- und SKPT-Zellen zwei geeignete Modelle zur Verfügung standen, um diese Fragen für PEPT1 und PEPT2 an intakten Zellen unter nahezu identischen Bedingungen zu untersuchen, erfolgte die in **Anlage 7.7** beigefügte Studie. Für ausgewählte Substrate (Gly-Sar, Ala-Lys, Ala-Asp) wurden in beiden Zelltypen bei einem extrazellulären pH Wert von 6,0 verglichen zu pH 7,0 die kinetischen Konstanten bestimmt; im Fall der unmarkierten Substanzen der Parameter K_t als Maß für die Affinität; im Fall des [¹⁴C]Gly-Sar die Parameter V_{max} und K_t . Außer für Ala-Asp verändern Protonen weder bei PEPT1 noch bei PEPT2 die Affinitätskonstanten der Substrate. An beiden Transportern erhöhen extrazelluläre Protonen die Maximalgeschwindigkeit des Gly-Sar-Transportes. Die Ergebnisse werden durch Experimente gestützt, bei denen die Zellen mit Diethylpyrocarbonat (DEP) vorbehandelt wurden (**Anlage 7.7**). DEP blockiert Histidylreste, die bei H^+ -abhängigen Symportern als Bindungsstellen für Protonen gelten. Unseren Daten zufolge senkt DEP bei beiden Peptid-Transportern die V_{max} -Werte (Gly-Sar-

Transport), hat aber keinen Einfluss auf die K_i - bzw. K_j -Werte der Substrate. Arbeiten von Fei et al. (1997), Steel et al. (1997), Terada et al. (1996, 1998) u.a. trugen zur Aufklärung der Funktion von Histidylresten bei PEPT1 und PEPT2 bei. Die Ergebnisse sind nicht widerspruchsfrei: His-57 bei PEPT1 und His-87 bei PEPT2 scheinen obligatorisch zu sein, nach manchen Autoren für die Bindung des Protons, nach anderen für die Interaktion mit der α -Aminogruppe der Substrate. Die Relevanz von His-121 bei PEPT1 und His-142 bei PEPT2 ist noch in Diskussion: Möglicherweise sind zwei Histidylreste notwendig, eines für die Bindung des Protons und eines für die des Substrates.

4.3 Regulation des intestinalen und renalen Peptidtransportes

Vgl. Anlagen 7.4 (Brandsch et al. 1994b), 7.5 (Brandsch et al. 1995b) und 7.8 (Müller et al. 1996)

Eine der Zielstellungen der vorgelegten Arbeiten bestand darin, erste Mechanismen der *Regulation* von H^+ /Peptid-Symportern zu untersuchen¹¹. Begonnen wurde mit der Frage, ob Protein-Kinase C solche Regulationsprozesse vermittelt. Die Inkubation von Caco-2-Zellen mit dem Phorbolster PMA führt zur Hemmung des Gly-Sar-Transportes (**Anlage 7.4**). Eine maximale Hemmung wird nach zweistündiger Vorbehandlung mit 50 nM PMA erreicht. Der Transport von Leucin bleibt unbeeinflusst. Die Hemmung ist spezifisch auch in dem Sinn, dass sie nur durch aktive Phorbolster wie PMA, PDBu und Mezerein, nicht aber durch den inaktiven Phorbolster PDD oder durch 4α -Phorbol erreicht wird. Parallelbehandlung mit Staurosporin kann die Effekte aufheben. Kinetische Analysen zeigen, dass die Modulation über eine Veränderung der Maximalgeschwindigkeit des Transportes erfolgt. Die Michaelis-Menten-Konstante bleibt unverändert. Die Hemmung wird nicht indirekt durch eine Senkung des intrazellulären pH-Wertes verursacht (untersucht mit 5,5-Dimethyloxazolidin-2,4-dion). Sie ist von der Proteinbiosynthese unabhängig (untersucht mit Cycloheximid). Protein-Kinase C reguliert die Aktivität von PEPT1 folglich posttranslational.

Analog stellte sich die Frage nach einer möglichen Modulation von PEPT1 durch die cAMP-aktivierte Protein-Kinase A (**Anlage 7.8**). Einer der effektivsten Stimulatoren der intrazellulären

¹¹Vielfalt und Zahl der Befunde zur Regulation des Transportes von Soluten an Epithelien ist kaum mehr überschaubar (für Übersichten siehe Cheeseman 1991, Clark & Amara 1993, Ermisch et al. 1993, Kilberg et al. 1993, Merrill et al. 1993, **Ganapathy et al. 1994a**, Kanner 1994, Mailliard et al. 1995, Levi et al. 1996, Wright et al. 1997, Palacin et al. 1998, McKay et al. 1999). Zur Regulation von Peptid-Transportern durch spezifische Signale war vor Beginn der vorgelegten Arbeiten noch nichts bekannt.

cAMP-Produktion ist das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae*. Vorbehandlung mit Cholera-Toxin¹² hemmt die Aufnahme von Gly-Sar in Caco-2-Zellen um 40-50% ($IC_{50} = 2,3$ ng/ml). Der Transport von Leucin und Glucose bleibt unbeeinflusst. Unter den gewählten Bedingungen steigt die cAMP-Konzentration in Caco-2-Zellen 118fach an. Andere Substanzen, die ebenfalls die Bildung von cAMP stimulieren bzw. dessen Abbau hemmen, sollten gleichsinnige Transportveränderungen auslösen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass das hitze-labile Enterotoxin von *E. coli*, IBMX und Forskolin den Gly-Sar-Transport um bis zu 50 % hemmen. Der Effekt von Cholera-Toxin auf die Gly-Sar-Aufnahme kann durch Behandlung mit Staurosporin, H-89 (selektiver Inhibitor von Protein-Kinase A) und Chelerythrin (selektiver Inhibitor von Protein-Kinase C) gehemmt werden. Kinetische Analysen zeigten auch in diesem Fall, dass die Modulation über die Veränderung der Maximalgeschwindigkeit des Transportes erfolgt. Mittels Northern-Blotting wurde ermittelt, dass sich die Menge an spezifischer PEPT1-mRNA bei Behandlung der Zellen mit Cholera-Toxin nicht verändert.

Auch PEPT1 des Nierenepithels unterliegt regulatorischen Mechanismen (**Anlage 7.5**). Calmodulin-Antagonisten wie W7, CGS-9343B oder Calmidazolium hemmen die Gly-Sar-Aufnahme in MDCK-Zellen um bis zu 63%. Gleichzeitig stimuliert W7 den Transport von Alanin, Leucin, Glucose und Taurin um 40 bis 141%. W7 verringert nur den V_{max} -Wert des Gly-Sar-Transportes. Außer dem Nachweis, dass (a) W7 bei den gewählten Konzentrationen keine unspezifischen Zellschäden verursacht und (b) sein Effekt nicht auf der bekannten Wirkung auf Protein-Kinase C beruht, wurden in dieser Studie keine weiteren Experimente zur Aufklärung des Mechanismus unternommen. Es ist möglich, dass die Inkubation der Zellen mit W7 posttranslational zu einer Verringerung der PEPT1-Zahl in der Membran oder zu Modifikationen der Transportproteine selbst führt.

Die Ergebnisse der als **Anlagen 7.4, 7.5 und 7.8** beigelegten Studien lassen schließen, dass Protein-Kinase A und/oder C sowie Calmodulin direkt oder indirekt in die Regulation von PEPT1 involviert sind. Es konnte bisher noch *nicht* gezeigt werden, dass PEPT1 durch *direkte* Phosphorylierung moduliert wird. Eine direkte Phosphorylierung von hPEPT1 durch Protein-Kinase A ist unwahrscheinlich: Nach Fei et al. (1994) verfügt rPEPT1 sowohl über eine potentielle Phosphorylierungsstelle für Protein-Kinase A (Thr-362) als auch für Protein-Kinase C (Ser-357). Bei hPEPT1 (humaner Dünndarm, Caco-2-Zellen) *fehlt* die potentielle Phosphorylie-

¹²Die Vorbehandlung ist notwendig, um das Einschleusen der katalytischen A-Untereinheit in die Zellen zu ermöglichen.

rungsstelle für Protein-Kinase A (Liang et al. 1995, **Anlage 7.8**). Andererseits ist die Abwesenheit potentieller Phosphorylierungsstellen *allein* kein Beweis gegen eine direkte Phosphorylierung: Der neuronale Glutamat-Transporter GLAST-1 verfügt z.B. über drei potentielle Protein-Kinase-C-Phosphorylierungsstellen. Werden diese ortsspezifisch mutiert, führt PMA-Behandlung unverändert zur Phosphorylierung von GLAST-1 und unverändert zur Hemmung des Glutamattransportes (Conradt & Stoffel 1997). Die Autoren postulieren eine Regulation von GLAST-1 durch direkte Phosphorylierung des Transportproteins an den Seitenketten anderer Aminosäurereste („non-PKC consensus sites“).

Analysiert man kritisch die große Zahl an Befunden zur Regulation von Translokatoren bei Vertebraten, so findet man nur wenige Arbeiten, bei denen ein schlüssiger Beweis für eine Regulation durch direkte Phosphorylierung geführt werden konnte. Solche Nachweise erfolgten durch Immunpräzipitation ³²P-markierter Transportproteine oder, mit der oben genannten Einschränkung, durch ortsspezifische Mutagenese. Beispiele sind in **Tab. 3** aufgeführt.

Tab. 3: Modulation von Translokatoren durch **direkte Phosphorylierung** der Transportproteine (nur Vertebraten)

Translokator	Zelltyp	Protein-Kinase	Referenz
Ca ²⁺ -Pumpe	Endothel	C	Kuo et al. 1991
Dopamin-Transporter	Neuronen	C	Huff et al. 1997
Glucose-Transporter	Erythrocyten	C	Witters et al. 1985
Glutamat-Transporter (GLAST1)	Neuronen	C	Conradt & Stoffel 1997
Glutamat-Transporter (GLT-1)	Glia, Neuronen	C	Casado et al. 1993
K ⁺ -Kanal	Epithelzellen der Niere	C	Busch et al. 1992
Na ⁺ /Cl ⁻ /Prolin-Symporter	Epithelzellen der Niere	C, CaM-Kinase II	Zelikovic & Przekwas 1993
Na ⁺ /Glucose-Symporter	Epithelzellen des Darmes	A	Ishikawa et al. 1997
Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ -Cotransporter	Epithelzellen der Rektaldrüse des Haies	A	Lytle & Forbush 3 rd 1992
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Epithelzellen der Niere	C	Middleton et al. 1993
System L	B-Lymphocyten	C	Woodlock et al. 1993
Taurin-Transporter	Epithelzellen der Niere	C	Han et al. 1996a,b, 1999

Zur Regulation von PEPT2 war keine Information verfügbar, bis Wenzel et al. (1999) an LLC-PK₁-Zellen entsprechende Studien durchführten. In diesen Zellen wird der D-Phe-L-Ala-Transport durch Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration reguliert. Protein-Kinase C vermittelt dabei das Signal. PMA-Behandlung hemmt den Peptidtransport. Ein für die eigenen Ergebnisse (**Anlagen 7.4, 7.5, 7.8**) relevanter Befund der Autoren ist, dass Staurosporin

zwar den pH_{in} senkt, den Peptidtransport jedoch stimuliert. Die Regulation des H^+ /Peptid-Symportes ist daher *unabhängig* von Änderungen des durch die Na^+/H^+ -Antiporter aufgebauten H^+ -Gradienten als der treibenden Kraft der Translokation. Im Gegensatz zu der Protein-Kinase-C-vermittelten Modulation von PEPT1, wird PEPT2 durch Veränderung der Affinität und nicht der Maximalgeschwindigkeit moduliert.

Es gibt unter physiologischen Bedingungen sehr wahrscheinlich viele Signale, die schnell und relativ spezifisch den Transport von Di- und Tripeptiden an Darm und Niere regulieren. Alle extrazellulären Peptidsignale, für die die Epithelzellen an der den Signalen zugänglichen Membranseite Rezeptoren besitzen, kommen dafür theoretisch in Frage. Kürzlich hat die Arbeitsgruppe von S.A. Adibi zeigen können, dass Insulin den intestinalen Peptidtransport in Caco-2-Zellen stimuliert. Der Mechanismus besteht in der erhöhten Rekrutierung von PEPT1-Transportproteinen aus cytoplasmatischen Vesikeln in die apikale Zellmembran (Thamotharan et al. 1999b).

Ein interessantes Ergebnis zur Regulation von PEPT1 stellte die Arbeitsgruppe Leibach kürzlich vor (Fujita et al. 1999b): Danach löst die Besetzung von σ -Rezeptoren eine erhöhte Biosynthese von PEPT1 aus. Behandlung von Caco-2-Zellen mit Haloperidol oder Pentazocin für 24 h stimuliert den Gly-Sar-Transport um den Faktor 2-3. Da sich die Menge an PEPT1-mRNA bei Inkubation der Zellen mit Pentazocin dosisabhängig erhöht, wird eine Regulation auf der Stufe der Transkription postuliert. Ein physiologisches Signal für diese Regulation könnte Progesteron darstellen, das als endogener Ligand von σ_1 -Rezeptoren diskutiert wird.

