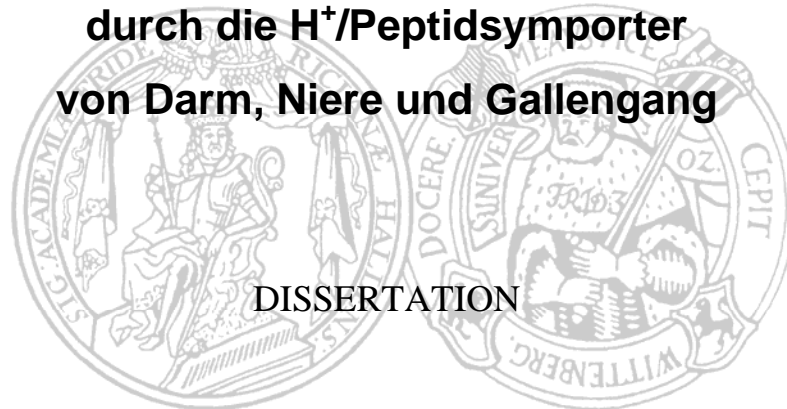


**Transport von therapeutisch wirksamen Peptidomimetika
durch die H⁺/Peptidsymporter
von Darm, Niere und Gallengang**



DISSERTATION

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

vorgelegt der

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

von

Frau Diplom-Biologin JANA NEUMANN
geb. am 15. Mai 1972 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. Klaus Neubert, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. habil. Gerhard Burckhardt, Georg-August-Universität Göttingen

Halle (Saale), 23. November 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009519

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3Agbv%3A3-000009519>]

Herrn Professor Martin Luckner
(1935 - 2004)

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung & Zielstellung	1
1.1 Transport an Epithelien	2
1.2 Peptidtransporter.....	5
1.3 Drug Delivery durch die H ⁺ /Peptidsymporter PEPT1 und PEPT2	7
1.3.1 δ -Aminolävulinsäure	10
1.3.2 Alafosfalin	14
1.3.3 Dipeptidylpeptidase IV-Inhibitoren.....	16
2 Material & Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Zelllinien.....	19
2.1.2 Chemikalien.....	19
2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellkultur	23
2.2.2 Transportstudien	25
2.2.2.1 <i>Uptake</i>	26
2.2.2.2 <i>Transepithelialer Flux</i>	27
2.2.2.3 <i>USSING-Kammer</i>	28
2.2.3 Proteinbestimmung.....	30
2.2.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie.....	31
2.2.5 Mathematische Methoden	32
3 Ergebnisse & Diskussion	36
3.1 Transport von δ -Aminolävulinsäure durch PEPT1 an Epithelzellen des Gallenganges	36
3.1.1 pH-Abhängigkeit der [³ H] δ -ALA-Aufnahme.....	36
3.1.2 Kinetische Parameter.....	37
3.1.3 Substratspezifität der δ -ALA-Aufnahme.....	38
3.1.4 Funktioneller Nachweis der δ -ALA-Aufnahme	40
3.1.5 Prüfung auf weitere potentielle Transportsysteme für δ -ALA	41
3.1.6 Regulation der [³ H] δ -ALA-Aufnahme	42
3.2 Transport von Alafosfalin durch PEPT1 und PEPT2 an Epithelzellen von Darm und Niere.....	47
3.2.1 Affinität von Alafosfalin an PEPT1 und PEPT2.....	47
3.2.2 Einfluss von Alafosfalin und Lys[Z(NO ₂)]-Val auf die [¹⁴ C]Gly-Sar-Aufnahme ..	50
3.2.3 Einfluss von Alafosfalin auf den [¹⁴ C]Gly-Sar-Flux.....	51
3.2.4 Transport von Alafosfalin: Messung des Kurzschlussstromes <i>I</i> _{sc}	55
3.3 Transport von DP IV-Inhibitoren an Epithelzellen des Darmes.....	57
3.3.1 Einfluss von DP IV-Inhibitoren auf [¹⁴ C]Mannitolaufnahme und -flux	57
3.3.2 Transepithelialer Transport von DP IV-Inhibitoren	58
3.3.3 Affinität von DP IV-Inhibitoren zu PEPT1	62
3.3.4 Charakterisierung des transepithelialen Transports von Ile-Thia.....	66
3.4 Interaktion weiterer Wirkstoffe mit PEPT1 an Epithelzellen des Darmes.....	71
4 Zusammenfassung & Ausblick	77
5 Literatur	80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	apikal
Ac	Acetyl-
ACE	angiotensin converting enzyme
ADME	absorption-distribution-metabolism-excretion
δ -ALA	δ -Aminolävulinsäure
AMCA	N(ϵ)-7-amino-4-methylcumarin-3-acetat

Proteinogene Aminosäuren:

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

6-APS	6-Aminopenicillansäure
b	basolateral
Bz	Benzoyl-
c	cellulär
Caco-2	humane Adenokarzinomzelllinie des Kolons
Ci	Curie
CMK	Chloromethylketon
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fum	Fumarat
GABA	γ -Aminobuttersäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die nötig ist, um 50% der spezifischen Aufnahme eines Standardsubstrates zu hemmen
I _{sc}	Kurzschlussstrom, (sc: short circuit)

J	transepithelialer Flux
K_i	Inhibitionskonstante
K_t	Affinitätskonstante des Transportes (MICHAELIS-MENTEN-Konstante)
MDCK	MADIN-DARBY canine kidney, Nierenepithel-Zelllinie
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
P-gp	P-Glykoprotein
PEPT1	H ⁺ /Di- und Tripeptidsympporter 1
PEPT2	H ⁺ /Di- und Tripeptidsympporter 2
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POT	protonenabhängige Oligopeptidtransporter Familie
Pyrr	Pyrrolidin
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
Sar	Sarkosin
SK-ChA-1	humane Adenokarzinomzelllinie des extrahepatischen Gallenganges
SKPT	Zelllinie des renalen proximalen Tubulus der Ratte <i>Rattus norvegicus</i>
Thia	Thiazolidin
TFA	Trifluoracetat
TNF	tumor necrosis factor (Zytokin)
TPP	Tripeptidylpeptidase
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (Zytokin, TNF-Superfamily)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit des Transportes
[Z(NO ₂)]	4-Nitrobenzyloxycarbonyl-

1 Einleitung & Zielstellung

Viele der gegenwärtig eingesetzten Arzneistoffe besitzen hinsichtlich ihrer oralen Verfügbarkeit ungünstige physikochemische Eigenschaften. Aufgrund ihrer aktiven Aufnahme durch intestinale Transportsysteme werden jedoch oftmals gute Bioverfügbarkeiten erreicht (STEFANSEN et al. 2004). Daher gewinnt die gezielte Involvierung der im Organismus existenten Carriersysteme zum Arzneimitteltransport zunehmend an Bedeutung. Ein zur Aufnahme von Peptidomimetika prädestinierter Carrier ist der intestinale niedrig-affine, jedoch mit hoher Aufnahmekapazität arbeitende, protonenabhängige Peptidsymporter PEPT1.

Wie auch der renale hoch-affine, mit geringerer Maximalgeschwindigkeit arbeitende H^+ /Peptidsymporter PEPT2 ist dieser nicht nur für die aktive Resorption der in der Nahrung vorkommenden Di- und Tripeptide über das intestinale bzw. das renale Epithelium und in andere Gewebe verantwortlich (RUBIO-ALLIAGA & DANIEL 2002, DANIEL & RUBIO-ALLIAGA 2003, BRANDSCH et al. 2004, DANIEL & KOTTRA 2004); er akzeptiert auch verschiedene pharmakologisch relevante Peptidomimetika als Substrate, beispielsweise eine Reihe von β -Lactamantibiotika und Protease-Inhibitoren, die δ -Aminolävulinsäure (GANAPATHY et al. 1995, BRETSCHEIDER et al. 1999, BRODIN et al. 2002, NIELSEN et al. 2002, NEUMANN & BRANDSCH 2003, BRANDSCH et al. 2004, DANIEL & KOTTRA 2004, NEUMANN et al. 2004) und auch „Nicht-Peptidomimetika“ (BÖRNER et al. 1998, DÖRING et al. 1998b, FOLTZ et al. 2004). Ausgehend von den 20 proteinogenen L- α -Aminosäuren ergeben sich allein 400 Dipeptid- bzw. 8000 Tripeptidsubstrate mit Molekulargewichten von 132 bis 576 Da; wobei sich die Bezeichnungen hoch- bzw. niedrig-affin in Bezug auf den jeweiligen H^+ /Peptidtransporter nicht vollständig generalisieren lassen.

Weitläufiges Ziel der Forschung an Struktur-Affinitätsbeziehungen ist die Erlangung allgemeingültiger Erkenntnisse zum molekularen Aufbau prädestinierter Substrate bzw. Inhibitoren zur zielgerichteten Synthese potentieller Pharmazeutika. Erste diesbezügliche Erfolge waren bei der systematischen Entwicklung von ACE-Hemmern über die Annahme der strukturellen Ähnlichkeit des katalytischen Zentrums des *Angiotensin Converting Enzyme* mit dem der Carboxypeptidase A zu verzeichnen (CUSHMAN et al. 1982). Ein weiteres Beispiel stellt die gezielte Entwicklung einer Vielzahl von Dipeptid- und Oligopeptidomimetika (u. a. von Alafosfalin) in struktureller Anlehnung an den Baustein der bakteriellen Zellwandsynthese D-Ala-D-Ala dar (ALLEN et al. 1978). Diese basierte auf den Kenntnissen zur Wirkungsweise von β -Lactamantibiotika, D-Cycloserin und Vancomycin. Eine bedeutende Verbesserung der

oralen Verfügbarkeit via PEPT1 gelang durch die Synthese von Prodrugs durch Anknüpfung von L-Valin an die Virustatika Acyclovir, Gancyclovir und Zidovudine über eine Esterbindung (LEE et al. 1996, GANAPATHY et al. 1998, HAN et al. 1998, SINKO & BALIMANE 1998, SUGAWARA et al. 2000) bzw. von L-Dopa-Phe, einem Dipeptidomimetikum des Parkinson-Therapeutikums L-Dopa (TAMAI et al. 1998). Weiterhin führte die Anknüpfung von Pro-Phe an die Osteoporosemittel Alendronat und Pamidronat durch eine Amidbindung zu einer geringfügigen Erhöhung der Bioverfügbarkeit (EZRA et al. 2000). Aufgrund des relativ breiten Substratspektrums von PEPT1 und PEPT2 sollte der Transport von therapeutisch wirksamen Peptidomimetika durch die Carrier an den Epithelien von Darm, Niere und Gallengang untersucht werden. Schwerpunkte bestanden dabei in der Charakterisierung des Transportes:

1. des Antitumormittels δ -Aminolävulinsäure am Gallengangsepithel durch PEPT1 der humanen Cholangiokarzinomzelllinie SK-ChA-1,
2. des Bakterizids Alafosfalin an den Epithelien von Darm und Niere via PEPT1 bzw. PEPT2 mittels der Zelllinien des humanen Kolonkarzinoms Caco-2 und des proximalen Tubulus SKPT der Ratte und
3. von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV – zur Behandlung verschiedener Stoffwechselerkrankungen – im Hinblick auf ihre orale Verfügbarkeit und die Untersuchung ihrer Affinität zu PEPT1 an Caco-2-Zellen.

Außerdem wurden weitere therapeutisch wirksame Peptidomimetika in einem Wettbewerbsassay auf Affinität zu PEPT1 an Caco-2-Zellen getestet.

1.1 Transport an Epithelien

Epithelgewebe sind flächenförmige Zellverbände, die zur Bedeckung der Körperoberfläche oder zur Auskleidung innerer Hohlräume dienen. Sie fördern den Erhalt der Homöostase des lebenden Organismus durch Kompartimentierung bei gleichzeitigem geregeltem Stoffaustausch mit der Außenwelt. Dabei existieren zwei verschiedene Absorptionswege – parazellulär und transzellulär. Typischerweise permeieren lipophile Arzneimittel über die transzelluläre Route, hydrophile Wirkstoffe hingegen nur langsam transzellulär, in einigen Fällen – meist handelt es sich dabei um kationische Verbindungen – parazellulär. Für die Pharmakokinetik von Wirkstoffen spielen dabei die Epithelien von Darm, Niere und Gallengang mit ihren Transportsystemen eine wichtige Rolle. Zum einen wird eine Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit durch die aktive Aufnahme vieler Pharmazeutika mittels membrangebundener Carrier

realisiert; hierbei wirken jedoch extra- und intrazelluläre Enzyme sowie Effluxpumpen in der apikalen Membran einer hohen Absorptionsrate oftmals entgegen. Zum anderen ist für eine gute Arzneimittelverträglichkeit die relativ schnelle renale Elimination des Wirkstoffs ein weiteres wichtiges Kriterium.

Die untersuchten Epithelien von Darm sowie Nieren- und Gallengang besitzen zahlreiche fingerförmige Ausstülpungen im Luminalbereich. Diese sogenannten Mikrovilli bilden in ihrer Gesamtheit die sogenannte Bürstensaummembran (*brush border membrane*), welche – wie auch die Einbuchtungen im basolateralen Bereich – der Oberflächenvergrößerung für die Gewährleistung einer optimalen Stoffwechselaktivität dienen. Bei den einschichtigen Epithelien von Jejunum, Nieren- und Gallengang handelt es sich infolge ihrer Funktionalität des regen Stoffaustausches zwischen Organismus und Umgebung um relativ durchlässige Zellverbände (Ausnahmen: Kolon, proximaler Bereich der HENLESchen Schleifen der Nierentubuli). Die Dichtigkeit wird dabei in hohem Maße durch die Zahl vorhandener Proteinstränge (*strands*) in den parazellulär, gürtelförmig ausgebildeten für Epithelien charakteristischen Schlussleisten (*tight junctions, Zonulae occludentes*) bestimmt, welche die Zellen nach außen hin miteinander verbinden. Zusammen mit den ebenfalls im Apikalbereich lokalisierten Gürteldesmosomen (*intermediate junctions, Zonulae adhaerentes*) bilden sie den Schlussleistenkomplex (*junctional complex*) und sorgen für einen restriktierten parazellulären Transport und – neben den basolateral vorhandenen Punktdesmosomen (*spot desmosomes, Maculae adhaerentes*) – für die mechanische Stabilisierung des Zellverbandes. Ein Verlust der *tight junctions* hätte eine Aufhebung der u. a. für Epithelien typischen Zellpolarität bei gleichzeitiger Einbuße der polaren Anordnung epithelialer Transportsysteme und Enzyme zur Folge. Durch eine dritte Form von Zellverbindungen – die lateral vorhandenen Konnexone (*gap junctions*) – wird der interzelluläre Informationsfluß innerhalb des Syncytiums mittels elektrischer ionaler Kopplung realisiert. Dieser Vorgang dient einer schnellen Anpassung an die jeweiligen physiologischen Bedingungen, z. B. durch Regulation der Carrierdichte mittels endo- bzw. exozytotischer Prozesse, dem Verschuß der *gap junctions* bei erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom etc. Einen Überblick zu den regulatorischen Einflüssen auf die epitheliale PEPT1- und PEPT2-Expression bzw. deren transmembranale Integration beinhaltet der Artikel von NIELSEN & BRODIN (2003).

Vermittelte, selektive Transportprozesse erfolgen zum einen passiv aufgrund eines Konzentrationsgefälles infolge erleichterter Diffusion durch Poren bzw. Carrier infolge der BROWNSchen Molekülbewegung. Zum anderen können sie ebenfalls aktiv entgegen einem Konzentrationsgradienten unter Energieaufwendung vermittelt durch Ionenpumpen und Carrier oder

auch durch verschiedene zytoseartige Prozesse ablaufen. Je nach Triebkraft unterscheidet man drei grundlegende Mechanismen der aktiven carriervermittelten Translokation. Beim primär-aktiven Transport wird die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie unmittelbar für den Transport- oder „Pump“-Mechanismus der sogenannten ATPasen verwendet (**Abb. 1**). Ist der

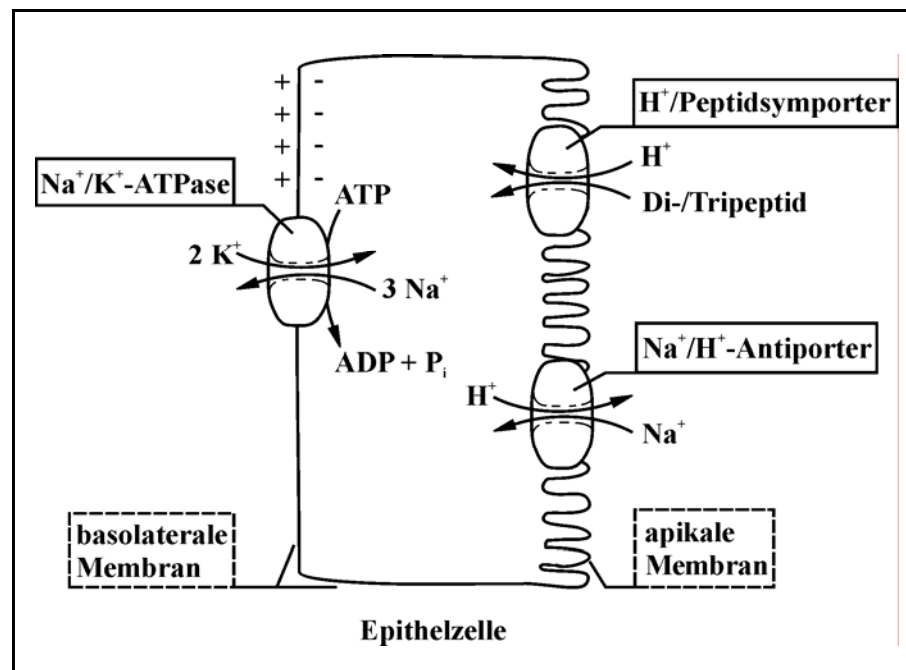


Abb. 1: Modell des Peptidtransportes als tertiär-aktiver Prozess an einer intestinalen, renalen bzw. cholangiozytären Epithelzelle.

Die Energiegewinnung für den Di-/Tripeptidtransport erfolgt primär mittels ATP-Hydrolyse durch die Na⁺/K⁺-ATPase. Der resultierende Na⁺-Gradient dient dabei als Triebkraft für den sekundär-aktiven Na⁺/H⁺-Antiporter, welcher das für den Peptidtransport via PEPT1 bzw. 2 notwendige saure Mikroklima an der apikalen Bürstensaummembran bewirkt.

carriervermittelte Transport einer Substanz entgegen eines Konzentrationsgefälles an einen vorhergehenden, passiven Ionentransport – unter Ausnutzung eines Ionengradienten aus primär-aktiven Transportprozessen (z. B. basolateral lokalisierte Na⁺/K⁺-ATPase) – gekoppelt, so ist dieser sekundär-aktiv (z. B. apikal lokalisierter Na⁺/H⁺-Antiporter) (**ebd.**). Dabei kann es sich sowohl um einen Symport als auch um einen Antiport von Ion und Kosubstrat handeln. Die apikal vorhandenen tertiär-aktiven H⁺/Peptidsymporter PEPT1 und PEPT2 agieren wiederum unter Nutzung des einwärts gerichteten Protonengradienten resultierend aus der Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers. Das luminalen Mikroklima an der Bürstensaummembran der untersuchten Epithelzellen ist daher durch einen sauren pH-Wert von etwa 6,0 bis 6,5 charakterisiert.

1.2 Peptidtransporter

Die Fähigkeit der aktiven Aufnahme von Oligopeptiden durch membranständige Transportsysteme für eine effiziente Versorgung des Organismus mit wichtigen Verbindungen bzw. Elementen wie Aminosäuren, Kohlenstoff und Stickstoff wurde bisher bei Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren nachgewiesen. Die ubiquitär verbreiteten di- und tripeptidtransportierenden Carrier sind aufgrund ihrer Sequenzhomologien in der PTR- bzw. POT-Familie (Peptidtransporter bzw. protonenabhängige Oligopeptidtransporter) zusammengefasst (PAULSEN & SKURRAY 1994, STEINER et al. 1994, 1995). Das tetra- und pentapeptidtransportierende OPT-System (Oligopeptidtransporter, NIELSEN & BRODIN 2003) kommt hingegen nur bei Pilzen und Pflanzen vor. Etwas irreführend erscheint daher die Bezeichnung opt für den Dipeptidtransporter der Schwarzbäuchigen Taufliege *Drosophila melanogaster* (Synonym: Fruchtfliege, ROMAN et al. 1998). Außerdem transportieren die OPT-Transporter des Fadenwurmes *Caenorhabditis elegans* neben Tetrapeptiden ebenfalls Di- und Tripeptide (FEI et al. 1998a & 2000a). Im Folgenden sollen die bisher beschriebenen, der POT- bzw. PTR-Familie angehörenden Peptidtransporter der *Mammalia* einer näheren Betrachtung unterzogen werden. Neben dem in physiologischer und pharmakologischer Hinsicht bedeutenden (Di-/Tri-)Peptidtransporter PEPT1 (SLC15A1) und dem ebenfalls gut charakterisierten, nahe verwandten Carrier PEPT2 (SLC15A2) (FEI et al. 1994, LIANG et al. 1995, LIU et al. 1995) wurden die (Di-/Tri-) Peptid-/Histidintransporter PHT1 (SLC15A3) und PHT2 (SLC15A4) beim Menschen nachgewiesen (YAMASHITA et al. 1997, BOTKA et al. 2000, HERRERA-RUIZ et al. 2001, SAKATA et al. 2001, HERRERA-RUIZ & KNIPP 2003, DANIEL & KOTTRA 2004). Möglicherweise handelt es sich bei PHT1 und PHT2 jedoch um lysosomal lokalisierte Transportsysteme (OCHELTREE et al. 2003, DANIEL & KOTTRA 2004). Ihre Homologie in der Aminosäuresequenz zu den PEPT-Transportern beträgt lediglich 20 - 25%. HERRERA-RUIZ und Mitarbeiter (2001) identifizierten im Darmgewebe von Mensch und Ratte unter Verwendung von cDNA-Datenbanken die mRNA von PEPT1, PHT1 und PTR3 (Peptidtransporter 3). Die aus menschlicher Plazenta bzw. -Gehirn geklonten Peptidtransporter hPTR3 und hPTR4 sollen in ihrer DNA-Sequenz PHT2 bzw. PHT1 sehr ähnlich sein (NIELSEN & BRODIN 2003).

Verschiedene funktionelle Untersuchungen an Darm und Niere ergaben basolaterale Peptidtransportsysteme, welche den In- bzw. Efflux von Di-/Tripeptiden, Peptidomimetika und einer Reihe weiterer „Nicht-Peptidomimetika“ bewirken sollen. Ihre Klonierung steht bisher noch aus (DYER et al. 1990, SAITO & INUI 1993, THWAITES et al. 1993a, TERADA et al. 1999, TERADA et al. 2000, IRIE et al. 2001, SUGAWARA et al. 2003).

Aufgrund der Relevanz von PEPT1 und PEPT2 für die Untersuchungsthematik sollen beide Transporter physiologisch und molekulargenetisch kurz charakterisiert werden. Die Bezeichnungen von PEPT1 und PEPT2 des intestinalen bzw. renalen Typus leiten sich von ihrem ursprünglichen Entdeckungsort ab. Beide in der Apikalmembran lokalisierten, tertiär-aktiven Carrier sind wie alle Mitglieder der SLC15-Familie (Solute Carrier 15) elektrogen, d. h. abhängig von einem zelleinwärts gerichteten Protonengradienten als Triebkraft für den Substrattransport und demzufolge vom extrazellulären pH-Wert und einem bestimmten Membranpotential (LEIBACH & GANAPATHY 1983). Die Existenz von PEPT1 ist für Regionen des Dünndarms, des Pankreas, der Leber, der Niere und des Gallenganges belegt (OGIHARA et al. 1996, BOCKMANN et al. 1997, THAMOTHARAN et al. 1997, SHEN et al. 1999, ZHOU et al. 2000, KNÜTTER et al. 2002). PEPT2 mit vergleichsweise niedriger Transportkapazität wurde bisher in Bereichen der Niere, des zentralen und peripheren Nervensystems, der Lunge, der Milchdrüsen und der Retina nachgewiesen (DRINGEN et al. 1998, BERGER & HEDIGER 1999, DIECK et al. 1999, SHEN et al. 1999, NOVOTNY et al. 2000, GRONEBERG et al. 2001b,c & 2002, OCHELTREE et al. 2003, FUJITA et al. 2004), desweiteren ohne genauere Lokalisation in Milz, Kolon und Pankreas (DÖRING et al. 1998a). Der Nettoladungstransport von Proton zu Substratmolekül steht meist im Verhältnis von 1:1 bei PEPT1 bzw. von 2:1 bei PEPT2 (THWAITES et al. 1993b, MACKENZIE et al. 1996, WENZEL et al. 1996, CHEN et al. 1999). Substanzen ohne Nettoladung weisen dabei höhere Transportraten auf als kationische bzw. anionische. Um den für den Transportprozess notwendigen Protonengradienten aufzubauen, sind neben dem Na^+/H^+ -Antiporter aus thermodynamischen Gesichtspunkten zusätzliche Translokatoren – möglicherweise ein $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter – notwendig (AMASHEH et al. 1997). Nach neueren Untersuchungen von KOTTRA et al. (2002) an PEPT1-exprimierenden Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* handelt es sich um einen bidirektionalen Carrier: Bei der Präsenz identisch geladener Substanzen auf beiden Seiten der Membranoberfläche wurde sowohl ein Auswärts- als auch ein verstärkter Einwärtsstrom gemessen. Aufgrund dieser Ergebnisse würde sich der transstimulative Effekt des „Vorladens“ von Zellen mit Substrat zumindest ansatzweise erklären. Weiterhin konnte THEIS (2002) mittels Zufallsmutagenese und anschließender Phänotypisierung feststellen, dass die Substitution der Aminosäurereste Ile-382 und Gly-476 zu einer veränderten pH-Abhängigkeit führt.

Die protonenabhängigen Peptidsymporter PEPT1 und PEPT2 wurden bereits aus zahlreichen Vertebraten bzw. Caco-2-Zellen kloniert (BOLL et al. 1994 & 1996, FEI et al. 1994 & 2000b, LIANG et al. 1995, LIU et al. 1995, SAITO et al. 1995 & 1996, WALKER et al. 1998, RUBIO-ALLIAGA et al. 2000, PAN et al. 2001, CHEN et al. 2002a & b, ZHANG et al. 2004). Die huma-

nen Transportproteine PEPT1 und PEPT2 mit einem Molekulargewicht von ~ 79 kDa bzw. ~ 82 kDa bestehen aus 12 membrandurchspannenden Domänen mit insgesamt 708 bzw. 729 Aminosäureresten, deren N- und C-terminale Enden im Zytosol lokalisiert sind (LIANG et al. 1995, LIU et al. 1995). Das auf dem 13. Chromosom angeordnete PEPT1-Gen (q33 - q34) besteht aus 24 Exons, welche für PEPT1 (23 Exons) und dessen regulatorischen Faktor PEPT1-RF (6 Exons, Splice-Variante) kodieren (LIANG et al. 1995, URTTI et al. 2001). Das menschliche PEPT2-Gen befindet sich auf Chromosom 3 (q13,3 - q21,1) und umfasst 22 Exons (RAMAMOORTHY et al. 1995). PEPT1 besitzt 7 N-Glykosilierungsstellen und 2 Bereiche für die Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung. PEPT2 zeichnet sich u. a. durch 3 N-Glykosilierungsstellen, 7 PKC-Konsensusbereiche, einen PKA-Bereich und einen weiteren Phosphorylierungsbereich für die Tyrosinkinase aus (NIELSEN & BRODIN 2003). Hydrophobizitätsanalysen der Aminosäureabfolge indizieren 12 Transmembrandomänen für alle bisher identifizierten PEPT1/2-Transporter (FEI et al. 1998b). Eine detaillierte Beschreibung zu den mutmaßlichen Funktionen der Transmembrandomänen und einzelner Aminosäurereste findet sich in einem Übersichtsartikel von RUBIO-ALLIAGA & DANIEL (2002).

1.3 Drug Delivery durch die H⁺/Peptidsymporter PEPT1 und PEPT2

Die Kristallografie der Transportproteine PEPT1 und PEPT2 und deren Röntgenstrukturanalyse könnte wesentliche Hinweise für die zielgerichtete Synthese neuer Pharmaka liefern. Da ihre Realisierung jedoch noch in weiter Ferne zu liegen scheint, bleiben Kompetitionsstudien an Transportsystemen etablierter Zelllinien – neben der Verwendung von heterologen Expressionssystemen und der gerichteten Mutagenese zur funktionellen Strukturaufklärung – ein probates Mittel zur Überprüfung der Affinitäten potentieller Substrate – so auch von Arzneistoffen – gegenüber dem Carrier (DANIEL 1996, BRANDSCH & BRANDSCH 2003). Die von BRANDSCH et al. (2004) und LUCKNER & BRANDSCH (2005) für PEPT1 an Caco-2- bzw. für PEPT2 an SKPT-Zellen aufgestellten Affinitätsklassen – Ergebnis des Vergleichs einer Vielzahl von Hemmkonstanten natürlicher Substrate mit den Werten von β -Lactamantibiotika – erleichtern dabei die qualitative Einstufung einer Testsubstanz (**Tabelle 1**). Wesentliche Anhaltspunkte für diese Klassifikation lieferten u. a. die Untersuchungen von BRETSCHEIDER et al. (1999) an 23 β -Lactamantibiotika, welche unter Verwendung von Caco-2-Zellmonolayern mittels Affinitäts- und Transportstudien eine gute Korrelation von Inhibitionskonstanten (K_i) und Fluxwerten nachwiesen. Dabei stellten die Autoren fest, dass die oral verfügbaren

β -Lactamantibiotika mit einem Flux von $> 2 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ in der Regel K_i -Werte $< 14 \text{ mM}$ besitzen. Für Pharmaka mit einer niedrigeren Hemmkonstante bleibt daher der Applikationsweg über PEPT1 höchstwahrscheinlich verschlossen. Allerdings sind diese Affinitäts-

Tab. 1: Klassifikation organischer Solute bezüglich ihrer Affinität zu PEPT1 für Caco-2- bzw. PEPT2 für SKPT-Zellen.

Die Deklaration der Affinitätsklassen beinhaltet die Interpretation der K_i -Werte natürlicher Substrate, von β -Lactamantibiotika/-intermediaten sowie die Affinitäts-Flux-Korrelationen von 23 β -Lactamantibiotika (BRETSCHNEIDER et al. 1999, BRANDSCH et al. 2004, LUCKNER & BRANDSCH 2005).

Substrathaftung	PEPT1	PEPT2
hohe Affinität	$< 0,5 \text{ mM}$	$< 0,1 \text{ mM}$
mittlere Affinität	$0,5 - 5 \text{ mM}$	$0,1 - 1 \text{ mM}$
niedrige Affinität	$> 5 - 15 \text{ mM}$	$> 1 - 5 \text{ mM}$
keine Affinität	$> 15 \text{ mM}$	$> 5 \text{ mM}$

klassen bezüglich der Einstufung potentieller PEPT1/2-Substrate nicht ohne weiteres allgemeingültig anwendbar. Während beispielsweise der cholangiozytäre- und der intestinale H^+ /Peptidtransporter 1 sehr ähnliche Affinitäten aufweisen, sind die K_i -Werte beim heterolog exprimierten, ebenfalls humanen PEPT1 in *Pichia pastoris* zum Teil um das Zehnfache erhöht. Eine eventuelle Anwendbarkeit der Affinitätsklassen von PEPT1 der Caco-2-Zellen auf die SK-ChA-1-Zelllinie müsste zuvor mittels intensiver vergleichender Hemmstudien bestätigt werden.

Bei der carriervermittelten Translokation spielen nichtkovalente Bindungen eine wesentliche Rolle bei der reversiblen Substrathaftung. So belegen Hemmstudien mit Diethylpyrocarbonat die Bindung des kotransportierten Protons über Wasserstoffbrücken an Histidylreste der Carrier, wobei die in der zweiten Transmembrandomäne oberflächennah lokalisierten Aminosäurereste His-57 für PEPT1 bzw. His-87 bei PEPT2 essentiell für die Transportfunktion sind (FEI et al. 1997, TERADA et al. 1998 & 1999, CHEN et al. 2000, IRIE et al. 2001). Erkenntnisse zu den strukturellen Erfordernissen potentieller PEPT1- bzw. PEPT2-Substrate beinhalten u. a. die Veröffentlichungen von BRANDSCH et al. 1999, DÖRING et al. 1998a & b, RUBIO-ALLIAGA & DANIEL 2002, THEIS 2002, KNÜTTER 2003 und BRANDSCH et al. 2004.

In Verallgemeinerung der Ergebnisse bisheriger Struktur-Affinitätsuntersuchungen an PEPT1 haben BRANDSCH et al. (2004) die bedeutendsten Merkmale hoch-affiner Substrate bzw. Peptidomimetika zusammengefasst:

- L-Konfiguration der Aminosäuren
- eine saure bzw. hydrophobe Gruppe am C-Terminus
- eine schwach basische Gruppe in α -Position am N-Terminus
- eine Peptid- oder Ketomethylenbindung
- trans-Konformation der Peptidbindung.

GEBAUER et al. (2003) ermittelten unter Anwendung der computergestützten, dreidimensionalen quantitativen Struktur-Wirkungsanalyse (3D-QSAR, GEBAUER et al. 2003) mittels CoMFA und CoMSIA an 79 Dipeptiden und Dipeptidomimetika folgende strukturell bzw. energetisch die Affinität zu PEPT1 begünstigenden Eigenschaften:

- relativ große, raumfüllende Seitenketten in N- bzw. C-terminaler Position
- ein positiv geladener N-Terminus und eine Region hoher Elektronendichte am C-Terminus
- eine zusätzliche, bevorzugt hydrophobe Region im C-terminalen Bereich
- eine Wasserstoffbrücken-Donorregion am N-Terminus
- eine Wasserstoffbrücken-Akzeptorregion, notwendig für die Differenzierung zwischen LL-, DL-, LD- und DD-Isomeren.

Dieses Modell wurde durch den Einbezug einer Vielzahl von β -Lactamantibiotika und Tripeptide bereits weiter vervollkommenet (BIEGEL et al. 2005).

Die aufgeführten strukturellen Anforderungen an Substrate des H^+ /Peptidsymporters 1 gelten in hohem Maße ebenfalls für PEPT2. Trotz der relativ ähnlichen strukturellen Ansprüche beider Carrier an das Substrat, besitzt der H^+ /Peptidsymporter 2 jedoch eine höhere Selektivität (GANAPATHY et al. 1995, BÖRNER et al. 1998, DÖRING et al. 1998b, FOLTZ et al. 2004). So ermittelten beispielsweise DÖRING & Mitarbeiter (1998b) bei ihrer Untersuchung von ω -Aminofettsäuren für PEPT1-Substrate eine Minimalstruktur von maximal vier Methylengruppen zwischen den beiden geladenen Zentren mit einem Abstand von $> 500 < 630$ pm, welcher von GEBAUER et al. (2003) im Wesentlichen bestätigt wurde. PEPT2 hingegen benötigt für die Substraterkennung zusätzlich das Vorhandensein einer Carbonylgruppe (DÖRING et al. 1998b, SCHOENMAKERS et al. 1999).

Eines der ersten und bekanntesten Beispiele für die Nutzung von Carriersystemen zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit war die gezielte Synthese von therapeutisch wirksamen Peptidomimetika durch Veresterungen des Virustatikums Acyclovir (ACV). Allein durch die durch die Kopplung dieses Nukleosidanalogs an die hydrophobe Aminosäure L-Valin konnte die orale Aufnahme beim Menschen von 15 - 21% auf 63% erhöht werden (BEAUCHAMP et al. 1992). Neben der intestinalen aktiven Translokation von Valacyclovir durch PEPT1 interagiert die Verbindung mit PEPT2 und möglicherweise ebenfalls mit organischen Kationen- bzw. Anionentransportern und dem basolateralen Peptidtransporter (HAN et al. 1998, GANAPATHY et al. 1998, SINKO & BALIMANE 1998, SAWADA et al. 1999, IRIE et al. 2001). Weiterführende Kompetitionsstudien mit den Dipeptid-Acyclovir-Konjugaten Val-Val-ACV und Gly-Gly-ACV an Caco-2-Zellmonolayern ergaben im Vergleich zu Val-ACV ähnlich hohe Affinitäten zu PEPT1 (ANAND et al. 2003b). Die Dipeptidester des ACV sollen zudem eine vermehrte Wasserlöslichkeit, eine geringere Toxizität und eine teils verbesserte Stabilität gegenüber sauren pH-Werten und enzymatischer Hydrolyse besitzen (ANAND et al. 2003a). Dieses Beispiel verdeutlicht die Bedeutung experimenteller Struktur-Affinitäts-Analysen für die Erlangung essentieller Erkenntnisse zum gezielten Einsatz bei der Synthese von arzneilichen Wirkstoffen bzw. Prodrugs mit verbesserten oralen Bioverfügbarkeiten. In den anschließenden Ausführungen erfolgt eine Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, pharmazeutisch wirksamen Peptidomimetika bezüglich ihrer medizinischen Einsatzgebiete.

1.3.1 δ -Aminolävulinsäure

δ -Aminolävulinsäure (δ -ALA, **Abb. 2**) hat in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung in der photodynamischen Diagnostik (PDD) und -Therapie (PDT) verschiedenartiger Tumoren erlangt (PENG et al. 1997, ZÖPF & RIEMANN 1997, RODRIGUEZ et al. 2004, FUKUDA et al. 2005). Es gehört zu den Photosensibilisatoren der zweiten Generation und zeichnet sich im Vergleich zu anderen photoaktiven Arzneistoffen durch einen relativ schnellen Abbau der eigentlichen lichtaktiven Substanz innerhalb von 24 bis 48 Stunden aus (ZOEPF et al. 2001b). Nach oraler oder intravenöser Applikation reichert sich δ -ALA vorwiegend in den Tumorzellen an und wird dort zu Protoporphyrin IX umgewandelt, welches durch die meist eingeschränkte Aktivität der Ferrochelatase verstärkt in diesen Zellen akkumuliert. Protoporphyrin IX, der eigentliche Photosensibilisator, ist die unmittelbare Vorstufe des Häms bei der Hämoglobinsynthese (STRYER 1991). Die Lichtaktivierung des Protoporphyrin IX mittels kalten

Rotlichts bei einer Wellenlänge von etwa 630 nm führt zur Bildung von Sauerstoffradikalen, hauptsächlich von Singulett-Sauerstoff und Hydroperoxiden. In deren Folge kommt es in den malignen Zellen zu einer Schädigung der Mitochondrien und letztlich zur Apoptose (HERMES-LIMA et al. 1991 & 1992, NOODT et al. 1996, PENATTI et al. 1996).

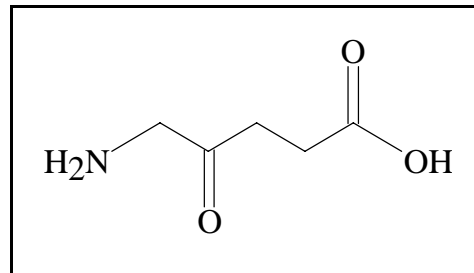


Abb. 2: Strukturformel von δ -Aminolävulininsäure (5-Amino-4-oxopentansäure).

Bei oraler Verabreichung von δ -ALA an Hunden und Menschen konnte eine gute Resorptionsrate im Gastrointestinaltrakt von durchschnittlich 41% bzw. 60% festgestellt werden (DALTON et al. 1999 & 2002). In der Niere wird die Substanz nach glomerulärer Filtration aus dem Primärfiltrat mit hoher Effizienz ins Blut rückresorbiert. Krankhaft erhöhte δ -ALA-Konzentrationen mit teilweise resultierenden Organschäden aufgrund des oxidativen Stresses finden sich u. a. bei der Porphyrie (hauptsächlich bei der akuten intermittierenden Porphyrie), bei der hereditären Hypertyrosinämie und infolge von Bleivergiftung (= Saturnismus) (BORNSTEIN et al. 1979, RUSSELL et al. 1982, ROTH et al. 1990, HERMES-LIMA et al. 1991 & 1992, SCHIERBEEK et al. 1993, PENATTI et al. 1996).

Neben der Verwendung als Tumordiagnostikum erwies sich δ -ALA vor allem zur Behandlung von Präkanzerosen und Basalzellkarzinomen der Haut, des gastrointestinalen Adenokarzinoms, der dysplastischen Mucosa des Dünndarms, der zervikalen intraepithelialen Neoplasie und von Präkanzerosen des Ösophagus (BARRETT's Syndrom) als geeignetes Mittel (PENG et al. 1997, ZÖPF & RIEMANN 1997, GOSSNER et al. 1998, WIERRANI et al. 1999, BYRNES & ADFAHL 2002, PECH et al. 2002, BODNER et al. 2003). Hinsichtlich der Behandlung von extrahepatischen Gallengangstumoren ist die PDT ebenfalls von großem Interesse. Dabei führte die Anwendung von Photophrin II und insbesondere Photosan-3 zur Beseitigung der durch Gallengangstumoren verursachten Stenosen (RUMALLA et al. 2001, ZOEPF et al. 2001a). Ein wesentlicher Nachteil dieser Substanzen im Gegensatz zu δ -ALA besteht in ihrer lang anhaltenden Photosensitivierung von bis zu sechs Wochen. Der Einsatz von δ -ALA in der PDT extrahepatischer Gallengangstumoren erwies sich jedoch bisher als ineffektiv (ZOEPF et al. 2001b). Dies lässt sich möglicherweise durch unterschiedliche biochemische Eigenschaf-

ten der Gallengangstumoren im Vergleich zu anderen epithelialen Tumoren erklären. So fanden GIBSON et al. (1999) bei der Untersuchung verschiedener Krebszellen unterschiedlich hohe δ -ALA-induzierte Protoporphyrin IX-Konzentrationen. Außerdem besitzt die Substanz in der Regel eine geringe Eindringtiefe von ≤ 2 mm, die sie zur Therapie flacher Läsionen prädestiniert (GOSSNER et al. 1998). Dies lässt auf das Fehlen hoch-affiner Transportsysteme für δ -ALA im mesenchymalen Gewebe schließen - eine Voraussetzung zur Erlangung der effektiven Therapiedosis. Eine erhöhte Wirksamkeit der Substanz kann jedoch u. a. bei bestimmten Kanzerosen durch die Umgehung der systemischen Zirkulation erreicht werden. So führte beispielsweise die lokale, intravesikuläre Administration von δ -ALA bei Blasenkrebs zu einer erheblichen Erhöhung der Wirkstoffkonzentration am Angriffsort um das 20.000fache im Vergleich zur oralen bzw. intravenösen Verabreichung (DALTON et al. 2002). Bemühungen zur Optimierung der topischen Behandlung von Hautkrebs und dessen Vorstufen, wie z. B. der prämaligen aktinischen Keratose, erfolgten – neben der Iontophorese oder der Verwendung von Additiva bzw. Nanopartikeln – durch den Einsatz des Methylesters der δ -Aminolävulinsäure (MAOP, Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat)) aufgrund seiner höheren Selektivität, der besseren Eindringtiefe und zugleich schnelleren Penetration in neoplastische Zellen (LOPEZ et al. 2001, PIERRE et al. 2001, BODDE et al. 2002, JOHNSON et al. 2002, SZEIMIES et al. 2002, LOPEZ et al. 2003a & b). Gute Ergebnisse durch MAOP wurden auch bei der Behandlung von Hautleishmaniose erzielt (GARDLO et al. 2003). Die Substanz eignet sich neben δ -ALA ebenfalls als Agens in der Tumordiagnostik (MANIVASAGER et al. 2003). Die herbiziden, insektiziden und pflanzenwachstumsregulierenden Eigenschaften von δ -ALA eröffnen weitere potentielle Einsatzgebiete im ökonomischen Bereich (FUKUDA et al. 2005).

Aufgrund der medizinischen Bedeutung von δ -ALA existieren bereits verschiedene Studien zum Membrantransport der Substanz in menschlichen Geweben, so z. B. an der apikalen und basolateralen Membran des intestinalen Epithels, des weiteren an Synaptosomen- (aus homogenisiertem Hirn gewonnene synaptische Endigungen) bzw. am Choroidplexusepithel der Ratte (MCCLOUGHLIN & CANTRILL 1984, NOVOTNY et al. 2000, IRIE et al. 2001, ENNIS et al. 2003). Überraschenderweise sind für δ -ALA in Abhängigkeit von der Art des Gewebes unterschiedliche Transportwege beschrieben worden. DÖRING et al. (1998a) führten eine gründliche Untersuchung des δ -ALA-Transportes mittels des Oocyten- (*Xenopus laevis*) und des Hefeexpressionssystems (*Pichia pastoris*) unter gezielter Betrachtung der Peptidtransporter durch. Sie fanden heraus, dass δ -ALA ein relativ hoch-affines Substrat für den intestinalen H^+ /Peptid-Kotransporter PEPT1 und den renalen H^+ /Peptid-Kotransporter PEPT2 darstellt. Da δ -ALA anstelle einer Peptidbindung eine Ketomethylenbindung aufweist, lieferten diese

Untersuchungen neue Erkenntnisse zu den strukturellen Erfordernissen potentieller Substrate der H^+ /Peptidsymporter PEPT1 und PEPT2. Der δ -ALA-Transport durch PEPT1 bzw. PEPT2 wird weder von GABA noch von Glutamin gehemmt (DÖRING et al. 1998a). Im Gegensatz dazu gibt es an den Synaptosomen des Rattenhirns durch $[^3H]\delta$ -ALA, GABA und Glutamat eine Interaktion mit demselben Transporter (MC LOUGHLIN & CANTRILL 1984). In analoger Weise wurde für die humane Adenokarzinomzelllinie des Kolons WiDr der Transport von δ -ALA, jedoch nicht seines Methylesters, durch die β -Aminosäuren- und GABA-Carrier festgestellt (RUD et al. 2000). Der Transport des δ -ALA-Esters erfolgt wahrscheinlich durch einen Carrier mit einer Affinität zu unpolaren Aminosäuren (GEDERAAS et al. 2001). In der murinen Mammaadenokarzinom-Zelllinie LM3 ist ebenfalls ein β -Aminosäuretransporter, mutmaßlich GAT2, für die δ -ALA-Aufnahme verantwortlich (BERMUDEZ-MORETTI 2002). In amelanotischen Melanomen (A-Mel-3) konnte die δ -ALA-Aufnahme durch Glycin inhibiert werden (LANGER et al. 1999), jedoch nicht in intestinalen und renalen Zellen (DÖRING et al. 1998). Bei Prokaryoten existieren gleichfalls zwei Carriersysteme für die δ -ALA-Aufnahme. So identifizierte man in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* die GABA-Permease UGA4 als verantwortlichen Transporter (BERMUDEZ-MORETTI et al. 1995) und in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* sowie in dem Symbionten *Rhizobium leguminosarum* die Dipeptidpermease dpp (ELLIOTT 1993, VERKAMP et al. 1993, CARTER et al. 2002). Für die Gattung *Rhizobium* ist zudem ein mutmaßlicher Dicarboxylat-Carrier als weiterer, in die δ -ALA-Translokation involvierter Transporter beschrieben worden (HERRADA et al. 1992).

Die Studien bezüglich des intestinalen Transportes von δ -ALA wurden von INUI & Mitarbeitern intensiviert. Dabei charakterisierten sie die Affinitäten und den Transport von δ -ALA an der apikalen und der basolateralen Membran von Caco-2-Zellen (IRIE et al. 2001), wobei für den Flux von der apikalen zur basolateralen Seite eine höhere Transportrate beobachtet werden konnte. Eine eventuelle Hemmung des $[^3H]\delta$ -ALA-Transportes durch GABA, Glutamat, Glycin bzw. Aspartat wurde in dieser Studie nicht untersucht. Am Epithelium des Choroidplexus wird der δ -ALA-Transport durch PEPT2 realisiert. Die Involvierung eines potentiellen Na^+/HCO_3^- -abhängigen organischen Anionentransporters (NOVOTNY et al. 2000), welcher infolge der Hemmbarkeit der δ -ALA-Aufnahme durch den OAT-Inhibitor Probenicid vermutet worden war (ENNIS et al. 2003), konnte durch neuere Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe an PEPT2(-/-)-Mäusen nicht bestätigt werden (OCHELTREE et al. 2004).

Wie bereits erwähnt, ist die PDT von Tumoren des extrahepatischen Gallenganges von besonderem medizinischem Interesse. Vor kurzem wiesen KNÜTTER et al. (2002) die Expression des intestinalen H^+ /Peptidtransporters in der Tumorzelllinie des extrahepatischen Gallen-

ganges SK-ChA-1 bzw. in nativen Gallengangszellen des Kaninchens sowie die kompetitive Hemmung des Dipeptids [^{14}C]Gly-Sar durch δ -ALA in SK-ChA-1-Zellen nach.

In der vorliegenden Arbeit soll der Transport von δ -ALA am Gallengangsepithel genauer charakterisiert werden.

1.3.2 Alafosfalin

Aminophosphonsäuren stellten ursprünglich eine Gruppe ausnahmslos natürlich vorkommender Substanzen dar, deren einfachste und zugleich häufigste – die 2-Aminoethylphosphonsäure – in einer Vielzahl von Protozoen, Coelenteraten und Mollusken als auch im menschlichen Gewebe nachgewiesen wurde (KAFARSKI & MASTALERZ 1984). Einige der in Lebewesen entdeckten Aminophosphonate wie Fosmidomycin aus *Streptococcus lavendulae* besaßen zugleich bakterizide Eigenschaften (OKUHARA et al. 1980). Bei Alafosfalin (Alaphosphin, L-Alanyl-L-1-aminoethylphosphonsäure, **Abb. 3**) wiederum handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes, antibakteriell wirksames Dipeptid-Analogon, bei welchem die Carboxylgruppe $-\text{C}(\text{O})(\text{OH})$ des C-terminalen Alanins durch eine Phosphonatgruppe $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ substituiert wurde (ALLEN et al. 1978). Die Substanz galt als eine der vielversprechendsten Aminophosphonsäuren auf der Suche nach einem antibakteriell wirksamen Peptidomimetikum mit Beeinflussung der bakteriellen Zellwandsynthese. Hierbei wurden insgesamt über 300 Di- bis Pentapeptidomimetika in struktureller Anlehnung an D-Ala-D-Ala mit unterschiedlichen Substitutionen des N-terminalen Alanins und/oder der Carboxylgruppe des C-terminalen Alanins synthetisiert.

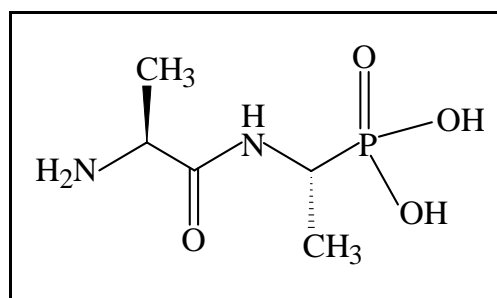


Abb. 3: Strukturformel von Alafosfalin (Alaphosphin, L-Alanyl-L-1-aminoethylphosphonsäure).

Alafosfalin besitzt bei einer hinreichenden oralen Verfügbarkeit von ca. 50% – hauptsächlich gegen gramnegative Bakterien – eine gute antibakterielle Wirkung (ALLEN et al. 1978, ALLEN & LEES 1980, ATHERTON et al. 1980, WESTMACOTT et al. 1981). Diese wird im Bakterium zum einen durch die Hemmung der Alanin-Racemase durch das Spaltprodukt L-1-Amino-

ethylphosphonsäure und zum anderen durch dessen Einbau in die Peptidoglycanketten anstelle des für die Vernetzung zuständigen D-Ala-D-Ala realisiert (ALLEN et al. 1978). Die gleichzeitige Verabreichung von Alafosfalin mit bestimmten β -Lactamantibiotika wie Ampicillin, Cephalexin, Cefamandol oder Mecillinam induziert synergistische Effekte (ALLEN et al. 1979a, MARUYAMA et al. 1979, ALLEN & LEES 1980, TRAUB et al. 1980, ATHERTON et al. 1981, ARISAWA et al. 1982, HALL et al. 1983). Proteinreiche Nahrung bewirkte eine Verlängerung der Halbwertszeiten von Alafosfalin im Gastrointestinaltrakt (WELLING et al. 1980). In klinischen Studien wurde Alafosfalin auf seine Wirksamkeit bei gastrointestinalen- (WESTMACOTT et al. 1981) und Harnwegsinfektionen (MARUYAMA et al. 1979, ARISAWA et al. 1982) getestet. Die endgültige Zulassung als Antibiotikum scheiterte; möglicherweise wegen des relativ hohen First-Pass-Metabolismus, aufgrund der relativ schnellen renalen Exkretion der Substanz (ALLEN et al. 1979b) und durch das Auftreten bakterieller Resistenzen (GIBSON et al. 1984).

Die partiell vorhandene Widerstandsfähigkeit einiger Bakterienarten gegenüber Alafosfalin favorisiert die Verbindung gegenwärtig für den Einsatz in Selektionsmedien zum Nachweis stark pathogener Keime, wie z. B. von *Salmonella*-Spezies (DRUGGAN 2002, PERRY et al. 2002). Die Substanz wurde bereits zuvor von GIBSON et al. (1987) zur Isolation von *Salmonella-typhimurium*-tppB-Mutanten verwendet. Eine weitere zukünftige Anwendungsmöglichkeit von [^{99m}Tc]Alafosfalin besteht – aufgrund seiner guten Verbreitungseigenschaften im Körpergewebe – im szintigraphischen Nachweis von Infektionsherden. So berichteten TSOPELAS & Mitarbeiter (2002 & 2003) über die erfolgreiche Verwendung von [^{99m}Tc]Alafosfalin bei der Lokalisation von abdominalen- und Weichteilinfektionen verursacht durch *Staphylococcus aureus* an Mäusen und Ratten.

Generell bleibt die Entwicklung neuartiger Aminophosphin- bzw. Aminophosphonsäuren Gegenstand intensiver pharmakologischer und medizinischer Forschung und bietet Chancen im Hinblick auf neue Therapieformen und vielfältige Anwendungsmöglichkeiten (KUKHAR & HUDSON 2000, KAFARSKI & LEJCZAK 2001). Diese bestehen nicht zuletzt aufgrund der guten antimetabolischen Eigenschaften dieser Substanzen – bedingt durch die hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Aminocarboxonsäuren – und eine unerhebliche Toxizität im Säugerorganismus (ebd.). Eine Reihe derartiger Syntheseprodukte – anfänglich hervorgerufen durch die Entwicklung von Alafosfalin (KUKHAR & HUDSON 2000) – findet sich u. a. in einem Übersichtsbeitrag von KAFARSKI et al. (1985).

Aufgrund seiner dipeptidartigen Struktur qualifiziert sich Alafosfalin als ein mutmaßliches Substrat für PEPT1 bzw. PEPT2, dessen Zugehörigkeit in entsprechenden Studien bestätigt

werden sollte. Einen Hinweis dafür lieferten die Untersuchungen zur Aufnahme von Alafosfalin durch die in der bakteriellen Zytoplasmamembran lokalisierten Peptidpermeasen (ALLEN et al. 1978, ATHERTON et al. 1979, NISBET & PAYNE 1982, ATHERTON et al. 1983, GRAPPEL et al. 1985, SMITH & PAYNE 1990). Dabei hatte die simultane Applikation von Dipeptiden bzw. die Nutzung von Peptonmedien o. ä. eine Verminderung der bakteriziden Wirkung zur Folge (ALLEN et al. 1979, TRAUB et al. 1980). Genauere Untersuchungen zur Aufnahme von Phosphonozeptiden, wie Alafosfalin, in Säugerzellen existierten bisher jedoch nicht. Obwohl Alafosfalin keine Carboxylgruppe am C-terminalen Ende besitzt, wurde von der Annahme ausgegangen, dass es sich dennoch um ein Substrat für die in den *Mammalia* exprimierten Peptidtransportsysteme PEPT1 und PEPT2 handeln könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden daher die Interaktion und der Transport von Alafosfalin mit bzw. durch PEPT1 der humanen permanenten Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 (GANAPATHY et al. 1995) und durch PEPT2 der immortalisierten Zelllinie SKPT des proximalen Tubulus von *Rattus norvegicus* (BRANDSCH et al. 1995a, GANAPATHY et al. 1995, SHU et al. 2001) untersucht.

1.3.3 Dipeptidylpeptidase IV-Inhibitoren

Elektrophysiologische Untersuchungen an *Xenopus laevis*-Oocyten unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemm-Technik hatten gezeigt, dass einige Aminosäurederivate wie beispielsweise Aminosäurearylamide und ω -Aminofettsäuren durch PEPT1 und PEPT2 transportiert werden (BÖRNER et al. 1998, DÖRING et al. 1998a & b).

Die während dieser Studie untersuchten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV gehören fast ausnahmslos zu einer Gruppe von Aminoacylpyrrolidid- bzw. -thiazolididverbindungen mit freiem N-Terminus (**Abb. 4**) in struktureller Anlehnung an Xaa-Pro-Dipeptide, welche als natürliche Inhibitoren des Enzyms agieren.

Das Typ-II-Glykoprotein Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5), ebenfalls bekannt als CD26 bzw. ADAbp (FLEISCHER 1994, KAMEOKA et al. 1993), ist eine membranoberflächen-gebundene, im menschlichen Organismus nahezu ubiquitär verbreitete Serinprotease. Zusätzlich zum extrinsischen DP IV-Enzym wurde eine lösliche Form aus Urin und Serum isoliert (CHIMUKA et al. 1990, DE MEESTER et al. 1999). Die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Molekülformation mittels Röntgenstrukturanalyse erfolgte durch RASMUSSEN et al. (2003) unter

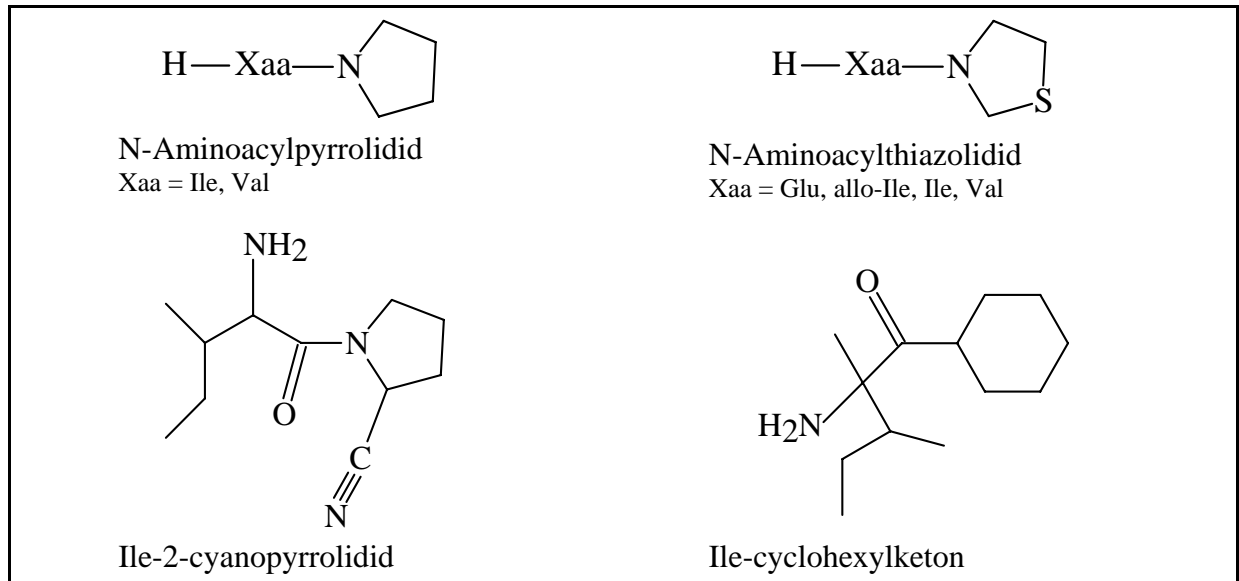


Abb. 4: Übersicht zu den untersuchten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV.

Verwendung rekombinanter humaner DP IV bzw. durch ENGEL et al. (2003) für das aus der Schweineniere präparierte Enzym. Bei der DP IV handelt es sich um eine multifunktionelle Protease, welche eine wichtige Rolle bei der Versorgung des Organismus mit prolinhaltigen Dipeptiden, der Prozessierung von regulatorischen Peptiden und als Oberflächenmarker der T-zellgesteuerten Immunantwort spielt (SCHÖN et al. 1991, BRANDSCH et al. 1995c).

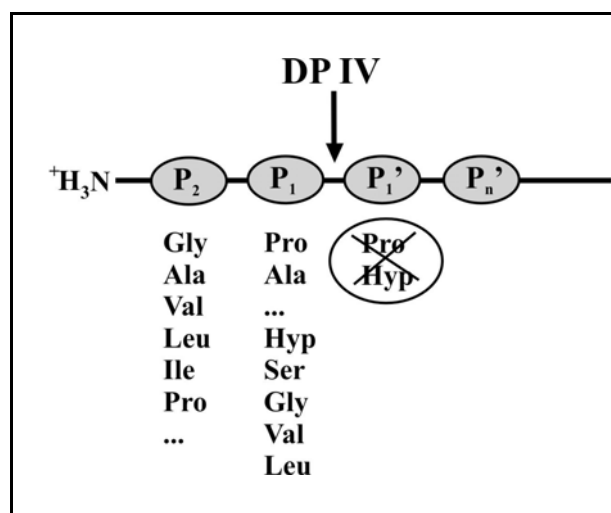


Abb. 5: Schematische Darstellung der Substratspezifität der Dipeptidylpeptidase IV.

Das Ektoenzym Dipeptidylpeptidase IV katalysiert die N-terminale Abspaltung von Dipeptiden, vornehmlich mit Prolin oder Alanin in P₁-Position (nach REINHOLD et al. 2002).

Der Katalysemechanismus der prolin-spezifischen Dipeptidylpeptidase IV resultiert in der N-terminalen Abspaltung von trans-konformierten Dipeptiden, bevorzugt mit Prolin oder Alanin in P₁-Position, welche in einer Feedback-Hemmung regulatorisch auf die Dipeptidylpeptidase-Aktivität einwirken (Abb. 5, DEMUTH & HEINS 1995). In P₂-Position werden alle

proteinogenen Aminosäuren akzeptiert. Weitere natürliche Inhibitoren der DP IV sind die N-terminale Nonapeptidsequenz des HIV-1-Tat-Proteins und des Thromboxan-A₂-Rezeptors (TXA₂-R) (WRENGER et al. 1997 & 2000). Neben den synthetisch hergestellten Aminoacylpyrrolididen bzw. -thiazolididen und deren strukturellen Abkömmlingen stehen u. a. auch die Boronsäuren bzw. Boronheterozyklen im Focus der Suche nach effizienten DP IV-Inhibitoren (GROZIAK 2001, SENTEN et al. 2003).

Aufgrund ihrer vielfältigen Stoffwechselfunktionen stellt die DP IV u. a. ein wichtiges Target bei der Behandlung von Zivilisationskrankheiten wie des Diabetes mellitus Typ II, der Adipositas sowie bei der Suppression von Autoimmunreaktionen nach Transplantationen bzw. von derartigen entzündlichen Erkrankungen dar (KOROM et al. 1999, TANAKA et al. 1997, STEINBRECHER et al. 2001, BAYS 2004, WEBER 2004). Ein anderes wichtiges Aufgabengebiet ist die Erforschung der DP IV-Aktivität bezüglich der Tumorgenese (IWATA & MORIMOTO 1999).

Weitläufiges Ziel ist letztlich die Entwicklung reversibler DP IV-spezifischer Inhibitoren und – im Hinblick auf die verschiedenen Wirkorte je nach Ätiologie – mit unterschiedlichen Halbwertszeiten.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte die Permeation von Dipeptidylpeptidase IV-Inhibitoren durch Caco-2-Zellmonolayer und deren eventuelle Zugehörigkeit zu den PEPT1-Substraten näher charakterisiert werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Für alle Versuche wurden ausschließlich etablierte Zelllinien verwendet (**Tabelle 2**). Diese haben im Vergleich zu Primärkulturen den Vorteil der relativ schnellen Anzucht des Zellmaterials und der recht guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, letzteres vor allem im Hinblick auf die alternative Nutzung von Gewebeproben. Außerdem lassen sich bei diesen Zelllinien einzelne Transportsysteme oftmals besser untersuchen.

Tab. 2: Biologischer Ursprung und Bezugsquellen der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung	Hersteller/Referenz
Caco-2	humanes Adenokarzinom des Kolons	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig/FOGH et al. 1977
SK-ChA-1	humanes extrahepatisches, cholangiozytäres Adenokarzinom	Dr. A. KNUTH, Ludwig Institut für Krebsforschung in Zürich, Schweiz/KNUTH et al. 1985
SKPT-0193 (Klon 2)	Epithel des proximalen Tubulus der Ratte <i>Rattus norvegicus</i> (SV40-Transfektion)	Dr. U. HOPFER, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, US/BRANDSCH et al. 1995a

2.1.2 Chemikalien

Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien für die Zellkultur und die Transportstudien.

Reagenzien für die Zellkultur		
Produkt	Produkt-Nr.	Bezugsquelle
Apo-Transferrin, bovin	11108-016	ICN, Eschwege
Dexamethason, wasserlöslich	D 2915	Sigma, Deisenhofen
DULBECCO's modifiziertes EAGLE Medium:Nutrient Mixtur F12 (HAM) 1:1 (DMEM/F12) mit Glutamax I und Pyridoxin	31331-028	Invitrogen, Karlsruhe
DULBECCO's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbicarbonat	11190-094	Invitrogen, Karlsruhe
epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), murin, lyophilisiert	53003-018	Invitrogen, Karlsruhe
fötale bovines Serum (FBS)	S 0115	Biochrom, Berlin

...

Reagenzien für die Zellkultur (Tabelle 3 – Fortsetzung)		
Produkt	Produkt-Nr.	Bezugsquelle
Gentamicin (10 mg/ml)	15710-049	Invitrogen, Karlsruhe
Insulin (10 mg/ml)	I 0516	Sigma, Deisenhofen
Minimum Essential Medium (MEM) mit EARLE's Salzen und Glutamin	31095-029	Invitrogen, Karlsruhe
nicht-essentielle Aminosäuren-Lösung (100X)	11140-035	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung (10X; 0,5% Trypsin, 5,3 mM EDTA)	15400-054	Invitrogen, Karlsruhe
Pufferzusätze und sonstige Chemikalien		
Produkt	Produkt-Nr.	Bezugsquelle
Acetonitril, z. A.	1.00030	VWR, Darmstadt
Bio-Rad Protein-Assay	500-0006	Bio-Rad, München
BSA (bovines Serumalbumin, Fraktion V)	A 9418	Sigma, Deisenhofen
Cholinchlorid	194639 C 7527	ICN, Eschwege Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	D 8779	Sigma, Deisenhofen
D-(+)-Glucose, wasserfrei, ACS-Reagenz	G 5767	Sigma, Deisenhofen
GABA (γ -Aminobuttersäure)	A 5835	Sigma, Deisenhofen
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)	9105	Roth, Karlsruhe
Igepal CA-630	I 3021	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid, ACS-Reagenz	P 3911	Sigma, Deisenhofen
Kalziumchlorid \cdot 2 H ₂ O	C 3881	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat \cdot 7 H ₂ O, ACS-Reagenz	M 9397	Sigma, Deisenhofen
D-Mannitol	M 4125	Sigma, Deisenhofen
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	4256	Roth, Karlsruhe
Methanol, z. A.	1.06007	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid, ACS-Reagenz	S 9888	Sigma, Deisenhofen
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	524400	Calbiochem, Schwalbach
o-Phosphorsäure, \geq 85%, p.a., ACS, ISO	6366.1	Roth, Karlsruhe
Staurosporin	S 4400	Sigma, Deisenhofen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	4855	Roth, Karlsruhe
Wasser, z. A.	kmf 03.2	KMF, Lohmar

....