Der intestinale Peptidtransport unterliegt möglicherweise auch der Regulation durch ein komplexes neuronales Netzwerk, in das noradrenerge sympathische Fasern, sensorische Neuronen und Synapsen mit nicotinerger Rezeptoren involviert sind (Berlioz et al. 1999).

Weitere Befunde zur Regulation von Peptid-Transportern betreffen zumeist *adaptive* Regulationen, also Anpassungen der Transportaktivität an die Substratkonzentration (Leibach & Ganapathy 1996, Miyamoto et al. 1996, Thamotharan et al. 1998, Walker et al. 1998, Shiraga et al. 1999, Thamotharan et al. 1999a).

4.4 Spezifität des Peptidtransportes

4.4.1 Allgemeine Aspekte

An der Aufklärung der Substratspezifität von Peptid-Transportern wird seit ihrer Entdeckung gearbeitet. Die Befunde zeigten frühzeitig, dass die Spezifität der Systeme nicht stark ausgeprägt ist. Die Zahl *physiologischer* Substrate beträgt mehr als 8.400. Die Zahl *möglicher* Substrate liegt, da die Transporter zusätzlich zu den aus Proteinen freigesetzten Di- und Tripeptiden viele Aminosäure- und Peptidderivate, β -Lactam-Antibiotika und zahlreiche weitere Peptidomimetika als Substrate erkennen, selbst bei konservativer Schätzung weit über 50.000. Man kann PEPT1 und PEPT2 mit einigem Recht zu den multi-spezifischen Membrantransportern zählen. Als strukturelle Erfordernisse für die Substraterkennung wurden bis Mitte der 90er Jahre oft die Existenz (a) einer *Peptidbindung*, (b) einer freien α -Aminogruppe und (c) einer freien *Carboxylgruppe* angesehen. Daneben betrachtete man eine Reihe von strukturellen Parametern als relevant für die Stärke der Substrat-Transporter-Interaktion wie Molekülgröße, Stereoisomerie, Ladung, Polarität und Hydrophobizität (Übersichten bei Meredith & Boyd 1995, Steiner et al. 1995, Tsuji 1995, Daniel 1996, Leibach & Ganapathy 1996, Tsuji & Tamai 1996, Walter et al. 1996, Adibi 1997a,b, Daniel & Herget 1997, Nussberger et al. 1997a, Lee et al. 1999, Tsuji 1999, Yang et al. 1999).

In den letzten Jahren gab es jedoch eine Reihe von Resultaten, die zum Teil Anlaß waren, frühere Postulate zu revidieren. Daniel & Adibi (1994) berichteten z.B., dass PEPT2 bestimmte Verbindungen mit einer Säureamid- oder Ketomethylenbindung erkennt. Die Autoren zeigten darüber hinaus, dass die Carboxylgruppe ohne Verlust an Affinität zum Transportprotein durch eine NO_2 -Gruppe ersetzt werden kann. Nach Temple et al. (1998) wird 4-Aminophenyllessigsäure von PEPT1 als Substrat erkannt, allerdings ist die Wechselwirkung nur sehr schwach. Die Gruppe von H. Daniel charakterisierte kürzlich detailliert den δ -Aminolävulinsäure-Transport durch PEPT1 und PEPT2 (Döring et al. 1998c). Außerdem erweiterten die Autoren durch systematische Analysen des Transportes einer Reihe von ω -Aminofettsäuren unser Wissen über die minimalen strukturellen Anforderungen von Peptid-Transportern beträchtlich (Döring et al. 1998d). Danach ist für den Transport eines PEPT1-Substrates eine Minimalstruktur erforderlich, bei der der Abstand zwischen zwei polaren Zentren wie dem Stickstoff der Aminogruppe und dem Kohlenstoff der Carboxylgruppe 500 bis 630 pm beträgt. Fehlt eine der Gruppen, so wird das Molekül von PEPT1 zwar noch erkannt, aber nicht mehr elektrogen transportiert. Dieser

Befund erklärt einerseits die Substratvielfalt und weist andererseits den Weg für die strukturelle Modifizierung bisher nicht oral verfügbarer pharmakologisch-aktiver Verbindungen. 1998 wurde z.B. mehrfach publiziert, dass die Ursache für die relativ hohe orale Bioverfügbarkeit von Valacyclovir darin begründet liegt, dass es, im Gegensatz zu Acyclovir, von PEPT1 als Prodrug transportiert wird (Ganapathy et al. 1998, Sinko & Balimane 1998 u.a.).

Neben dem erkenntnistheoretischen Aspekt, die Substraterkennung auf molekularer Ebene verstehen zu wollen, gibt es folglich für die intensive Untersuchung der Spezifität von Peptid-Transportern drei weitere wesentliche Motive:

1. die Suche nach hoch-affinen, markierten PEPT1(2)-Inhibitoren für biochemische und molekularbiologische Analysen der Struktur der Transportproteine *in der Zellmembran*
2. die Suche nach hoch-affinen, markierten PEPT1(2)-Substraten für mikroskopische Analysen von *intrazellulären Ereignissen* nach der Translokation („intracellular fate“)
3. die Suche nach Leitstrukturen für die *Entwicklung* von oral verfügbaren Peptidpharmaka/ Peptidomimetika („drug design“)

In den folgenden Abschnitten werden die eigenen Beiträge zur Aufklärung der Substratspezifität von H⁺/Peptid-Symportern zusammengefasst. Diese bestehen in:

- der Beschreibung neuer Aminosäurederivate als Substrate für PEPT1
- dem Nachweis einer unterschiedlichen Substraterkennung durch PEPT1 und PEPT2
- der systematischen Untersuchung des intestinalen transepithelialen Transportes von β -Lactam-Antibiotika im Vergleich mit ihrer Affinität zu PEPT1
- dem Nachweis der *cis/trans*-Konformations-Spezifität von PEPT1
- der systematischen Untersuchung der Interaktion von Prolinderivaten mit PEPT1

4.4.2 Intestinaler Transport von Aminosäurederivaten

Vgl. Anlage 7.9 (Börner et al. 1998)

In dieser Arbeit wurden verschiedene neue Aminosäure- und Dipeptidderivate hinsichtlich ihrer Interaktion mit PEPT1 untersucht. Während freie Aminosäuren von PEPT1 wie erwartet nicht als Substrate erkannt werden, ergibt sich für strukturmodifizierte Aminosäureamide eine breite Differenzierung des intestinalen Transportes in Abhängigkeit sterischer, elektronischer und hydrophober Parameter der Amidstruktur.

Im ersten Teil erfolgten Konkurrenzexperimente, in denen wir die K_i -Werte der potentiellen Substrate bei der Hemmung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme in Caco-2-Zellen ermittelten. Die Derivate Ala-NH₂, Phe-NH₂, Ala-methylester, Ala-4-nitrobenzylester und Ala-methylamid sind selbst in hohen Konzentrationen nicht in der Lage, den Transport von [^{14}C]Gly-Sar in die Zellen zu hemmen ($K_i > 20$ mM). Die in *para*-Stellung substituierten Arylamide Ala-4-nitroanilid, Phe-4-nitroanilid, Ala-4-phenylanilid, Ala-4-chloranilid und Ala-4-methylanilid können dagegen als potentielle Substrate betrachtet werden, deren K_i -Werte denen natürlicher Dipeptide vergleichbar sind (0,03 – 0,3 mM). Durch die Einführung einer CH₂-Gruppe zwischen Amidstickstoff und Arylsystem (H-Ala-4-nitrobenzylamid u.a.) geht die hohe Affinität der Aminosäurearylamide verloren. Da Daniel & Adibi (1994) in einer Studie zu Substrattransport und -hydrolyse bereits erkannt hatten, dass verschiedene Xaa-4-nitroanilide den Transport von [^3H]Gly-Gln am Nierenepithel kompetitiv mit hoher Affinität hemmen, kann davon ausgegangen werden, dass diese Verbindungen sehr gute Substrate für *beide* Peptidtransporter darstellen.

Der Einsatz neuer, bildgebender Verfahren in der Zellbiologie, wie der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie, löste die Suche nach Transportsubstraten für PEPT1 aus, die sich mikroskopisch nachweisen und quantifizieren lassen. Mit solchen Substraten ist es z.B. möglich, intrazelluläre Ereignisse nach der Translokation zu analysieren (Hydrolyse, intrazellulärer Transport u.a.). Unseren bisherigen Ergebnissen zufolge könnte Ala-7-amido-4-methyl-coumarin ein Substrat für solche Messungen sein, zumindest wird es von PEPT1 mit hoher Affinität erkannt ($K_i = 0,2$ mM). Verschiedene Gruppen haben mit Erfolg das Dipeptidderivat β -Ala-Lys-N(ϵ)-amido-4-methyl-coumarin als Substrat zum Nachweis von Peptid-Transportern an verschiedenen Zelltypen eingesetzt (Dieck et al. 1998, Döring et al. 1998b, Abe et al. 1999).

Im zweiten Teil der Experimente führte Y.-J. Fei (Arbeitsgruppe F.H. Leibach) elektrophysiologische Messungen an *Xenopus laevis*-Oocyten, in denen hPEPT1 exprimiert worden war

durch. Sie sind für unsere Schlussfolgerungen von hoher Relevanz: Die Verdrängung eines markierten Substrates ($[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$) vom Transportprotein (PEPT1) durch unmarkierte Derivate (Xaa-4-nitroanilide etc.) kann als Beweis für eine *Interaktion* der Derivate mit PEPT1 betrachtet werden, aber nicht als Beweis für einen tatsächlichen *Transport* der Verbindungen *in die Zelle*. Da im *Xenopus laevis*-Oocyten-Modell der Transport von Ala-4-nitroanilid, Ala-7-amido-4-methyl-coumarin, Ala-4-methylanilid und Ala-anilid mit dem Transfer von positiven Ladungen (H^+) assoziiert ist (**Anlage 7.9**), kann von einer tatsächlichen Translokation zumindest dieser Derivate durch den intestinalen H^+ /Peptid-Symporter ausgegangen werden.

4.4.3 Intestinaler und renaler Transport von β -Lactam-Antibiotika

Vgl. Anlagen 7.10 (Ganapathy et al. 1995a) und 7.11 (Bretschneider et al. 1999)

Mit der Etablierung von Caco-2- und SKPT-Zellen als Modelle für PEPT1- bzw. PEPT2-vermittelten Transport (**siehe Abschnitt 4.2**) war die Möglichkeit gegeben, die Affinitätskonstanten von Cephalosporinen und Penicillinen an PEPT1 und PEPT2 unter sehr vergleichbaren Bedingungen zu bestimmen (**Anlage 7.10**).

Eine Zielstellung dabei war es, Unterschiede bei der Substraterkennung durch PEPT1 und PEPT2 aufzufinden. PEPT1 und PEPT2 unterscheiden sich zwar in ihrer Primärstruktur, ihrem Vorkommen, ihren kinetischen Konstanten und einigen funktionellen Parametern, signifikante *qualitative* Unterschiede bei der Substraterkennung waren bislang nicht bekannt. PEPT2 weist zu vielen Di- und Tripeptiden und β -Lactam-Antibiotika meist eine etwa 10-20fach höhere Affinität auf als PEPT1; innerhalb der untersuchten Reihen von Substraten wurde jedoch überwiegend die gleiche Rangordnung an Affinitätskonstanten festgestellt (Übersichten bei Meredith & Boyd 1995, Tsuji & Tamai 1996, Walter et al. 1996, Adibi 1997a,b, Daniel & Herget 1997, Nussberger et al. 1997a, Lee et al. 1999, Tsuji 1999, Yang et al. 1999)¹³.