Testsubstanzen (Tabelle 3 – Fortsetzung)		
Produkt	Produkt-Nr.	Bezugsquelle
<i>Aminosäuren</i>		
L-Aspartat · H ₂ O, Natriumsalz ^a	A 6683	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamat, Natriumsalz, Zellkultur getestet	G 5889	Sigma, Deisenhofen
Glycin	G 7032	Sigma, Deisenhofen
<i>Dipeptide</i>		
Alanylalanin (Ala-Ala)	A 9502	Sigma, Deisenhofen
Glycylsarkosin (Gly-Sar)	G 2195	Sigma, Deisenhofen
<i>ACE-Hemmer</i>		
Captopril ^b	154928	ICN, Eschwege
Enalapril · Maleat	E 6888	Sigma, Deisenhofen
<i>β-Lactam-Antibiotika</i>		
(+)-6-Aminopenicillansäure (6-APS) ^c	A 1005	Sigma, Deisenhofen
Amoxicillin	A 8523	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	190146	ICN, Eschwege
Aztreonam (Azactam)	150415	ICN, Eschwege
Carbenicillin, Dinatriumsalz	195092	ICN, Eschwege
Cefadroxil	C 7020	Sigma, Deisenhofen
Cefoperazon, Natriumsalz	C 4292	Sigma, Deisenhofen
Metampicillin, Natriumsalz	M 6777	Sigma, Deisenhofen
(+,-)-Moxalactam, Natriumsalz	195040	ICN, Eschwege
Oxacillin · H ₂ O, Natriumsalz	O 1002	Sigma, Deisenhofen
Penicillin V (Phenoxyethylpenicillinsäure)	P 1382	Sigma, Deisenhofen
Pheneticillin, Kaliumsalz	194177	ICN, Eschwege
<i>Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV</i>		
Glu-Thia · HCl		Probiodrug AG
Ile-cyclohexylketon		
Ile-Pyrr · HCl		
Ile-Pyrr-(2-CN) · HCl		
allo-Ile-Thia · Fumarat		
Ile-Thia · Fumarat		
Val-Pyrr · Fumarat		
Val-Pyrr · HCl		
Val-Thia · Fumarat		

....

Testsubstanzen (Tabelle 3 – Fortsetzung)		
Produkt	Produkt-Nr.	Bezugsquelle
Protease-Hemmer		
Ala-Ala-Phe-CMK · TFA (AAF-CMK)	N 1005	Bachem, Weil (Rhein)
Bestatin · HCl (N-[(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyryl]L-leucin)		Abt. Naturstoffbiochemie, FB Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg
Leupeptin (Ac-Leu-Leu-Arg-CHO · 0,5 H ₂ SO ₄ · 0,5 H ₂ O)	N 1000	Bachem, Weil (Rhein)
Tos-Lys-CMK · HCl (TLCK)	N 1155	Bachem, Weil (Rhein)
Sonstige Substanzen		
N-Ac-L-Phe	150241	ICN, Eschwege
Alafosfalin (L-Alanyl-L-1-aminoethylphosphonsäure)	05260	Fluka, Buchs, Schweiz
p-Aminobenzamidin · HCl	Q 1960	Bachem, Weil (Rhein)
δ-Aminolävulinsäure · HCl (5-Amino-4-oxopentansäure)	A 3785	Sigma, Deisenhofen
Carboxymethyl-Phe-Leu-OH · 0,8 H ₂ O	N 1190	Bachem, Weil (Rhein)
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol, CLELAND's Reagenz)	Q 1225	Bachem, Weil (Rhein)
Hippuryl-Arg-OH (Bz-Gly-Arg-OH)	G 2265	Bachem, Weil (Rhein)
H-Leu-NHOH · TFA	E 3455	Bachem, Weil (Rhein)
Lys[Z(NO ₂)]-Val · HCOOH	-	Abt. Naturstoffbiochemie, FB Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg
Melanostatin (H-Pro-Leu-Gly-NH ₂)	H 4305	Bachem, Weil (Rhein)
Thiazolidinlactamamid	-	Prof. A. Geyer, FB Chemie Philipps-Universität Marburg
TRH (pyro-Glu-His-Pro-NH ₂)	H 4915	Bachem, Weil (Rhein)
Radioaktiv markierte Substanzen		
Produkt (Spezifische Aktivität)	Produkt-Nr.	Bezugsquelle
δ-[3,5- ³ H(N)]Aminolävulinsäure (0,7 Ci/mmol)	ART 345	Biotrend, Köln
[2- ³ H]Glycin (15 Ci/mmol)	TRK 71	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
[Glycin-1- ¹⁴ C]Glycylsarcosin (53 mCi/mmol)	Kundensynthese	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
[3,4,5- ³ H(N)]Leucin (150 Ci/mmol)	NET 460	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim
D[1- ¹⁴ C]Mannitol (56 mCi/mmol)	MC203W	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
[1,2,6,7- ³ H(N)]Testosteron (95 Ci/mmol)	NET 370	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim

^a im Folgenden: vereinfachte Darstellung der Verbindungen ohne Salzform und/oder Hydratation

^b ebenfalls inhibierende Wirkung auf verschiedene Proteasen

^c Intermediat der Synthese von β-Lactam-Antibiotika

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 75 cm²-Gewebekulturflaschen der Firma Greiner unter Verwendung von 12 ml Kulturmedium bei 37°C unter Carbogenbegasung (5% CO₂/95% O₂) im Zellzuchtinkubator (Heraeus® HERAcell® 150, Kendro, Hanau) bei einer Innenraumfeuchte von ≥ 95%. **Tabelle 4** zeigt die zellspezifische Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien, wobei Caco-2- bzw. SK-ChA-1-Zellen unter gleichen Wachstumsbedingungen herangezogen wurden.

Tab. 4: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Zelllinie	Zellkulturmedium
▪ Caco-2/SK-ChA-1	<ul style="list-style-type: none"> - 88,5% Minimum Essential Medium, mit EARLE's Salzen und Glutamin - 10% fötales bovines Serum - 1% nicht-essentielle Aminosäurenlösung (100X) - 0,5% Gentamicin (45 µg/ml)
▪ SKPT	<ul style="list-style-type: none"> - 89,1% DULBECCO's modifiziertes EAGLE Medium:Nutrient Mixtur F12 (HAM) 1:1, mit Glutamax I & Pyridoxin - 10% fötales bovines Serum - 0,1% epidermaler Wachstumsfaktor (10 ng/ml) - 0,1% Insulin (4 µg/ml) - 0,1% Dexamethason (5 µg/ml) - 0,1% bovines Apo-Transferrin (5 µg/ml) - 0,5% Gentamicin (45 µg/ml)

Die Aussaatdichte in den Flaschen betrug 21.330 Zellen/cm² für die Caco-2- bzw. SK-ChA-1-Zelllinien und 4.300 Zellen/cm² für die SKPT-Zelllinie. Die Zellen wurden zweimal pro Woche nach Erreichen einer ca. 95%igen Konfluenz trypsiniert. Dazu wurden nach Absaugen des Mediums 5 ml phosphatgepufferte Salzlösung (ohne Kalzium- und Magnesium-Ionen, PBS) für eine Dauer von 5 min auf die Zellmonolayer gegeben, um Mediumreste zu entfernen und dem Zellverband Kalzium- und Magnesium-Ionen zu entziehen. Bei den stärker an der Plastikoberfläche anhaftenden Zelllinien SKPT und SK-ChA-1 enthielt die PBS-Lösung deshalb zusätzlich den Komplexbildner EDTA (1 mM). Nach Entfernen der PBS- bzw. PBS/EDTA-Lösung erfolgte eine etwa dreiminütige Zugabe von 0,05% Trypsin/0,53 mM EDTA-Lösung für die Caco-2- und SK-ChA-1-Zellen in Abhängigkeit von der Ablösungsgeschwindigkeit vom Flaschenboden. SKPT-Zellen wurden der doppelten Trypsin/EDTA-Konzentration bei ungefähr einminütiger Einwirkzeit ausgesetzt. Nach dem Absaugen der Trypsin-Lösung, dem

vorsichtigen Abklopfen der Zellen vom Flaschenboden und der anschließenden Mediumzugabe sind die Zellen durch wiederholtes Aufziehen in eine 10-ml-Pipette resuspendiert und einzeln worden. Die Aussaat erfolgte je nach den experimentellen Erfordernissen entweder in Polyesterol-Petrischälchen (Ø 35 mm, BD Biosciences, Heidelberg) oder in Transwell®-Kammern (**Abb. 6**) mit permeabler Polycarbonatmembran (Ø 24 mm, 3 µm Porengröße,

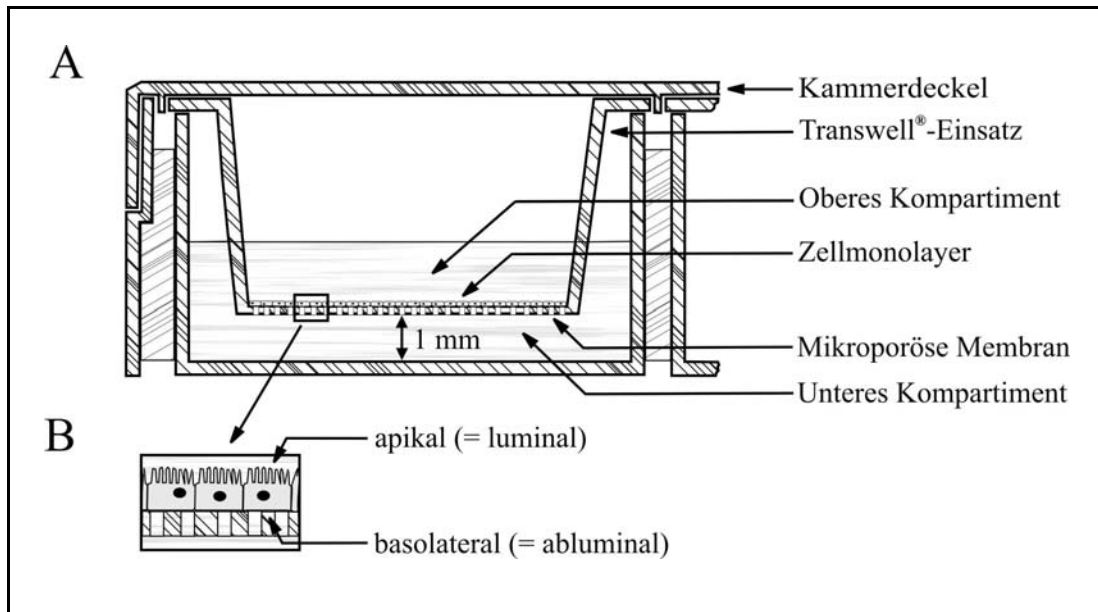


Abb. 6: Schematische Darstellung einer Transwell®-Kammer.

A Darstellung einer Transwell®-Kammer eines 6-Well-Kammersystems ($A = 4,52 \text{ cm}^2$, 3 µm Porengröße). Die Füllvolumina im oberen und unteren Kompartiment betragen 1,5 ml bzw. 2,6 ml. Seitliche Öffnungen am Transwell®-Einsatz ermöglichen den Mediumwechsel bzw. die Probeentnahme im unteren Kompartiment. Der standardisierte Abstand von 1 mm zwischen Transwell®-Einsatz und Kammerboden ermöglicht das unbeschadete Wachstum von Kokulturen. Der Aufbau einer Snapwell®-Kammer ist adäquat zur Transwell®-Kammer.

B Charakterisierung der Zellpolarität der verwendeten Epithelzellen von Caco-2, SK-ChA-1 und SKPT

Costar, Bodenheim); für die Transportversuche in der USSING-Kammer wurden Snapwells® (Aufbau vergleichbar mit **Abb. 6**, Ø 12 mm, 3 µm Porengröße, Costar, Bodenheim) verwendet. Eine Übersicht über Aussaatdichten und Anzuchtdauer, d. h. den Tag des Aufnahme- bzw. Fluxexperiments, findet sich in **Tabelle 5**. Die Füllmengen in den Versuchsgefäßen betragen 2 ml im Petrischälchen, in der Transwell®-Kammer 1,5 ml im oberen und 2,6 ml im unteren Kompartiment. Im Snapwell® entsprachen die Volumina 0,5 ml im Filtereinsatz bzw. 5 ml in der Kammer. Vor dem eigentlichen Einsäen der Zellen in die Trans- bzw. Snapwells® wurde das untere Kompartiment mit Medium befüllt. Nach 10 min erfolgte die Mediumzugabe in das obere Kompartiment für weitere 20 min. Während dieser Vorbehandlungszeit wurden die Kammern bereits im Zellzuchtinkubator aufbewahrt. Bei der Zellaussaat wurde das Medium vollständig durch neues ersetzt.

Tab. 5: Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Polysterol-Petrischälchen		Transwell®-Kammer	
	Aussaatdichte (Zellen/cm ²)	Anzuchtdauer (d)	Aussaatdichte (Zellen/cm ²)	Anzuchtdauer (d)
Caco-2	83.150	7 bzw. 8	44.210	21
SK-ChA-1	83.150	7 bzw. 8	44.210	14
SKPT	83.150	4	132.630	4

Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2 Tage, einen Tag nach der Aussaat bzw. einen Tag vor Versuchsbeginn. Aufgrund der verwendeten Aussaatdichte im Petrischälchen war ein Erreichen der Konfluenz ca. 24 h nach dem Einsäen gewährleistet, welches sich vorteilhaft auf die Ausdifferenzierung der Zellen und entsprechend auf die spezifische Expression der zellulären Transportsysteme auswirkte. Für die Aussaat auf der Polycarbonatmembran wurde eine geringere Zelldichte gewählt, um ein vorzeitiges Ausdifferenzieren mit einer eventuell einhergehenden Zellablösung zu vermeiden.

2.2.2 Transportstudien

Bei den Untersuchungen kamen ausnahmslos durch Transfektion immortalisierte- bzw. Krebszelllinien zur Anwendung. Zum Erreichen der maximalen Aktivität der Peptidtransporter wurde bei einem pH-Optimum von 6,0 gearbeitet. Zu Vergleichszwecken dienten Messungen bei pH 7,5, da dieser pH-Wert ungefähr dem physiologischen intrazellulären bzw. interstitiellen Mileu entspricht. Für die Transwell®- bzw. Snapwell®-Kammern ist deshalb

Tab. 6: Zusammensetzung der Versuchspuffer.

500 ml deionisiertes Wasser enthalten:	- 140 mM Natriumchlorid (4,09 g)
	- 5,4 mM Kaliumchlorid (0,2 g)
	- 1,8 mM Kalziumchlorid · Dihydrat (0,13 g)
	- 0,8 mM Magnesiumsulfat · Heptahydrat (0,1 g)
	- 5 mM Glucose (0,45 g)
	- 25 mM MES (2,67 g) für pH 6,0 bzw. 25 mM
	HEPES (2,98 g) für pH 7,5 .
Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte durch Zusatz der Base Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) bei der jeweiligen Versuchstemperatur. Für die Untersuchung der Na ⁺ -Abhängigkeit wurde das Natriumchlorid gegen gleich konzentriertes Cholinchlorid substituiert.	

generell ein pH-Wert von 7,5 im basolateralen (serosalen) Kompartiment verwendet worden. Die Versuchspufferherstellung ohne bzw. inklusive der jeweiligen gelösten Testsubstanz erfolgte in der Regel unmittelbar vor dem Experiment unter Verwendung deionisierten Wassers,

um mikrobiellen Kontaminationen sowie eventuellen Instabilitäten der Substanzen in wässriger Lösung entgegen zu wirken (**Tabelle 6**).

2.2.2.1 Uptake

Zu Beginn der Aufnahmeexperimente im Petrischälchen wurde das Kulturmedium abgesaugt, zweimal mit je 1 ml Versuchspuffer gespült und gegen 1 ml Puffer ausgetauscht, welcher die radioaktiv markierte bzw. unmarkierte Substanz enthielt. Für die Ermittlung der Ausgangskonzentration der eingesetzten Puffer-Substanz-Lösung wurden vor jedem Versuch Proben entnommen. Nach einem definierten Zeitraum von in der Regel 10 min wurde die Interaktion der Substanz mit den Zellen durch Absaugen der Lösung und schnelles viermaliges Spülen mit eiskaltem Puffer gestoppt. Bei der Arbeit mit radioaktiv markierten Substanzen sind die Zellen anschließend mit 1 ml Lysispuffer versetzt und in Szintillationsröhrchen überführt worden (**Tabelle 7**). Nach Zusatz von 2,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint[®] eco plus, Roth, Karlsruhe) erfolgte die Radioaktivitätsmessung durch Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie (Tri-Carb[®] Liquid Scintillation Analyzer 2100TR, Packard, Meriden, USA).

Tab. 7: Zusammensetzung des Lysispuffers.

500 ml deionisiertes Wasser enthalten:	- 50 mM Tris (3,03 g)
	- 140 mM Natriumchlorid (4,09 g)
	- 1,5 mM Magnesiumsulfat · Heptahydrat (0,2 g)
	- 0,5% (v/v) Igepal Ca-630 (2,5 ml)
Die Einstellung des Puffers auf einen pH-Wert von 8,0 erfolgte durch den Zusatz von Salzsäure.	

Nicht-radioaktive Proben wurden nach dem Spülen mit 0,5 ml deionisiertem Wasser versetzt. Das zweimalige Einfrieren bzw. Auftauen, das Ablösen- und die anschließende Homogenisation des Zellmonolayers durch wiederholtes Aufziehen in eine feinkanulige Insulinspritze dienten dem Zellaufschluss. Die Probenaufbewahrung in Eppendorf[®]-Tubes erfolgte bis zur Quantifizierung mittels HPLC, HPLC-MS bzw. bis zur Durchführung des Bradford-Assays bei -21°C im Tiefkühlschrank (HPLC-MS-Analytik der DP IV-Inhibitoren durch ANTJE MEYER, Probiobdrug AG).

Die Aufnahmeexperimente an Caco-2- und SKPT-Zellen wurden in der Regel bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Ausnahme bildeten die Versuche bei 4°C zur Ermittlung der passiven Transportkomponente an den Darmzellen bzw. die Experimente mit der Gallengangszelllinie. Um eine höhere Maximalgeschwindigkeit des cholangiozytären Transportes zu errei-

chen, wurden die SK-ChA-1-Zellen während des Versuches bei 37°C inkubiert (Kleinbrutschrank Heraeus® B15, Kendro, Hanau).

Ein Experiment zur Stimulation/Inhibierung der [³H]δ-ALA-Aufnahme durch die Proteinkinase C-Modulatoren PMA und Staurosporin setzte eine Vorinkubation der Cholangiozytenlinie SK-ChA-1 im Zellzuchtschrank für 2 h mit der/den entsprechenden Substanz/-en, gelöst in 1,5 ml Medium, voraus.

Um die Stabilität von Alafosfalin unter dem Einfluss enzymatischer Aktivität zu überprüfen, wurden Caco-2- und SKPT-Zellen für 10, 30, 60 und 120 min mit einer 1 mM Alafosfalin-Pufferlösung bei pH 6,0 bzw. 7,5 inkubiert. Dabei wurde die Beständigkeit der Verbindung gegenüber luminal aktiven Enzymen mittels HPLC analysiert.

Zur Quantifizierung der Aufnahmerate bezogen auf die Proteinmenge wurde der Proteingehalt nach der BRADFORD-Methode bestimmt (s. 2.2.2.4).

2.2.2.2 *Transepithelialer Flux*

Die Experimente zum transepithelialen Transport von Substanzen wurden in Transwell®-Kammern von der luminalen in die abluminale (= apikal nach basolateraler Flux, ↓, J_{a-b}) und in Einzelfällen auch in umgekehrter Richtung (= basolateral nach apikaler Flux, ↑, J_{b-a}) bei 37°C durchgeführt. Während des gesamten Versuches wurden die Kammern auf dem Schüttler (Minishaker MS1, Roth, Karlsruhe) mit ca. 150 Umdrehungen pro min bewegt, welcher in einem Kleinbrutschrank integriert war.

Vor dem Versuchsbeginn erfolgten das Absaugen des Mediums und das zweimalige Waschen der Zellen mit Puffer/-n, welcher dem/den im nachfolgenden Versuch verwendeten pH-Wert/-en entsprach/-en. Die Füllvolumina betragen 2,6 ml im unteren (= basolateralen) bzw. 1,5 ml im oberen (= apikalen) Kompartiment, die Puffertemperatur entsprach 37°C. Während dieser zehnmütigen Präinkubationsphase zur Entfernung von Mediumresten erfolgte der Integritätstest des Zellmonolayers durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ durch Drei-Punkt-Messung mittels Ag-/AgCl-Chopstick-Elektroden (Millicell®-ERS Voltohmmeter, Schwalbach). Die Widerstandswerte sind im Falle der Untersuchung nicht-radioaktiver Substanzen ca. 105 min nach Versuchsbeginn nochmals auf eventuelle, durch die Substanzen verursachte Veränderungen überprüft worden.

Zu Anfang des Experimentes wurde der Puffer abgesaugt und im Akzeptorkompartiment durch neuen ersetzt. Anschließend wurde das Donorkompartiment mit einer Testsubstanz-Versuchspuffer-Lösung befüllt. Die Konzentration radioaktiv markierter Substanzen lag dabei im mikromolaren Bereich, die der unmarkierten Substanzen in der Regel bei 1 mM. Nach

einem definierten Zeitraum von 10, 30, 60 und 120 min wurde jeweils eine 200 μl - ($J_{\text{a-b}}$) bzw. 100 μl -Probe ($J_{\text{b-a}}$) aus dem Akzeptorkompartiment entnommen und nach den ersten drei Entnahmen durch frischen Puffer ersetzt. Der durch diese Vorgehensweise entstandene Verdünnungseffekt wurde später bei der Berechnung des transepithelialen Transportes berücksichtigt (s. 2.2.4). Weitere Probeentnahmen erfolgten aus dem Donorkompartiment zu Versuchsbeginn bzw. nach dem Versuch zur Ermittlung von Ausgangs- und Endkonzentration der eingesetzten Puffer-Substanzlösung. Nach dem Absaugen der Lösungen aus beiden Kammerbereichen und dem zweimaligen Spülen der Transwell[®]-Einsätze mit eiskaltem Puffer wurden die permeablen Polycarbonatmembranen mit den anhaftenden Zellmonolayern ausgeschnitten und im Falle nicht-radioaktiver Messungen nach Addition von 0,5 ml deionisiertem Wasser in Eppendorf[®]-Tubes bis zur HPLC-MS-Analytik zusammen mit den übrigen während des Versuches entnommenen Proben bei -21°C gelagert. Bei Verwendung radioaktiv markierter Testsubstanzen wurden die Entnahmen mittels Flüssigkeitsszintillationsspektroskopie quantifiziert.

Zur Untersuchung des passiven, transepithelialen Transportes von Ile-Thia bei 4°C ist der Schüttler (Minishaker MS1, ebd.) mit der Transwell[®]-Kammer im Kühlschrank positioniert worden. Die dortige Aufbewahrung der Zellen mit 4°C kaltem Puffer erfolgte bereits 20 min vor Versuchsbeginn, um aktive Transportprozesse weitgehend auszuschalten. Während der Verweilzeiten außerhalb des Kühlschranks zur Widerstandsmessung und für die Probeentnahmen, befand sich die Kammer auf einem Eiswasserbad. Die Puffer wurden ebenfalls durch ein Eis-Wasser-Gemisch gekühlt.

2.2.2.3 USSING-Kammer

Zum Nachweis aktiver Transportprozesse durch isolierte Gewebeproben entwickelten USSING & ZEHRAN (1951) eine Technik, die auf elektrophysiologischen Messmethoden basiert.

Durch elektrogene Ionentranslokationen und/oder durch den Transport kationischer bzw. anionischer Verbindungen zwischen beiden Seiten des Zellverbandes kommt es zum Aufbau einer Potentialdifferenz PD_r . Dieser elektrische Gradient wird durch das Applizieren eines gleich großen, entgegengesetzt gerichteten Kurzschlussstromes I_{sc} zwischen beiden Kammerhälften auf 0 V kompensiert. Kommt es nun nach Zugabe der Testsubstanz zu einer Ladungsverschiebung, so ist diese an aktive Transportprozesse gekoppelt. Dabei zeigt ein positiver Kurzschlussstrom einen aktiven Netto-Kationentransport durch das Epithel von der luminalen zur abluminalen Seite bzw. einen Netto-Anionentransport in umgekehrter Richtung an. **Abbildung 7** zeigt die schematische Darstellung einer USSING-Kammer.

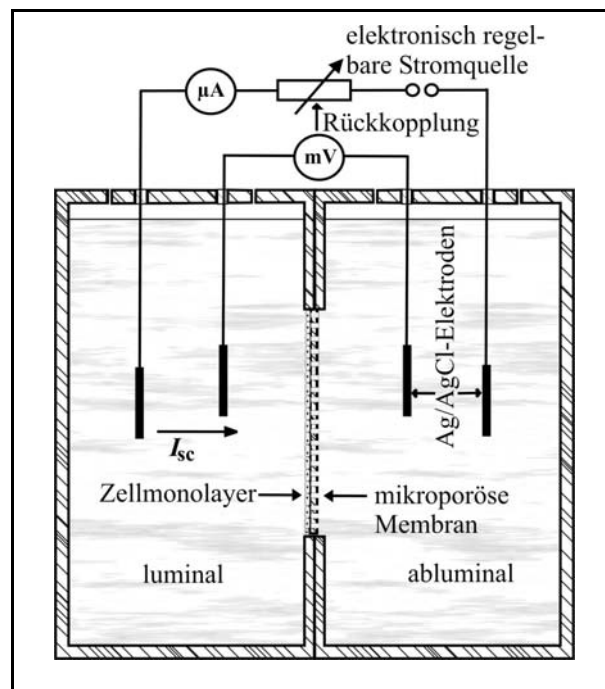


Abb. 7: Schematische Darstellung einer USSING-Kammer.

Im dargestellten Versuch kommt es zu einem positiven Kurzschlussstrom I_{sc} durch den Zellmonolayer von der luminal befindlichen Kathode zur abluminal positionierten Anode, wobei die Cl^- -Ionen der $Ag/AgCl$ -Elektroden als Ladungsträger fungieren.

Zu Beginn des Versuches diente eine einstündige Vorwärmphase mit Versuchspuffer bei pH 7,5 dem nochmaligen Spülen der USSING-Kammer (K. MUSSLER, Scientific Instruments, Aachen) zur Beseitigung eventuell anhaftender Reinigungsmittelreste o. ä. in den schwer zugänglichen Kammerbereichen bzw. der Ermittlung der Asymmetriespannung zwischen den Elektroden und deren Kompensation. Dabei wurde der Leerwert für den transepithelialen Widerstand R_t in der USSING-Kammer unter Verwendung einer unbewachsenen Snapwell[®]-Polycarbonatmembran unter Versuchsbedingungen ermittelt. Für die Experimente in der Kammer wurden Caco-2- und SKPT-Zellen für 14 bzw. 4 Tage in Snapwells[®] kultiviert. Eine permanente Zirkulation der Versuchspufferlösungen durch die beidseitige, seitliche Einspeisung von Carbogen (5% $CO_2/95\% O_2$) in Kammerbodennähe diente der Aufrechterhaltung des pH-Wertes und einem Konzentrationsausgleich zwischen epithelnahen bzw. -fernen Bereichen bei gleichzeitiger Versorgung der Zellen mit Sauerstoff. Ein thermostatgeregelter, äußerer Wasserkreislauf sorgte für eine konstante Temperatur von 37°C. Anschließend erfolgte die Arretierung des permeablen, zellbewachsenen Snapwell[®]-Polycarbonatbodens zwischen den beiden Kammerhälften unter Verwendung von SEEGER-Ringen. Aufgrund der Stimulation des PEPT1-vermittelten Substrattransportes durch einen einwärts gerichteten Protonengradienten, wurde die an die luminalen Seite des Zellmonolayers angrenzende Kammerhälfte mit

5 ml Versuchspuffer bei pH 6,0 und die der abluminalen Seite mit 5 ml Puffer bei pH 7,5 befüllt. Die Verwendung gleicher Volumina führte dabei zur Vermeidung hydrostatischer Druckdifferenzen. Jeweils zwei Öffnungen in beiden Kammerdeckeln dienten der Einführung von Ag/AgCl-Glaselektroden – gewebstnah zur Messung der Potentialdifferenz PD_t und gewebstfern zur Einspeisung des Kurzschlussstromes I_{sc} .

Während einer 20-minütigen Vorlaufphase kommt es in der Kammer allmählich zur Gewebestabilisierung, welche durch annähernd konstante Werte für R_t , PD_t und I_{sc} gekennzeichnet ist. Die Kompensierung der Potentialdifferenz auf 0 mV zwischen beiden Seiten des einschichtigen Epithels erfolgte 5 min vor dem eigentlichen Versuch durch Applikation eines adäquaten Kurzschlussstromes. Danach wurden 1 ml des luminal verwendeten Puffers durch jeweils 1 ml einer fünffach konzentrierten Stammlösung – gelöst in Puffer pH 6,0 – ausgetauscht, welche Alafosfalin, Gly-Sar, D-Mannitol bzw. Phenylalanin enthielten. Für die kontinuierliche Aufzeichnung von Gewebepotentialdifferenz (PD_t) und Kurzschlußstrom (I_{sc}) fand ein computergesteuerter Spannungs-/Strom-Klemm-Apparat Verwendung (voltage-/current-clamp, K. MUSSLER, Scientific Instruments, Aachen). Anhand des gemessenen Kurzschlussstromes und der Wertigkeit z des transportierten Ions lässt sich unter gleichzeitiger Verwendung der FARADAY-Konstante F der transepitheliale Nettoflux berechnen:

$$J = \frac{I_{sc}}{z \cdot F} \quad \text{Gleichung 1}$$

Demnach entspricht J [nmol/(h · cm²)] = 37,31 · I_{sc} [µA/cm²]/ z .

Zur Ermittlung des Gewebewiderstandes R_t [Ω · cm²] bzw. der Gewebeleitfähigkeit G_t wurde alle 60 s ein bipolarer Strompuls von 20 µA Amplitude über eine Dauer von jeweils 200 ms gegeben. Die Ströme wurden alle 6 s bei einer Auflösung von 1 µA/cm² ermittelt. Aus der resultierenden Potentialdifferenz wurden R_t bzw. G_t vom Programm kontinuierlich nach dem OHMSchen Gesetz berechnet:

$$R_t = \frac{1}{G_t} = \frac{PD_t}{I_{sc}} \quad \text{Gleichung 2}$$

2.2.3 Proteinbestimmung

Nach Versuchsende erfolgte die sofortige Aufbereitung der Proben durch viermaliges Spülen der Zellen mit Puffer und dessen Substitution durch deionisiertes Wasser unter anschließender Aufbewahrung bei -21°C. Die Verwendung von deionisiertem Wasser und das zweimalige

Einfrieren und Auftauen der Monolayer diente dem Zellaufschluss. Eine Homogenisierung des Zell-Wasser-Gemisches wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml-Insulinspritze (Omnican[®]100, Fa. BRAUN) erreicht. Für die Bestimmung der Masse an zellulärem, löslichen Protein wurde die Methode nach BRADFORD (1976) angewandt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Anleitung des verwendeten Protein-Assays der Firma Bio-Rad (München). Die Kalibrierung zur Quantifizierung der im Plattenreader (FLUOstar Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg) gemessenen Extinktionswerte wurde mit einer Verdünnungsreihe von boviner Serumalbuminlösung im entsprechenden Konzentrationsbereich durchgeführt.

2.2.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Für die Quantifizierung von Alafosfalin wurde die HPLC-Anlage Merck-Hitachi D 7000, bestehend aus einem Autosampler L-7200, einer Pumpe L-7100 und dem Dioden-Array-Detektor L-7445, verwendet. Zur Auftrennung der Proben diente die Anionenaustauschersäule Nuclogen-DEAE 60-7 (Macherey-Nagel) und ein Lösungsmittelgemisch aus 0,1 mM o-Phosphorsäure mit 5% Methanol. Das Injektionsvolumen betrug 50 µl bei einer festgesetzten Durchflussrate von 0,6 ml/min. Die Versuchstemperatur in der Säule entsprach 20°C. Der angewandte UV-Detektionsbereich lag zwischen 200 und 300 nm. Die simultane Datenerfassung und -verarbeitung erfolgte mittels HPLC-Manager Version 4.1.

Eine ausführliche Beschreibung der von ANTJE MEYER (Probiodrug AG) durchgeführten HPLC-gekoppelten Massenspektroskopie (LC-MS/MS) zur quantitativen Analyse der DP IV-Inhibitoren aus dem Probenmaterial findet sich in der Dissertationsschrift von MEYER (2004).

2.2.5 Mathematische Methoden

Die experimentellen Ergebnisse wurden als Mittelwerte einschließlich der Standardfehler aus 3 - 10 Einzelmessungen dargestellt. Dazu erfolgte die Berechnung der Werte mittels Excel für Windows XP. Für die graphische Darstellung und die Kalkulation der kinetischen Parameter durch Regressionsanalysen wurde Sigmaplot 8.0 verwendet. Erforderliche statistische Auswertungen fanden unter Anwendung des nichtparametrischen zweiseitigen MANN-WHITNEY-U-Testes bei einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ statt.