In der vorgelegten Arbeit (**Anlage 7.10**) wurden an SKPT-Zellen zunächst die IC_{50} -Werte der Cephalosporine Cephalexin, Cefadroxil und Cephalotin sowie der Penicilline Cyclacillin, Ampicillin und Benzylpenicillin an PEPT2 bestimmt, bei denen sie die Transporter-vermittelte Aufnahme von $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ in die Zellen um 50% hemmen. Für Cephalexin erfolgte darüber

¹³Die Unterscheidung in „hoch-“ und „niedrig“-affinen Transport galt ursprünglich für „Standardsubstrate“ wie $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$, $[^3\text{H}]\text{Gly-Gln}$, natürlich vorkommende Di- und Tripeptide und Cephalosporine. Sie muss nicht automatisch für *alle* Substrate der Symporter gelten.

hinaus die Bestimmung des V_{\max} - und K_t -Wertes. Der Einsatz verschiedener markierter und unmarkierter Substrate (A-B-C-Test) ermöglichte den in SKPT-Zellen bis dahin noch nicht geführten Beweis, dass Gly-Sar und die eingesetzten β -Lactam-Antibiotika durch ein und dasselbe System, d.h. PEPT2 transportiert werden. Cefadroxil, Cyclacillin und Cephalexin interagieren mit PEPT2 mit sehr hoher Affinität ($IC_{50} = 3 - 73 \mu\text{M}$). Ampicillin, Cephalotin und Benzylpenicillin weisen nur eine sehr schwache Wechselwirkung mit PEPT2 auf ($IC_{50} = 1,3 - >10 \text{ mM}$). Im Weiteren verglichen wir die Affinität von Cefadroxil und Cyclacillin an PEPT1 (Caco-2-Zellen) und PEPT2 (SKPT-Zellen). In diesen Experimenten zeigte sich ein Unterschied zwischen beiden Transportern hinsichtlich der Substraterkennung: An PEPT1 liegt der IC_{50} -Wert von Cyclacillin 9fach *unter* dem von Cefadroxil. An PEPT2 liegt der IC_{50} -Wert von Cyclacillin 14fach *über* dem von Cefadroxil. Folglich interagiert PEPT1 mit Cyclacillin stärker als mit Cefadroxil und PEPT2, genau umgekehrt, stärker mit Cefadroxil als mit Cyclacillin. Ein Faktor 9 bzw. 14 ist dabei als signifikant einzuschätzen. Es muss betont werden, dass die Zelllinien von unterschiedlichen Spezies - Mensch bzw. Ratte - stammen; für unterschiedliche Substraterkennung könnten also Speziesdifferenzen geltend gemacht werden. Um dies auszuschließen, wurde die hPEPT1- bzw. hPEPT2-cDNA in HeLa-Zellen exprimiert. Der Unterschied zwischen PEPT1 und PEPT2 hinsichtlich der Erkennung von Cyclacillin und Cefadroxil konnte auch in diesem System bestätigt werden (**Anlage 7.10**). Dieser Befund ändert nichts an der Tatsache, dass beide Substanzen zu PEPT2 eine sehr viel höhere Affinität als zu PEPT1 aufweisen.

Die zahlreichen Veröffentlichungen zum intestinalen Transport von β -Lactam-Antibiotika sind nur sehr begrenzt miteinander vergleichbar (Übersichten bei Tsuji 1995, Walter et al. 1996, Yang et al. 1999). Der Grund ist hauptsächlich darin zu sehen, dass die Daten mit sehr verschiedenen Methoden erzielt wurden. Daher sind Versuche fraglich, die Daten methodisch verschieden arbeitender Gruppen zu kombinieren und nachfolgend mittels computergestütztem Modelling die Minimal- bzw. Optimalstruktur von Substraten und Inhibitoren zu berechnen. Zur weiteren systematischen Aufklärung der strukturellen Erfordernisse, die hinsichtlich ihres aktiven Transportes an neue β -Lactam-Antibiotika zu stellen sind, wurden in der vorliegenden Arbeit (**Anlage 7.11**) verschiedene Transportparameter von 23 Cephalosporinen und Penicillinen an Caco-2-Zellen bestimmt. In den ersten Versuchsserien ermittelten wir die Inhibierungskonstanten (K_i) der Antibiotika, mit denen sie den [^{14}C]Gly-Sar-Transport hemmen. Die

K_i -Werte differieren bis um den Faktor >400 . Die β -Lactam-Antibiotika lassen sich wie folgt gruppieren:

1. Ceftibuten und Cyclacillin weisen eine sehr hohe Affinität zu PEPT1 auf.
2. Cefadroxil, Cefamandol, Cephadrin, Cefaclor, Cefuroxim-Axetil, Cefixim, Cephalothin, Cephalexin und Ampicillin sind Substrate mit niedriger Affinität.
3. Ceftriaxon, Cefotaxim, Cefepim, Cefsulodin u.v.a. (**siehe Anlage 7.11, Tab. I**) werden von PEPT1 nicht als Substrat erkannt.

Struktur-Affinitäts-Vergleiche ergeben in großer Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren (Übersichten bei Tsuji 1995, Walter et al. 1996), dass für die Erkennung als Substrat folgende strukturellen Merkmale relevant sind:

1. Sterische Ähnlichkeit zum Tripeptid-Rückgrat
2. die N-terminale Peptidbindung und eine α -Aminogruppe, die durch eine Hydroxylgruppe ersetzt sein kann
3. die C-terminale Peptidbindung im Lactamring, wobei es unerheblich ist, ob es sich um einen Cephem- oder Penam-Grundkörper handelt
4. eine Carboxylgruppe am Dihydrothiazinring der Cephalosporine bzw. am Thiazolidinring der Penicilline, die nicht mit einer quarternären Ammoniumgruppe in einer C3-Seitenkette eine zwitterionische Struktur ausbilden darf
5. die Substituenten und der Sättigungsgrad des N-terminalen Ringsystems

In der vorgelegten Arbeit (**Anlage 7.11**) konnte mit einer relativ großen Datenmenge gezeigt werden, dass die Affinität der Cephalosporine und Penicilline an PEPT1 sehr gut mit ihrer derzeit praktizierten Applikation (oral bzw. parenteral) korreliert. Mit Ausnahme von Cefamandol und Cephalotin sind genau *diejenigen* oral applizierbar, deren K_i -Werte an PEPT1 in Caco-2-Zellen unter den gewählten Bedingungen *unter* 14 mM liegen.

In den nächsten Versuchsserien wurden (a) die Akkumulationen der 23 β -Lactam-Antibiotika in Caco-2-Zellen und (b) ihre transepithelialen Fluxe bestimmt. Die Akkumulationen variieren bis um den Faktor 176 und die Fluxe bis um den Faktor 70. Beide Werte sind für das oral applizierbare Cefadroxil am höchsten. Dieses Cephalosporin wird in den Zellen 9fach angereichert. Akkumulationen und Fluxe sind positiv korreliert ($p < 0,0001$). Das wichtigste Ergebnis war, dass die totalen transepithelialen Fluxe und die Affinitätskonstanten an PEPT1 signifikant korreliert

sind ($p < 0,0001$). Die Variation der Fluxe wird also hauptsächlich von der Variation der Affinität an PEPT1 bestimmt. Dabei gibt es Substanzen, für die dies aus bekannten (Cefuroxim-Axetil: Lipophilie) oder noch unbekanntem Gründen (Cephalotin) nicht zutrifft.

Unzweifelhaft ist die Korrelation zwischen dem transepithelialen Transport an Caco-2-Zell-Monolayern und der derzeit praktizierten Applikation: Cefamandol ist die einzige Ausnahme von der Regel, dass an dem verwendeten Modell ein Flux $> 2 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ bei einer luminalen Substratkonzentration von 1 mM, also eine scheinbare Permeabilität P_{app} von $> 5 \cdot 10^{-9} \text{ m/s}$, eine orale Verfügbarkeit von $> 50\%$ bedeutet. Mit anderen Worten: *Die* Substanzen, deren Flux an kultivierten Caco-2-Zellen unter unseren Bedingungen *über* diesem Schwellenwert liegt, sind die oral applizierbaren. Alle Substanzen mit Fluxen *unter* diesem Wert erfordern eine i.v.-Applikation. Innerhalb bestimmter Grenzen kann also durch Messung von Affinität, Aufnahme und Flux die Bioverfügbarkeit neu entwickelter Substanzen prognostiziert werden. Zu erwartende Unterschiede in den verschiedenen Testsystemen, Kulturbedingungen, etc. sind durch vergleichende Messung der Transportparameter von „Standard“-Substanzen wie Mannitol, Gly-Sar, Salicylsäure, Testosteron u.a. zu erfassen.

In diesen Studien blieben andere, zusätzliche Transport-Komponenten wie z.B. weitere Mechanismen für den Influx oder für den luminalen Efflux von β -Lactam-Antibiotika (Saitoh et al. 1997, Tsuji 1999) weitgehend unberücksichtigt. Unseren Ergebnissen und denen anderer Autoren zufolge stellt der PEPT1-vermittelte Transport jedoch den *wichtigsten* Mechanismus zur Resorption oral verfügbarer β -Lactam-Antibiotika – auch ungeachtet ihrer Ladung – dar (Wenzel et al. 1995, 1996, Tamai et al. 1997).

4.4.4 *Cis/trans*-Konformations-Spezifität des intestinalen H^+ /Peptid-Symporters **Vgl. Anlagen 7.12 (Brandsch et al. 1998) und 7.13 (Brandsch et al. 1999)**

Eine Frage, die experimentell noch nicht untersucht worden war, ist die Frage nach der Konformationspezifität von Peptid-Transportern. Peptide und Proteine können auf Grund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung *cis/trans*-Isomerie aufweisen. Da die Energiedifferenz zwischen *cis*- und *trans*-Konformation bei der Imidbindung bedeutend niedriger ist als bei der Amidbindung, findet man unter genkodierte Di- und Tripeptiden signifikante Anteile der *cis*-Konformation nur bei **Xaa-Pro**-Peptidbindungen (Übersicht bei

Fischer 1994). Zwischen den Konformeren besteht dabei ein Gleichgewicht, das von der Struktur und von den experimentellen Bedingungen abhängt.

Für Peptidasen und Proteasen ist beschrieben worden, dass sie die *trans*-Konformation der Substrate bevorzugen (Lin & Brandts 1979, Fischer et al. 1984, Yaron & Naider 1993, Merker et al. 1996, Vance et al. 1997). Für Peptid-Rezeptoren wird in manchen Fällen eine Erkennung der *trans*-, in anderen Fällen eine solche der *cis*-Konformere der Liganden diskutiert (Yamazaki et al. 1993, Otleben et al. 1997).

Daniel et al. (1992) hatten für ihr Ergebnis, dass am Nierenepithel Gly-Pro- und Gly-Sar eine 4–12fach niedrigere Affinität als Gly-Gly und Gly-Ala aufwiesen, eine Isomerisierung der Peptidbindung als Ursache bereits diskutiert. In der vorliegenden Arbeit (**Anlage 7.12.**) war es erstmals möglich, den Transport von Konformeren *ein und desselben* Substrates messen.

Es musste dafür ein Peptid gefunden werden, das

- cis/trans*-Isomerie aufweist,
- von PEPT1 erkannt wird,
- eine hinreichend niedrige *cis/trans*-Interkonversionsrate aufweist und
- dessen *cis/trans*-Verhältnis sich experimentell verändern lässt.

Als Modellsubstrat für die Transportstudien wählten wir das Thioxodipeptid Ala-Ψ[CS-N]-Pro (**Anlage 7.12**). Von Thioxopeptiden war bekannt, dass der Austausch der Peptidbindung durch die Thioxopeptidbindung in einer bis zu 100fach langsameren *cis/trans*-Interkonversionsrate resultiert, die durch die höhere Rotationsbarriere an der C-N-Bindung bedingt ist (Schutkowski et al. 1995, 1997). Die Derivate sind darüber hinaus oft isosterisch zu den entsprechenden nicht-thioxylierten Peptiden.

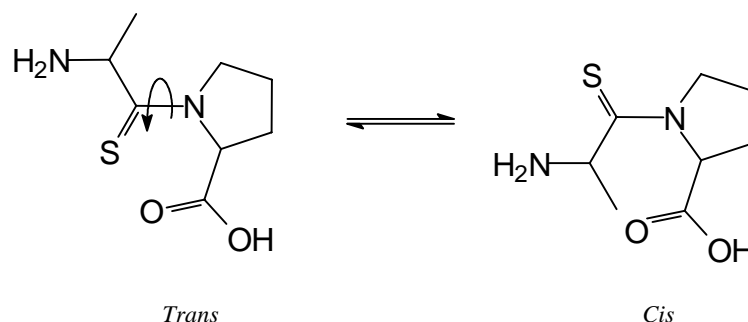


Abb. 2: Die *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxopeptidbindung in Ala-Ψ[CS-N]-Pro

Ala- Ψ [CS-N]-Pro liegt in wässriger Lösung in *cis*- und *trans*-Konformation vor; die Konformere können mittels Kapillarelektrophorese getrennt werden. Sofort nach dem Lösen des Peptides in Puffer liegt das Gleichgewicht deutlich auf Seiten der *trans*-Konformation (*trans*-Gehalt 96%). Die Interkonversion in Richtung des *cis/trans*-Gleichgewichtes (**Abb. 2**) verläuft langsam. Ein Einfrieren der Lösung verzögert die Interkonversion drastisch, den *trans*-Gehalt von 96% buchstäblich arretierend. Bei Raumtemperatur wird das Gleichgewicht nach zwei Tagen mit 62% *trans*- und 38% *cis*-Anteilen erreicht¹⁴. Somit war es möglich, Transportexperimente mit Peptidlösungen durchzuführen, die unterschiedliche *trans*-Anteile aufwiesen.

Der Austausch der α -Peptidbindung durch die Thiopeptidbindung in Ala- Ψ [CS-N]-Pro wird von PEPT1 toleriert (**Anlage 7.12**). Im Fall der *ad hoc*-Lösung (*trans*-Gehalt 96%) beträgt $K_i = 0,3$ mM. Dieser Wert ist dem natürlicher Dipeptide vergleichbar. Der K_i -Wert liegt im Fall der equilibrierten Ala- ψ [CS-N]-Pro-Lösung (*trans*-Gehalt 62%) um 70% höher. Die K_i -Werte unterscheiden sich damit um *den* Anteil, der dem *cis*-Gehalt entspricht. PEPT1 erkennt offensichtlich nur das *trans*-Konformer.