Die Berechnung der **Aufnahmegeschwindigkeit v** einer Substanz in die Zellen sei durch folgende Gleichung wiedergegeben:

$$v_{[n/(t \cdot \text{mg Protein})]} = \frac{\text{Probe} \cdot V_{\text{Standard}} \cdot c_0^*}{\text{Standard} \cdot \text{Proteingehalt}} \quad \text{Gleichung 3}$$

$[n/(t \cdot \text{mg Protein})]$ aufgenommene Stoffmenge in einer bestimmten Zeiteinheit (meist 10 min), bezogen auf die Masse von 1 mg an zellulärem, löslichen Protein
Probe in die Zellen aufgenommene bzw. den Zellen anhaftende Substanzkonzentration in [dpm] bei radioaktiven bzw. in [μg] bei nicht-radioaktiven Messungen
Standard ermittelte Ausgangskonzentration der Substanz vor Versuchsbeginn in [dpm] bei radioaktiven bzw. in [μg] bei nicht-radioaktiven Messungen
 V_{Standard} Entnahmevolumen zur Bestimmung der Ausgangskonzentration
 c_0 berechnete, molare Ausgangskonzentration der Substanz, * bei einer Abweichung $\geq 5\%$ von der gemessenen Ausgangskonzentration des Äquivalents (= *Standard*) sollte eine Korrektur von c_0 erfolgen (**Gleichung 4**)

$$c_{0\text{kor}} = \frac{\text{Standard}_{\text{gemessen}} \cdot c_0}{\text{Standard}_{\text{erwartet}}} \quad \text{Gleichung 4}$$

$\text{Standard}_{\text{erwartet}}$ die der berechneten, molaren Ausgangskonzentration einer Substanz entsprechenden Äquivalente in [dpm] bei radioaktiven bzw. in [μg] bei nicht-radioaktiven Messungen

Infolge der Verdrängung eines radioaktiv markierten Substrates durch eine unmarkierte Substanz in ansteigender Konzentration kommt es zu einer verminderten Aufnahmerate (v) des Tracers. Dabei wurden die **prozentuale Hemmung Y des radioaktiv markierten Substrates** und die eingesetzten **Inhibitorkonzentrationen** dargestellt. Aus dieser Auftragung der Messergebnisse lässt sich unter Verwendung der Logistik-Gleichung für Dosis-Wirkungsbeziehungen (allosterische HILL-Kinetik) der **IC₅₀-Wert** (= Halbhemmkonzentration) der unmarkierten Substanz berechnen:

$$Y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{s}{\text{IC}_{50}}\right)^{-P}} \quad \text{Gleichung 5}$$

s Konzentration der radioaktiv markierten Substanz

Der IC_{50} -Wert ist ein Maß für die Konzentration eines Inhibitors, die notwendig ist, um das in einer bestimmten Konzentration vorliegende, radioaktiv markierte Substrat auf die Hälfte seiner maximalen Aufnahmerate zu reduzieren. Bei festgelegtem Minimum **Min** und Maximum **Max** (= 100%) wird das Minimum (= nicht-hemmbarer Anteil, bestehend aus passiver Diffusion und unspezifischer Bindung) durch die Verdrängung des radioaktiv markierten Substrates zuvor durch einen Überschuss derselben, jedoch unmarkierten radioaktiven Substanz bestimmt. Ein 20- bis 30-facher Überschuss an unmarkierter Substanz in Bezug auf deren IC_{50} -Wert wird dabei zur Determination des Minimums als ausreichend erachtet. In der Annahme, dass Substrat und Inhibitor am gleichen Transportsystem kompetitiv interagieren, erfolgte die Festlegung des **HILL-Koeffizienten P** auf den Wert 1.

Um eine direkte Aussage über die Affinität eines potentiellen Inhibitors zum Transporter – unabhängig vom radioaktiv markierten Substrat und dessen Konzentration s – zu erhalten, wird der IC_{50} -Wert in die **Hemmkonstante K_i** umgerechnet (nach CHENG & PRUSOFF 1973):

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \left(\frac{s}{K_t}\right)} \quad \text{Gleichung 6}$$

Der K_i -Wert kann ebenfalls über den DIXON-Plot (s. 3.1.4, 3.2.1, 3.3.1) bestimmt werden. Dabei entspricht die Hemmkonstante dem berechneten Schnittpunkt beider Geraden im 4. Quadranten unter Verwendung der aus der linearen Regression erhaltenen Anstiege und Ordinatenschnittpunkte.

Der **K_t -Wert** (MICHAELIS-MENTEN-Konstante) beschreibt die Affinität eines Substrates zum Transportsystem und wird experimentell durch die Verdrängung des radioaktiv markierten Substrates durch dasselbe, jedoch unmarkierte Substrat in ansteigender Konzentration bestimmt (**Gleichung 7**). Dabei wurde der passiv transportierte Substratanteil von der Gesamtaufnahmemenge vor der Berechnung der Affinitätskonstante K_t abgezogen; s impliziert hier sowohl die Konzentration an markiertem und als auch an unmarkiertem Substrat. K_t lässt sich

gleichfalls über die inverse MICHAELIS-MENTEN-Kinetik ohne vorherigen Abzug des passiv transportierten Anteils bestimmen (**Gleichung 8**). V_{max} bezeichnet die maximale Aufnahmegeschwindigkeit des Substrates bzw. -kapazität durch den Carrier. Sie ist von den jeweiligen äußeren Versuchsbedingungen, insbesondere vom pH-Wert und von der Temperatur abhängig.

$$v = \frac{V_{max} \cdot s}{K_t + s} \quad \text{Gleichung 7}$$

$$v = \frac{a}{K_t + s} + v_{min} \quad \text{Gleichung 8}$$

v_{min} minimale Aufnahmerate des Tracers

Eine weitere Methode der K_t -Wert-Evaluierung ist die Kurventransformation nach EADIE-HOFSTEE, wobei die Aufnahmerate v des Substrates gegen den Quotienten aus der Aufnahmerate und der Substratkonzentration s aufgetragen wird. Im Ergebnis der anschließenden linearen Regression ist K_t als negativer Anstieg - und V_{max} als Schnittpunkt der Regressionsgerade mit der Ordinate definiert.

Tab. 8: Verwendete K_t -Werte zur Berechnung der Affinitätskonstanten K_i .

Zelllinie	Substanz	Peptidtransporter	K_t -Wert (mM)
Caco-2	Gly-Sar	PEPT1	$0,83 \pm 0,04$ (BRANDSCH et al. 1999, s. 3.3)
	Gly-Sar	PEPT1	$0,58 \pm 0,02$ (NEUMANN et al. 2004, s. 3.2)
SK-ChA-1	Gly-Sar	PEPT1	$1,10 \pm 0,10$ (KNÜTTER et al. 2002, s. 3.1)
	δ -ALA	PEPT1	$2,10 \pm 0,30$ (NEUMANN & BRANDSCH 2003, s. 3.1)
SKPT	Gly-Sar	PEPT2	$0,07 \pm 0,01$ (NEUMANN et al. 2004, s. 3.2)

Zur Berechnung des **transepithelialen Transportes J** einer Substanz in der Transwell[®]-Kammer musste der Verdünnungseffekt im Akzeptorkompartiment – hervorgerufen durch das Auffüllen mit Puffer nach den Probenentnahmen – berücksichtigt und entsprechend korrigiert werden (**Gleichung 9**):

$$Probe_{korr_m} = Probe_{gem_m} + \frac{Probe_{korr_{m-1}} \cdot V_{Probe}}{V_{Akzeptor}} \quad \text{Gleichung 9}$$

$Probe_{korr(tn)}$ korrigierte Substanzkonzentration zum Zeitpunkt der Entnahme

$Probe_{gem(tn)}$ gemessene Substanzkonzentration zum Zeitpunkt der Entnahme

$Probe_{korr(t-1)}$ korrigierte Substanzkonzentration zum Zeitpunkt der vorhergehenden Entnahme

($Probe$ – Messung in [dpm] bei radioaktiv markierter- bzw. in [μ g] bei unmarkierter Substanz)

Die korrigierten Werte nach **Gleichung 9** wurden in den **Gleichungen 10** und **11** zur Flux-Berechnung berücksichtigt.

$$J [\%/(t \cdot Filter)] = \frac{Probe_{korr_m} \cdot V_{Akzeptor} \cdot V_{Standard} \cdot 100\%}{Standard \cdot V_{Donor} \cdot V_{Probe}} \quad \text{Gleichung 10}$$

$$J [n/(t \cdot Filter)] = \frac{Probe_{korr_m} \cdot V_{Akzeptor} \cdot V_{Standard} \cdot c_0^*}{Standard \cdot V_{Probe}} \quad \text{Gleichung 11}$$

c_0^* Weicht der erwartete *Standard* in Bezug auf die berechnete, molare Ausgangskonzentration c_0 (**Gleichung 11**) vom gemessenen *Standard* um $\geq 5\%$ ab, so sollte auch hier eine Korrekturrechnung erfolgen (s. **Gleichung 4**).

3 Ergebnisse & Diskussion

3.1 Transport von δ -Aminolävulinsäure durch PEPT1 an Epithelzellen des Gallenganges

3.1.1 pH-Abhängigkeit der [^3H] δ -ALA-Aufnahme

Frühere Transportuntersuchungen an PEPT1/2 ergaben eine Stimulation der Substrattranslokation bei pH-Werten im Bereich von 6,0 (BRANDSCH et al. 1995a, BRETSCHEIDER et al. 1999). Im folgenden Experiment konnte die Aufnahme von [^3H] δ -ALA (1 μM) in Cholangiozyten der Zelllinie SK-ChA-1 durch einen einwärts gerichteten Protonengradienten ebenfalls stimuliert werden (**Abb. 8**). So ließ sich die Aufnahmerate des radioaktiv markierten δ -ALA

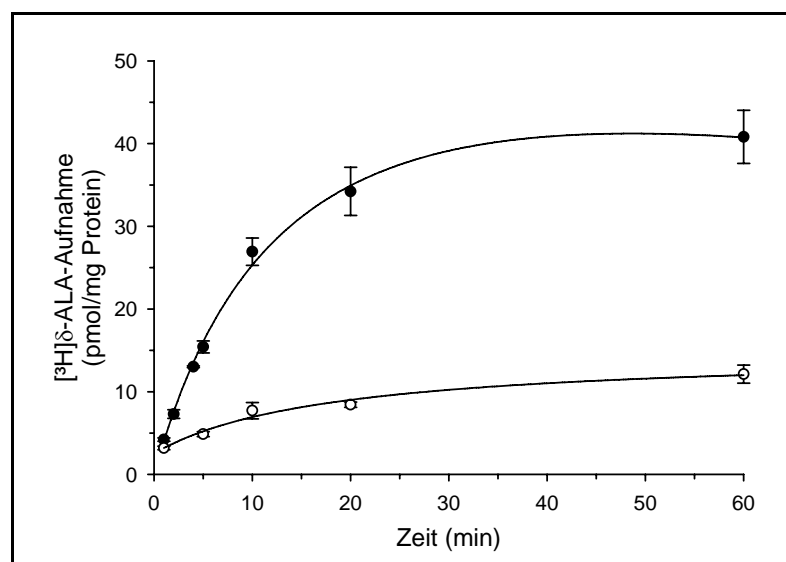


Abb. 8: pH- und zeitabhängige Aufnahme von [^3H] δ -ALA in SK-ChA-1-Zellen.

Die Aufnahme von [^3H] δ -ALA (1 μM) wurde bei 37°C über einen Zeitraum von 60 min bei pH 7,5 (○) und 6,0 (●) gemessen (n = 3 - 4).

bei pH 6,0 auf das Drei- bis Vierfache im Vergleich zu einem äußeren pH-Wert von 7,5 steigern. Die Aufnahme von δ -ALA war bei pH 6,0 für einen Zeitraum bis zu 10 min linear. Außerdem gab es keine Na^+ -Abhängigkeit zu verzeichnen. Die Aufnahme von [^3H] δ -ALA (3 μM) bei pH 7,5 betrug in Na^+ -Anwesenheit $17,7 \pm 0,6$ pmol/(10 min · mg Protein) und $15,3 \pm 0,4$ pmol/(10 min · mg Protein) in Na^+ -Abwesenheit, wobei das Natriumchlorid des Versuchspuffers durch Cholinchlorid substituiert war (**ohne Abb.**). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Experimente ein pH-Wert von 6,0 und – in der Regel – eine

Inkubationszeit von 10 min gewählt. Um eine höhere Geschwindigkeit der Substrataufnahme durch die SK-ChA-1-Zellen zu erreichen, betrug die Versuchstemperatur generell 37°C.

3.1.2 Kinetische Parameter

Die Aufnahme von [^3H] δ -ALA war sättigbar. Durch die Inkubation der SK-ChA-1-Zellen mit einem Überschuss (31,6 mM) derselben unmarkierten Substanz konnte die Aufnahme von [^3H] δ -ALA (2 μM) um 85% des Kontrollwertes gesenkt werden. Der Differenzbetrag von 15% entspricht dem linearen, nicht sättigbaren passiven Transportanteil der Substanz, hervorgerufen durch einfache Diffusion und äußere unspezifische Membrananhaftung. Um die kinetischen Parameter der carriervermittelten δ -ALA-Aufnahme zu bestimmen, wurden die SK-ChA-1-Zellen für 10 min mit [^3H] δ -ALA (2 μM) unter Addition unmarkierter Substanz in einer Konzentration von 0,316 - 31,6 mM inkubiert. Das Verhältnis zwischen Gesamtaufnahmerate und Substratausgangskonzentration ist in **Abbildung 9** dargestellt:

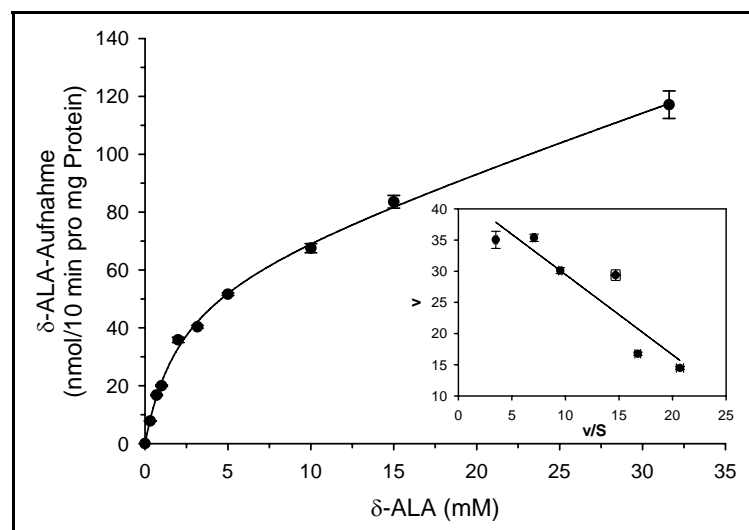


Abb. 9: Gesamtaufnahme von δ -ALA in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration in SK-ChA-1-Zellen.

Die Aufnahme von [^3H] δ -ALA (2 μM) wurde bei einer totalen δ -ALA-Konzentration von 0,002 - 31,6 mM bei 37°C und pH 6,0 nach zehnmütiger Inkubationszeit gemessen. **Nebenabb.:** EADIE-HOFSTEE-Transformation (n = 4).

Nicht-lineare Regressionsanalysen der Gesamtaufnahmerate von δ -ALA ergaben für den sättigbaren, aktiven Transport einen K_t -Wert von $2,1 \pm 0,3$ mM und eine Maximalgeschwindigkeit des Transports von $V_{\max} = 60,1 \pm 3,7$ nmol/(10 min \cdot mg Protein). Die lineare, nicht-sättigbare Transportkonstante (K_d) betrug $1,9 \pm 0,1$ $\mu\text{l}/(10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$. Die Überprüfung der kinetischen Parameter nach Abzug der passiven Komponente ist in der eingeschobenen Darstellung von **Abbildung 9** in linearisierter Form eines EADIE-HOFSTEE-Plots

gezeigt. Dessen Analyse ergab keinen Hinweis auf die Beteiligung einer zweiten, sättigbaren Transportkomponente an der Aufnahme von δ -ALA im untersuchten Konzentrationsbereich ($p < 0,05$). Die Ergebnisse dieser inversen Auftragung betragen für die MICHAELIS-MENTEN-Konstante ($K_t =$) $1,5 \pm 0,2$ mM und $V_{\max} = 48,3 \pm 2,6$ nmol/(10 min · mg Protein) für die maximale Aufnahme. Damit handelt es sich bei δ -ALA um ein Substrat mit relativ guter Affinität zum cholangiozytären H^+ /Peptidsympporter 1 in SK-ChA-1-Zellen.

3.1.3 Substratspezifität der δ -ALA-Aufnahme

Die Aufnahme von [3H] δ -ALA (2 μ M) in SK-ChA-1-Zellen bei pH 6,0 konnte durch 10 mM unmarkiertes δ -ALA, Ala-Ala, Gly-Sar und das β -Lactamantibiotikum Cefadroxil gehemmt werden (**Abb. 10**). Beim hydrolysestabilen Gly-Sar ist das Proton vom Stickstoff der Peptidbindung der Gly-Gly-Ausgangsstruktur durch eine Methylgruppe substituiert. Jede dieser Substanzen wurde bereits in früheren Untersuchungen als Substrat des H^+ /Peptidsympporters PEPT1 charakterisiert (THWAITES et al. 1993a, GANAPATHY et al. 1995, DÖRING et al. 1998, BRANDSCH et al. 1999). Im Gegensatz dazu konnte für die verwendeten Negativkontrollen Glycin, GABA, Aspartat und Glutamat (10 mM) keine inhibierende Wirkung nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Diese Substanzen wurden nicht vom Transportsystem der δ -ALA in SK-ChA-1-Zellen erkannt.

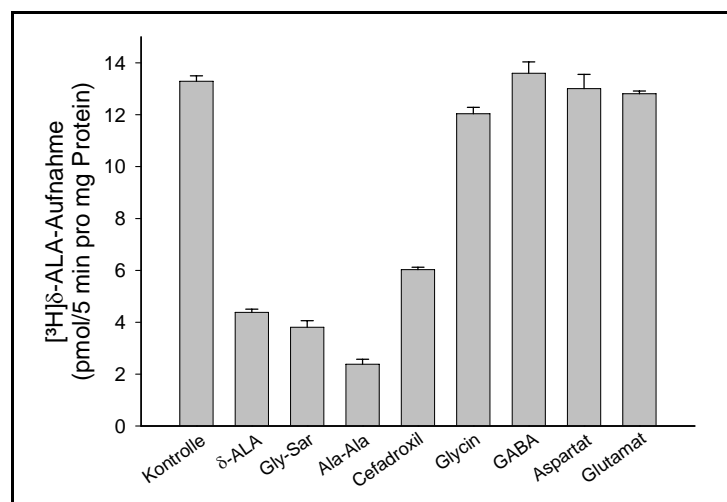


Abb. 10: Substratspezifität der [3H] δ -ALA-Aufnahme in SK-ChA-1-Zellen.

Die Aufnahme von [3H] δ -ALA (1 μ M) wurde unter Zusatz verschiedener unmarkierter Substanzen (10 mM) bei pH 6,0 und 37°C nach fünfminütiger Inkubationszeit gemessen ($n = 4$).

Abbildung 11A zeigt die Ergebnisse der Verdrängungsexperimente zur Bestimmung der Hemmkonstanten (K_i) potentieller Inhibitoren gegen die Aufnahme von [3H] δ -ALA bei pH 6,0. Dabei wurden die Konzentrationen an unmarkiertem Inhibitor gegen die [3H] δ -ALA-

Aufnahme (1 μM) logarithmisch aufgetragen. Aus den erhaltenen Verdrängungskurven konnten die entsprechenden IC_{50} -Werte durch nicht-lineare Regression ermittelt werden. In **Tabelle 9** sind die aus den IC_{50} -Werten berechneten Hemmkonstanten (K_i) zusammenfassend dargestellt. Die dabei erhaltenen Affinitätskonstanten der untersuchten Dipeptide und Peptidomimetika entsprachen hoher bis mittlerer Affinität (0,2 - 3,6 mM). Die kinetischen Parameter

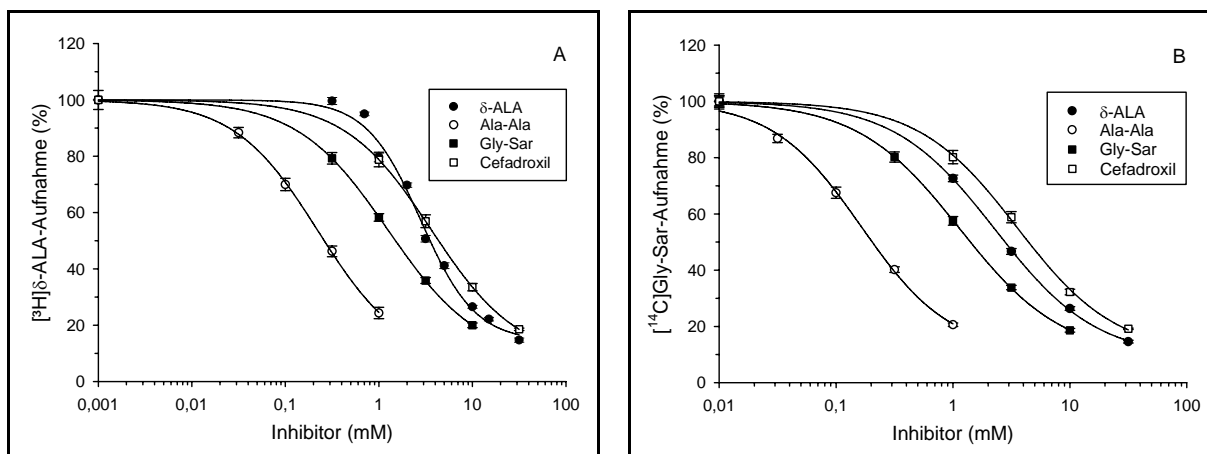


Abb. 11: Substratspezifität der $[^3\text{H}]\delta\text{-ALA}$ - (A) und $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ -Aufnahme (B) in SK-ChA-1-Zellen.

Die Aufnahme von $[^3\text{H}]\delta\text{-ALA}$ (1 μM) und $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ (10 μM) wurde unter Koinkubation mit verschiedenen unmarkierten Substanzen in ansteigender Konzentration bei 37°C und pH 6,0 nach 10 min gemessen. Die in Abwesenheit unmarkierter Substanzen ermittelten Aufnahmeraten von $[^3\text{H}]\delta\text{-ALA}$ mit $v = 23,8 \pm 0,6$ pmol/(10 min · mg Protein)) und von $v = 372,6 \pm 12,9$ pmol/(10 min · mg Protein)) für $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ entsprechen dem 100%-Wert ($n = 4$).

Tab. 9: Inhibitionskonstanten K_i verschiedener Substanzen, gemessen gegen die Aufnahme von radioaktiv markiertem $\delta\text{-ALA}$ und Gly-Sar.

Die Aufnahme von $[^3\text{H}]\delta\text{-ALA}$ (1 μM) und $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ (10 μM) in konfluente Monolayer der Zelllinie SK-ChA-1 wurde bei 37°C und pH 6,0 nach Zusatz von unmarkiertem $\delta\text{-ALA}$, Gly-Sar, Ala-Ala bzw. Cefadroxil in ansteigenden Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Die Inhibitionskonstanten wurden aus den IC_{50} -Werten (erhalten aus den Verdrängungskurven durch nicht-lineare Regression, s. **Abb. 11**) bestimmt ($n = 4$).

Inhibitor	K_i -Wert	
	$[^3\text{H}]\delta\text{-ALA}$	$[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$
	<i>mM</i>	
$\delta\text{-ALA}$	$2,7 \pm 0,3^a$	$2,1 \pm 0,1$
Gly-Sar	$1,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1^a$
Ala-Ala	$0,23 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,01$
Cefadroxil	$3,6 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$

^a die Werte repräsentieren sowohl K_i als auch K_t

wurden auch für die Inhibition der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme (10 μM) bestimmt (**Abb. 11B**, **Tabelle 9**, s. **3.1.4**). Die Transportgeschwindigkeiten in Abwesenheit unmarkierter Substanzen betragen für [^3H] δ -ALA (1 μM) $v = 23,8 \pm 0,6$ pmol/(10 min \cdot mg Protein) und für [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) $v = 372,6 \pm 12,9$ pmol/(10 min \cdot mg Protein) (= 100%-Wert).

3.1.4 Funktioneller Nachweis der δ -ALA-Aufnahme

Für den weiteren Nachweis des ausschließlichen Transportes von δ -ALA durch den H^+ /Peptidsympporter 1 in SK-ChA-1-Zellen wurden zum einen der A-B-C-Test (GANAPATHY et al. 1995) und zum anderen die Untersuchung des Hemmtyps mit Hilfe der DIXON-Auftragung durchgeführt.

Beim A-B-C-Test wurden zusätzlich zu den IC_{50} -Werten von δ -ALA, Gly-Sar, Ala-Ala und Cefadroxil – bestimmt durch Kompetitionsstudien mit [^3H] δ -ALA (1 μM , **Abb. 11A**) – die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50}) selbiger Substanzen bezüglich der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme ermittelt (**Abb. 11B**). Die Kompetitionsassays erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie der [^3H] δ -ALA-Aufnahme bei einer [^{14}C]Gly-Sar-Konzentration von 10 μM und ansteigenden Konzentrationen von δ -ALA, Gly-Sar, Ala-Ala und Cefadroxil von 0 - 31,6 mM. Gemäß den geforderten Bedingungen des A-B-C-Testes wurde die transportervermittelte [^3H] δ -ALA-Aufnahme durch δ -ALA sowie durch Gly-Sar mit ähnlicher Intensität gehemmt (**Tabelle 9**). Gleiches galt für die Inhibierung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme durch δ -ALA und Gly-Sar. Der K_i -Wert des Gly-Sar mit 1,1 mM, ermittelt gegen die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme, stimmt mit zudem mit seinem K_t -Wert (KNÜTTER et al. 2002) in SK-ChA-1-Zellen überein. Außerdem konnten Ala-Ala bzw. Cefadroxil die Aufnahmeraten von [^3H] δ -ALA und [^{14}C]Gly-Sar mit nahezu gleicher Affinität inhibieren. Die entsprechenden K_i -Werte für Ala-Ala betragen 0,23 mM bei der Verdrängung von [^3H] δ -ALA am Transportsystem bzw. 0,16 mM bei der Hemmung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme. Für Cefadroxil wurden Werte von 3,6 mM und 3,4 mM bei der Inhibierung des radioaktiv markierten δ -ALA bzw. Gly-Sar erhalten. Die aus den Hemmkurven gewonnenen Ergebnisse erfüllen somit die Kriterien des A-B-C-Testes in klassischer Weise und sind daher ein Indiz für den gemeinsamen δ -ALA- und Gly-Sar-Transport durch den cholangiozytären H^+ /Peptidtransporter 1 in SK-ChA-1-Zellen.

Im Folgenden wurden sowohl Hemmtyp als auch Inhibitionskonstante (K_i) von δ -ALA gegenüber Gly-Sar mit Hilfe des DIXON-Plots ermittelt (**Abb. 12**). Dabei wurde die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) bei verschiedenen Gly-Sar-Gesamtkonzentrationen (50 und 500 μM) unter Koinkubation mit unmarkiertem δ -ALA (0 - 10 mM) gemessen. Die Geraden

beider Gly-Sar-Konzentrationen weisen Linearität auf ($50 \mu\text{M}$: $r^2 = 0,9903$; $500 \mu\text{M}$: $r^2 = 0,9925$) und schneiden sich – wie für kompetitive Inhibitoren erwartet – im 4. Quadranten des Koordinatensystems. Aus dem Schnittpunkt beider Geraden wurde für δ -ALA ein K_i -Wert von $1,7 \text{ mM}$ berechnet. Die Linearität der beiden Punktescharen gilt als weiterer Beweis für die Beteiligung eines einzelnen Systems an Substratbindung und -transport.

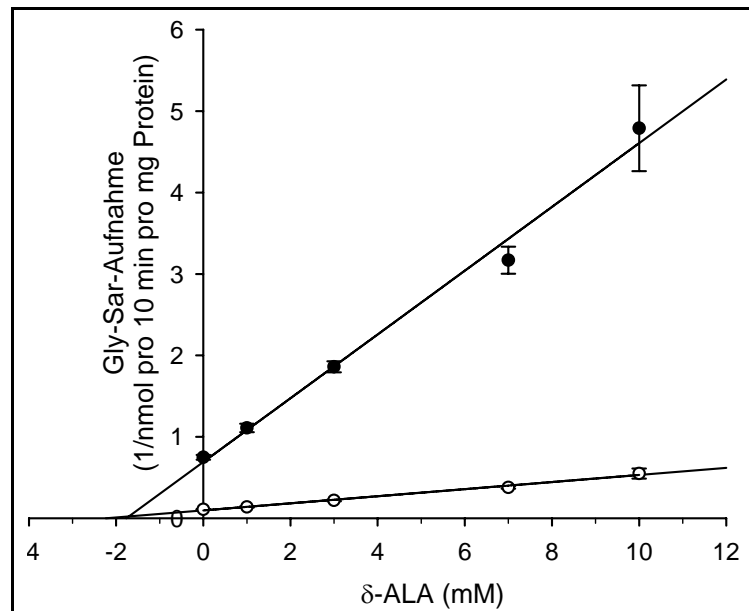


Abb. 12: Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i von δ -ALA mittels DIXON-Plot.

Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar ($10 \mu\text{M}$) wurde bei 37°C und pH 6,0 nach 10 min bei zwei verschiedenen Gly-Sar-Gesamtkonzentrationen - $50 \mu\text{M}$ (\bullet) und $500 \mu\text{M}$ (\circ) - unter Koinkubation mit unmarkiertem δ -ALA ($0 - 10 \text{ mM}$) gemessen. Die passive Komponente von 11,6% des totalen Gly-Sar-Transportes, gemessen unter Zusatz eines Überschusses an Gly-Sar (50 mM), wurde von der Gesamtaufnahmerate zur Berechnung des aktiven Transportes abgezogen ($n = 3$).

3.1.5 Prüfung auf weitere potentielle Transportsysteme für δ -ALA

Der Transport von δ -ALA in SK-ChA-1-Zellen ist – wie bereits in Abschnitt 3.1.1 erwähnt – Na^+ -unabhängig. Außerdem gab es keine signifikanten Effekte von Glycin, GABA, Glutamat oder Aspartat (jeweils 10 mM) auf die [^3H] δ -ALA-Aufnahme ($1 \mu\text{M}$) bei pH 6,0 nach einer Inkubationsdauer von 5 min ($p < 0,05$, **Abb. 10**). Um nachzuweisen, dass PEPT1 das Haupt- bzw. einzige für den Transport von δ -ALA verantwortliche System in diesen Gallengangszellen ist, wurde in einem weiteren Versuch der Einfluss von jeweils 10 mM Glycin, GABA, Glutamat und Aspartat auf die [^3H] δ -ALA-Aufnahme ($3 \mu\text{M}$) in Abwesenheit eines Protonengradienten bei pH 7,5 untersucht (**Tabelle 10**). Bei diesem pH-Wert ist die [^3H] δ -ALA-Aufnahme im Vergleich zu pH 6,0 generell um etwa zwei Drittel erniedrigt. Es konnte gezeigt werden, dass weder Glycin noch Glutamat, GABA oder Aspartat die [^3H] δ -ALA-Aufnahme

signifikant beeinflussten ($p < 0,05$). Erwartungsgemäß hemmte unmarkierte δ -ALA (10 mM) die [^3H] δ -ALA-Aufnahme ebenfalls in der Abwesenheit eines Protonengradienten, da PEPT1 auch unter diesen Bedingungen seine Substrate bis zum Konzentrationsausgleich transportiert. Als nächstes wurde die Aufnahme von [^3H]Glycin (70 nM) in SK-ChA-1-Zellen bei pH 7,5 nach einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Durch Addition von unmarkiertem Glycin in einer Konzentration von 10 mM konnte die [^3H]Glycin-Aufnahme von $v = 3,5 \pm 0,1$ pmol/(10 min · mg Protein) auf $v = 0,68 \pm 0,01$ pmol/(10 min · mg Protein) um insgesamt 81% gehemmt werden. Der Einsatz eines Überschusses von 10 mM δ -ALA führte nur zu einer schwachen Hemmung der [^3H]Glycin-Aufnahme um 17% auf $v = 2,9 \pm 0,1$ pmol/(10 min · mg Protein).

Tab. 10: Substratspezifität der [^3H] δ -ALA-Aufnahme in Anwesenheit eines Protonengradienten.

Die Aufnahme von [^3H] δ -ALA (3 μM) in konfluente Monolayer der Zelllinie SK-ChA-1 wurde bei 37°C und pH 7,5 unter Vorhandensein eines Na^+ -Gradienten nach zehnmütiger Inkubationszeit gemessen ($n = 4$).

Inhibitor	[^3H] δ -ALA-Aufnahme
<i>10 mM</i>	%
Kontrolle	100 \pm 2
Glycin	91 \pm 5
δ -ALA	71 \pm 3 ^a
GABA	96 \pm 3
Glutamat	112 \pm 4
Aspartat	114 \pm 4

^a signifikanter Unterschied zur Kontrolle

3.1.6 Regulation der [^3H] δ -ALA-Aufnahme

Für die Aufnahme von Gly-Sar durch den apikal exprimierten Peptidtransporter PEPT1 der intestinalen Zelllinie Caco-2 ist beschrieben worden, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit Phorbolestern zu einer reduzierten Dipeptid-Transportrate führt (BRANDSCH et al. 1994). Dieser Hemmeffekt konnte durch die gleichzeitige Zugabe von Staurosporin aufgehoben werden, welches eine stimulierende Wirkung auf die PEPT1-Regulation besitzt. Das in dieser Untersuchung eingesetzte Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist das funktionelle Analogon vom physiologischen PKC-Aktivator Diacylglycerol in nanomolarer Konzentration (KONTNY et al. 1992). Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war die Überprüfung eines eventuellen-Einflusses der erwähnten Proteinkinase C-Modulatoren auf die [^3H] δ -ALA-Aufnahme (**Ta-**

Tab. 11: Einfluss der Vorinkubation mit Proteinkinase C-Modulatoren (PMA und Staurosporin) auf die [³H]δ-ALA-Aufnahme in SK-ChA-1-Zellen.

SK-ChA-1-Zellen wurden mit PMA (1 μM) und/oder Staurosporin (0,5 μM) bzw. ohne PKC-Modulatoren (Kontrolle) bei 37 °C in humidifizierter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5% für 2 h in 1,5 ml Medium vorinkubiert. Die anschließende Aufnahme von [³H]δ-ALA (1 μM) in konfluente Zellmonolayer erfolgte bei 37°C und pH 6,0 über einen Zeitraum von 10 min (n = 4).

Substanz	[³ H]δ-ALA-Aufnahme	
	<i>pmol/(10 min · mg Protein)</i>	%
Kontrolle	36,2 ± 0,2	100
PMA (1 μM)	26,4 ± 0,6 ^a	73
Staurosporin (0,5 μM)	42,1 ± 0,7 ^a	116
PMA (1 μM) + Staurosporin (0,5 μM)	36,1 ± 0,2 ^b	100

^a signifikanter Unterschied zur Kontrolle

^b signifikanter Unterschied zu 1 μM PMA bzw. zu 0,5 μM Staurosporin

belle 11). Dazu wurden die SK-ChA-1-Zellen mit 1 μM PMA und/oder 0,5 μM Staurosporin, gelöst in Nährmedium, für 2 h vorinkubiert. Nach dem zweimaligen Waschen der Zellen mit 37°C warmen Versuchspuffer bei einem pH-Wert von 6,0 wurde die [³H]δ-ALA-Aufnahme nach einer zehnminütigen Inkubationszeit gemessen. Im Ergebnis führte die Vorbehandlung mit PMA zu einer signifikanten Hemmung des [³H]δ-ALA-Transportes auf 73% (**Tabelle 11**). Die gleichzeitige Vorinkubation mit Staurosporin konnte die inhibierende Wirkung von PMA vollständig aufheben. Bei den SK-ChA-1-Zellen, welche lediglich mit Staurosporin präinkubiert wurden, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der [³H]δ-ALA-Aufnahme um 16%.

Der Gallengang dient der Exkretion von Verdauungssäften und Abfallprodukten, herrührend aus dem Metabolismus der Leber als wichtigstem Stoffwechselorgan. Aus diesem Stoffwechsel resultierende Dipeptide bzw. strukturell ähnliche Substanzen können durch die Leber mittels PEPT1 zurückgewonnen werden. KNÜTTER et al. (2002) konnten kürzlich nachweisen, dass das protonenabhängige Peptid-Kotransportsystem PEPT1 ebenfalls in der extrahepatischen Gallengangszelllinie SK-ChA-1 präsent ist. Obwohl die physiologische Rolle von PEPT1 im Gallengangsepithel nicht eindeutig geklärt ist, konnte das natürliche Vorkommen dieses Peptidtransporters im Gallengangsepithel von Maus und Kaninchen anhand von Immunofluoreszenz- bzw. RT-PCR-Analysen unter Verwendung isolierter RNA-Proben bestätigt werden. Nahe liegend scheint jedoch, dass eventuell in der Gallenflüssigkeit noch vor-

handene Substanzen des Lebermetabolismus mit einer Affinität zum Peptidtransporter durch PEPT1 des Gallenganges resorbiert und somit einer effektiven Nutzung unterzogen werden. Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. H. DANIEL konnte eindeutig nachweisen, dass δ -ALA – trotz Substitution der Peptidbindung durch eine Ketomethylengruppe – ein Substrat für die klonierten H^+ /Peptidsymporter PEPT1 und PEPT2 darstellt. Unter den verschiedenen Substraten des „intestinalen Typs“ des Peptidtransporters PEPT1 besaß δ -ALA demnach eine relativ gute Affinität mit Hemmkonstanten von $K_i = 0,3$ mM bei Integration von hPEPT1-mRNA in *Pichia pastoris*-Hefezellen bzw. von $K_i = 0,4$ mM bei dessen Expression in Oocyten des Kralenfrosches *Xenopus laevis* (DÖRING et al. 1998a). IRIE et al. (2001) konnten später an intakten intestinalen Caco-2-Zellen bestätigen, dass δ -ALA vom apikal lokalisierten PEPT1 mit einer Affinitätskonstante von $K_i = 1,6$ mM transportiert wird. Diese Ergebnisse dürften die hohen Serumkonzentrationen von δ -ALA nach oraler Verabreichung erklären, denn das relativ geringe Penetrationsvermögen in tiefere Gewebeschichten weist auf eine hohe Hydrophilie der Substanz hin.

Beim Vergleich der an PEPT1 von Caco-2-Zellen erhaltenen K_i -Werte mit denen aus heterologen Expressionssystemen offenbaren sich in manchen Fällen erhebliche Affinitätsunterschiede, welche u. a. durch unterschiedliche bzw. fehlende Signaltransduktionswege (z. B. Insulinwirkung, THAMOTHARAN et al. 1999), einen abweichenden bzw. schwankenden Membrangradienten (z. B. *Xenopus laevis* Oocyten, BILL 2001) und/oder durch veränderte posttranslationale Modifizierungen des Transportproteins (z. B. Hypermannosylierung der Oligosaccharidketten beim Hefesystem, BILL et al. 1998) verursacht sein können. Für die Expression von PEPT1 in *Pichia pastoris*-Zellen bzw. in *Xenopus laevis*-Oocyten ist ebenfalls eine veränderte pH-Abhängigkeit des Substrattransportes beschrieben worden (DÖRING et al. 1998a), welche eventuell auf eine modifizierte Interaktion des regulatorischen Faktors RF-hPEPT1 (SAITO et al. 1997) mit dem Carrier zurückzuführen ist. Letztlich gilt es abzuwägen, ob die Nutzung heterologer Expressionssysteme trotz gewisser Vorteile in der Handhabung – zumindest in Bezug auf das Hefesystem – zur Klärung einer bestimmten wissenschaftlichen Fragestellung essentiell ist (DREYER et al. 1999).

Die Zweckmäßigkeit der Anwendung von δ -ALA bei der palliativen Behandlung von Patienten mit Gallengangstumoren ist noch nicht endgültig geklärt (ZOEPEL et al. 2001b). Der Nachweis des aktiven Transportes von δ -ALA in Tumorzellen des Gallenganges durch ein spezifisches System – hier gezeigt an SK-ChA-1 – sollte jedoch einige Hinweise bezüglich der Optimierung von Behandlungsparametern erlauben. Hypothetisch gesehen könnte δ -ALA nach oraler Verabreichung hoher Dosen und erfolgter Akkumulation der Substanz in der Gallen-

flüssigkeit während der Gallengangspassage in cholangiogene Tumorzellen „aufwärts“ transportiert werden. Den hier gewonnenen Ergebnissen zufolge wird für die zelluläre Anhäufung von δ -ALA entgegen einem Konzentrationsgefälle ein pH-Gradient an der apikalen Membran der Cholangiozyten – vergleichbar mit dem Mikroklima an intestinalen und renalen Epithelien – benötigt. In der Tat konnte für SK-ChA-1-Zellen und Epithelzellen des intrahepatischen Gallenganges der Na^+/H^+ -Austauscher NHE2 nachgewiesen werden, welcher höchstwahrscheinlich für die Reabsorption von Na^+ und die Ansäuerung der Gallenflüssigkeit verantwortlich ist (STRAZZABOSCO et al. 1994, SPIRLI et al. 1998). Letztlich muss auch die Höhe der therapeutischen Dosis weiter optimiert werden (GIBSON et al. 1999).

Es sind zwar mehrere, für δ -ALA affine Systeme beschrieben worden, so z. B. die Transporter für Glycin, GABA, Asparaginsäure oder die β -Aminosäuretransporter (MCLOUGHLIN & CANTRILL 1984, LANGER et al. 1999, NOVOTNY et al. 2000, RUD et al. 2000); die Untersuchungen an SK-ChA-1-Zellen lieferten jedoch keinen Hinweis auf eine etwaige Beteiligung eines Transportsystems für Glycin, GABA, Glutamat oder Aspartat – weder bei pH 6,0 noch bei pH 7,5. Keine dieser Substanzen beeinflusste den Transport radioaktiv markierter δ -ALA. Der [^3H]Glycintransport konnte jedoch durch eine hohe δ -ALA-Konzentration in geringem Ausmaß gehemmt werden. Verglichen mit den sehr niedrigen Affinitätskonstanten Glycintransportierender Systeme scheint diese Interaktion nicht von physiologischer Bedeutung zu sein, zumal die kinetischen Analysen keinen Rückschluss auf das Vorhandensein eines zweiten Transportsystems für δ -ALA zulassen. Stattdessen wird eindeutig belegt, dass δ -ALA und das PEPT1-Substrat Gly-Sar vom gleichen System transloziert werden. Der Transport von δ -ALA war außerdem protonenabhängig, d.h. er wurde bei einem äußeren pH-Wert von 6,0 stark stimuliert. Die Hemmkonstanten von Ala-Ala, Gly-Sar, Cefadroxil und δ -ALA, ermittelt gegen die [^3H] δ -ALA- bzw. die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme, stimmen sehr gut mit den publizierten Werten für den Transport von Dipeptiden und Peptidomimetika via PEPT1 an anderen Zelllinien überein (GANAPATHY et al. 1995, IRIE et al. 2001). Die Hemmung des Gly-Sar-Transportes durch δ -ALA war streng kompetitiv.

Für den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 wurde nachgewiesen, dass er entweder einer unmittelbaren oder zumindest mittelbaren Kontrolle durch die Proteinkinase C unterliegt (BRANDSCH et al. 1994, CHEN et al. 2002a). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Proteinkinase C-Modulatoren PMA und Staurosporin ebenfalls die Aufnahme von δ -ALA in Gallengangszellen beeinflussen. Als Wirkungsweise dieser Substanzen wurde eine direkte oder indirekte De-/Phosphorylierung des Proteins oder aber ein mittelbarer Einfluss auf den H^+ -Gradienten als treibende Kraft des Transportes diskutiert (KENNEDY et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass δ -ALA durch den H^+ /Peptidsympporter PEPT1 entgegen einem Konzentrationsgradienten aktiv in die Zellen des extrahepatischen Gallenganges transportiert wird. Als Schlussfolgerung dieser Studie ergibt sich daher, dass SK-ChA-1-Zellen nicht lediglich nur ein weiteres Zellkulturmodell zur Untersuchung des H^+ /Peptidsymports an intakten Epithelzellen darstellen, wie die Zelllinie Caco-2 für den „intestinalen Typ“ von PEPT1, die MDCK-Zellen für den „renalen“ PEPT1-Typus und die SKPT-Zellen für den renal exprimierten PEPT2 (BRANDSCH et al. 1994, 1995a & b), sondern dass dieses Transportsystem bei der photodynamischen Therapie von Gallengangstumoren durchaus von therapeutischer Relevanz sein könnte.

Die Ergebnisse sind publiziert (NEUMANN & BRANDSCH 2003).

3.2 Transport von Alafosfalin durch PEPT1 und PEPT2 an Epithelzellen von Darm und Niere

3.2.1 Affinität von Alafosfalin an PEPT1 und PEPT2

Caco-2- und SKPT-Zellkulturen sind etablierte Systeme für intestinale und renale Peptidtransportstudien. Es konnte eindeutig in verschiedenen Untersuchungen mittels funktioneller Studien, RT-PCR, Northern Blot Analysen und der Verwendung von Antikörpern gezeigt werden, dass Caco-2 den mit hoher Transportkapazität arbeitenden „intestinalen Typ“ PEPT1 exprimiert, wohingegen SKPT ausschließlich den „renalen Typ“ des Peptidtransporters PEPT2 mit einer vergleichsweise niedrigen Transportgeschwindigkeit besitzt (GANAPATHY et al. 1995, BRANDSCH et al. 1995, SHU et al. 2001).

Im Vorversuch wurde die Stabilität von Alafosfalin mittels HPLC analysiert. Dabei erfolgte die Probeentnahme aus dem luminalen Kompartiment, nachdem die Zellen für 10, 30, 60 und 120 min mit 1 mM Alafosfalin, gelöst in Versuchspuffer, inkubiert worden waren. Die Wiederfindungsraten betragen $93 \pm 0,7\%$ (Caco-2) und $96 \pm 0,3\%$ (SKPT) nach 10 min bzw. $81 \pm 3\%$ (Caco-2) und $90 \pm 0,8\%$ (SKPT) nach 2 h. Die Stabilität der Verbindung kann somit für die im Folgenden beschriebenen Studien als ausreichend betrachtet werden. Der Transport von Alafosfalin durch Caco-2- und SKPT-Zellmonolayer wurde ebenfalls mittels HPLC analysiert, konnte jedoch aufgrund von Auftrennungsschwierigkeiten bei der geringen Alafosfalin-Konzentration nicht eindeutig quantifiziert werden.

In einer ersten Affinitätsüberprüfung wurde der Einfluss von Alafosfalin auf die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme (10 μM) an PEPT1 in Caco-2- und PEPT2 in SKPT-Zellen untersucht. Gly-Sar wird als Standardsubstrat bei Peptidtransportstudien aufgrund seiner relativ hohen Stabilität gegen enzymatische Hydrolyse genutzt (BRETSCHNEIDER et al. 1999, BRANDSCH et al. 1995, SHU et al. 2001, BÖRNER et al. 1998, BRANDSCH et al. 1999). Bei diesem Versuch konnte eine starke kompetitive Inhibierung der Gly-Sar-Aufnahme durch Alafosfalin am jeweiligen Transportsystem beider Zelllinien festgestellt werden (**Abb. 13**). Aus den dargestellten Verdrängungskurven wurde die halbmaximale Hemmung der Gly-Sar-Aufnahme (IC_{50}) durch nicht-lineare Regressionsmethoden ermittelt. Die resultierenden IC_{50} -Werte dienten der Berechnung der zugehörigen Hemmkonstanten (K_i) unter Verwendung der entsprechenden K_t -Werte des Gly-Sar-Transportes ($K_{t\text{Gly-Sar(PEPT1)}} = 580 \mu\text{M}$, $K_{t\text{Gly-Sar(PEPT2)}} = 71 \mu\text{M}$, s. u.). Die Ergebnisse zeigen, dass Alafosfalin eine bemerkenswert hohe Affinität zu beiden Transportern besitzt: K_i -Werte von $195 \pm 13 \mu\text{M}$ für PEPT1 an Caco-2- und $78 \pm 10 \mu\text{M}$ für PEPT2 an

SKPT-Zellen wurden erhalten. Zum Vergleich seien die an gleichen Zelllinien ermittelten Hemmkonstanten (K_i) von Dipeptidsubstraten wie Ala-Ala mit $80 \pm 10 \mu\text{M}$ für PEPT1 und $6,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ für PEPT2 bzw. für Ala-Lys mit $210 \pm 20 \mu\text{M}$ für PEPT1 und $11,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ für PEPT2 genannt (BRANDSCH et al. 1995a, BRANDSCH et al. 1999, KNÜTTER et al. 2004).

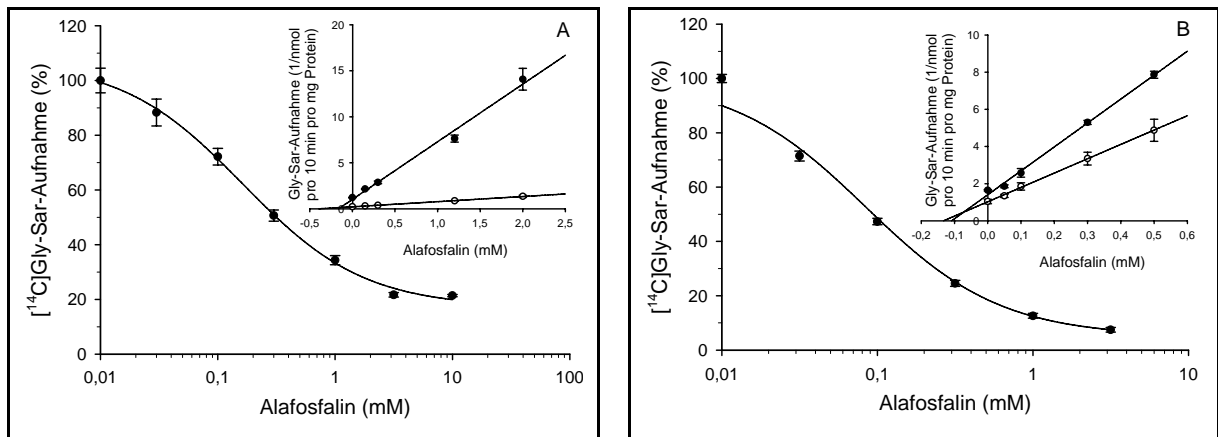


Abb. 13: Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme durch Alafosfalin in Caco-2- (A) und SKPT-Zellen (B).

Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar (10 μM) in konfluente Zellmonolayer wurde unter Koinkubation mit unmarkiertem Alafosfalin in ansteigender Konzentration (Caco-2: 0 - 10 mM, SKPT: 0 - 3,16 mM) bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach 10 min gemessen. Die in Abwesenheit von Alafosfalin gemessenen Aufnahmegeschwindigkeiten von [¹⁴C]Gly-Sar (Caco-2: $v = 215,3 \pm 18,2 \text{ pmol}/(10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$, SKPT: $v = 241,7 \pm 32,1 \text{ pmol}/(10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$) entsprechen dem 100%-Wert ($n = 4$). **Nebenabb.:** Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar (10 μM, pH 6,0, 10 min) wurde bei zwei verschiedenen Gly-Sar-Gesamtkonzentrationen – 50 μM (●) und 500 μM (○) für Caco-2- bzw. 20 μM (●) und 50 μM (○) für SKPT-Zellen – unter Koinkubation mit unmarkiertem Alafosfalin in ansteigender Konzentration (Caco-2: 0 - 10 mM, SKPT: 0 - 2 mM) gemessen. Die passive Komponente von 19,2% (Caco-2) bzw. 5,1% (SKPT) des totalen Gly-Sar-Transportes, gemessen unter Zusatz eines Überschusses an Gly-Sar (Caco-2: 30 mM, SKPT: 20 mM), wurde von der Gesamtaufnahmerate zur Berechnung des aktiven Transportes abgezogen ($n = 4$).

Als nächstes wurde die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar (10 μM) für 10 min bei pH 6,0 bei zwei verschiedenen Gly-Sar-Gesamtkonzentrationen (Caco-2: 50 & 500 μM, SKPT: 20 & 50 μM) in der Anwesenheit ansteigender Alafosfalin-Konzentrationen (Caco-2: 0 - 10 mM, SKPT: 0 - 2 mM) gemessen. Die lineare, nicht-sättigbare Transportkomponente, bestehend aus einfacher Diffusion und unspezifischer Substrathaftung an den Zellen, von 19,2% für Caco-2- und 5,1% für SKPT-Zellmonolayer wurde mit einem Überschuss an unmarkiertem Gly-Sar bestimmt (Caco-2: 31,6 mM, SKPT: 20 mM) und von der Gesamtaufnahmerate subtrahiert. Die Ergebnisse sind in Form des DIXON-Plots dargestellt (**Abb. 13: Nebenabb.**). Die Regressionen verlaufen für beide Gly-Sar-Konzentrationen linear ($r^2 > 0,99$), wobei sich die Geraden – wie für kompetitive Inhibitoren erwartet – im 4. Quadranten des Koordinatensystems schneiden. Die berechneten Schnittpunkte der Geraden ergaben für Alafosfalin K_i -Werte von

140 μM für PEPT1 an Caco-2- bzw. 73 μM für PEPT2 an SKPT-Zellen. Die kalkulierten Werte aus der DIXON-Auftragung stimmen dabei in hohem Maße mit den experimentell ermittelten Inhibitionskonstanten von $K_i = 195 \mu\text{M}$ bzw. $K_i = 78 \mu\text{M}$ aus den nicht-linearen Regressionen (**Abb. 13**) überein.

In einem dritten Experiment wurde die Art der Interaktion zwischen Alafosfalin und Gly-Sar an beiden Peptidtransportsystemen in Form des EADIE-HOFSTEE-Plots nochmals überprüft. Dabei erfolgte die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) unter Zugabe von unmarkiertem Gly-Sar in ansteigenden Konzentrationen in An- bzw. Abwesenheit von Alafosfalin in einer Konzentration von 260 μM (Caco-2) bzw. 80 μM (SKPT). Die Auftragung der Versuchsergebnisse (Aufnahmerate vs. Aufnahmerate/Substratkonzentration, **Abb. 14**) unter vorherigem Abzug der passiven Komponente ergab für beide Carrier jeweils zwei Geraden, die sich nahe der Ordinate schneiden. Die Maximalgeschwindigkeit der Gly-Sar-Aufnahme für PEPT1 an Caco-2-Zellen mit $V_{\text{max}} = 7,8 \pm 0,1 \text{ nmol}/(10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$ wurde durch den Zusatz von Alafosfalin erwartungsgemäß nicht beeinflusst ($V_{\text{max}} = 7,6 \pm 0,3 \text{ nmol}/(10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$): die Affinitätskonstante $K_{\text{i(Gly-Sar)}}$ jedoch in starkem Maße. In Anwesenheit von Alafosfalin in einer Konzentration nahe seines K_i -Wertes betrug der K_i -Wert der Gly-Sar-Aufnahme in Caco-2-Zellen 1160 μM verglichen mit 580 μM in Abwesenheit von Alafosfalin. Die gleichen Effekte konnten für PEPT2 an SKPT-Zellen beobachtet werden.

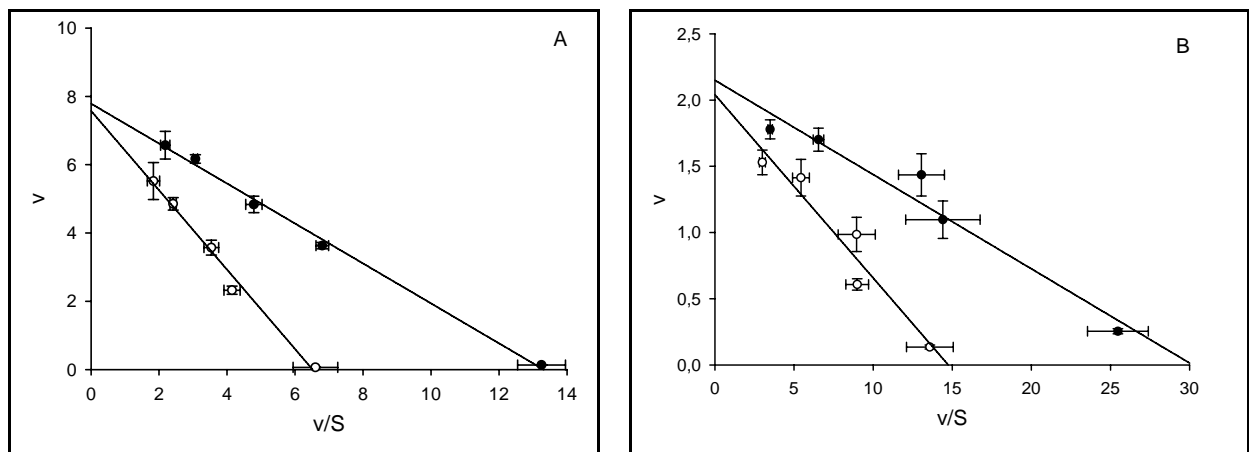


Abb. 14: Gesamtaufnahme von Gly-Sar in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration und der Ab-/Anwesenheit von Alafosfalin in Caco-2- (A) und SKPT-Zellmonolayer (B).

Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) wurde in Abwesenheit (\bullet) bzw. Anwesenheit von Alafosfalin (\circ ; Caco-2: 0,26 mM, SKPT: 0,08 mM) und einer totalen Gly-Sar-Konzentration von 0,01 - 3,01 mM (Caco-2) bzw. 0,01 - 0,51 mM (SKPT) bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach zehnmütiger Inkubationszeit gemessen (EADIE-HOFSTEE-Transformation, $n = 4$).

Hier betragen die V_{\max} -Werte $2,2 \pm 0,1$ nmol/(10 min · mg Protein) in Abwesenheit und $2,0 \pm 0,2$ nmol/(10 min · mg Protein) in Anwesenheit von Alafosfalin, wohingegen sich die MICHAELIS-MENTEN-Konstante der Gly-Sar-Aufnahme bei Zusatz von Alafosfalin in einem Konzentrationsbereich seiner halbmaximalen Hemmwirkung von ($K_t =$) $71,2 \mu\text{M}$ auf $138 \mu\text{M}$ verdoppelte. Beide Typen des Experimentes – sowohl nach DIXON- als auch nach EADIE-HOFSTEE – zeigen, dass die Hemmung der Gly-Sar-Aufnahme durch Alafosfalin kompetitiver Art ist. Die Linearität der Punktescharen beider Untersuchungen indiziert die Involvierung eines einzigen Carriers an der aktiven Aufnahme von Alafosfalin.

3.2.2 Einfluss von Alafosfalin und Lys[Z(NO₂)]-Val auf die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme

Um einen weiteren Beweis für die Aufnahme des Dipeptidomimetikums Alafosfalin durch PEPT1/2 an Caco-2- und SKPT-Zellen zu erhalten, wurde dessen Einfluss auf die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme ($10 \mu\text{M}$) in Ab- bzw. Anwesenheit von Lys[Z(NO₂)]-Val bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach zehnmütiger Inkubationszeit untersucht (Tabelle 12).

Tab. 12: Einfluss von Alafosfalin in Ab-/Anwesenheit des PEPT1/2-Inhibitors Lys[Z(NO₂)]-Val auf die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme.

Die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme ($10 \mu\text{M}$) wurde bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 6,0 nach zehnmütiger Inkubationszeit gemessen. Die Konzentrationen von Alafosfalin und Lys[Z(NO₂)]-Val betragen $300 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{M}$ für die Caco-2-Zellmonolayer und $100 \mu\text{M}$ bzw. $1 \mu\text{M}$ für die SKPT-Zellen (Caco-2: $n = 7$; SKPT: $n = 4$).

Substanz	Caco-2		SKPT	
	[¹⁴ C]Gly-Sar-Aufnahme			
	<i>pmol/mg Protein</i>	%	<i>pmol/mg Protein</i>	%
Kontrolle	277 ± 15	100	197 ± 14	100
Alafosfalin	146 ± 7	53	103 ± 7	53
Alafosfalin + Lys[Z(NO ₂)]-Val	78 ± 3	28	28 ± 2	14

Lys[Z(NO₂)]-Val besitzt mit K_i -Werten von $1,7 \mu\text{M}$ an Caco-2- bzw. von 100 nM an SKPT-Zellen eine stark inhibierende Wirkung auf beide H^+ /Peptid-Kotransporter (THEIS et al. 2002, BRANDSCH et al. 2003). Die Inkubation von Caco-2-Zellmonolayern mit $300 \mu\text{M}$ Alafosfalin reduzierte die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahmegeschwindigkeit von $v = 277 \pm 8$ pmol/(10 min · mg Protein) um 47% auf 146 ± 7 pmol/(10 min · mg Protein). Die zusätzliche Disposition von $20 \mu\text{M}$ Lys[Z(NO₂)]-Val führte mit $v = 78 \pm 3$ pmol/(10 min · mg Protein) zu einer weiteren Reduktion der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme auf 28% des Kontrollwertes. In SKPT-Zellen wurde die Kontrolle von 197 ± 14 pmol/(10 min · mg Protein) durch $100 \mu\text{M}$ Alafosfalin auf

103 ± 7 pmol/(10 min · mg Protein) gehemmt (= 53% der Kontrolle). Lys[Z(NO₂)]-Val (1 μM) reduzierte die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme zusätzlich auf 28 ± 2 pmol/(10 min · mg Protein) (= 14% der Kontrolle).

Die Aufnahmeraten von [¹⁴C]Gly-Sar bei gleichzeitigem Zusatz von Alafosfalin und Lys[Z(NO₂)]-Val erscheinen etwas zu hoch, zumal in früheren Studien der alleinige Einsatz von Lys[Z(NO₂)]-Val bei einer Konzentration über dem Zehnfachen seines K_i-Wertes zu einer totalen Hemmung des aktiven Transportes führte (pers. Mitteilung ILKA KNÜTTER).

3.2.3 Einfluss von Alafosfalin auf den [¹⁴C]Gly-Sar-Flux

PEPT1 und PEPT2 sind in der apikalen Membran von intestinalen und renalen Epithelzellen exprimiert. Die Versorgung des Organismus mit Di-/Tripeptiden bzw. Peptidomimetika und deren Konservierung erfordert ihre Aufnahme in das intestinale- bzw. die Reabsorption durch das renale Epithelium aus dem Lumen in die Zellen via PEPT1/2 und ihren Transport durch die basolaterale Membran über Basalmembran und Lymphe durch das Kapillarendothel in die Blutbahn. Ferner sind sowohl für das intestinale als auch für das renale Epithel basolaterale bidirektionale Carrier beschrieben worden, welche desgleichen in die Betrachtung des Einflusses von Alafosfalin auf den epithelialen [¹⁴C]Gly-Sar-Transport einbezogen werden (SHU et al. 2001, THWAITES et al. 1993a & b, TERADA et al. 1999 & 2000).

Die bisherigen Untersuchungen ergaben, dass es sich bei Alafosfalin um einen kompetitiven Inhibitor des PEPT1/2-vermittelten Substrattransportes handelt. In einem weiteren Experiment sollten ebenfalls die Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme- bzw. des transepithelialen Fluxes an PEPT1 und PEPT2 charakterisiert werden. Für diese Flux-Studien wurden Caco-2- und SKPT-Zellen auf permeablen Transwell[®]-Filtern für 21 (Caco-2) bzw. 4 Tage (SKPT) kultiviert. Nach dieser Differenzierungsphase betragen die transepithelialen elektrischen Widerstände $803 \pm 29 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei der Caco-2- und $452 \pm 13 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für die SKPT-Zelllinie.

Um einen schädigenden Effekt von Alafosfalin auf die Integrität der Zellmonolayer auszuschließen, wurde vorerst der [¹⁴C]Mannitol-Flux (10 μM) von der apikalen zur basolateralen Seite (J_{a-b}) bei bestehendem Protonengradienten ($\text{pH}_{a-b} = 6,0:7,5$) und einer Versuchsdauer von 2 h in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von 3 mM Alafosfalin gemessen (**Abb. 15**). Dabei betrug die passive Diffusion von [¹⁴C]Mannitol durch Caco-2-Zellmonolayer – ermittelt durch lineare Regression der Flux-Daten (J_{a-b}) – unabhängig von einer Alafosfalinzugabe durchschnittlich $0,07 - 0,08 \pm 0,005\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$. Für SKPT-Zellen betragen die Mannitol-Fluxwerte $0,28 \pm 0,01\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ in Abwesenheit und $0,27 \pm 0,01\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ in Anwesenheit von 3 mM Alafosfalin. Die durchschnittliche [¹⁴C]Mannitol-Aufnahme mit

$J_{a-c} = 0,05 \pm 0,0004\%/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ in beide Zelltypen wurde durch Alafosfalin ebenfalls nicht beeinflusst.

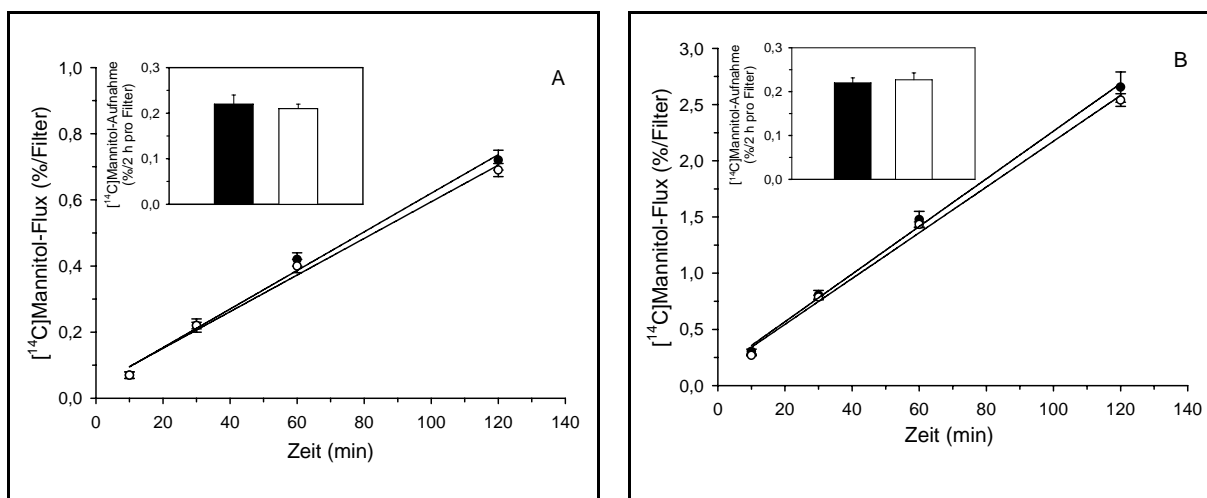


Abb. 15: Einfluss von Alafosfalin auf den [^{14}C]Mannitol-Flux durch Caco-2- (A) und SKPT-Zellmonolayer (B), gemessen von der apikalen zur basolateralen Seite.