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese konnte direkt gezeigt werden, dass das Thiopeptid auch nur in seiner *trans*-Konformation aktiv in die Zelle transportiert wird. Obwohl bei diesen Messungen der *trans*-Gehalt im Inkubationspuffer 62% betrug (*cis/trans*-Gleichgewicht), wurde Ala- ψ [CS-N]-Pro in den Zellen zu 92% in *trans*-Konformation nachgewiesen. Während der Inkubation der Caco-2-Zellen nimmt nur der Anteil an *trans*-Konformeren im Medium signifikant ab. Das extrazelluläre *cis/trans*-Verhältnis verschiebt sich in Richtung der *cis*-Konformere.

Die Begründung für die Präferenz der *trans*-Konformere durch PEPT1 sollte in der räumlichen Anordnung der NH₂- und COOH-Gruppen zueinander - eben in deren *cis*- oder *trans*-Stellung – bzw. in dem davon abhängigen Abstand der beiden Gruppen voneinander zu suchen sein. Nach Döring et al. (1998d) muss dieser Abstand (N-C) bei einem PEPT1-Substrat für elektrogenen Transport 500 bis 630 pm betragen. Bei *trans* Ala- ψ [CS-N]-Pro beträgt der Abstand vom N- zum C-Terminus 525 pm¹⁵. In *cis*-Stellung ist der Abstand auf 402 pm verkürzt. Wenn an der Zellmembran die Abstände tatsächlich diese Werte betragen, wäre es denkbar, dass es dieser zu

¹⁴Solche Unterschiede in *cis/trans* Verhältnissen zwischen *ad hoc*- und equilibrierten Lösungen, die die folgenden Experimente erst möglich machten, sind auch für natürliche Xaa-Pro-Konformere beschrieben (Thuncke et al. 1997).

¹⁵Die Berechnung der Abstände erfolgte mit dem Programm Hyperchem nach Optimierung der Struktur *in vacuo* durch den AMBER-Algorithmus. Für das *cis*-Konformer betrug der geometrie-optimierte Torsionswinkel $\omega = 8^\circ$ und für das *trans*-Konformer 176° .

geringe Abstand ist, der eine Erkennung der *cis*-Konformere nicht erlaubt. Andererseits ist es leichter vorstellbar, dass die diametral verschiedene Anordnung der NH₂- und COOH-Gruppen bei Interaktionen der Konformere mit geladenen Seitenketten der Substrat-Bindungsstelle des Transportproteins ausschlaggebend ist.

Aus den bisherigen Daten kann *nicht* geschlossen werden, dass PEPT1 auch physiologisch vorkommende Dipeptide in *trans*-Konformation bevorzugt. Daher wurden Untersuchungen zur Interaktion von PEPT1 mit Xaa-Pro-Dipeptiden durchgeführt (**Anlage 7.13**). Xaa-Pro-Dipeptide liegen bei physiologischem pH in sehr unterschiedlichen *cis/trans*-Verhältnissen vor; im Gleichgewicht sind *trans*-Gehalte von 24 - 70% messbar. Es gibt eine signifikante negative Korrelation ($p < 0,001$) zwischen den *trans*-Gehalten und den K_i-Werten. Eine hohe Affinität zeigen die Substrate, die einen *hohen trans*-Gehalt aufweisen und umgekehrt. Die scheinbare Affinität von Xaa-Pro-Dipeptiden zu PEPT1 wird daher hauptsächlich von ihrem *cis/trans*-Verhältnis bestimmt. Auch diese Resultate sprechen für die (*trans*-) Konformations-Spezifität von PEPT1. Analoge Ergebnisse wurden für einige Xaa-Sar-Dipeptide, die ebenfalls *cis/trans*-Isomerie aufweisen, erzielt¹⁶.

Die deutliche Präferenz von *trans*-Konformeren durch PEPT1 bedeutet, dass bei Untersuchungen zum Einfluss der N-terminalen Aminosäure auf den Transport von Xaa-Pro- und Xaa-Sar-Dipeptiden die *cis/trans*-Verhältnisse nicht unberücksichtigt bleiben dürfen. Eine Vernachlässigung des *cis*-Gehaltes führt zu überschätzten IC₅₀-, K_i- oder K_t-Werten. Solche Parameter sollten um genau *den* Anteil vom „wahren“ Wert abweichen, der dem Anteil an *cis*-Konformeren entspricht. Abweichungen um (maximal) Faktor 2-3 sind daher leicht möglich und würden das Aufklären von weiteren strukturellen Erfordernissen für die Interaktion von Substraten mit PEPT1 erschweren. In der vorgelegten Arbeit wurde daher eine Korrektur der K_i-Werte bezogen auf den *trans*-Gehalt durchgeführt (**Anlage 7.13**). Die K_{i korrt}-Werte der Dipeptide (außer bei Pro-Pro und den kationischen Dipeptiden Lys-Pro und Arg-Pro) liegen in dem engen Bereich von 0,1 bis 0,15 mM, d.h. PEPT1 erkennt die *trans*-Konformere von Xaa-Pro-Dipeptiden ungeachtet ihrer Größe oder Hydrophobizität gleichermaßen.

¹⁶Gly-Sar wird sehr häufig als stabiles Substrat für Peptid-Transporter eingesetzt. Man hat die Inkompetenz seiner *cis*-Konformere bisher nie berücksichtigt. Der unkorrigierte K_t-Wert von Gly-Sar beträgt in Caco-2-Zellen 0,83 mM (**Anlage 7.13**). Gly-Sar weist in wässriger Lösung im Gleichgewicht jedoch einen *trans*-Gehalt von nur 61% auf. Die Korrektur ergibt K_{t korrt}=0,51 mM. Die Affinitätskonstanten potentieller Substrate werden oft in Kompetitionsassays mit [¹⁴C]Gly-Sar indirekt ermittelt. Praktisch hat die Vernachlässigung der Korrektur um den *cis*-Gehalt *keine* Konsequenzen bei der Berechnung der K_i-Werte aus IC₅₀-Werten, *solange* die Konzentration des radioaktiven Substrates sehr viel niedriger ist als sein K_t-Wert.

Diese Schlussfolgerung ist neu. Sie konnte durch Bestimmung der Affinitätskonstanten der korrespondierenden Xaa-Ala-Dipeptide, die unter den gegebenen Bedingungen nur in *trans*-Konformation vorliegen, vollauf bestätigt werden (**Anlage 7.13**): Die K_i -Werte der Xaa-Ala-Dipeptide entsprechen sowohl relativ (hinsichtlich der Rangfolge) als auch absolut (hinsichtlich der Konzentrationen) weitgehend den $K_{i\text{ kor}}$ -Werten der (*trans*-) Xaa-Pro-Dipeptide. Prolin *per se* erniedrigt die Affinität daher nicht. Auch bei Xaa-Ala-Dipeptiden sind Größe und Hydrophobizität der N-terminalen Aminosäurereste für die Interaktion mit PEPT1 irrelevant¹⁷. Von Bedeutung scheint dagegen die Ladung zu sein; Lys-Ala und Arg-Ala weisen wiederum eine signifikant niedrigere Affinität auf. Dieses Phänomen war bekannt (Übersicht bei Daniel 1997). Welche Konsequenzen hat die Konformationsspezifität von PEPT1 unter physiologischen Bedingungen für den Transport von Xaa-Pro-Dipeptiden am Darmepithel? Auch wenn (a) die hydrolytische Spaltung von Oligopeptiden im Lumen, (b) die Translokation der resultierenden Xaa-Pro-Dipeptide und (c) die hydrolytische Spaltung der Dipeptide im Cytoplasma *konformationsspezifisch* erfolgen, wird sich in den verschiedenen Kompartimenten, sowohl extrazellulär als auch intrazellulär, permanent das spezifische Gleichgewicht *spontan* (Xaa-Pro-Dipeptide sind keine Substrate für bisher bekannte Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, Fischer 1994, Fischer et al. 1998) und sehr schnell wieder einstellen. Vergleicht man die Zeiträume, in denen Verdauungs- und Resorptionsprozesse am Jejunum stattfinden, mit den *cis/trans*-Interkonversionsraten von Xaa-Pro-Dipeptiden ist zu erwarten, dass diese Substrate trotz ihrer Besonderheit vollständig resorbiert werden. Bei der Entwicklung neuer, pharmakologisch-aktiver Peptidomimetika sollten sich jedoch auf Grund der Konformationsspezifität von PEPT1 stabile „Backbone“-Modifikationen als relevant für die Bioverfügbarkeit der Substrate erweisen. In der vorgelegten Arbeit (**Anlage 7.13**) wurde eine Reihe von Xaa-Pro-Derivaten wie Aminosäure-pyrrolidide und -thiazolidide hinsichtlich ihrer Interaktion mit PEPT1 untersucht. Xaa-pyrrolidide weisen keine Affinität zu PEPT1 auf. Für die ebenfalls decarboxylierten Derivate Ala- und Ile-thiazolidid, Peptidaseinhibitoren mit möglicher klinischer Anwendbarkeit (Schön et al. 1991, Reinhold et al. 1998), wurden dagegen K_i -Werte gemessen, die für eine mäßig starke Interaktion mit PEPT1 sprechen. Noch ist unbekannt, ob sie tatsächlich in die Zellen transportiert werden.

¹⁷Eine weitere Versuchsserie (**Anlage 7.13**) beschäftigte sich mit Pro-Xaa-Dipeptiden. Pro-Xaa-Dipeptide weisen keine *cis/trans*-Isomerie auf. Für Pro-Ser, Pro-Glu und Pro-Gly ist keine Interaktion mit PEPT1 nachweisbar. Pro-Leu, Pro-Tyr und Pro-Pro stellen mit K_i -Werten $< 1,2$ mM zumindest hinsichtlich ihrer Affinität gute Substrate für PEPT1 dar. Die Interaktion von Pro-Xaa-Dipeptiden scheint positiv mit der Hydrophobizität der C-terminalen Aminosäure und der Rigidität der Struktur korreliert zu sein.

4.5 Ausblick

Zusätzlich zu den aktuellen, unter 4.1 genannten Schwerpunkten zeichnen sich folgende neue Forschungsrichtungen und Methoden ab:

1. Derzeit wird an der Generierung von PEPT1-Knock-out-Mäusen gearbeitet (Leibach 1999). Es ist zu erwarten, dass sich dieses Modell für die Aufklärung der verschiedenen physiologischen Funktionen des intestinalen H^+ /Peptid-Symportes als von besonderem Wert erweisen wird. Dazu gehören ernährungsphysiologische Experimente, bei denen man z.B. definierte dipeptid-reiche Diäten füttert, wie auch Studien, die sich mit der Resorption von pharmakologisch-aktiven PEPT1-Substraten beschäftigen. Analog liegen zu einigen Aminosäure-Transportern sehr interessante, an Knock-out-Mäusen erzielte Ergebnisse bereits vor, z.B. zu dem Transporter für kationische Aminosäuren mCAT-1 (Perkins et al. 1997) sowie den Glutamat-Transportern EAAT2 (Phegini et al. 1997) und EAAT3 (Tanaka et al. 1997).
2. Ein weiterer, derzeit noch nicht absehbarer Schritt wird die Röntgenstrukturanalyse sein. Dazu muss PEPT1 bzw. PEPT2 mit amphiphilen Molekülen als Micelle kristallisiert werden. Eine Auflösung von 0,3 nm würde Aussagen über die Lage von Seitengruppen und intramolekularen Wechselwirkungen ermöglichen. Beispiele für erfolgreich durchgeführte Kristallstrukturanalysen von Translokatoren sind der Kalium-Kanal von *Streptomyces lividans* (Doyle et al. 1998) und die bakteriellen Eisen-Transporter FhuA und FepA (Buchanan et al. 1999, Sansom 1999).
3. Zur Aufklärung der strukturellen Erfordernisse, die an PEPT1(2)-Substrate zu stellen sind, empfiehlt sich die Verbindung der kombinatorischen Chemie mit schnellen Transporttests. Das Ziel ist die systematische Selektion von Substraten aus der Vielfalt möglicher Strukturvariationen. Auf diese Weise konnte z.B. das wesentliche Erkennungsprinzip des TAP-Transporters aufgeklärt werden (Uebel et al. 1997). Im Fall von PEPT1(2) kann man die Produkte der kombinatorischen chemischen Synthese z.B. mit dem von der Arbeitsgruppe H. Daniel entwickelten PEPT1(2)/Pichia-Assay (Döring et al. 1997) hinsichtlich ihrer Interaktion mit den Systemen schnell und effizient untersuchen.
4. Polymorphismen von Transportproteinen sind eine der vielen möglichen Erklärungen für die interindividuelle Variabilität bei der Wirkung von Pharmaka (Sadée 1999). Bei hoher interindividueller Variabilität der *Resorption* oral applizierter β -Lactam-Antibiotika würde man nicht nur Körpermasse, Geschlecht, Alter etc., sondern auch genetische Polymorphismen

von PEPT1 zu berücksichtigen haben. Damit im Zusammenhang steht die Suche nach etwaigen pathologischen Situationen, die auf Defekten von Peptid-Transportern und Defiziten bei der Di- und Tripeptid-Resorption beruhen. Derzeit ist darüber nichts veröffentlicht. Für andere Solute sind Krankheiten, die auf Mutationen der Translokatoren beruhen, bekannt, z.B. die Mucoviscidose, die Glucose-Galactose-Malabsorption, die Cystinurie und die Hartnup-Krankheit.