Der transepitheliale Flux von [^{14}C]Mannitol ($10 \mu\text{M}$) wurde in der Abwesenheit (\bullet , Kontrolle) bzw. Anwesenheit von 3 mM Alafosfalin (\circ) bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h bei Vorhandensein eines pH-Gradienten gemessen ($\text{pH}_{a-b} = 6,0:7,5$). **Nebenabb.:** Einfluss von 3 mM Alafosfalin (\square) auf die [^{14}C]Mannitol-Aufnahme ($10 \mu\text{M}$, \blacksquare Kontrolle) in die Zellmonolayer nach zweistündiger Inkubationszeit ($n = 3 - 4$).

Bei Betrachtung der Kompetitionsstudie unter Vorhandensein eines pH-Gradienten ($\text{pH}_{a-b} = 6,0:7,5$) kam es durch Alafosfalin (3 mM) zu einer starken Reduktion des [^{14}C]Gly-Sar-Fluxes ($10 \mu\text{M}$) durch Caco-2-Zellmonolayer von der apikalen zur basolateralen Seite (J_{a-b}) von $165,8 \pm 5,5 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 1,11 \pm 0,04\%/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, Kontrolle) um 73% auf $45,1 \pm 0,7 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ (**Abb. 16A**). Die Gly-Sar-Aufnahme (J_{a-c}) in die Zellen wurde von $135,6 \pm 2,7 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,91 \pm 0,02\%/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) auf $36,1 \pm 1,0 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$, d. h. ebenfalls um 73% , reduziert (**Abb. 16A: Nebenabb.**). Bei den SKPT-Zellmonolayern betragen die Flux-Raten $45,1 \pm 2,0 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 0,3 \pm 0,01\%/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) in Abwesenheit und $45,7 \pm 3,2 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ in Anwesenheit von 3 mM Alafosfalin (**Abb. 16B**). Folglich konnte keine inhibierende Wirkung von Alafosfalin auf den [^{14}C]Gly-Sar-Flux in SKPT-Zellen nachgewiesen werden. Die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme in die Zellen wurde jedoch durch 3 mM Alafosfalin um 61% von $9,6 \pm 1,3 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,06 \pm 0,009\%/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) auf $3,7 \pm 0,4 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ gehemmt (**Abb. 16B: Nebenabb.**).

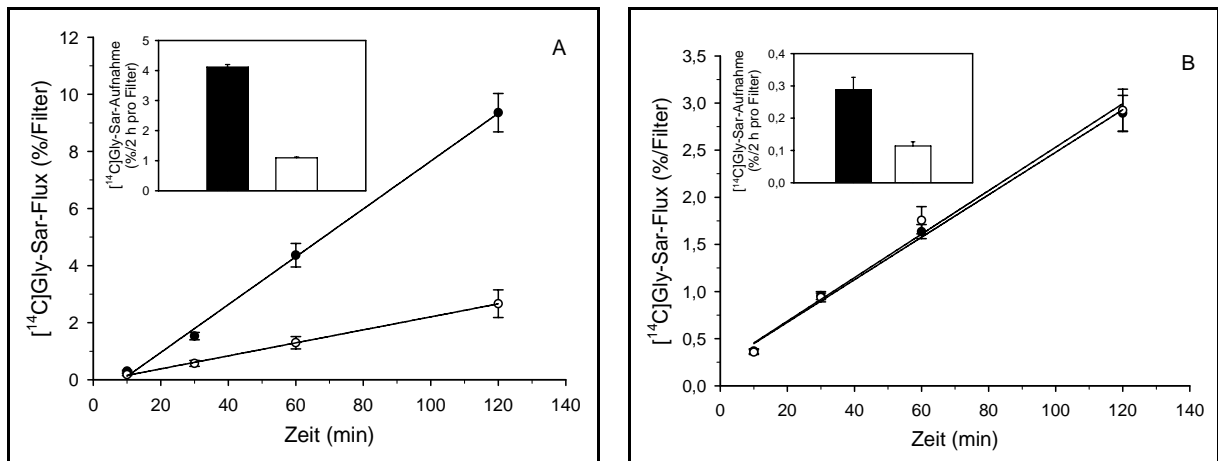


Abb. 16: Einfluss von Alafosfalin auf den $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar-Flux durch Caco-2- (A) und SKPT-Zellmonolayer (B), gemessen von der apikalen zur basolateralen Seite.

Der transepitheliale Flux von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar ($10\ \mu\text{M}$) wurde in der Abwesenheit (\bullet) bzw. Anwesenheit von 3 mM Alafosfalin (\circ) bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h unter Anwesenheit eines pH-Gradienten gemessen ($\text{pH}_{\text{a-b}} = 6,0:7,5$). **Nebenabb.:** Einfluss von 3 mM Alafosfalin (\square) auf die $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar-Aufnahme ($10\ \mu\text{M}$, \blacksquare Kontrolle) in die Zellmonolayer nach zweistündiger Inkubationszeit ($n = 4 - 5$).

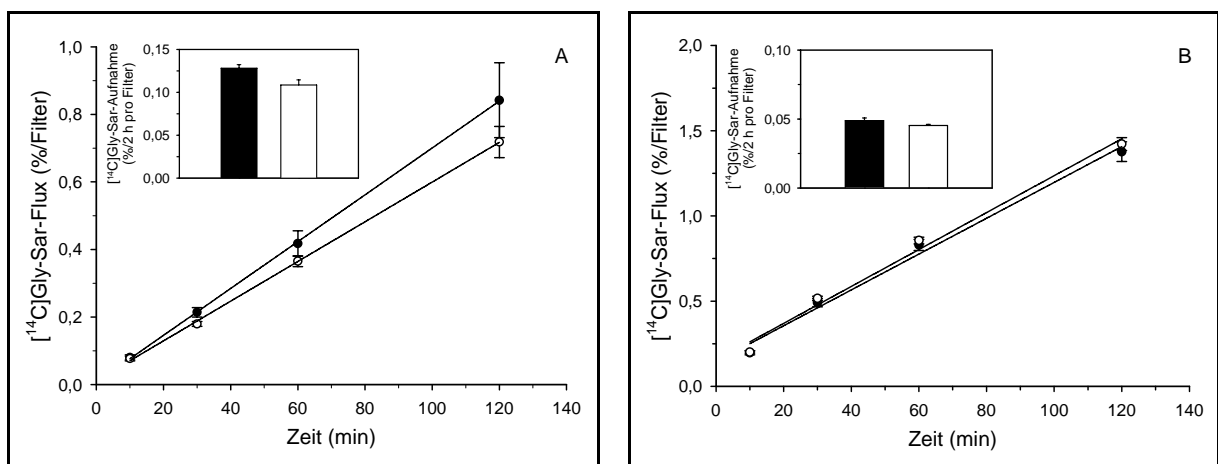


Abb. 17: Einfluss von Alafosfalin auf den $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar-Flux durch Caco-2- (A) und SKPT-Zellmonolayer (B), gemessen von der basolateralen zur apikalen Seite.

Der transepitheliale Flux von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar ($10\ \mu\text{M}$) wurde in der Abwesenheit (\bullet) bzw. Anwesenheit von 3 mM Alafosfalin (\circ) bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h unter Vorhandensein eines pH-Gradienten gemessen ($\text{pH}_{\text{b-a}} = 7,5:6,0$). **Nebenabb.:** Einfluss von 3 mM Alafosfalin (\square) auf die $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar-Aufnahme ($10\ \mu\text{M}$, \blacksquare Kontrolle) in die Zellmonolayer nach zweistündiger Inkubationszeit ($n = 4 - 6$).

Im Folgenden wurde überprüft, ob Alafosfalin eine inhibierende Wirkung auf die $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar-Aufnahme bzw. den Flux ($10\ \mu\text{M}$) von der basolateralen zur apikalen Seite ($J_{\text{b-a}}$) bei Vorhandensein eines pH-Gradienten ($\text{pH}_{\text{b-a}} = 7,5:6,0$) besitzt (**Abb. 17**). In Caco-2-Zellen betragen die Werte des transepithelialen $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar-Fluxes $J_{\text{b-a}} = 22,9 \pm 0,2\ \text{pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 0,09 \pm 0,001\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) ohne bzw. $J_{\text{b-a}} = 19,3 \pm 0,3\ \text{pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ bei Zusatz von 3 mM

Alafosfalin. Bei den SKPT-Zellen betragen die Nettofluxraten von [^{14}C]Gly-Sar von der basolateralen zur apikalen Seite $J_{b-a} = 35,2 \pm 2,5 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 0,14 \pm 0,009\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) ohne und $J_{b-a} = 37,1 \pm 2,7 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ mit 3 mM Alafosfalin.

Die Aufnahmeraten von [^{14}C]Gly-Sar in die intestinalen Caco-2-Zellen von der basolateralen Seite entsprachen $J_{b-c} = 7,4 \pm 0,2 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,3 \pm 0,001\% / (\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) für die Kontrolle und $J_{b-c} = 6,2 \pm 0,3 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ unter Koinkubation mit 3 mM Alafosfalin. Für die SKPT-Zellen ergab sich eine intrazelluläre [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme durch die basolaterale Membran von $J_{b-c} = 2,8 \pm 0,1 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,01 \pm 0,0004\% / (\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) in Abwesenheit (Kontrollwert) und $J_{b-c} = 2,6 \pm 0,05 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ in Anwesenheit von 3 mM Alafosfalin. Die Ergebnisse zeigen, dass die basolateralen zu apikalen Fluxraten (J_{b-a}) von Gly-Sar bei Caco-2 verglichen mit der umgekehrten Transportrichtung (J_{a-b} , **Abb. 16**) – im Gegensatz zu SKPT – nur etwa ein Fünftel betragen. Der relativ geringe Unterschied zwischen beiden Fluxrichtungen bei den SKPT-Zellen ist höchstwahrscheinlich durch eine geringe Expressionsrate von PEPT2 bedingt. Verglichen mit früheren Studien innerhalb der Arbeitsgruppe, müsste die

Tab. 13: Effekt von Alafosfalin auf den transepithelialen Flux und die intrazelluläre Akkumulation von [^{14}C]Mannitol und [^{14}C]Gly-Sar durch bzw. in Caco-2- und SKPT-Zellmonolayer, gemessen von der apikalen zur basolateralen Seite (J_{a-b}) und vice versa (J_{b-a}).

Der transepitheliale Flux und die intrazelluläre Aufnahme von [^{14}C]Mannitol (10 μM) und von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) wurde in der Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von 3 mM Alafosfalin bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h unter Anwesenheit eines pH-Gradienten gemessen ($\text{pH}_a = 6,0$, $\text{pH}_b = 7,5$; $n = 4 - 5$).

	Caco-2				SKPT			
	Flux		Aufnahme		Flux		Aufnahme	
	$\text{pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$	%	$\text{pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$	%	$\text{pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$	%	$\text{pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$	%
[^{14}C]Mannitol								
<i>J_{a-b}, J_{a-c}</i>								
Kontrolle	11,5 ± 0,8	100	7,3 ± 0,6	100	42,5 ± 1,5	100	7,4 ± 0,4	100
Alafosfalin	11,0 ± 0,8	96	7,0 ± 0,3	96	40,8 ± 2,0	96	7,6 ± 0,5	103
[^{14}C]Gly-Sar								
<i>J_{a-b}, J_{a-c}</i>								
Kontrolle	165,8 ± 5,5	100	135,6 ± 2,7	100	45,1 ± 2,0	100	9,6 ± 1,3	100
Alafosfalin	45,1 ± 0,7	27	36,1 ± 1,0	27	45,7 ± 3,3	101	3,7 ± 0,4	38
<i>J_{b-a}, J_{b-c}</i>								
Kontrolle	22,9 ± 0,2	14	7,4 ± 0,2	5,4	35,2 ± 2,5	78	2,8 ± 0,1	29
Alafosfalin	19,3 ± 0,3	12	6,2 ± 0,3	4,6	37,1 ± 2,7	82	2,6 ± 0,1	27

[¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahmerate (J_{a-b}) wenigstens das Doppelte betragen. Weiterhin konnte die basolaterale Gly-Sar-Aufnahme in beiden Zelllinien nicht durch einen Überschuss an Alafosfalin gehemmt werden. Es gibt daher keinen Hinweis auf eine Interaktion von Alafosfalin mit den mutmaßlichen basolateralen Peptidtransportern. Eine zusammenfassende Darstellung der aus den **Abbildungen 15 - 17** erhaltenen Flux- und Aufnahmewerte ist in **Tabelle 13** gegeben.

3.2.4 Transport von Alafosfalin: Messung des Kurzschlussstromes I_{sc}

Die Hemmung der PEPT1/2-vermittelten Gly-Sar-Aufnahme und des transepithelialen -Fluxes durch Alafosfalin liefert neue, interessante Erkenntnisse zu den strukturellen Erfordernissen potentieller Substrate der betrachteten Transportsysteme. Es wurde gezeigt, dass das Phosphonodipeptid Alafosfalin mit hoher Affinität mit PEPT1/2 von Säugerzellen interagiert. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig einen tatsächlichen Transport in die Zellen. Die Interaktion mit PEPT1 und PEPT2, die Aufnahme von Alafosfalin durch bakterielle Permeasen (NISBET & PAYNE 1982, ATHERTON et al. 1983, GRAPPEL et al. 1985, SMITH & PAYNE 1990) und die bekannte orale Verfügbarkeit von Alafosfalin können lediglich als starkes Indiz auf eine aktive Translokation gewertet werden. Um einen direkten Hinweis auf aktive Transportprozesse zu erhalten, wurden die elektrogenen Eigenschaften der H⁺/Peptidsymporter unter Einfluss von Alafosfalin in der USSING-Kammer untersucht: **Abbildung 18** zeigt den einwärts gerichteten Kurzschlussstrom (I_{sc}) durch Caco-2-Zellmonolayer, kultiviert auf permeablen Snapwell[®]-Polycarbonatmembranen. Der Strom stieg nach der Zugabe von 7 mM Alafosfalin in das apikale (luminale) Kompartiment rapide um $4,3 \pm 0,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($J_{a-b} = 160,4 \pm 11,2 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$), wohingegen der transepitheliale elektrische Widerstand mit $175 \pm 2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ während des Versuches unverändert blieb. Wie erwartet, kam es ebenfalls durch das Dipeptid Gly-Sar (10 mM), jedoch nicht durch die Aminosäure Phenylalanin (10 mM, Negativkontrolle) zu einer Induktion des Stromflusses ($\Delta I_{sc(\text{Gly-Sar})} = 3,4 \pm 0,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $J_{a-b} = 126,9 \pm 7,5 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, **Abb 18: Nebenabb.**). THWAITES und Mitarbeiter (1993b) konnten bei der doppelten Gly-Sar-Ausgangskonzentration (20 mM) einen Kurzschlussstrom ΔI_{sc} von $6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in der USSING-Kammer feststellen. Die äußerst geringen Stromschwankungen bei der Messung mit Phenylalanin ($\Delta I_{sc} = 0,26 \pm 0,14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, **Abb.18: Nebenabb.**) deuten auf eine geringe Instabilität des Meßsystems innerhalb des normalen Bereiches. Als zusätzliche Negativkontrolle kam D-Mannitol zum Einsatz (**ohne Abb.**). Für den indirekten Nachweis des Alafosfalintransportes durch PEPT2 an SKPT-Zellen erwies sich die USSING-Kammertechnik aufgrund der geringen Transportkapazität des Car-

riers erwartungsgemäß als zu insensitiv. Für die Positivkontrolle Gly-Sar konnten daher ebenfalls keine Ionenströme gemessen werden.

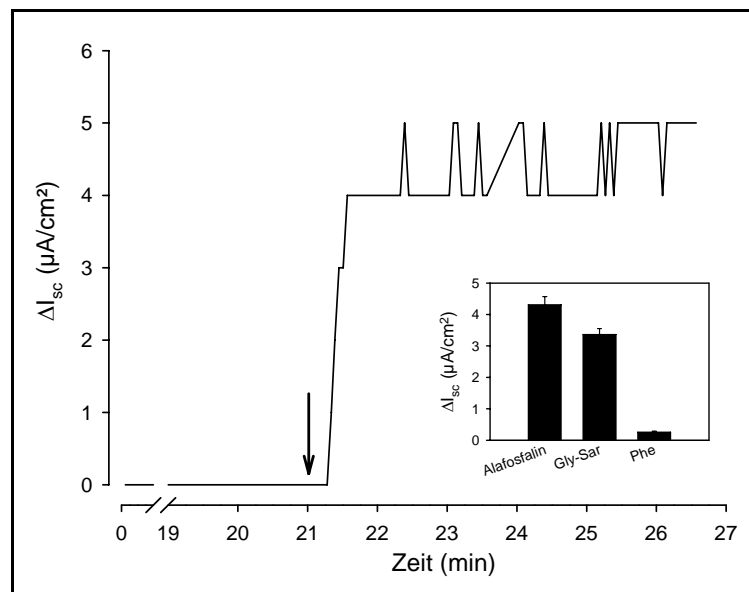


Abb. 18: Stimulativer Effekt von Alafosfalin (7 mM) auf den Kurzschlussstrom durch Caco-2-Zellmonolayer.

Alafosfalin wurde ca. 20 min nach dem Einspannen der Caco-2-Zellen in die USSING-Kammer, welche auf Polycarbonatmembranen von Snapwell®-Einsätzen wuchsen, zugefügt (\downarrow). Die Messungen fanden bei 37°C und einem pH-Wert von 6,0 auf der luminalen Seite und pH 7,5 auf der abluminalen Seite statt. **Nebenabb.:** Totaler Anstieg des Kurzschlussstromes, induziert durch Alafosfalin (7 mM, n = 3), Gly-Sar (10 mM, n = 6) und Phenylalanin (10 mM, n = 3).

Anhand der vorbeschriebenen Untersuchungen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Phosphonodipeptide von den beiden in Säugerzellen vorkommenden H^+ /Peptidsymportern 1/2 mit hoher Affinität erkannt werden. Die Toleranz der Phosphonatgruppe des Alafosfalins am C-terminalen Ende führt im Vergleich zum strukturanalogen Ala-Ala lediglich zu einer geringfügigen Affinitätsniedrigung. Wahrscheinlich wird die Substitution der C-terminalen Carboxylfunktion durch die höhere Elektronendichte der Phosphonatgruppe kompensiert (GEBAUER et al. 2003). Der durch Alafosfalin erzeugte Kurzschlussstrom indiziert den Transport der Substanz durch PEPT1. Die carriervermittelte Translokation des relativ hydrophilen Alafosfalins erklärt möglicherweise die gleichfalls hohe orale Verfügbarkeit strukturanaloger, antibakteriell wirksamer Peptidderivate. Phosphonodipeptide stellen interessante Substrate für Struktur-Affinitätsuntersuchungen an PEPT1 und PEPT2 dar.

Die Ergebnisse sind publiziert (NEUMANN et al. 2004)

3.3 Transport von DP IV-Inhibitoren an Epithelzellen des Darmes

Im Rahmen des dritten Teilabschnittes der Untersuchungen sollte der Transport neuer DP IV-Inhibitoren an Caco-2-Zellen untersucht werden. Primäres Ziel der Studie war die Evaluation der oralen Verfügbarkeit dieser Substanzen.

3.3.1 Einfluss von DP IV-Inhibitoren auf [¹⁴C]Mannitolaufnahme und -flux

Um einen schädigenden Einfluss der in den Experimenten verwendeten DP IV-Inhibitoren (s. **1.3.3: Abb. 4**) – und eventuell einhergehende Veränderungen von Membranfluidität und -integrität – ausschließen zu können, wurden in Petrischälchen kultivierte Caco-2-Zellmonolayer mit 1 mM DP IV-Inhibitor, gelöst in Versuchspuffer mit einem pH-Wert von 7,5, für 2 h bei 37°C vorinkubiert. Im anschließenden Versuch erfolgte eine zehnmünütige Inkubation der Zellen mit [¹⁴C]Mannitol (10 µM) bei Raumtemperatur. Die Quantifizierung der radioaktiven Proben mittels Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollwerten und Zellen, welche mit DP IV-Inhibitoren vorinkubiert waren. Lediglich für das Isoleucincyclohexylketon ergab sich ein signifikanter Unterschied von 9,7% im Vergleich zum Kontrollwert. Die durchschnittliche [¹⁴C]Mannitolaufnahme betrug $0,30 \pm 0,03\% / (10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$ (n = 5) ohne und $0,28 \pm 0,09\% / (10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$ (n = 8) bei zweistündiger Vorinkubation mit 1 mM DP IV-Inhibitoren. Eine zusätzliche Betrachtung der Zellen unter dem Umkehrmikroskop erbrachte keine Unterschiede hinsichtlich der Zellmorphologie zwischen mit DP IV-Inhibitoren vorinkubierten- und Kontrollzellmonolayern ohne Präinkubation.

In einem zweiten Test wurde der Einfluss der DP IV-Inhibitoren (1 mM) auf den [¹⁴C]Mannitolflux (10 µM) durch Caco-2-Zellmonolayer von der apikalen zur basolateralen Seite bei zweistündiger Versuchsdauer, pH 7,5 und einer Temperatur von 37°C untersucht. Dabei konnte ein durchschnittlicher [¹⁴C]Mannitolflux (J_{a-b}) von $0,45 \pm 0,22\% / (\text{h} \cdot \text{Filter})$ für die Kontrollen (n = 4) und von $0,44 \pm 0,07\% / (\text{h} \cdot \text{Filter})$ (n = 8) bei gleichzeitiger Inkubation mit DP IV-Inhibitoren verzeichnet werden. Es wurde kein schädigender Einfluss der DP IV-Inhibitoren auf die Zellmonolayer festgestellt. Ein toxischer Effekt mit einhergehender Zerstörung der Zellen hätte einen massiven Mannitoldurchfluss bis hin zum Equilibrium zur Folge. Die visuelle Kontrolle unter dem Umkehrmikroskop ließ ebenfalls auf eine Unversehrtheit der Zellen schließen.

3.3.2 Transepithelialer Transport von DP IV-Inhibitoren

Im Anschluss an die Messungen zur Zellintegrität und -fluidität wurde der transepitheliale Flux einiger ausgewählter DP IV-Inhibitoren (1 mM, Ile-Thia: 2 mM) durch Caco-2-Zellmonolayer unter annähernd physiologischen Bedingungen bei 37°C sowie pH 6,0 im Donor- und pH 7,5 im Akzeptorkompartiment (**Abb. 19**) bzw. ohne pH-Gradient mit pH 7,5 in beiden Bereichen (**Abb. 20**) untersucht. Auffällig ist der stark erhöhte Flux von DP IV-Inhibitoren beim Fehlen des pH-Gradienten. Da die pK_A-Werte der untersuchten Verbindungen in einem Bereich von 7,08 bis 7,60 liegen, kommt es bei pH 7,5 im Vergleich zu pH 6,0 zu einer starken Erhöhung des unprotonierten Anteils von 2,4 - 9,7% auf 44,3 - 72,2% (**Tabelle 14**), so dass der gesteigerte transepitheliale Transport der untersuchten Substanzen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in der Zunahme der lipophilen Eigenschaften bei pH 7,5 – und damit in einer erhöhten passiven Diffusionsrate – seine Begründung findet. Allerdings ist eine zusätzliche passive Permeation von DP IV-Inhibitoren bei vorhandener Nettoladung durch die Phosphatidylcholinbilayer aufgrund anderweitiger diesbezüglich positiver Befunde nicht auszuschließen (PALM et al. 1999). Die hohen Fluxraten unter beiden pH-Bedingungen lassen auf eine gute orale Verfügbarkeit der untersuchten DP IV-Inhibitoren schließen.

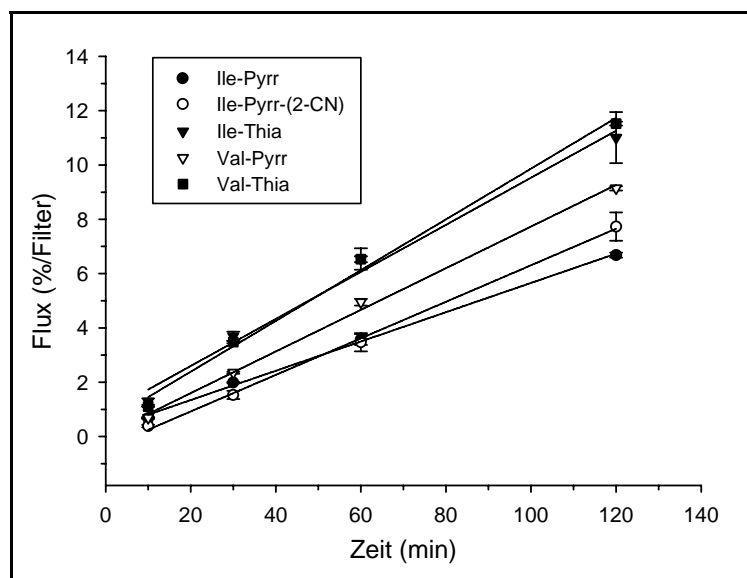


Abb. 19: Flux von DP IV-Inhibitoren durch Caco-2-Zellmonolayer in Anwesenheit eines pH-Gradienten, gemessen von der apikalen zur basolateralen Seite.

Der transepitheliale Transport wurde nach apikaler Zugabe von DP IV-Inhibitoren (1 mM, Ile-Thia: 2 mM), gelöst in Versuchspuffer, über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C unter Anwesenheit eines pH-Gradienten gemessen ($\text{pH}_{\text{a-b}} = 6,0:7,5$) ($n = 3 - 9$). Die Analytik erfolgte mittels HPLC-MS durch ANTJE MEYER (Probiodrug AG).

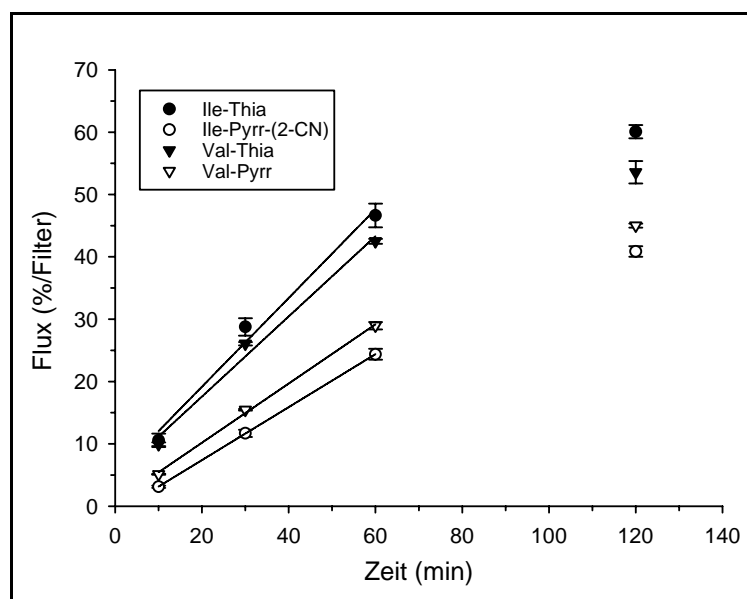


Abb. 20: Flux von DP IV-Inhibitoren durch Caco-2-Zellmonolayer in Abwesenheit eines pH-Gradienten, gemessen von der apikalen zur basolateralen Seite.

Der transepitheliale Transport wurde nach apikaler Zugabe von DP IV-Inhibitoren (1 mM, Ile-Thia: 2 mM), gelöst in Versuchspuffer, über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C unter Abwesenheit eines pH-Gradienten gemessen ($\text{pH}_{\text{a-b}} = 7,5:7,5$) ($n = 3 - 6$). Die Analytik erfolgte mittels HPLC-MS durch ANTJE MEYER (Probiodrug AG).

Tab. 14.: Protonierungsgrad von DP IV-Inhibitoren in Abhängigkeit vom pH-Wert.

DP IV-Inhibitor	pK _A -Wert ^a	Protonierungsgrad (%)	
		pH 6,0	pH 7,5
Ile-Pyrr	7,60	97,6	55,7
Ile-Pyrr-(2-CN)	7,08	92,3	27,6
Ile-Thia	7,43	96,4	46,0
Val-Pyrr	7,66	97,9	59,1
Val-Thia	7,36	95,8	42,0

^a mit freundlicher Genehmigung der Probiodrug AG

Eine Zusammenfassung der mittels linearer Regression berechneten Stundenwerte des transepithelialen Fluxes der DP IV-Inhibitoren findet sich in **Tabelle 15**. Dabei tendieren die Aminoacylthiazolidverbindungen unter adäquaten Versuchsbedingungen bei pH 6,0 im Vergleich zu den jeweiligen Aminoacylpyrrolidverbindungen zu leicht erhöhten Transportraten ($p < 0,05$). Insgesamt wiesen die Fluxmessungen bei Vorhandensein eines pH-Gradienten – möglicherweise bedingt durch den Einfluss des Protonierungsgrades – annähernd gleiche Werte zwischen 13 und 18 nmol/(cm² · h) auf. Bei den transepithelialen Fluxversuchen ohne Protonengradient tendieren die Aminoacylthiazolidide im Vergleich zu den jeweiligen -pyrrolididen ebenfalls zu höheren Transportraten (**Tabelle 15**).

Tab. 15: Transepithelialer Flux von DP IV-Inhibitoren in An-/Abwesenheit eines pH-Gradienten.

Der transepitheliale Transport von DP IV-Inhibitoren (1 mM, Ile-Thia: 2 mM) wurde bei 37°C von der apikalen zur basolateralen Seite durch konfluente Monolayer der Zelllinie Caco-2 unter An-/Abwesenheit eines pH-Gradienten gemessen. Die Berechnung der Werte erfolgte mittels linearer Regression, bei den Versuchen ohne pH-Gradient aufgrund der auftretenden Sättigung unter Ausschluss des 2-h-Wertes (n = 3 - 9). Die Analytik erfolgte mittels HPLC-MS durch ANTJE MEYER (Probiodrug AG).

DP IV-Inhibitor	Flux			
	mit pH-Gradient (pH _{a-b} = 6,0:7,5)		ohne pH-Gradient (pH _{a-b} = 7,5:7,5)	
<i>J</i> _{a-b}	nmol/(cm ² · h)	%/(cm ² · h)	nmol/(cm ² · h)	%/(cm ² · h)
Ile-Pyrr	13,0 ± 0,4	0,72 ± 0,02	n. b.	n. b.
Ile-Pyrr-(2-CN)	13,3 ± 0,4	0,89 ± 0,03	56,1 ± 0,2	5,64 ± 0,02
Ile-Thia	33,3 ± 2,3 (16,7 ± 1,2) ^{a, b}	1,15 ± 0,08	287,2 ± 34,8 (143,6 ± 17,4) ^{a, b}	9,45 ± 1,14
Val-Pyrr	14,4 ± 0,5	1,02 ± 0,04	89,9 ± 3,5	6,30 ± 0,24
Val-Thia	18,0 ± 1,0 ^a	1,24 ± 0,07	137,8 ± 15,1 ^a	8,53 ± 0,94

^a signifikant verschieden von der zugehörigen Pyrrolididverbindung

^b () - hypothetische Fluxrate von Ile-Thia bei c₀ = 1 mM

In einem weiteren Versuch wurde der Flux von 1 mM Ile-Pyrr-(2-CN) in beiden Transportrichtungen untersucht (**Abb. 21**). Der apikale zu basolaterale transepitheliale Transport (*J*_{a-b}) betrug 56,1 ± 0,2 nmol/(cm² · h) (= 5,6 ± 0,2%/(cm² · h)) bei pH 7,5 ohne bzw. 12,5 ± 0,3 nmol/(cm² · h) (= 0,86 ± 0,02%/(cm² · h)) mit pH-Gradient (pH_{a-b} = 6,0:7,5). Der basolaterale zu apikale Flux (*J*_{b-a}) bei Vorhandensein des pH-Gradienten betrug 112,9 ± 1,1 nmol/(cm² · h) (= 6,9 ± 0,1%/(cm² · h)), wobei es unter Berücksichtigung der Molaritäten nach etwa 2 h zu einer starken Aufkonzentrierung im oberen Akzeptorkompartiment um ca. 66% kam. Ile-Pyrr-(2-CN) ist daher möglicherweise ein Substrat von apikal lokalisierten, für die Ausschleusung von Xenobiotika verantwortlichen Effluxpumpen, beispielsweise des P-Glykoproteins mit einem sehr hohen Substratspektrum (P-gp, CHAN et al. 2004), des MRP2 (multidrug resistance-associated protein, TSUJI 2002) bzw. des „Halbtransporters“ BCRP (breast cancer resistance protein, TAIPALENSUU et al. 2001, XIA et al. 2005). Alle drei zur Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette) gehörenden Proteine wurden bereits in der Bürstensaummembran menschlicher Darmepithelzellen nachgewiesen.

Die intrazellulären Aufnahmeleistungen von Ile-Pyrr-(2-CN) während des Fluxexperimentes widerspiegeln die Verhältnisse des transepithelialen Transportes (**Abb. 21: Nebenabb.**). Sie betragen bei der apikalen intrazellulären Aufnahme *J*_{a-c} = 0,60 ± 0,01 nmol/(cm² · 2 h) (= 0,06 ± 0,001%/(cm² · 2 h)) unter Abwesenheit bzw. *J*_{a-c} = 0,21 ± 0,11 nmol/(cm² · 2 h)

(= $0,02 \pm 0,002\% / (\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) bei Anwesenheit eines Protonengradienten. Die intrazelluläre Aufnahme durch die Basalmembran bei pH 7,5 betrug $J_{b-c} = 0,75 \pm 0,005 \text{ nmol} / (\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ (= $0,05 \pm 0,0003\% / (\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$).