5 Zusammenfassung

1. TRANSPORT VON TAURIN AM EPITHEL DES DARMES

- Die Darmzellen HT-29 und Caco-2 exprimieren den *sekundär aktiven* Na⁺/Cl⁻/Taurin-Symporter.
- Der Taurintransport wird durch die Protein-Kinasen A und C reguliert. Die Daten lassen auf posttranslationale Modifikationen des Transportproteins schließen.
- Guanylin, das hitze-stabile *E. coli*-Enterotoxin und Cholera-Toxin sind physiologische bzw. pathophysiologische Signale für die Regulation des intestinalen Taurintransportes.

2. TRANSPORT VON LEUCIN AM EPITHEL DER PLACENTA

- Die Placentazellen JAR exprimieren den *passiven* Leucin-Transporter (System L).
- Die pH-Sensitivität des Systems wird durch Calmodulin-abhängige Prozesse moduliert.

3. TRANSPORT VON PEPTIDEN UND PEPTIDOMIMETIKA AN DEN EPITHELIIEN VON DARM UND NIERE

Charakterisierung

- Die Darmzellen Caco-2 und die Nierenzellen MDCK exprimieren den *tertiär aktiven* „low-affinity, high-capacity“ H⁺/Peptid-Symporter PEPT1.
- Die Nierenzellen SKPT-0193 exprimieren den *tertiär aktiven* „high-affinity, low-capacity“ H⁺/Peptid-Symporter PEPT2.
- Protonen stimulieren beide Symporter durch Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit. Eine Blockierung von Histidylresten senkt die Maximalgeschwindigkeit.

Regulation

- Der intestinale Peptidtransport wird durch die Protein-Kinasen A und C posttranslational reguliert.
- Cholera-Toxin und das hitze-labile *E. coli* Enterotoxin sind pathophysiologische Signale für die Regulation des intestinalen Peptidtransportes.
- PEPT1 des Nierenepithels unterliegt einer Calmodulin-abhängigen Regulation.

Spezifität

- PEPT1 transportiert Aminosäureamide in Abhängigkeit sterischer, elektronischer und hydrophober Parameter der Amidstruktur.
- Die Substraterkennung kann bei PEPT1 und PEPT2 qualitativ verschieden sein.
- Die transepithelialen Fluxe von β -Lactam-Antibiotika an Caco-2-Zell-Monolayern und ihre Affinitätskonstanten an PEPT1 sind signifikant korreliert. Beide Parameter sind signifikant mit den derzeit praktizierten therapeutischen Applikationswegen (oral bzw. parenteral) korreliert. Der Transport durch PEPT1 stellt den wichtigsten Mechanismus zur Resorption oral verfügbarer β -Lactam-Antibiotika dar.
- Isostere „Backbone“-Modifizierungen wie der Austausch der α -Peptidbindung bei Ala-Pro durch die isostere Thioxopeptidbindung (Ala- ψ [CS-N]-Pro) werden von PEPT1 toleriert.
- PEPT1 weist Konformations-Spezifität auf. Das System erkennt und transportiert Ala- ψ [CS-N]-Pro nur in dessen *trans*-Konformation. PEPT1 erkennt Xaa-Pro- sowie Xaa-Sar-Dipeptide bevorzugt in ihrer *trans*-Konformation.
- Größe und Hydrophobizität der N-terminalen Aminosäure sind bei Xaa-Pro- und Xaa-Ala-Dipeptiden für ihre Interaktion mit PEPT1 nicht relevant.
- Die Affinität von Pro-Xaa-Dipeptiden zu PEPT1 ist positiv mit der Hydrophobizität der C-terminalen Aminosäure und der Rigidität der Struktur korreliert.

Die in der vorgelegten Arbeit an Zellen charakterisierten Transportsysteme arbeiten mit sehr verschiedenen Mechanismen. Die Transporter sind substratspezifisch, oft Epithelgewebespezifisch, und sie sind in den Zellmembranen asymmetrisch verteilt. Durch ein solches Arrangement sind Epithelien in der Lage, Stoffaustausch **qualitativ, quantitativ** und **ortsgerichtet** zu kontrollieren. Ihre Zellen verfügen außerdem über komplexe Mechanismen zur **Feinregulation** der Transportprozesse entsprechend den externen und internen Bedingungen. Die Epithelzellen empfangen, transduzieren und amplifizieren dafür extrazelluläre Signale.

6 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Satoh, M., Miyauchi, S., Shuto, S., Matsuda, A., Kamo, N. (1999) 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
- Addison, J.M., Burston, D., Matthews, D.M. (1972) Evidence for active transport of the dipeptide glycylsarcosine by hamster jejunum in vitro. *Clin. Sci.* 43, 907-911
- Adibi, S.A. (1971) Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J. Clin. Invest.* 50, 2266-2275
- Adibi, S.A. (1987) Experimental basis for the use of peptides as substrates for parenteral nutrition: A review. *Metabolism* 36, 1001-1011
- Adibi, S.A. (1997a) Renal assimilation of oligopeptides: physiological mechanisms and metabolic importance. *Am. J. Physiol.* 272, E723-E736
- Adibi, S.A. (1997b) The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology* 113, 332-340
- Amasheh, S., Wenzel, U., Boll, M., Dorn, D., Weber, W.-M., Clauss, W., Daniel, H. (1997) Transport of charged dipeptides by the intestinal H⁺/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membrane Biol.* 155, 247-256
- Berlitz, F., Julien, S., Tsocas, A., Chariot, J., Carbon, C., Farinotti, R., Roze, C. (1999) Neural modulation of cephalixin intestinal absorption through the di- and tripeptide brush border transporter of rat jejunum in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 1037-1044
- Berteloot, A., Semenza, G. (1990) Advantages and limitations of vesicles for the characterization and the kinetic analysis of transport systems. *Methods Enzymol.* 192, 409-437
- Bertran, J., Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Kuhn, L.C., Palacin, M., Murer, H. (1992a) Stimulation of system y⁺-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5606-5610
- Bertran, J., Werner, A., Moore, M.L., Stange, G., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacin, M., Murer, H. (1992b) Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5601-5605
- 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. (1998) Structure, function and molecular modeling approaches to the study of the intestinal dipeptide transporter PepT1. *J. Pharm. Sci.* 87, 1286-1291
- Boll, M., Daniel, H. (1995) Target size analysis of the peptide/H⁺-symporter in kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1233, 145-152
- Boll, M., Herget, M., Wagener, M., Weber, W.M., Markovich, D., Biber, J., Clauss, W., Murer, H., Daniel, H. (1996) Expression cloning, and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 284-289
- Boll, M., Markovich, D., Weber, W.M., Korte, H., Daniel, H., Murer, H. (1994) Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, β -lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflügers Arch.* 429, 146-149

- Börner, V., Fei, Y.-L., Hartrodt, B., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Neubert, K., Brandsch, M. (1998) Transport of amino acid aryl amides by the intestinal H⁺/peptide cotransport system, PEPT1. *Eur. J. Biochem.* 255, 698-702 (**Anlage 7.9**)
- Brandsch, M., Brandsch, C., Ganapathy, M.E., Chew, C.S., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1997) Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H⁺/peptide cotransport systems in intestine (PEPT1) and kidney (PEPT2). *Biochim. Biophys. Acta* 1324, 251-262 (**Anlage 7.7**)
- Brandsch, M., Brandsch, C., Prasad, P. D., Ganapathy, V., Hopfer, U., Leibach, F. H. (1995a) Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter. *FASEB J.* 9, 1489-1496 (**Anlage 7.6**)
- Brandsch, M., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1995b) H⁺-peptide cotransport in Madin-Darby canine kidney cells: expression and calmodulin-dependent regulation. *Am. J. Physiol.* 268, F391-F397 (**Anlage 7.5**)
- Brandsch, M., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1995c) Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) in intestinal and renal absorption of peptides. In: *Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in Metabolism and the Immune Response*, Fleischer, B. (Hrsg.), Molecular Biology Intelligence Unit, R.G. Landes Company Austin, Texas, Springer-Verlag Heidelberg, S. 111-129
- Brandsch, M., Knütter, I., Thunecke, F., Hartrodt, B., Born, I., Börner, V., Hirche, F., Fischer, G., Neubert, K. (1999) Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H⁺/peptide symporter. *Eur. J. Biochem.* 266, 502-508 (**Anlage 7.13**)
- Brandsch, M., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Ganapathy, V. (1994a) Calmodulin-dependent modulation of pH sensitivity of the amino acid transport System L in human placental choriocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 177-184 (**Anlage 7.3**)
- Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1993) Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines (HT-29 and Caco-2) by protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 264, G939-G946 (**Anlage 7.1**)
- Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1994b) Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H⁺ co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem. J.* 299, 253-260 (**Anlage 7.4**)
- Brandsch, M., Ramamoorthy, S., Marczin, N., Catravas, J.D., Leibach, J.W., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1995d) Regulation of taurine transport by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin in human intestinal cell lines. *J. Clin. Invest.* 96, 361-369 (**Anlage 7.2**)
- Brandsch, M., Thunecke, F., Küllertz, G., Schutkowski, M., Fischer, G., Neubert, K. (1998) Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter, PEPT1. *J. Biol. Chem.* 273, 3861-3864 (**Anlage 7.12**)
- Bretschneider, B., Brandsch, M., Neubert, R. (1999) Intestinal transport of β -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 (**Anlage 7.11**)
- Brust, P., Christensen, T., Diemer, N.H. (1992) Decrease of extracellular taurine in the rat dorsal hippocampus after central nervous administration of vasopressin. *J. Neurochem.* 58, 1427-1431

- Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., Deisenhofer, J. (1999) Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 6, 56-63
- Busch, A.E., Varnum, M.D., North, R.A., Adelman, J.P. (1992) An amino acid mutation in a potassium channel that prevents inhibition by protein kinase C. *Science* 255, 1705-1707
- Casado, M., Bendahan, A., Zafra, F., Danbolt, N.C., Aragon, C., Gimenez, C., Kanner, B.I. (1993) Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268, 27313-27317
- Cheeseman, C.I. (1991) Molecular mechanisms involved in the regulation of amino acid transport. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 55, 71-84
- Chen, X.Z., Zhu, T., Smith, D.E., Hediger, M.A. (1999) Stoichiometry and kinetics of the high-affinity H⁺-coupled peptide transporter PepT2. *J. Biol. Chem.* 274, 2773-2779
- Chesney, R.W., Jones, D., Zelikovic, I. (1993) Renal amino acid transport: cellular and molecular events from clearance studies to frog eggs. *Pediatr. Nephrol.* 7, 574-584
- Christensen, H.N. (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70, 43-77
- Christensen, H.N., de Cespedes, C., Handlogten, M.E., Ronquist, G. (1974) Modified transport substrates as probes for intramembrane gradients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 227, 355-379
- Clark, J.A., Amara, S.G. (1993) Amino acid neurotransmitter transporters: structure, function, and molecular diversity. *Bioessays* 15, 323-332
- Cohen, M.B., Jensen, N.J., Hawkins, J.A., Mann, E.A., Thompson, M.R., Lentze, M.J., Giannella, R.A. (1993) Receptors for *Escherichia coli* heat stable enterotoxin in human intestine and in a human intestinal cell line (Caco-2). *J. Cell. Physiol.* 156, 138-144
- Conradt, M., Stoffel, W. (1997) Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J. Neurochem.* 68, 1244-1251
- Covitz, K.M., Amidon, G.L., Sadee, W. (1998) Membrane topology of the human dipeptide transporter, hPEPT1, determined by epitope insertions. *Biochemistry* 37, 15214-15221
- Crone, C., Bundgaard, M., Olesen, S.-R. (1988) Endothelial properties assessed from single-capillary methods. In: *Endothelial Cells*, Vol. III, Ryan, U.S. (Hrsg.), Boca Raton, S. 91-101
- Daniel, H. (1996) Function and molecular structure of brush border membrane peptide/H⁺ symporters. *J. Membr. Biol.* 154, 197-203
- Daniel, H. (1997) First insights into the operational mode of epithelial peptide transporters. *J. Physiol.* 498, 561
- Daniel, H., Adibi, S.A. (1993) Transport of β -lactam antibiotics in kidney brush border membrane. Determinants of their affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter. *J. Clin. Invest.* 92, 2215-2223
- Daniel, H., Adibi, S.A. (1994) Functional separation of dipeptide transport and hydrolysis in kidney brush border membrane vesicles. *FASEB J.* 8, 753-759
- Daniel, H., Fett, C., Kratz, A. (1989) Demonstration and modification of intervillous pH profiles in rat small intestine in vitro. *Am. J. Physiol.* 257, G489-G495
- Daniel, H., Herget, M. (1997) Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am. J. Physiol.* 273, F1-F8

- Daniel, H., Morse, E.L., Adibi, S.A. (1992) Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane. *J. Biol. Chem.* 267, 9565-9573
- Dantzig, A.H., Bergin, L. (1990) Uptake of the cephalosporin, cephalexin, by a dipeptide transport carrier in the human intestinal cell line, Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1027, 211-217
- Dantzig, A.H., Tabas, L.B., Bergin, L. (1992) Cefaclor uptake by the proton-dependent dipeptide transport carrier of human intestinal Caco-2 cells and comparison to cephalexin uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1112, 167-173
- Das, M., Radhakrishnan, A.N. (1974) Studies on the uptake of glycyl-L-leucine by strips of monkey small intestine. *Indian J. Biochem. Biophys.* 11, 12-16
- Delie, F., Rubas, W. (1997) 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
- Dieck, S.T., Heuer, H., Ehrchen, J., Otto, C., Bauer, K. (1998) The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative β -Ala-Lys-N(ϵ)-AMCA in astrocytes. *Glia* 25, 10-20
- Döring, F., Dorn D., Bachfischer, U., Amasheh, S., Herget, M., Daniel, H. (1996) Functional analysis of a chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J. Physiol.* 497, 773-779
- Döring, F., Klapper, M., Theis, S., Daniel, H. (1998a) Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 531-535
- Döring, F., Michel, T., Rosel, A., Nickolaus, M., Daniel, H. (1998b) Expression of the mammalian renal peptide transporter PEPT2 in the yeast *Pichia pastoris* and applications of the yeast system for functional analysis. *Mol. Membr. Biol.* 15, 79-88
- Döring, F., Theis, S., Daniel, H. (1997) Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PEPT1 in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 656-662
- Döring, F., Walter, J., Will, J., Föcking, M., Boll, M., Amasheh, S., Clauss, W., Daniel, H. (1998c) Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J. Clin. Invest.* 101, 2761-2767
- Döring, F., Will, J., Amasheh, S., Clauss, W., Ahlbrecht, H., Daniel, H. (1998d) Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 273, 23211-23218
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77
- Dyer, J., Beechey, R.B., Gorvel, R.B., Smith, J.P., Wooton, R., Shirazi-Beechey, S.P. (1990) Glycyl-L-proline transport in rabbit enterocyte basolateral-membrane vesicles. *J. Biochem.* 269, 565-571
- Ericsson, C.D. (1998) Travelers' diarrhea. Epidemiology, prevention, and self-treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 12, 285-303
- Ermisch, A., Brust, P., Kretzschmar, R., Rühle, H.-J. (1993) Peptides and blood-brain barrier transport. *Physiol. Rev.* 73, 489-527

- Farthing, M.J.G. (1994) Travellers` diarrhoea. *Gut* 35, 1-4
- Fei, Y.-J., Fujita, T., Lapp, D.F., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1998a) Two oligopeptide transporters from *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning and functional expression. *Biochem. J.* 332, 565-572
- Fei, Y.-J., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1998b) Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58, 239-261
- Fei, Y.-J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Romero, M.F., Singh, S.K., Boron, W.F., Hediger, M.A. (1994) Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 368, 563-566
- Fei, Y.-J., Liu, J.-C., Fujita, T., Liang, R., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1998c) 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
- Fei, Y.-J., Liu, W., Prasad, P.D., Kekuda, R., Oblak, T.G., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1997) Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H⁺/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry* 36, 452-460
- Fei, Y.-J., Nara, E., Liu, J.C., Boyd, C.A., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1999) Preferential recognition of zwitterionic dipeptides as transportable substrates by the high-affinity peptide transporter PEPT2. *Biochim. Biophys. Acta* 1418, 344-351.
- Fischer, G. (1994) About PPIases and their Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 1415-1436
- Fischer, G., Bang, H., Berger, E., Schellenberger, A. (1984) Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 791, 87-97
- Fischer, G., Tradler, T., Zarnt, T. (1998) The mode of action of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases *in vivo*: binding vs. catalysis. *FEBS Lett.* 426, 17-20
- Forte, L.R., Currie, M.G (1995) Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *FASEB J.*, 9, 643-650
- Freeman, T.C., Bentsen, B.S., Thwaites, D.T., Simmons, N.L. (1995) H⁺/di-tripeptide transporter (PepT1) expression in the rabbit intestine. *Pflügers Arch.* 430, 394-400
- Fujita, T., Kishida, T., Okada, N., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Yamamoto, A. (1999a) Interaction of kyotorphin and brain peptide transporter in synaptosomes prepared from rat cerebellum: implication of high affinity type H⁺/peptide transporter PEPT2 mediated transport system. *Neurosci. Lett.* 271, 117-120
- Fujita, T., Majikawa, Y., Umehisa, S., Okada, N., Yamamoto, A., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1999b) Sigma receptor ligand-induced up-regulation of the H⁺/Peptide transporter PEPT1 in the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 242-246
- Ganapathy, M.E., Brandsch, M., Prasad, P.D., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1995a) Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J. Biol. Chem.* 270, 25672 – 25677 (**Anlage 7.10**)
- Ganapathy, M.E., Huang, W., Wang, H., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1998) Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 470-475

- Ganapathy, V., Brandsch, M., Leibach, F.H. (1994a) Intestinal transport of amino acids and peptides. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract (3. Aufl.) Johnson, L.R. (Hrsg.), Raven Press Ltd., New York, S. 1773-1794
- Ganapathy, V., Brandsch, M., Leibach, F.H. (1994b) Proton-coupled peptide transport in the small intestine and kidney. In: Molecular and Cellular Mechanisms of H⁺ Transport. NATO ASI Series H: Cell Biology, Vol. 89, Hirst, B.H. (Hrsg.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, S. 275-282
- Ganapathy, V., Burckhardt, G., Leibach, F.H. (1984) Characteristics of glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 259, 8954-895
- Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1986a) Carrier-mediated reabsorption of small peptides in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 251, F945-F953
- Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1986b) Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient? *Am. J. Physiol.* 249, G153-G160
- Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1991) Protons and regulation of biological functions. *Kidney Int.* 33, S4-S10
- Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1996) Peptide transporters. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 5, 395-400
- Ganapathy, V., Ramamoorthy, J.D., Del Monte, M.A., Leibach, F.H., Ramamoorthy, S. (1995b) Cyclic AMP-dependent up-regulation of the taurine transporter in a human retinal pigment epithelial cell line. *Curr. Eye Res.* 14, 843-850
- Giannella, R.A (1995) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: what are they and what do they do? *J. Lab.Clin. Med.* 125, 173-181
- Han, X., Budreau, A.M., Chesney, R.W. (1996a) Role of conserved peptide in taurine transporter inactivation modulated by protein kinase C. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 2088-2096
- Han, X., Budreau, A.M., Chesney, R.W. (1998) Molecular cloning and functional expression of an LLC-PK₁ cell taurine transporter that is adaptively regulated by taurine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 442, 261-268
- Han, X., Budreau, A.M., Chesney, R.W. (1999) Ser-322 is a critical site for PKC regulation of the MDCK cell taurine transporter. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1874-1879
- Han, X., Chesney, R.W., Budreau, A.M., Jones, D.P. (1996b) Regulation of expression of taurine transport in two continuous renal epithelial cell lines and inhibition of taurine transporter by a site-directed antibody. *Adv. Exp. Med. Biol.* 403, 173-191
- Hayes, K.C., Carey, R.E., Schmidt, S.Y. (1975) Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* 188, 949-951
- Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S., Wright, E.M. (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330, 379-381
- Hediger, M.A., Kanai, Y., You, G., Nussberger, S. (1995) Mammalian ion-coupled solute transporters. *J. Physiol.* 482, 7S-17S
- Hediger, M.A., Rhoads, D.R. (1994) Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol. Rev.* 74, 993-1026

- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749
- Hopfer, U. (1989) Tracer studies with isolated membrane vesicles. *Methods Enzymol.* 172, 313-331
- Hoshi, T. (1985) Proton-coupled transport of organic solutes in animal cell membranes and its relation to Na⁺ transport. *Jpn. J. Physiol.* 35, 179-191
- Huff, R.A., Vaughan, R.A., Kuhar, M.J., Uhl, G.R. (1997) Phorbol ester increase dopamine transporter phosphorylation and decrease transport V_{max}. *J. Neurochem.* 68, 225-232
- Huxtable, R.J. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101-163
- Huxtable, R.J. (1996) Taurine: Past, present, and future. *Adv. Exp. Med. Biol.* 403, 641-650
- Hyun, C.S., Martello, L.A., Karl, P.I. (1994) Identification of protein kinase C- α , ϵ , and ζ in rabbit ileal enterocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 108, 171-178
- Inui, K., Yamamoto, M., Saito, H. (1992) Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: specific transport systems in apical and basolateral membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 195-201
- Ishikawa, Y., Eguchi, T., Ishida, H. (1997) Mechanism of β -adrenergic agonist-induced transmural transport of glucose in rat small intestine. Regulation of phosphorylation of SGLT1 controls the function. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 306-318
- Jacobsen, J.G., Smith, L.H. (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48, 424-511
- Jessen, H., Jacobsen, C. (1997) Adaptive regulation of taurine and beta-alanine uptake in a human kidney cell line from the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* 1325, 309-317
- Jones, D.P., Miller, L.A., Chesney, R.W. (1993) Polarity of taurine transport in cultured renal epithelial cell lines: LLC-PK₁ and MDCK. *Am. J. Physiol.* 265, F137-F145
- Jones, D.P., Miller, L.A., Dowling, C., Chesney, R.W. (1991) Regulation of taurine transporter activity in LLC-PK₁ cells: role of protein synthesis and protein kinase C activation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2, 1021-1029
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K.I., Uchino, H., Takeda, E., Endou, H. (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 273, 23629-23632
- Kanner, B.I. (1994) Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J. Exp. Biol.* 196, 237-249
- Kararli, T.T. (1989) Gastrointestinal absorption of drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 39-86
- Keep, R.F., Xiang, J. (1996) Choroid plexus taurine transport. *Brain Res.* 715, 17-24
- Kilberg, M.S., Stevens, B.R., Novak, D.A. (1993) Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu. Rev. Nutr.* 13, 137-165
- Kim, H.W., Shim, M.J., Kim, W.B., Kim, B.K. (1996) Dexamethasone recovers phorbol-ester induced reduction of taurine transportation in mouse macrophage cell line, RAW 264.7. *Adv. Exp. Med. Biol.* 403, 59-66

- Kimmich, G.A. (1990) Isolation of intestinal epithelial cells and evaluation of transport functions. *Methods Enzymol.* 192, 324-340
- Kontny, E., Kvanta, A., Fredholm, B.B. (1992) Activation of protein kinase C and elevation of cAMP interact synergistically to raise c-Fos and AP-1 activity in Jurkat cells. *Eur. J. Pharmacol.* 227, 333-338
- Kramer, W., Girbig, F., Bewersdorf, U., Kohlrantz, S., Weyland, C. (1998) Structural studies of the H⁺/oligopeptide transport system from rabbit small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1373, 179-194
- Krause, W.J., London, R.M., Freeman, R.H., Forte, L.R. (1997) The guanylin and uroguanylin peptide hormones and their receptors. *Acta Anat.* 160, 213-231
- Kulanthaivel, P., Cool, D.R., Ramamoorthy, S., Mahesh, V.B., Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1991) Transport of taurine and its regulation by protein kinase C in the JAR human placental choriocarcinoma cell line. *Biochem. J.* 277, 53-58
- Kuo, T.H., Wang, K.K., Carlock, L., Diglio, C., Tsang, W. (1991) Phorbol ester induces both gene expression and phosphorylation of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J. Biol. Chem.* 266, 2520-2525
- Lee, C.M., Tung, W.L., Young, J.D. (1992) Tachykinin-stimulated inositol phospholipid hydrolysis and taurine release from human astrocytoma cells. *J. Neurochem.* 59, 406-414
- Lee, V.H., Chu, C., Mahlin, E.D., Basu, S.K., Ann, D.K., Bolger, M.B., Haworth, I.S., Yeung, A.K., Wu, S.K., Hamm-Alvarez, S., Okamoto, C.T. (1999) Biopharmaceutics of transmucosal peptide and protein drug administration: role of transport mechanisms with a focus on the involvement of PepT1. *J. Contr. Release* 62, 129-140
- Leibach, F.H. (1999) Peptide transport. In: Abstracts PharmaConference 99 „Membrane Transporters: New Perspectives in Drug Delivery and Drug Targeting“, 8.-12. August 1999, Ascona, Schweiz, S. 11
- Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1996) Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 99-119
- Levi, M., Kempson, S.A., Lotscher, M., Biber, J., Murer, H. (1996) Molecular regulation of renal phosphate transport. *J. Membr. Biol.* 154, 1-9
- Li, J., Hidalgo, I.J. (1996) Molecular modeling study of structural requirements for the oligopeptide transporter. *J. Drug. Target.* 4, 9-17
- Liang, R., Fei, Y.-J., Prasad, P.D., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Feng, T.L., Hediger, M.A., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1995) Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* 270, 6456-6463
- Lin, L.N., Brandts, J.F. (1979) Evidence suggesting that some proteolytic enzymes may cleave only the *trans* form of the peptide bond. *Biochemistry* 18, 43-47
- Liu, W., Liang, R., Ramamoorthy, S., Fei, Y.-L., Ganapathy, M.E., Hediger, M.A., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1995) Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1235, 461-466
- Longo, N., Griffin, L.D., Langley, S.D., Elsas, L.J. (1992) Glucose transport by cultured human fibroblasts: regulation by phorbol esters and insulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 24-30
- Loo, D.D., Hirsch, J.R., Sarkar, H.K., Wright, E.M. (1996) Regulation of the mouse retinal taurine transporter (TAUT) by protein kinases in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 392, 250-254