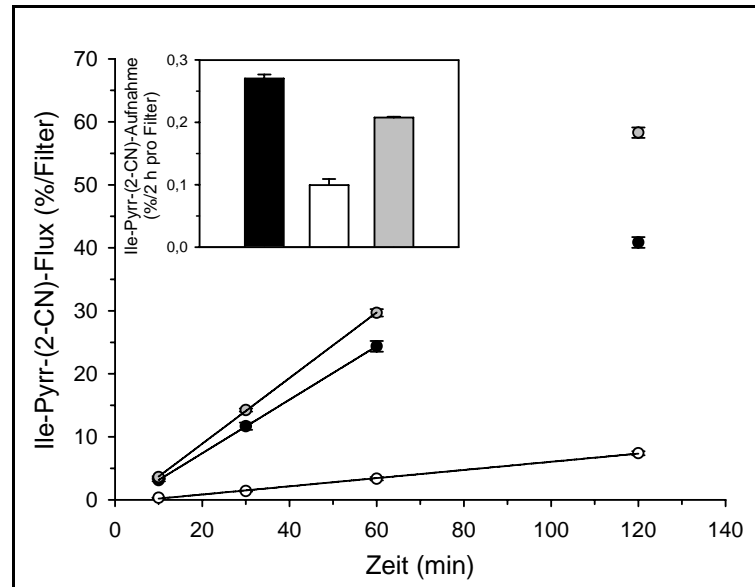


Abb. 21: Flux von Ile-Pyrr-(2-CN) durch Caco-2-Zellmonolayer in Abhängigkeit von pH-Wert und Transportrichtung.

Der transepitheliale Transport von 1 mM Ile-Pyrr-(2-CN) durch Caco-2-Zellmonolayer wurde bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h gemessen (n = 3). **Nebenabb.:** Aufnahme von Ile-Pyrr-(2-CN) nach zweistündiger Inkubationszeit. Versuchsbedingungen: ●, ■ - J_{a-b} , pH_{a,b} = 7,5:7,5; ○, □ - J_{a-b} , pH_{a,b} = 6,0:7,5; ●, ■ - J_{b-a} , pH_{a,b} = 6,0:7,5. Die Analytik erfolgte mittels HPLC-MS durch ANTJE MEYER (Probiodrug AG).

Der Anteil des Effluxes nach apikaler Zugabe von Ile-Pyrr-(2-CN) könnte durch den Einsatz von Inhibitoren – im Falle des P-gp bereits in der klinischen Anwendung – geklärt werden (THOMAS & COLEY 2003). Die Caco-2-Zellen weisen als *in-vitro*-Modell des humanen Jejunums zwar eine gute Übereinstimmung bezüglich der ABC-Transporterexpression im Vergleich zu normalem menschlichen jejunalem Gewebe auf (TAIPALENSUU et al. 2001), eine Vergleichbarkeit von *in-vitro*- mit *in-vivo*-Daten ist allerdings nur begrenzt möglich (KIM et al. 1999). Weitere Transportuntersuchungen an Caco-2-Zellen unter Verwendung von herkömmlicher, im Zellkulturversuch angewandter physiologischer Salzpufferlösung bzw. humaner intestinaler Flüssigkeit ergaben eine stärkere P-gp-Aktivität beim Einsatz der Salzlösung (DEFERME et al. 2003). Außerdem spielt der Resorptionsort des Arzneimittels eine entscheidende Rolle. Analysen am humanen Dünndarm ergaben eine Zunahme der P-gp-Konzentration von den proximalen zu den distalen Regionen (MOULY & PAINE 2003). Zusätzlich existieren interindividuelle Unterschiede in der quantitativen P-gp-Expression bedingt

durch funktionelle Polymorphismen des MDR1-Gens (multidrug-resistance gene 1, HOFFMEYER et al. 2000, ISHIKAWA et al. 2004). Veränderte P-gp-Konzentrationen wurden aber auch nach Exposition mit bestimmten Nahrungsmittelbestandteilen und arzneilichen Wirk- bzw. Hilfsstoffen beobachtet (DEFERME & AUGUSTIJS 2003, LI et al. 2003, SUN et al. 2004). Dies kann zu erheblichen Auswirkungen auf die Medikation bei bestehender geringer therapeutischer Breite führen, wie z. B. während der Digoxinverabreichung zur Behandlung von Herzinsuffizienz (GREINER et al. 1999).

Aufgrund der hohen Rate bestehender Arzneimittelresistenzen im Zusammenhang mit ABC-Transportern (LEONARD et al. 2003) wäre die Klärung einer eventuellen Substratzugehörigkeit von DP IV-Inhibitoren während des ersten Screenings im Zellkulturversuch sinnvoll. Die gleichzeitige orale Verabreichung von P-gp-Blockern kann bei Dauermedikamentierung nicht in Betracht gezogen werden. Weiterhin gilt zu bedenken, dass es sich bei ca. der Hälfte aller gegenwärtig beschriebenen Arzneimittel um Substrate des Stoffwechsellzyms Cytochrom P450 (CYP) – insbesondere der Isoform CYP3A4 – handelt, deren Stoffwechselprodukte wiederum Substrate des P-gp darstellen (THUMMEL & WILKINSON 1998, KEPPLER et al. 1999).

3.3.3 Affinität von DP IV-Inhibitoren zu PEPT1

Aufgrund früherer Affinitätstests von BRANDSCH et al. (1999) an PEPT1 mit Aminoacylthiazolididen und -pyrrolididen kam es zu der Annahme, dass neben der bereits erwiesenen hohen Diffusionsrate für die DP IV-Inhibitoren ebenfalls aktive Transportprozesse - zumindest für die intestinale Absorption bestimmter Aminoacylthiazolidide - von Bedeutung sein könnten.

Aus diesem Grund wurde die Interaktion der DP IV-Inhibitoren mit dem intestinalen protonenabhängigen, hochkapazitären Peptidtransporter PEPT1 unter Verdrängung des Dipeptids [¹⁴C]Gly-Sar (10 µM) durch die Testsubstanzen in ansteigenden Konzentrationen (0 - 31,6 mM, allo-Ile-Thia & Ile-cyclohexylketon: 0 - 10 mM) ermittelt (**Abb. 22**). Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur, einem pH-Wert von 6,0 und einer Inkubationsdauer von 10 min durchgeführt. Die IC₅₀-Werte wurden mittels nicht-linearer Regression unter Berücksichtigung von passivem Transport und unspezifischer Bindung bestimmt. Der passive Anteil der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme schwankte, vermutlich je nach Ausbildungsintensität der Bürstensaummembran der Caco-2-Zellen, zwischen 9 - 21%. Die Berechnung der zugehörigen K_i-Werte erfolgte unter Verwendung des K_t-Wertes von Gly-Sar mit 0,83 mM, gemessen an PEPT1 von Caco-2-Zellen (K_t-Wert: BRANDSCH et al. 1999).

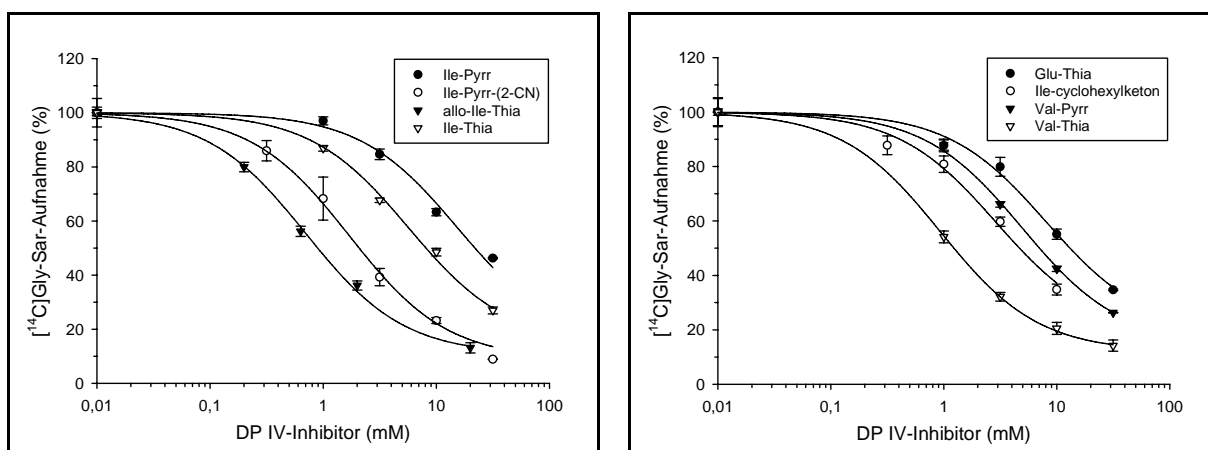


Abb. 22: Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme in Caco-2-Zellen.

Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar (10 μM) in konfluente Zellmonolayer wurde unter Zusatz ansteigender Konzentrationen unmarkierter DP IV-Inhibitoren (0 - 31,6 mM, Ile-cyclohexylketon & allo-Ile-Thia: 0 - 10 mM) bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 6,0 nach zehnmütiger Inkubationszeit gemessen (n = 3 - 9). Die in Abwesenheit von DP IV-Inhibitoren ermittelte Aufnahmegeschwindigkeit von [¹⁴C]Gly-Sar mit $v = 301,9 \pm 14,2$ pmol/(10 min · mg Protein) entspricht dem 100%-Wert (n = 10).

Tab. 16: Inhibitionskonstanten K_i verschiedener DP IV-Inhibitoren bezüglich PEPT1 an Caco-2-Zellen

Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar (10 μM) in konfluente Monolayer der Zelllinie Caco-2 wurde bei Raumtemperatur und pH 6,0 unter Zusatz unmarkierter DP IV-Inhibitoren in ansteigenden Konzentrationen (0 - 31,6 mM, Ile-cyclohexylketon & allo-Ile-Thia: 0 - 10 mM) nach zehnmütiger Inkubationszeit gemessen. Die Inhibitionskonstanten wurden aus den IC_{50} -Werten (erhalten aus den Verdrängungskurven mittels nicht-linearer Regression, s. **Abb. 22**) bestimmt (n = 3 - 9).

DP IV-Inhibitor	K_i -Wert
	<i>mM</i>
Glu-Thia	$8,0 \pm 0,6$
Ile-cyclohexylketon	$2,9 \pm 0,3$
Ile-Pyrr	$15,3 \pm 1,3$
Ile-Pyrr-(2-CN)	$1,7 \pm 0,1$
allo-Ile-Thia	$0,70 \pm 0,03$
Ile-Thia	$5,6 \pm 0,3$
Val-Pyrr	$4,9 \pm 0,2$
Val-Thia	$0,92 \pm 0,02$

Anhand der in **Tabelle 16** aufgelisteten Hemmkonstanten (K_i) ist ersichtlich, dass alle untersuchten DP IV-Inhibitoren – außer Ile-Pyrr – mittlere bis niedrige Affinitäten aufwiesen. Dabei besitzen die untersuchten Aminoacylthiazolidid-Verbindungen Val-Thia und Ile-Thia im Vergleich zu den entsprechenden Aminoacylpyrrolididen eine drei- bis fünffach höhere Affi-

nität zum intestinalen H⁺/Peptid-Kotransporter PEPT1. Eine ähnliche Korrelation ergab sich für Aminoacylthiazolidid- und -pyrrolididverbindungen bei früheren Untersuchungen von BRANDSCH und Mitarbeitern (1999) bzw. von SCHLENZIG (2001), welches wahrscheinlich mit einer erhöhten Hydrophobizität und gesteigerten Elektronendichte durch Einbau des Schwefels in den Pyrrolidinring in Verbindung steht. So begründeten GEBAUER et al. (2003) in Auswertung ihrer 3D-QSAR-Studien die hohen bis mittleren Affinitäten der Alanylarylamide mit der Existenz aromatischer Gruppen am C-Terminus, deren hohe Elektronendichte die Substitution der Carboxylgruppe kompensierte.

Von den untersuchten DP IV-Inhibitoren ergab sich für Val-Thia die höchste Affinität mit einem K_i -Wert von $0,92 \pm 0,02$ mM, ähnlich dem Referenzsubstrat Gly-Sar. Der Austausch des Valylrestes durch einen Isoleucylrest führte dagegen bei den Thiazolididen zu einer sechsfachen Verschlechterung der Affinität ($K_i = 5,6 \pm 0,3$ mM), bei den Pyrrolididen betrug sie das Dreifache ($K_i = 4,9 \pm 0,2$ mM bzw. $K_i = 15,3 \pm 1,3$ mM). Die Unterschiede in den Affinitäten zwischen den jeweiligen Thiazolidid- bzw. Pyrrolididverbindungen werden möglicherweise durch ein unterschiedliches cis-/trans-Verhältnis (E/Z-Isomere) verursacht. Nach Untersuchungen von BRANDSCH et al. (1998, 1999) wird lediglich die trans-Konformation bei Dipeptiden bzw. deren Analoga durch PEPT1 erkannt. Weiterhin kam es bei den Aminoacylthiazolididen durch Substitution von hydrophoben- (Val-, Ile-) durch einen hydrophileren Glutamat-Rest zu einer weiteren Affinitätssenkung gegenüber PEPT1. Dies korreliert mit Resultaten von Kompetitionsstudien an PEPT1-transfizierten Zellen der Hefe *Pichia pastoris* (FOLTZ et al. 2004), wobei die Werte für Val-Thia ($K_i = 0,1 \pm 0,01$ mM), Ile-Thia ($K_i = 0,51 \pm 0,2$ mM) und Glu-Thia ($K_i = 1,17 \pm 0,12$ mM) im Vergleich zur homologen Expression in Caco-2 in einem ähnlichen Affinitätsverhältnis stehen (**Tabelle 16**). Der K_i -Wert für Ile-Thia von 5,6 mM (**Tabelle 16**) wird durch Messungen von Brandsch et al. (1999) mit $K_i = 6,3$ mM in seiner Größenordnung bestätigt. Bemerkenswert ist die achtfach erhöhte Affinität von allo-Ile-Thia ($K_i = 0,70 \pm 0,03$ mM) gegenüber seinem Diastereomer Ile-Thia (threo-Form, **Tabelle 16**). Die Affinität des Ile-cyclohexylketons ($K_i = 2,9 \pm 0,3$ mM) ist im Vergleich zum Ile-Thia (threo-Form) auf das Doppelte erhöht.

Zusammenfassend betrachtet, hätten die sich um das Drei- bis Fünffache unterscheidenden Affinitätskonstanten des jeweiligen Aminoacylthiazolidids von dem entsprechenden -pyrrolidid größere Differenzen der transepithelialen Transportraten erwarten lassen, bei denen nur eine leichte Abhängigkeit zu verzeichnen war (**Tabelle 15**).

Die Modifizierung von Ile-Pyrr zu Ile-Pyrr-(2-CN) durch Einführung einer Cyanogruppe am zweiten Kohlenstoffatom des Pyrrolidinringes bewirkte eine Affinitätssteigerung auf das

Neunfache. Bemerkenswert sind dabei die indifferenten Transportraten von Ile-Pyrr mit $13,0 \pm 0,4$ nmol/(cm² · h) und Ile-Pyrr-(2-CN) mit $13,3 \pm 0,4$ nmol/(cm² · h) bei pH 6,0 trotz der erheblichen Affinitätsunterschiede von $K_i = 15,3$ mM für Ile-Pyrr bzw. $K_i = 1,7$ mM für Ile-Pyrr-(2-CN) (vgl. **Tabelle 15 & 16**).

Die Überprüfung der Hemmkonstanten (K_i) von Ile-Pyrr-(2-CN) erfolgte durch die Messung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme (20 μM) bei zwei verschiedenen Gly-Sar-Gesamtkonzentrationen (50 μM und 500 μM) und ansteigenden Konzentrationen von Ile-Pyrr-(2-CN) (0 - 10 mM). Die Ergebnisse sind als DIXON-Plot in der eingeschobenen Darstellung von **Abbildung 23** gezeigt. Wie für einen kompetitiven Inhibitor erwartet, verlaufen beide Punktescharen linear und schneiden sich im 4. Quadranten der Auftragungsebene. Die Hemmung der PEPT1-vermittelten Gly-Sar-Aufnahme in die Caco-2-Zellmonolayer durch Ile-Pyrr-(2-CN) ist folglich kompetitiver Natur. Aus dem Verlauf beider Geraden konnte mittels linearer Regression für das Ile-cyanopyrrolidid eine Hemmkonstante von $K_i = 1,6$ mM berechnet werden und bestätigt damit das Ergebnis des vorherigen Affinitätstests (s. **Tabelle 16**) mit einem K_i -Wert von 1,7 mM.

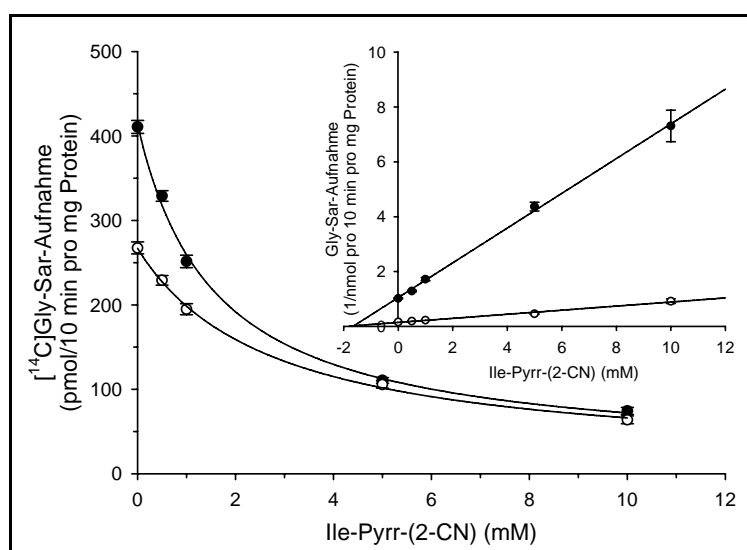


Abb. 23: Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar in Anwesenheit des DP IV-Inhibitors Ile-Pyrr-(2-CN).

Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar (20 μM) in konfluente Zellmonolayer wurde bei einer Gly-Sar-Gesamtkonzentration von 50 μM (●) bzw. 500 μM (○) unter Koinkubation mit unmarkiertem Ile-Pyrr-(2-CN) in ansteigender Konzentration (0 - 10 mM) bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach zehnmütiger Inkubationszeit gemessen. **Nebenabb.:** Bestimmung der Hemmkonstante mittels DIXON-Plot. Die passive Transportrate von 4,5% wurde von der Gesamtaufnahme zur Berechnung der carriervermittelten Aufnahme abgezogen (n = 4).

Abbildung 24 zeigt die Hemmung von [^{14}C]Ile-Thia ($1,73\ \mu\text{M}$) durch unmarkiertes Ile-Thia in ansteigender Konzentration (0 - 30 mM) bei Raumtemperatur nach einer Inkubationszeit von 10 min. Daraus wird ersichtlich, dass die Ile-Thia-Moleküle untereinander kompetitiv am

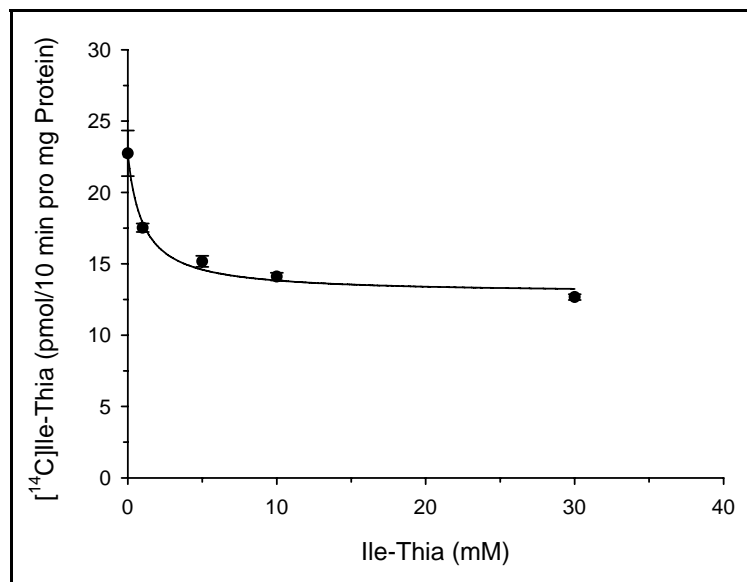


Abb. 24: Bestimmung der kinetischen Parameter von Ile-Thia.

Die Aufnahme von [^{14}C]Ile-Thia ($1,73\ \mu\text{M}$) wurde bei einer totalen Ile-Thia-Konzentration von $0,002 - 30,002\ \text{mM}$ bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach zehnmütiger Inkubationszeit gemessen ($n = 3$).

Transportsystem interagieren. Der aus passivem Transport und unspezifischer Bindung bestehende Anteil erscheint in Anbetracht des Kurvenverlaufes sehr hoch zu sein, konnte jedoch mangels radioaktiv markierten Ile-Thiazolidids leider nicht überprüft werden. Aus dem gleichen Grund musste auf eine genaue K_T -Wert-Bestimmung verzichtet werden. Nach Interpretation der Daten aus **Abbildung 24** wird jedoch eine Diffusion/unspezifische Bindung von ca. 50% der totalen Ile-Thia-Aufnahme angenommen. Die Auswertung des Kurvenverlaufes ergab für Ile-Thia einen K_T -Wert von $1,03 \pm 0,36\ \text{mM}$. Die maximale Aufnahme von [^{14}C]Ile-Thia in Abwesenheit unmarkierter Substanz betrug $v = 10,1 \pm 3,7\ \text{pmol}/(10\ \text{min} \cdot \text{mg Protein})$, die kalkulierte passive Transport-/Bindungsrate entsprach $12,9 \pm 0,6\ \text{pmol}/(10\ \text{min} \cdot \text{mg Protein})$.

3.3.4 Charakterisierung des transepithelialen Transports von Ile-Thia

Nach Überprüfung der Affinitäten der DP IV-Inhibitoren zu PEPT1 erfolgte die Untersuchung des transepithelialen Fluxes von Ile-Thia bei verschiedenen pH- und Temperaturverhältnissen. **Abbildung 25A** zeigt den Flux von Ile-Thia ($2\ \text{mM}$) durch Caco-2-Zellmonolayer ohne pH-Gradient ($J_{a-b} = 7,5:7,5$) bei 37°C bzw. 4°C sowie bei Vorhandensein eines zelleinwärts ge-

richteten pH-Gradienten ($J_{a-b} = 6,0:7,5$) bei 37°C . Die Aufnahme der Substanz nach zwei-stündiger Inkubationszeit unter den zuvor genannten Versuchsbedingungen ist in **Abbildung 25B** dargestellt:

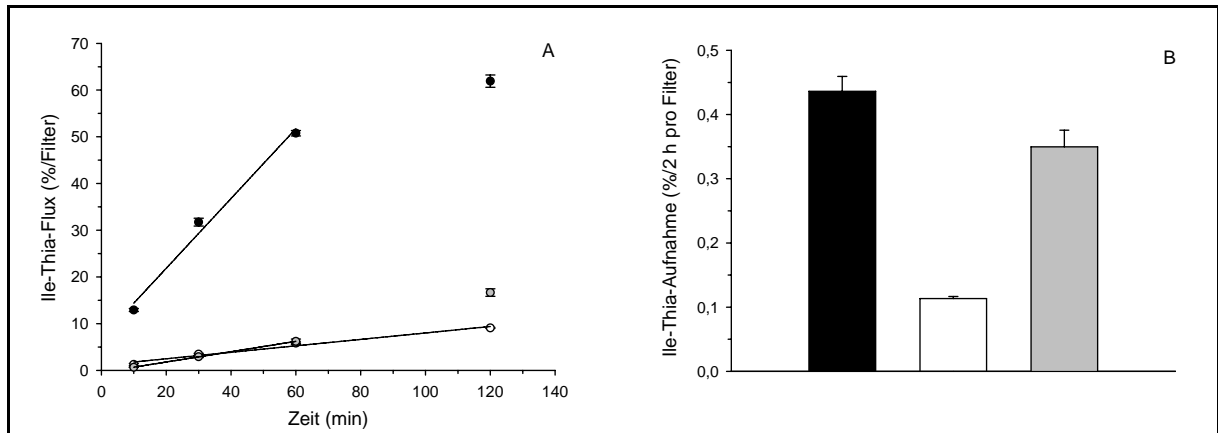


Abb. 25: Flux (A) und Aufnahme (B) von Ile-Thia durch bzw. in Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur, gemessen von der apikalen zur basolateralen Seite.

Der transepitheliale Transport (A) durch Caco-2-Zellmonolayer wurde nach apikaler Zugabe von 2 mM Ile-Thia über einen Zeitraum von 2 h gemessen ($n = 3$). (B) Aufnahme von Ile-Thia nach zwei-stündiger Inkubationszeit. Versuchsbedingungen: ●, ■ - 37°C , $\text{pH}_{a-b} = 7,5:7,5$; ○, □ - 37°C , $\text{pH}_{a-b} = 6,0:7,5$; ●, ■ - 4°C , $\text{pH}_{a-b} = 7,5:7,5$. Die Analytik erfolgte mittels HPLC-MS durch ANTJE MEYER (Probiobio AG).

Nach den bisherigen Erkenntnissen früherer Untersuchungen sowie aus dieser Studie wirkt PEPT1 als alleiniges Transportsystem an der aktiven Aufnahme der untersuchten DP IV-Inhibitoren an der apikalen Membran. PEPT1 ist protonenabhängig und arbeitet bei einem pH-Optimum von 6,0 mit maximaler Transportgeschwindigkeit. Die bei pH 6,0 gemessenen Werte von $24,4 \pm 2,6 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 0,92 \pm 0,10\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) könnten demnach der maximalen Transportkapazität bei einer Ausgangskonzentration von 1 mM inklusive eines aus passiver Diffusion und unspezifischer Bindung an die äußere Membran bestehenden Anteils entsprechen. Der Transport von Ile-Thia beim Fehlen eines pH-Gradienten bei pH 7,5 und einer Temperatur von 37°C betrug $274,6 \pm 30,8 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 9,9 \pm 1,1\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$). Dabei kommt es nach etwa 1 h zu einem Konzentrationsausgleich zwischen dem oberen und dem unteren Kompartiment der Transwell[®]-Kammer. Der das Equilibrium etwas übersteigende Nettoflux von $62\% / (\text{Filter} \cdot 2 \text{ h})$ erklärt sich durch den Verdünnungseffekt beim Auffüllen der Probeentnahmen mit Versuchspuffer gleicher Volumina. Ile-Thia ist bei pH 7,5 bezüglich seiner hohen Permeationsrate durch die Zellmonolayer mit dem Referenzsubstrat Testosteron vergleichbar. Zur Überprüfung des passiven Transportes wurde ein weiterer Versuch ohne pH-Gradient ($J_{a-b} = 7,5:7,5$) bei 4°C durchgeführt. Die niedrige Versuchstemperatur sollte ein

Ausschalten jeglicher aktiver Transportprozesse bewirken. Der Flux von $J_{a-b} = 43,9 \pm 0,8 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 1,47 \pm 0,003\%/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) entsprach dabei in etwa der doppelten Transportmenge des Versuches mit pH-Gradient ($J_{a-b} = 6,0:7,5$) bei 37°C . Die transepithelialen elektrischen Widerstände der Caco-2-Zellmonolayer zu Versuchsbeginn bei 37°C sowie bei 4°C betragen $\text{TEER} = 691 \pm 19 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bzw. $\text{TEER} = 2259 \pm 21 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die beachtliche Steigerung um ca. $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei 4°C wird hauptsächlich durch die mit der Temperaturerniedrigung einhergehende Verringerung der Membranfluidität hervorgerufen, welche wiederum zu einer verminderten passiven Diffusion von Ile-Thia durch den Caco-2-Zellmonolayer geführt haben könnte. Kontrollmessungen 15 min vor Versuchsende ergaben erniedrigte Widerstände von $\text{TEER} = 455 \pm 42 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei 37°C und von $\text{TEER} = 1799 \pm 82 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei 4°C . Die im Vergleich zum Versuchsbeginn generell leicht erniedrigten Widerstände bei der üblicherweise verwendeten Versuchstemperatur von 37°C sind u. a. auf die verzögerte Auswaschung von Mediumresten (inklusive des enthaltenen Serums) zurückzuführen.

Im Falle des Kälteversuches muss von einem schädigenden Einfluss der Temperatur auf die Zellen ausgegangen werden, da nach zweistündiger Versuchszeit ein geringfügig erhöhter transepithelialer Flux gemessen wurde. Dieser Einzelwert fand daher keinen Einbezug bei der Kalkulation des Nettotransportes. Bei Betrachtung der intrazellulären Aufnahme von Ile-Thia nach zweistündiger Inkubationszeit unter Abwesenheit eines pH-Gradienten bei pH 7,5 ergaben sich Transportraten von $J_{a-c} = 2,31 \pm 0,17 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,08 \pm 0,01\%/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) bei 4°C und $J_{a-c} = 2,67 \pm 0,14 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,1 \pm 0,01\%/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) bei 37°C (**Abb. 25B**). Die resultierende Differenz von $0,36 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ bei gleichen pH-Verhältnissen könnte der aktiven Ile-Thia-Aufnahme (2 mM) bei 37°C entsprechen. Das Vorhandensein eines pH-Gradienten reduziert die Ile-Thia-Aufnahme bei 37°C um 74,9% auf $0,67 \pm 0,02 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,03 \pm 0,001\%/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$). In diesem Fall wurde die passive Transportkomponente bei 4°C nicht bestimmt.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von 10 mM Ile-Thia auf den [^{14}C]Gly-Sar-Flux (10 μM) bei Vorhandensein eines Protonengradienten untersucht (**Abb. 26**). Dabei kam es zu einer Reduktion des Kontrollwertes um 36,9% von $J_{a-b} = 59,1 \pm 3,8 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 1,76 \pm 0,11\%/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) auf $J_{a-b} = 37,3 \pm 2,1 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 1,11 \pm 0,06\%/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) bei Koinkubation mit dem DP IV-Inhibitor. Die intrazelluläre [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme (J_{a-c}) verringerte sich nach zweistündiger Koinkubation mit 10 mM Ile-Thia um 48,9% von einem durchschnittlichen Kontrollwert von $37,6 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 1,12\%/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$; $n = 2$) auf $15,4 \pm 0,5 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,46 \pm 0,01\%/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$, $n = 3$).

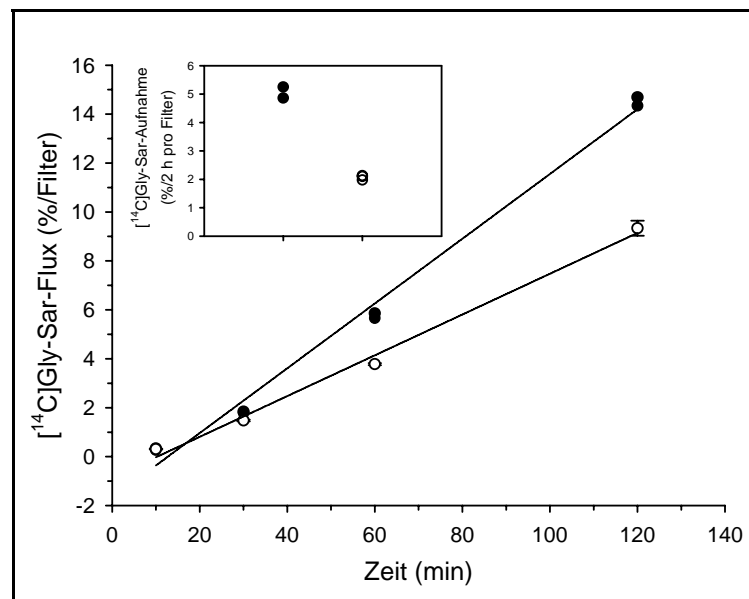


Abb. 26: Einfluss von 10 mM Ile-Thia auf Flux und Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar (10 μM), gemessen an Caco-2-Zellmonolayern von der apikalen zur basolateralen Seite.

Der transepitheliale Transport J_{a-b} von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar (10 μM , Kontrolle: ●, $n = 2$) wurde nach Zugabe von 10 mM Ile-Thia (○, $n = 3$) durch konfluente Zellmonolayer bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h unter Vorhandensein eines pH-Gradienten gemessen ($\text{pH}_{a-b} = 6,0:7,5$). **Nebenabb.:** Intrazelluläre Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar ohne (Kontrolle: ●) bzw. mit 10 mM Ile-Thia (○) nach zweistündiger Inkubationszeit.

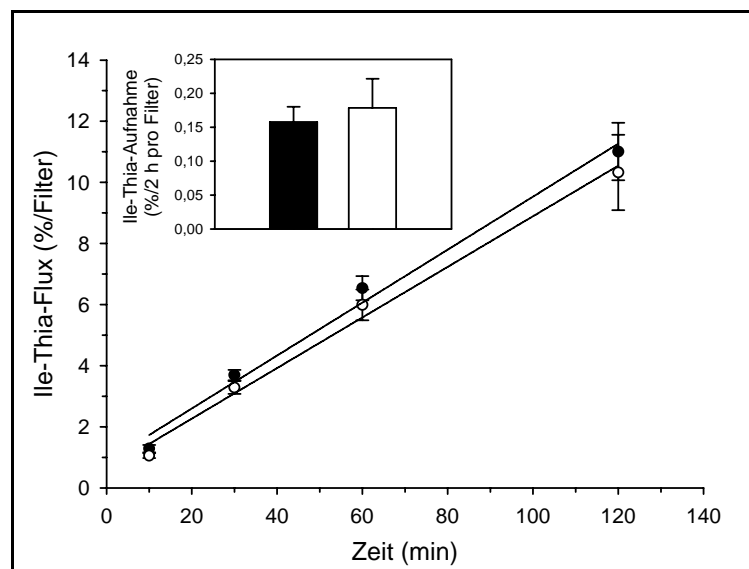


Abb. 27: Einfluss von 10 mM Gly-Sar auf Flux und Aufnahme von Ile-Thia (2 mM), gemessen an Caco-2-Zellmonolayern von der apikalen zur basolateralen Seite.