- Lucas, M. (1983) Determination of acid surface pH in vivo in rat proximal jejunum. *Gut* 24, 734-739
- Lytle, C., Forbush, B. 3rd (1992) The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 267, 25438-25443
- Mackenzie, B., Fei, Y.-J., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1996) The human intestinal H⁺/oligopeptide cotransporter hPEPT1 transports differently-charged dipeptides with identical electrogenic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1284, 125-128
- Mailliard, M.E., Stevens, B.R., Mann, G.E. (1995) Amino acid transport by small intestinal, hepatic, and pancreatic epithelia. *Gastroenterology* 108, 888-910
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P.J., Loffing, J., Shoemaker, C.B., Verrey, F. (1998) Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395, 288-291
- Matthews, D.M. (1975) Intestinal absorption of peptides. *Physiol. Rev.* 55, 537-608
- Matthews, D.M. (1991) Protein Absorption - development and present state of the subject. Wiley Liss, New York
- Matthews, D.M., Adibi, S.A. (1976) Peptide absorption. *Gastroenterology* 71, 151-161
- Matthews, D.M., Laster, L. (1965) Absorption of protein digestion products: a review. *Gut* 6, 411-426
- McEwan, G.T., Daniel, H., Fett, C., Burgess, M.N., Lucas, M.L. (1988) The effect of *Escherichia coli* STa enterotoxin and other secretagogues on mucosal surface pH of rat small intestine in vivo. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 234, 219-237
- McKay, D.M., Baird, A.W. (1999) Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut* 44, 283-289
- Mellor, H., Parker, P.J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332, 281-292
- Meredith, D., Boyd, C.A.R. (1995) Oligopeptide transport by epithelial cells. *J. Membrane Biol.* 145, 1-12
- Merker, M.P., Armitage, I.M., Audi, S.H., Kakalis, L.T., Linehan, J.H., Maehl, J.R., Roerig, D.L., Dawson, C.A. (1996) Impact of angiotensin-converting enzyme substrate conformation on fractional hydrolysis in lung. *Am. J. Physiol.* 270, L251-L259
- Merlin, D., Steel, A., Gewirtz, A.T., Si-Tahar, M., Hediger, M.A., Madara, J.L. (1998) hPepT1-mediated epithelial transport of bacteria-derived chemotactic peptides enhances neutrophil-epithelial interactions. *J. Clin. Invest.* 102, 2011-2018
- Merrall, N.W., Plevin, R., Gould, G.W. (1993) Growth factors, mitogens, oncogenes and the regulation of glucose transport. *Cell Signal* 5, 667-675
- Middleton, J.P., Khan, W.A., Collinsworth, G., Hannun, Y.A., Medford, R.M. (1993) Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/K-ATPase in kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 268, 15958-15964
- Militante, J.D., Lombardini, J.B. (1998) Pharmacological characterization of the effects of taurine on calcium uptake in the rat retina. *Amino Acids* 15, 99-108
- Militante, J.D., Lombardini, J.B. (1999) Taurine uptake activity in the rat retina: protein kinase C-independent inhibition by chelerythrine. *Brain Res.* 818, 368-374

- Minami, H., Daniel, H., Morse, E.L., Adibi, S.A. (1992) Oligopeptides: mechanism of renal clearance depends on molecular structure. *Am. J. Physiol.* 263, F109-F115
- Mitsumoto, Y., Sato, K., Ohyashiki, T., Mohri, T. (1986) Leucine-proton cotransport system in Chang liver cell. *J. Biol. Chem.* 261, 4549-4554
- Miyamoto, K., Shiraga, T., Morita, K., Yamamoto, H., Haga, H., Taketani, Y., Tamai, I., Sai, Y., Tsuji, A., Takeda, E. (1996) Sequence, tissue distribution and developmental changes in rat intestinal oligopeptide transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1305, 34-38
- Moe, A.J. (1995) Placental amino acid transport. *Am. J. Physiol.* 268, C1321-C1331
- Mollerup, J., Lambert, I.H. (1996) Phosphorylation is involved in the regulation of the taurine influx via the beta-system in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 150, 73-82
- Mollerup, J., Lambert, I.H. (1998) Calyculin A modulates the kinetic constants for the Na⁺-coupled taurine transport in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1371, 335-344
- Mollgard, K., Rostgaard, J. (1978) Morphological aspects of some sodium transporting epithelia suggesting a transcellular pathway via elements of endoplasmic reticulum. *J. Membr. Biol.* 40, 71-89
- Moyer, M.S., Goodrich, A.L., Rolfes, M.M., Suchy, F.J. (1988) Ontogenesis of intestinal taurine transport: evidence for a β -carrier in developing rat jejunum. *Am. J. Physiol.* 254, G870-G877
- Müller, U., Brandsch, M., Prasad, P.D., Fei, Y.-J., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1996) Inhibition of the H⁺/peptide cotransporter in the human intestinal cell line Caco-2 by cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218, 461-465 (**Anlage 7.8**)
- Munck, B.G. (1981) Intestinal absorption of amino acids. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Johnson, L.R. (Hrsg.) Raven Press, New York, S. 1097-1122
- Murer, H., Gmaj, P., Steiger, B., Hagenbuch, B. (1989) 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
- Musch, M.W., Davis-Amaral, E.M., Goldstein, L. (1996) Erythropoietin stimulates tyrosine phosphorylation and taurine transport in skate erythrocytes. *J. Exp. Zool.* 274, 81-92
- Nedergaard, S., Larsen, E.H., Ussing, H.H. (1999) Sodium recirculation and isotonic transport in toad small intestine. *J. Membr. Biol.* 168, 241-251
- Newey, H., Smyth, D.H. (1960) Intracellular hydrolysis of dipeptides during intestinal absorption. *J. Physiol.* 152, 367-380
- Newey, H., Smyth, D.H. (1962) Cellular mechanisms in intestinal transfer of amino acids. *J. Physiol.* 164, 527-551
- Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312
- Norman, J.A., Ansell, J., Stone, G.A., Wennogle, L.P., Wasley, J.W. (1987) CGS 9343B, a novel, potent, and selective inhibitor of calmodulin activity. *Mol. Pharmacol.* 31, 535-540
- Nussberger, S., Foret, F., Hebert, S.C., Karger, B.L., Hediger, M.A. (1996) Nonradioactive monitoring of organic and inorganic solute transport into single *Xenopus* oocytes by capillary zone electrophoresis. *Biophys. J.* 70, 998-1005

- Nussberger, S., Steel, A., Hediger, M.A. (1997a) Structure and pharmacology of proton-linked peptide transporters. *J. Contr. Release* 46, 31-38
- Nussberger, S., Steel, A., Trotti, D., Romero, M.F., Boron, W.F., Hediger, M.A. (1997b) Symmetry of H⁺ binding to the intra- and extracellular side of the H⁺-coupled oligopeptide cotransporter PepT1. *J. Biol. Chem.* 272, 7777-7785
- O'Flaherty, L., Stapleton, P.P., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D.J. (1997a) Intestinal taurine transport: a review. *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 873-880
- O'Flaherty, L., Stapleton, P.P., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D. (1997b) Dexamethasone and lipopolysaccharide regulation of taurine transport in Caco-2 cells. *J. Surg. Res.* 69, 331-336
- Ottleben, H., Haasemann, M., Ramachandran, R., Gorlach, M., Muller-Esterl, W., Brown, L.R. (1997) An NMR study of the interaction of ¹⁵N-labelled bradykinin with an antibody mimic of the bradykinin B₂ receptor. *Eur. J. Biochem.* 244, 471-478
- Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78, 969-1054
- Pasantes-Morales, H., Quesada, O., Moran, J. (1998) Taurine: an osmolyte in mammalian tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 442, 209-217
- Peghini, P., Janzen, J., Stoffel, W. (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J.* 16, 3822-3832
- Peng, J.-B., Hediger, M.A. (1999) Nomenclature of mammalian transporter genes. In: Abstracts PharmaConference 99 „Membrane Transporters: New Perspectives in Drug Delivery and Drug Targeting“, 8.-12. August 1999, Ascona, Schweiz, S. 67; <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>
- Perkins, C.P., Mar, V., Shutter, J.R., del Castillo, J., Danilenko, D.M., Medlock, E.S., Ponting, I.L., Graham, M., Stark, K.L., Zuo, Y., Cunningham, J.M., Bosselman, R.A. (1997) Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT-1. *Genes Dev.* 11, 914-925
- Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., Kuhn, L., Verrey, F. (1999) Amino acid transport of y⁺L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* 18, 49-57
- Philibert, R.A., Dutton, G.R. (1988) Phorbol ester and dibutyryl cyclic AMP reduce content and efflux of taurine in primary cerebellar astrocytes in culture. *Neurosci. Lett.* 95, 323-328
- Pineda, M., Fernandez, E., Torrents, D., Estevez, R., Lopez, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A., Palacin, M. (1999) Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.* 274, 19738-19744
- Prasad, P.D., Wang, H., Huang, W., Kekuda, R., Rajan, D.P., Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1999) Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 283-288
- Ramamoorthy, S., Del Monte, M.A., Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1994) Molecular identity and calmodulin-mediated regulation of the taurine transporter in a human retinal pigment epithelial cell line. *Curr. Eye Res.* 13, 523-529

- Ramamoorthy, S., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Ganapathy, V. (1992a) Modulation of the activity of amino acid transport System L by phorbol esters and calmodulin antagonists in a human placental choriocarcinoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1136, 181-188
- Ramamoorthy, S., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Ganapathy, V. (1992b) Selective impairment of taurine transport by cyclosporin A in a human placental cell line. *Pediatr. Res.* 32, 125-127
- Reinhold, D., Hemmer, B., Gran, B., Born, I., Faust, J., Neubert, K., McFarland, H.F., Martin, R., Ansorge, S. (1998) Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4⁺T cell clones. *J. Neuroimmunol.* 87, 203-209
- Romero, M.F., Kanai, Y., Gunshin, H., Hediger, M.A. (1998) Expression cloning using *Xenopus laevis* oocytes. *Methods Enzymol.* 296, 17-52
- Sadee, W. (1999) Pharmacogenetics/genomics relevant to drug transporters. In: Abstracts PharmaConference 99 „Membrane Transporters: New Perspectives in Drug Delivery and Drug Targeting“, 8.-12. August 1999, Ascona, Schweiz, S. 31
- Saito, H., Inui, K. (1993) Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* 265, G289-G294
- Saito, H., Okuda, M., Terada, T., Sasaki, S., Inui, K. (1995) 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
- Saito, H., Terada, T., Okuda, M., Sasaki, S., Inui, K. (1996) Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim. Biophys. Acta* 1280, 173-177
- Saitoh, H., Fujisaki, H., Aungst, B.J., Miyazaki, K. (1997) Restricted intestinal absorption of some beta-lactam antibiotics by an energy-dependent efflux system in rat intestine. *Pharm. Res.* 14, 645-649
- Salceda, R. (1999) Insulin-stimulated taurine uptake in rat retina and retinal pigment epithelium. *Neurochem. Int.* 35, 301-306
- Sansom, M.S. (1999) Membrane proteins: A tale of barrels and corks. *Curr. Biol.* 9, R254-R257
- Satsu, H., Watanabe, H., Arai, S., Shimizu, M. (1997) Characterization and regulation of taurine transport in Caco-2 human intestinal cells. *J. Biochem.* 121, 1082-1087
- Schoenmakers, R.G., Stehouwer, M.C., Tukker, J.J. (1999) Structure-transport relationship for the intestinal small-peptide carrier: is the carbonyl group of the peptide bond relevant for transport? *Pharm. Res.* 16, 62-68
- Schön, E., Born, I., Demuth, H.U., Faust, J., Neubert, K., Steinmetzer, T., Barth, A., Ansorge, S. (1991) Dipeptidyl peptidase IV in the immune system. Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372, 305-311
- Schutkowski, M., Jakob, M., Landgraf, G., Born, I., Neubert, K., Fischer, G. (1997) Probing substrate backbone function in prolyl oligopeptidase catalysis—large positional effects of peptide bond monothioxylation. *Eur. J. Biochem.* 245, 381-385
- Schutkowski, M., Wöllner, S., Fischer, G. (1995) Inhibition of peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity by substrate analog structures: thioxo tetrapeptide-4-nitroanilides. *Biochemistry* 34, 13016-13026

- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., Kanai, Y. (1999) Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* 274, 19745-19751
- Shen, H., Smith, D.E., Yang, T., Huang, Y.G., Schnermann, J.B., Brosius, F.C.^{3rd} (1999) Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 276, F658-665
- Shiraga, T., Miyamoto, K., Tanaka, H., Yamamoto, H., Taketani, Y., Morita, K., Tamai, I., Tsuji, A., Takeda, E. (1999) Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology* 116, 354-362
- Shotwell, M.A., Kilberg, M.S., Oxender, D.L. (1983) The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 737, 267-284
- Sinko, P.J., Balimane, P.V. (1998) Carrier-mediated intestinal absorption of valacyclovir, the L-valyl ester prodrug of acyclovir: 1. Interactions with peptides, organic anions and organic cations in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 19, 209-217
- Smith, C.H., Moe, A.J., Ganapathy, V (1992) Nutrient transport pathways across the epithelium of the placenta. *Annu. Rev. Nutr.* 12, 183-206
- Smith, D.E., Pavlova, A., Berger, U.V., Hediger, M.A., Yang, T., Huang, Y.G., Schnermann, J.B. (1998) Tubular localization and tissue distribution of peptide transporters in rat kidney. *Pharm. Res.* 15, 1244-1249
- Smith, M.W. (1990) Peptide and amino acid absorption in the small intestine. *Comp. Physiol.* 5, 146-155
- Steel, A., Nussberger, S., Romero, M.F., Boron, W.F., Boyd, C.A., Hediger, M.A. (1997) Stoichiometry and pH-dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PEPT1. *J. Physiol.* 498, 563-569
- Steiner, H.Y., Naider, F., Becker, J.M. (1995) The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol. Microbiol.* 16, 825-834
- Steinhardt, H.J., Adibi, S.A. (1986) Kinetics and characteristics of absorption from an equimolar mixture of 12 glycyl-dipeptides in human jejunum. *Gastroenterology* 90, 577-582
- Sturman, J. A. (1993) Taurine in development. *Physiol. Rev.* 73, 119-147
- Tamai, I., Nakanishi, T., Hayashi, K., Terao, T., Sai, Y., Shiraga, T., Miyamoto, K., Takeda, E., Higashida, H., Tsuji, A. (1997) The predominant contribution of oligopeptide transporter PepT1 to intestinal absorption of β -lactam antibiotics in rat small intestine. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 796-801
- Tamai, I., Nakanishi, T., Nakahara, H., Sai, Y., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Tsuji, A. (1998) Improvement of L-dopa absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PepT1. *J. Pharm. Sci.* 87, 1542-1546
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699-1702
- Taub, M.E., Larsen, B.D., Steffansen, B., Frokjaer, S. (1997a) 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

- Taub, M.E., Moss, B.A., Steffansen, B., Frokjaer, S. (1997b) Influence of oligopeptide transporter binding affinity upon uptake and transport of D-Asp(OBzl)-Ala and Asp(OBzl)-Sar in filter grown Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.* 156, 219-228
- Taylor, M.D., Amidon, G.L. (1995) *Peptide-Based Drug Design*. American Chemical Society, Washington, DC
- Tchoumkeu-Nzouessa, G.C., Rebel, G. (1996a) Characterization of taurine transport in human glioma GL15 cell line: regulation by protein kinase C. *Neuropharmacology* 35, 37-44
- Tchoumkeu-Nzouessa, G.C., Rebel, G. (1996b) Regulation of taurine transport in rat astrocytes by protein kinase C: role of calcium and calmodulin. *Am. J. Physiol.* 270, C1022-C1028
- Temple, C.S., Bronk, J.R., Bailey, P.D., Boyd, C.A. (1995) Substrate-charge dependence of stoichiometry shows membrane potential is the driving force for proton-peptide cotransport in rat renal cortex. *Pflügers Arch.* 430, 825-829
- Temple, C.S., Stewart, A.K., Meredith, D., Lister, N.A., Morgan, K.M., Collier, I.D., Vaughan-Jones, R.D., Boyd, C.A.R., Bailey, P.D., Bronk, J.R. (1998) Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 273, 20-22
- Terada, T., Saito, H., Inui, K. (1998) Interaction of β -lactam antibiotics with histidine residue of rat H⁺/peptide cotransporters. PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem.* 273, 5582-5585
- Terada, T., Saito, H., Mukai, M., Inui, K.-I. (1996) Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H⁺/peptide cotransporter, PEPT1. *FEBS Lett.* 394, 196-200
- Terada, T., Sawada, K., Saito, H., Hashimoto, Y., Inui, K.I. (1999) Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* 276, G1435-G1441
- Thamotharan, M., Bawani, S.Z., Zhou, X., Adibi, S.A. (1998) Mechanism of dipeptide stimulation of its own transport in a human intestinal cell line. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110, 361-368
- Thamotharan, M., Bawani, S.Z., Zhou, X., Adibi, S.A. (1999a) Functional and molecular expression of intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) after a brief fast. *Metabolism* 48, 681-684
- Thamotharan, M., Bawani, S.Z., Zhou, X., Adibi, S.A. (1999b) Hormonal regulation of oligopeptide transporter Pept-1 in a human intestinal cell line. *Am. J. Physiol.* 276, C821-C826
- Thuncke, F., Kalman, A., Kalman, F., Ma, S., Rathore, A.S., Horvath, C. (1996) Kinetic study on the *cis-trans* isomerization of the peptidyl-proline dipeptides. *J. Chromatogr. A* 744, 259-272
- Thwaites, D.T., Brown, C.D.A., Hirst, B.H., Simmons, N.L. (1993a) Transepithelial glycylsarcosine transport in intestinal Caco-2 cell mediated by expression of H⁺-coupled carriers at both apical and basal membranes. *J. Biol. Chem.* 268, 7640-7642
- Thwaites, D.T., Hirst, B.H., Simmons, N.L. (1993b) 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

- Thwaites, D.T., Hirst, B.H., Simmons, N.L. (1994) Substrate specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (Caco-2): identification of substrates that undergo H⁺-coupled absorption. *Br. J. Pharmacol.* 13, 1050-1056
- Tiruppathi, C., Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1992) Constitutive expression of the taurine transporter in a human colon carcinoma cell line. *Am. J. Physiol.* 263, G625-G631
- Tsuji, A. (1995) Intestinal absorption of β -lactam antibiotics. In: Peptide-based drug design. Taylor, M.D., Amidon, G.L. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington, DC. S. 101-134
- Tsuji, A. (1999) Tissue selective drug delivery utilizing carrier-mediated transport systems. *J. Contr. Release* 62, 239-244
- Tsuji, A., Tamai, I. (1996) Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.* 13, 963-977
- Uchida, S., Kwon, H.M., Yamauchi, A., Preston, A.S., Marumo, F., Handler, J.S. (1992) Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na⁺- and Cl⁻-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8230-8234
- Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Tampe, R. (1997) Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8976-8981
- Ueda, H. (1999) In vivo molecular signal transduction of peripheral mechanisms of pain. *Jpn. J. Pharmacol.* 79, 263-268
- Ugolev, A.M. (1971) Membrane digestion and peptide transport. *Ciba Found. Symp.* 1971, 123-143
- Van Winkle, L.J. (1993) Endogenous amino acid transport systems and expression of mammalian amino acid transport proteins in *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 157-172
- Vance, J.E., LeBlanc, D.A., London, R.E. (1997) Cleavage of the X-Pro peptide bond by pepsin is specific for the *trans* isomer. *Biochemistry* 36, 13232-13240
- Vinnakota, S., Qian, X., Egal, H., Sarthy, V., Sarkar, H.K. (1997) Molecular characterization and in situ localization of a mouse retinal taurine transporter. *J. Neurochem.* 69, 2238-2250
- Walker, D., Thwaites, D.T., Simmons, N.L., Gilbert, H.J., Hirst, B.H. (1998) Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPEPT1. *J. Physiol.* 507, 697-706
- Walter, E., Kissel, T., Amidon, G.L. (1996) The intestinal peptide carrier: A potential transport system for small peptide derived drugs. *Adv. Drug Delivery Rev.* 20, 33-58
- Wang, H., Fei, Y.J., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1998) Electrophysiological characteristics of the proton-coupled peptide transporter PEPT2 cloned from rat brain. *Am. J. Physiol.* 275, C967-C975
- Wenzel, U., Diehl, D., Herget, M., Daniel, H. (1998) Endogenous expression of the renal high-affinity H⁺-peptide cotransporter in LLC-PK₁ cells. *Am. J. Physiol.* 275, C1573-C1579
- Wenzel, U., Diehl, D., Herget, M., Kuntz, S., Daniel, H. (1999) Regulation of the high-affinity H⁺/peptide cotransporter in renal LLC-PK₁ cells. *J. Cell. Physiol.* 178, 341-348

- Wenzel, U., Gebert, I., Weintraut, H., Weber, W.M., Clauss, W., Daniel, H. (1996) Transport characteristics of differently charged cephalosporin antibiotics in oocytes expressing the cloned intestinal peptide transporter PepT1 and in human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Exp. Ther.* 277, 831-839
- Wenzel, U., Thwaites, D.T., Daniel, H. (1995) Stereoselective uptake of β -lactam antibiotics by the intestinal peptide transporter. *Br. J. Pharmacol.* 116, 3021-3027
- Witters, L.A., Vater, C.A., Lienhard, G.E. (1985) Phosphorylation of the glucose transporter *in vitro* and *in vivo* by protein kinase C. *Nature* 315, 777-778
- Wolf, G. (1988) *Lexikon Neurobiologie*. 1. Aufl., Bibliographisches Institut, Leipzig
- Woodlock, T.J., Young, D.A., Boal, T.R., Lichtman, M.A., Segel, G.B. (1993) Phorbol ester-induced membrane proteins in chronic leukemic B-lymphocytes. Candidate proteins for the L-system amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* 268, 16020-16027
- Woost, P.G., Orosz, D.E., Jin, W., Frisa, P.S., Jacobberger, J.W., Douglas, J.G., Hopfer, U. (1996) Immortalization and characterization of proximal tubule cells derived from kidneys of spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Kidney Int.* 50, 125-134
- Wright, E.M., Hirsch, J.R., Loo, D.D., Zampighi, G.A. (1997) Regulation of Na^+ /glucose cotransporters. *J. Exp. Biol.* 200, 287-293
- Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T., Tohyama, M. (1997) Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J. Biol. Chem.* 272, 10205-10211
- Yamazaki, T., Ro, S., Goodman, M., Chung, N.N., Schiller, P.W. (1993) A topochemical approach to explain morphiceptin bioactivity. *J. Med. Chem.* 36, 708-719
- Yang, C.Y., Dantzig, A.H., Pidgeon, C. (1999) Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.* 16, 1331-1343
- Yao, S.Y., Muzyka, W.R., Cass, C.E., Cheeseman, C.I., Young, J.D. (1998) Evidence that the transport-related proteins BAT and 4F2hc are not specific for amino acids: induction of Na^+ -dependent uridine and pyruvate transport activity by recombinant BAT and 4F2hc expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochem. Cell Biol.* 76, 859-865
- Yaron, A., Naider, F. (1993) Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 28, 31-81
- Zelikovic, I., Przekwas, J. (1993) The role of protein phosphorylation in renal amino acid transport. *Pediatr. Nephrol.* 7, 621-629

DANKADRESSEN

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. F.H. Leibach, Ph.D. und Prof. Dr. K. Neubert. In ihren Arbeitsgruppen fand ich für viele Jahre meine wissenschaftliche Heimstatt. Ihnen und Prof. V. Ganapathy, Ph.D. bin ich insbesondere für die lehrreichen, begeisternden und prägenden Diskussionen sehr dankbar.

Mein Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mich als Postdoktorand drei Jahre im Ausland finanzierte, um die Themen zu bearbeiten, die mich am meisten interessieren.

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

Großen Dank schulde ich Prof. Dr. M. Luckner für die Schaffung von Freiräumen, die für die Fertigstellung meiner Arbeit notwendig waren.

Meiner Frau Dr. Corinna Brandsch danke ich ganz besonders herzlich für ihre Unterstützung und ihre Geduld.

CURRICULUM VITAE

Geboren	10. Februar 1961 in Halle/Saale (Sachsen-Anhalt)
Schulbildung	
1967 - 1975	Grundschule (Nauendorf/Saalkreis und Leipzig)
1975 - 1979	Abiturstufe (Leipzig)
Wehrdienst	1979 - 1982
Studium	
1982 - 1986	Studium der Biologie, Fachrichtung Tierphysiologie, am Fachbereich Biowissenschaften der Universität Leipzig Abschluß mit dem akademischen Grad Diplombiologe
Promotion	
1987 - 1991	Dissertation angefertigt am Fachbereich Biowissenschaften der Universität Leipzig Abschluß mit dem akademischen Grad Dr. rer. nat.
Berufliche Stationen	
1987 - 1991	Wissenschaftlicher Assistent am Bereich Zellbiologie und Regulation, Fachbereich Biowissenschaften der Universität Leipzig
1992	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Georgia, Augusta, USA
1993 - 1995	Postdoktorand der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Georgia, Augusta, USA
1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Fachbereich Pharmazie und im Institut für Biochemie, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), 7. Dezember 1999

Matthias Brandsch

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden sind als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), 7. Dezember 1999

Matthias Brandsch