Der transepitheliale Transport J_{a-b} von Ile-Thia (2 mM, Kontrolle: ●) wurde nach Zusatz von 10 mM Gly-Sar (○) durch konfluente Zellmonolayer bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h unter Anwesenheit eines pH-Gradienten gemessen ($\text{pH}_{a-b} = 6,0:7,5$) ($n = 6$). **Nebenabb.:** Intrazelluläre Aufnahme von Ile-Thia ohne (Kontrolle: ■) bzw. mit 10 mM Gly-Sar (□) nach zweistündiger Inkubationszeit. Die Analytik erfolgte mittels HPLC-MS durch ANTJE MEYER (Probiobdrug AG).

Im umgekehrten Fall konnte keine signifikante Hemmung des transepithelialen Fluxes (J_{a-b}) von 2 mM Ile-Thia bei Gly-Sar-Koinkubation (10 mM) über dem Zehnfachen seines K_i -Wertes verzeichnet werden (**Abb. 27**). Die Permeationsraten betragen $J_{a-b} = 33,3 \pm 2,3 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 1,15 \pm 0,08\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) ohne und $J_{a-b} = 32,7 \pm 2,3 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ($= 1,10 \pm 0,07\% / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) mit 10 mM Gly-Sar. Die intrazelluläre Aufnahme (J_{a-c}) von Ile-Thia (2 mM) nach zweistündiger Inkubationszeit bei bestehendem pH-Gradienten ergab $1,02 \pm 0,17 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,035 \pm 0,005\% / (\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) ohne bzw. $1,15 \pm 0,24 \text{ nmol}/(\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$ ($= 0,039 \pm 0,01\% / (\text{cm}^2 \cdot 2 \text{ h})$) unter Zugabe von 10 mM Gly-Sar.

Eine wesentliche Ursache für die unveränderten Transportraten von Ile-Thia (2 mM) in An-/Abwesenheit von 10 mM Gly-Sar stellt wahrscheinlich der ausreichende Diffusionsanteil der Aminoacylthiazolididverbindung bei pH 6,0 bei gleichzeitig vorhandener, hoher Ausgangskonzentration des DP IV-Inhibitors dar. Somit muss die Hemmung von Ile-Thia am Transportsystem keine Auswirkungen auf die Nettoaufnahme haben (**Abb. 27**). Als weiterer Beleg für die hintergründige Rolle einer aktiven Aufnahme durch PEPT1 ist die verhältnismäßig geringe Affinität von Ile-Thia ($K_i \approx 5 \text{ mM}$) im Vergleich zu Gly-Sar ($K_i \approx 1 \text{ mM}$) zu werten. Die im Rahmen der Gesamtstudie erfolgten Strommessungen an PEPT1-exprimierten *Xenopus laevis*-Oocyten ergaben für Ile-Thia einen relativ niedrigen Aufnahmewert von ca. 29% des Kontrollwertes ($\approx 200 \text{ nA}$) von Gly-Gln ($\approx 700 \text{ nA}$) (FOLTZ et al. 2004). Eine zusätzliche Beteiligung anderer Transportsysteme an der aktiven, intestinalen Absorption von Ile-Thia ist ebenfalls nicht auszuschliessen.

Die eingesetzten, stark variierenden Ausgangskonzentrationen während beider Kompetitionsexperimente (vgl. **Abb. 26 & 27**) sind aufgrund des Mangels an radioaktiv markiertem Ile-Thia den unterschiedlichen Analysemethoden geschuldet. Da jedoch die Konkurrenz von Ile-Thia mit Gly-Sar an PEPT1 eine eher untergeordnete Rolle des Carriers für den Nettotransport des untersuchten DP IV-Inhibitors offenbart, wurde auf die relativ aufwendige Etablierung der HPLC-Analytik für die Quantifizierung des unmarkierten Gly-Sars verzichtet.

Das Transport- und Affinitätsverhalten der untersuchten DP IV-Inhibitoren an/zu PEPT1 an Caco-2-Zellen indiziert die vorrangige Beteiligung von Diffusionsprozessen bei der intestinalen Absorption der Substanzen. Die annähernd gleichen transepithelialen Fluxwerte von Ile-Pyrr, Ile-Pyrr-(2-CN), Ile-Thia, Val-Pyrr und Val-Thia lassen auf eine hohe orale Verfügbarkeit dieser Substanzen schließen. Um endgültige Aussagen zum Transport der untersuchten DP IV-Inhibitoren im Hinblick auf unerwünschte Nebeneffekte treffen zu können, müsste die Involvierung weiterer Carrier bei der intestinalen Absorption der Substanzen, hauptsächlich sogenannter Effluxpumpen, genauer überprüft werden.

3.4 Interaktion weiterer Wirkstoffe mit PEPT1 an Epithelzellen des Darmes

Im Verlauf der Untersuchungen wurden zusätzlich zu den näher charakterisierten Substanzen (3.1 - 3.3) weitere Peptidomimetika mit unterschiedlichen Wirkungsspektren bezüglich ihrer Affinität zu PEPT1 der Zelllinie Caco-2 überprüft. Dabei handelte es sich überwiegend um β -Lactamantibiotika, Protease- und ACE-Inhibitoren. Die Ergebnisse dieses Screenings sind in **Tabelle 17** zusammengefasst. Dabei wurde die Hemmung von [14 C]Gly-Sar (10 μ M) durch die Testsubstanzen (0 - 10 bzw. - 31,6 mM, in Abh. v. Löslichkeit) bei Raumtemperatur nach zehnminütiger Inkubationsdauer gemessen. Ein Teil dieser Verbindungen wurde bereits in früheren Studien von anderen Autoren auf seine Affinität zu PEPT1 überprüft, sollte jedoch aufgrund teilweise widersprüchlicher Literaturangaben einem nochmaligen Affinitätstest unterzogen werden.

So existieren beispielsweise für die beiden untersuchten Vertreter der ACE-Hemmer Captopril und Enalapril – mit einer oralen Verfügbarkeit von 62% bzw. 69% (DUCHIN et al. 1982, DICKSTEIN 1986) – unterschiedliche Resultate bezüglich ihrer Affinitäten zu PEPT1. Die Ergebnisse von HU & AMIDON (1988), THWAITES et al. (1995) und TEMPLE & BOYD (1998) qualifizieren Captopril als Substrat des intestinalen H^+ /Peptidtransporters 1. Ebenso konnten HU et al. (1994) und GRONEBERG et al. (2001) eine kompetitive Hemmung der Phe-Pro- bzw. D-Ala-Lys-AMCA-Aufnahme durch Captopril feststellen. ZHU et al. (2000) gelang die Messung Captopril- (sowie Enalapril-) induzierter Ionenströme an PEPT1- und PEPT2-transfizierten *Xenopus laevis*-Oocyten mittels Patch-Clamp-Technik, wobei jedoch die Ergebnisse an PEPT2 bei gleichem Versuchsansatz durch BOLL et al. (1996) keine Bestätigung finden. Andere Autoren wiederum konnten für Captopril keine Affinität zu PEPT1 nachweisen (KNÜTTER 1998, MOORE et al. 2000), wobei die Substitution der α -Aminogruppe durch eine Mercaptogruppe -[SH] und deren β -Stellung als ursächlicher Effekt für den Bindungsverlust am Transportsystem diskutiert wurde (KNÜTTER 2003). Eigene Messungen mit einem K_i -Wert > 30 mM (≈ 58 mM) für Captopril liegen ebenfalls weit außerhalb des Affinitätsbereiches von PEPT1 (**Tabelle 17**). Bei Enalapril handelt es sich im Gegensatz zu Captopril um eine Prodrug, welche erst während der Leberpassage durch Esterhydrolyse zum eigentlichen Wirkstoff Enalaprilat (Dicarboxylat) abgebaut wird (DICKSTEIN 1986). Für Enalapril existieren bis auf das Ergebnis von MOORE & Mitarbeitern ($K_i > 20$ mM, 2000) K_i -Werte im niedrigaffinen Bereich von $K_i = 12$ mM bzw. 10,8 mM (KNÜTTER 1998, ZHU et al. 2000). Letztere entsprechen in ihrer Relation dem eigenen Wert für die Substanz von $K_i = 13,4 \pm 0,7$ mM. Strukturelle Unterschiede, welche möglicherweise die Affinität von Enalapril im Vergleich zu

Captopril erhöhen, sind – neben der Peptidbindung – die Ethoxycarbonylgruppe und der Phenylrest am C3-Atom der Propylseitenkette. Die Qualifikation bestimmter Esterverbindungen als potentielle PEPT1-Substrate konnte bereits in früheren Studien belegt werden (s. u., GANAPATHY et al. 1998, LI et al. 1999, SAWADA et al. 1999).

Von den zehn untersuchten, in **Tabelle 17** aufgeführten β -Lactamantibiotika weisen lediglich Oxacillin ($K_i = 10,2 \pm 0,6$ mM), Moxalactam ($K_i = 12,3 \pm 0,6$ mM) und Metampicillin ($K_i = 12,7 \pm 1,1$ mM) eine niedrige Affinität zum H^+ /Peptidsympporter PEPT1 auf. Letzteres unterscheidet sich von seinem Metaboliten Ampicillin (LEE et al. 1995) durch die Substitution einer Methylengruppe an der freien Aminfunktion des α -Kohlenstoffatoms. Eine weitere Methode zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit des Ampicillins ($\approx 60\%$) um ca. 50% ist die Veresterung der Säuregruppe (EHRNEBO et al. 1979) oder die Synthese von Acylureido-Penicillinen durch Acylierung der freien Aminfunktion (AUTERHOFF et al. 1994). Diese Substitutionen führen zum einen zu einer Erhöhung der Lipophilie der Prodrug und damit zu einem gesteigerten transzellulären passiven Transport. Veresterungen können aber zum anderen ebenfalls zu einer verbesserten Substrataffinität gegenüber PEPT1 (bzw. PEPT2) führen, wie beispielsweise Studien von GANAPATHY et al. (1998) an Valacyclovir und SAWADA et al. (1999) an L-Aminosäureesterverbindungen belegen. Eine Überprüfung der Ampicillinester hinsichtlich ihrer Affinität zu PEPT1 und PEPT2 könnte in weiterführenden Untersuchungen erfolgen. Diskrepanzen ergeben sich hinsichtlich des K_i -Wertes von Ampicillin ($K_i > 30$ mM, ≈ 90 mM) beim Vergleich mit dem Ergebnis von BRETSCHNEIDER et al. (1999, $K_i = 14,5 \pm 1,7$ mM). Für das strukturanaloge, sich lediglich durch eine zusätzliche affinitätssteigernde Hydroxylgruppe (LUCKNER & BRANDSCH 2005) am C4-Atom des N-terminalen Phenylringes unterscheidende Amoxicillin, mit einer relativ guten oralen Verfügbarkeit von ca. 80% (ARANCIBIA 1980, DALHOFF 1981), konnte bei den eigenen Untersuchungen ebenfalls keine Substrathaftung an PEPT1 festgestellt werden ($K_i > 30$ mM, ≈ 50 mM). BARR et al. (1994) gaben für Amoxicillin eine gute Resorptionsrate im humanen Duodenum und Jejunum bzw. eine geringere, konzentrationsabhängige Aufnahme im Ileum an, wohingegen sich das Kolon als Permeationsschranke erwies. Dies lässt auf die aktive Aufnahme der Substanz schließen.

Tab. 17: Inhibitionskonstanten K_i verschiedener Substanzen an PEPT1.

Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM , pH 6,0, 10 min) in Caco-2-Zellmonolayer wurde nach dem Zusatz unmarkierter Substanzen in ansteigenden Konzentrationen (0 - 10 bzw. - 31,6 mM) gemessen. Die Berechnung der Inhibitionskonstanten erfolgte aus den IC_{50} -Werten der Testsubstanzen mittels nicht-linearer Regression ($n = 3 - 6$).

	Substanz	K_i -Wert <i>mM</i>	Pharmazeutische Anwendung/Wirkung
ACE-Hemmer	Enalapril	13,4 \pm 0,7	Antihypertonika/Reduktion von Angiotensin II und Erhöhung von Bradykinin durch Inhibierung des ACE; Captopril: zusätzl. Hemmung von Peptidyl-Dipeptidase A- und Leukotrien A4-Hydrolase (AUGUSTIJS & BORCHARDT 1995, ORNING et al. 1991)
	Captopril ^a	> 30 (\approx 58)	
β-Lactamantibiotika/-Intermediate	(+)-6-APS	> 30 (\approx 48)	Penamgrundkörper der Penicillinsynthese/-
	Amoxicillin	> 30 (\approx 49)	Bakterizide/Beeinflussung der Biosynthese der bakteriellen Zellwand durch die irreversible Hemmung der D-Alanin-Transpeptidase aufgrund ihrer Struktur analogie zu D-Ala-D-Ala
	Ampicillin	> 30 (\approx 91)	
	Aztreonam	> 30 (\approx 68)	
	Carbenicillin	> 30 (\approx 62)	
	Cefoperazon	> 30 (\approx 54)	
	Metampicillin	12,7 \pm 1,1	
	Moxalactam	12,3 \pm 0,6	
	Oxacillin	10,2 \pm 0,6	
	Penicillin V	21,1 \pm 2,3	
Pheneticillin	23,3 \pm 0,9		
Protease-Hemmer	Ala-Ala-Phe-CMK	8,7 \pm 1,3	Inhibitor von TPPI/II, Chymase und Chymotrypsin (EZAKI et al. 2000, HILBI et al. 2000, JOHNSON et al. 1988), Apoptoseinduktion bei Leukämiezellen im Synergismus mit TRAIL und TNF (MLNARCZUK 2004)
	Bestatin	$\approx 1^b$	Inhibitor von Leukotrien-A4-Hydrolase, Leucinaminopeptidase und Aminopeptidase B & M; Immunstimulanz u.a. bei Krebs und HIV (CHEN et al. 2004, MATHÉ 1991, TAKI et al. 1995)
	Ac-Leu-Leu-Arg-CHO (Leupeptin)	> 10 ^c (\approx 54)	Calpain-, Trypsin-, Cystein- bzw. Serinprotease-Inhibitor (AUGUSTIJS & BORCHARDT 1995, BADALAMENTE et al. 1995, NAKAMATSU & TANAKA 2004, PEDICORT et al. 2004)
	Tos-Lys-CMK	16,3 \pm 2,0	Serinprotease-Hemmer (ENDEGE et al. 1989), antiinflammatorisch, Antipromotor bei Tumorgenese (FISCHER et al. 1986, PARIKH et al. 2000, POTOKA et al. 2000)
Sonstige	N-Ac-Phe	> 10 ^c (\approx 23)	-/-
	pGlu-His-Pro-NH ₂ (TRH, Thyrotropin-Releasing Hormon)	> 20 (\approx 85)	Freisetzung von Thyrotropin und Prolactin aus dem Hypophysenvorderlappen (SILBERNAGEL & DESPOPOULOS 1991), Zentralnervöse Wirkungen (antidepressiv, neuroprotektiv, analeptisch, krampflösend, antiamnesisch, euphorisch, HINKLE et al. 2002)
	Thiazolidinlactamamid ^d	15,5 \pm 1,2	-/-, Peptid aus Forschungsprojekt (s. TREMMEL & GEYER 2002)

^a ebenfalls hemmende Wirkung auf Proteasen

^b geschätzter K_i -Wert, Hemmung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme durch Zusatz von 2 mM Bestatin auf 40,4% ($n = 4$)

^c höchste, eingesetzte Konzentration aufgrund der schlechten Löslichkeit der Substanzen im eingesetzten Versuchspuffer bei pH 6,0

^d mit freundlicher Genehmigung von Prof. A. Geyer, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg

Für die beiden Oral-Penicilline Penicillin V (Phenoxyethylpenicillinsäure) und Pheneticillin (Phenoxyethylpenicillin, Kaliumsalz) mit einer intestinalen Absorptionsrate von 48% bzw. 86% (OVERBOSCH et al. 1985) ließ sich ebenfalls keine Affinität zu PEPT1 feststellen. Dass die gute orale Verfügbarkeit mancher β -Lactamantibiotika trotz fehlender Affinität zu PEPT1 nicht immer ausnahmslos deren Lipophilie zuzuschreiben ist, beweisen u. a. die Untersuchungen von ITOH et al. (1998), LI et al. (1999), MENON & BARR (2002) und TSUJI et al. (1993) zur intestinalen Absorption von β -Lactamantibiotika wie Carindacillin (Prodrugester von Carbenicillin), Cefdinir, Ceftributen und Pheneticillin durch Monocarboxylsäuretransporter (MCT, Solute Carrier 16-Familie).

Aztreonam, Carbenicillin und Cefoperazon können aufgrund ihrer hohen K_i -Werte (> 30 mM, **Tabelle 17**) ebenfalls nicht zu den Substraten von PEPT1 gezählt werden. Diese Substanzen werden mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließlich durch passive Diffusion in die Zellen aufgenommen (KOGA et al. 2002, LI et al. 1999, SWABB et al. 1983). So beträgt die Bioverfügbarkeit von Aztreonam nach oraler Applikation weniger als 1% der verabreichten Dosis (SWABB et al. 1983, BROGDEN & HEEL 1986).

Von den untersuchten Protease-Hemmern besitzen Bestatin (= UBENIMEX[®], $K_i \approx 1$ mM) und Ala-Ala-Phe-CMK ($K_i = 8,7 \pm 1,3$ mM) ein gutes bzw. schwaches Bindungsvermögen an das intestinale H^+ /Peptidsymportsystem 1. Der infolge der geringen Substanzmenge lediglich grob kalkulierte Wert für Bestatin wird dabei durch gleichartige Untersuchungen von SAITO & INUI (1993, $K_i = 0,34$ mM) in seiner Größenordnung bestätigt. Die ermittelten K_i -Werte für Leupeptin und Tos-Lys-CMK lagen außerhalb des definierten Affinitätsbereiches (KNÜTTER 2003). Bei Leupeptin (Ac-Leu-Leu-Arg-CHO) ist die fehlende Affinität zu PEPT1 mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die N-terminale Blockierung mittels eines Acetylrestes und die zusätzlich verringerte Elektronendichte am C-Terminus infolge der Substitution der Carboxyl- durch eine Aldehydgruppe verursacht. Bezüglich des N-Acetylphenylalanins konnte im Gegensatz zu den Messungen von MEREDITH et al. (2000, $K_i = 1,8$ mM) keine Affinität zu PEPT1 festgestellt werden ($K_i > 10$ mM, ≈ 23 mM, **Tabelle 17**). In der Regel führt – wie bereits erwähnt – die Blockierung des N-Terminus zu einem Affinitätsverlust gegenüber PEPT1 (und PEPT2) (MEREDITH et al. 2000, KNÜTTER 2003).

Für die Aufnahme und den Transport des Thyrotropin-freisetzenden Hormons (TRH) an Caco-2-Zellen existieren ebenfalls widersprüchliche Angaben in der Literatur. Es wurden sowohl die sättigbare, durch Oligopeptide und β -Lactamantibiotika hemmbare carrier-vermittelte Aufnahme (YOKOHAMA et al. 1984b, YAMAMOTO 1998) als auch der ausschließlich passive Transport für TRH (GAN et al. 1993, THWAITES et al. 1993c) beschrieben. Letzteres wür-

de die generell sehr geringe orale Bioverfügbarkeit des relativ hydrophilen TRH bei den *Mammalia* erklären (YOKOHAMA et al. 1984a). WALTER & KISSEL (1994) fanden bei Caco-2-Zellen eine modifizierte Aufnahme von TRH in Abhängigkeit der Passagehäufigkeit. Dabei konnte lediglich für die älteren Passagen (P89 - P99) ein aktiver, sättigbarer Transport bei vorwiegend niedrigeren Konzentrationen ($< 3 \text{ mM}$) und einem pH-Optimum von 6,0 festgestellt werden – für die jüngeren (P30 - P34) hingegen nicht. Aus den eigenen Untersuchungen ließ sich keine Affinität des TRH zu PEPT1 an Caco-2-Zellmonolayern herleiten. Dies betrifft sowohl die Verwendung unterschiedlicher TRH-Konzentrationen bei den Verdrängungsstudien (0,316 - 20 mM) als auch den Einsatz junger (P15 & P16) und alter Zellkulturpassagen (P77 & P78).

Die relativ hohe K_i -Wert des Thiazolidinlactamamids (**Tabelle 17**) von $K_i = 15,5 \pm 1,2 \text{ mM}$ gegenüber PEPT1 ist wahrscheinlich durch die starre Grundstruktur des Moleküls bei gleichzeitigem Fehlen umfangreicher Seitenketten bedingt.

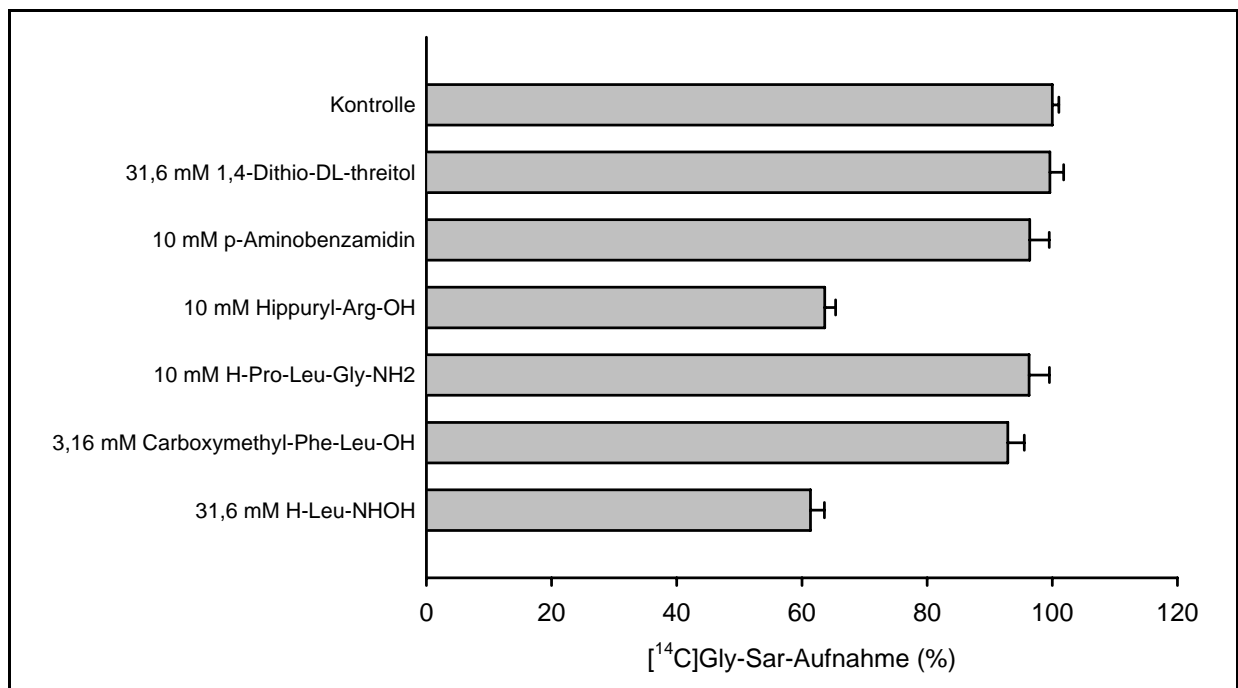


Abb. 28: Substratspezifität der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme in Caco-2-Zellen.

Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar (10 μM) wurde unter Koinkubation mit verschiedenen unmarkierten Substanzen bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach 10 min gemessen (n = 4). Die in Abwesenheit unmarkierter Substanzen berechnete Aufnahmegeschwindigkeit von [¹⁴C]Gly-Sar (Kontrolle) betrug $v = 253,5 \pm 6,0 \text{ pmol}/(10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$ (n = 8).

Weitere in dieser Studie verwendete Substanzen zur Affinitätsprüfung an PEPT1 an Caco-2-Zellen (pH 6,0, 10 min) sind in **Abbildung 28** dargestellt. Dabei konnte keine der Verbindungen als potentiell PEPT1-Substrat identifiziert werden, so dass eine nähere Spezifizierung

unterblieb. Lediglich für Hippuryl-L-Arginin (10 mM) mit einer Hemmung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme (10 μM) auf 64% des Kontrollwertes konnte eine sehr niedrige Affinität zu PEPT1 verzeichnet werden. Die Inhibierung des Kontrollwertes durch 3,16 mM N-Carboxymethyl-L-Phenylalanyl-L-Leucin auf 93% bzw. durch 31,6 mM Leucyl-Hydroxylamin (H-Leu-NHOH) auf 61% hingegen erfüllt nicht die Voraussetzung für eine Einstufung als PEPT1-Substrat. Durch den Einsatz der übrigen in **Abbildung 28** dargestellten Verbindungen 1,4-Dithio-DL-threitol (31,6 mM), p-Aminobenzamidin (10 mM) und Melanostatin (H-Pro-Leu-Gly-NH₂, 10 mM) kam es zu keiner signifikanten Hemmung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme.

Die K_i -Wert-Ermittlung wird lediglich als erstes Screening von potentiellen Substraten des jeweils untersuchten Transportsystems angewandt, denn der Nachweis einer hohen kompetitiven Hemmung eines Standardsubstrates durch eine Testsubstanz am Carrier qualifiziert letztere nicht automatisch als Substrat desselben. Hierfür sind unbedingt weiterführende Transportstudien notwendig. So kann bei der Untersuchung potentieller PEPT1-Substrate die transportierte Substanzmenge sowohl direkt in kinetischen Studien mit radioaktiv- bzw. fluoreszenzmarkierten Substraten, als auch indirekt über fluorospektrometrische Messungen des simultanen Protoneneinstromes bestimmt werden (LANDOWSKI et al. 2003, FARIA et al. 2004). Diese Ergebnisse sollten zusätzlich zum K_i -Wert und den umfangreichen strukturellen Parametern (s. z. B. GEBAUER et al. 2003, BIEGEL et al. 2005) bei der computergestützten Struktur-Affinitäts-Analyse zur Datenbankoptimierung einbezogen werden. Die berechneten K_i -Werte aus etablierten und mehrfach verifizierten Modelling-Programmen dienen wiederum der Überprüfung experimentell ermittelter Hemmkonstanten. Abgesehen von unterschiedlichen Versuchs- und Kulturbedingungen können diesbezügliche Abweichungen ebenfalls durch die Verwendung verschiedener Caco-2-Klone begründet sein (HU et al. 1995, BEHRENS et al. 2004). Ein Vergleich von Daten verschiedener permanent wachsender Zelllinien, von Primärkulturen bzw. von unterschiedlichen Testsystemen (Zelllinie vs. heterologes Expressionssystem) ist nur bedingt möglich. Zur Erlangung vergleichbarer Ergebnisse sollten daher die Entwicklung und der universelle Einsatz einheitlicher, effektiver Assays für Affinitäts- bzw. Transportuntersuchungen – beispielsweise unter Nutzung der Caco-2-Zelllinie, dem allgemein anerkannten Modellsystem für das humane Dünndarmepithel (HILGERS et al. 1990, XIA et al. 2005) – im Vordergrund stehen.

4 Zusammenfassung & Ausblick

Transport von δ -Aminolävulinsäure durch PEPT1 an Epithelzellen des Gallenganges

- Der Transport von δ -Aminolävulinsäure – Stoffwechselintermediat der Hämsynthese und Photosensibilisator bei der photodynamischen Diagnostik und -Therapie – wurde am humanen extrahepatischen Gallengang mittels der Tumorzelllinie SK-ChA-1 erstmals charakterisiert.
- Der Transport von δ -ALA war sättigbar und Na^+ -unabhängig. Unter Anwesenheit eines Protonengradienten kam es bei pH 6,0 im Vergleich zu pH 7,5 zu einer Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit von [^3H] δ -ALA auf das Drei- bis Vierfache.
- Im A-B-C-Test konnte die Aufnahme von [^3H] δ -ALA und [^{14}C]Gly-Sar durch die Referenzsubstrate des H^+ /Peptidsymporters 1 Gly-Sar, Ala-Ala und Cefadroxil bzw. durch δ -ALA bei übereinstimmenden Affinitätskonstanten (K_i) in Bezug auf den jeweiligen Inhibitor kompetitiv gehemmt werden. Demnach ist lediglich PEPT1 für den aktiven Transport von δ -ALA und Gly-Sar verantwortlich.
- Die [^3H] δ -ALA-Aufnahme wurde durch γ -Aminobuttersäure, Glycin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure nicht inhibiert, weder bei pH 6,0 noch bei pH 7,5.
- Weiterführende kinetische Studien bestätigten PEPT1 als alleiniges Transportsystem für δ -Aminolävulinsäure an der Apikalmembran von SK-ChA-1-Zellen. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante (K_t) betrug $2,1 \pm 0,3$ mM und die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) $60,1 \pm 3,7$ nmol/(10 min \cdot mg Protein). Die Substanz besitzt trotz Substitution der Peptidbindung durch eine Ketomethylenbindung eine relativ gute Affinität zum H^+ /Peptidsymporter PEPT1 in SK-ChA-1-Zellen.
- Die [^3H] δ -ALA-Aufnahme konnte durch den Proteinkinase-C-Aktivator PMA bzw. deren Inhibitor Staurosporin reguliert werden.
- Die relativ schnelle Aufnahme von δ -ALA in die Epithelzellen des Gallenganges wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Aktivität von PEPT1 realisiert.

Transport von Alafosfalin durch PEPT1 und PEPT2 an Epithelzellen von Darm und Niere

- Der Transport von Alafosfalin wurde an der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 und der SKPT-Zelllinie des proximalen Nierentubulus von *Rattus norvegicus* untersucht.
- Kinetische Studien ergaben eine starke kompetitive Hemmung der Aufnahme des Referenzsubstrates Gly-Sar mit Inhibitionskonstanten für Alafosfalin von $K_i = 0,19 \pm 0,01$ mM für PEPT1 an Caco-2-Zellen bzw. von $K_i = 0,07 \pm 0,01$ mM für PEPT2 der Zelllinie SKPT.
- Der transepitheliale Flux und die intrazelluläre Aufnahme von [14 C]Gly-Sar (J_{a-b}) wurden an Caco-2-Zellen durch einen Alafosfalinüberschuss um jeweils 73% gehemmt. Bei den SKPT-Zellen wurde die Aufnahme um 61% reduziert; der Flux blieb unbeeinflusst. Alafosfalin hatte dabei keine Auswirkungen auf die Membranintegrität und -fluidität der Zellmonolayer.
- Die transepitheliale Translokation von Alafosfalin ist aufgrund des simultanen Protonensymportes elektrogen. Messungen in der USSING-Kammer führten bei einer Ausgangskonzentration von 7 mM Alafosfalin bei konstantem transepitheliale Widerstand zu einem vergleichsweise hohen Kurzschlussstrom (I_{sc}) von $4,3 \pm 0,3$ μ A/cm² durch die Caco-2-Zellmonolayer.
- Die Substitution der C-terminalen Carboxylgruppe des Ala-Ala durch eine Phosphonatgruppe beim Alafosfalin wird von PEPT1 und PEPT2 toleriert.
- Alafosfalin wird durch die H⁺/Peptidsymporter 1 und 2 transportiert.

Transport von DP IV-Inhibitoren an Epithelzellen des Darmes

- Der Transport von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV wurde an Caco-2-Zellen untersucht. Dabei handelte es sich vorrangig um Aminoacylthiazolidide und -pyrrolidide.
- Die eingesetzten DP IV-Inhibitoren hatten – bis auf Isoleucincyclohexylketon – keinen Einfluss auf die Membranintegrität und -fluidität der Zellmonolayer.
- Die hohen transepithelialen Flux- und intrazellulären Aufnahmeraten der DP IV-Inhibitoren wurden vorrangig durch Diffusionsprozesse realisiert.
- Im Kompetitionsassay konnte für die DP IV-Inhibitoren eine mittlere bis niedrige Affinität zu PEPT1 ermittelt werden. Dabei wiesen die Aminoacylthiazolidide im Vergleich zu den strukturanalogen Aminoacylpyrrolididen eine drei- bis fünffach erhöhte Affinität zu PEPT1 auf.

- Ile-Pyrr-(2-CN) ist möglicherweise ein Substrat von Effluxpumpen aus der Familie der ABC-Transporter.
- Die untersuchten DP IV-Inhibitoren besitzen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften bei unterschiedlichen physiologischen pH-Werten gute Voraussetzungen für eine hohe orale Verfügbarkeit.

Interaktion weiterer Wirkstoffe mit PEPT1 an Epithelzellen des Darmes

- Die Interaktion verschiedener, zumeist therapeutisch wirksamer Substanzen mit PEPT1 wurde an Caco-2-Zellen mittels Kompletionsassay gegen die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme ermittelt.
- Im Unterschied zu den Cephalosporinen unter den β -Lactamantibiotika konnte eine generell niedrige bzw. fehlende Affinität der Penicilline zu PEPT1 bestätigt werden. Die Affinitätssteigerung von Metampicillin gegenüber Ampicillin wird durch die Substitution einer Methylengruppe an der freien Aminfunktion des α -Kohlenstoffatoms erreicht.
- Unter den Protease-Hemmern wiesen Bestatin und Ala-Ala-Phe-CMK eine mittlere bzw. niedrige Affinität zum intestinalen H⁺/Peptidsymporter 1 auf.
- Die von anderen Autoren beschriebenen Affinitäten von Captopril, TRH und N-Ac-Phe konnten nicht bestätigt werden.

In zukünftigen wissenschaftlichen Studien bezüglich PEPT1/2 sollten folgende Aspekte schwerpunktmäßig Beachtung finden:

- Die vollständige Aufklärung der Regulation dieser Transportsysteme und ihrer Polymorphismen,
- die verstärkte Anwendung der kombinatorischen Peptidchemie zur Substrat-/Inhibitorsynthese,
- die Entwicklung effizienter, radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierter Inhibitoren,
- die Optimierung computergestützter Affinitäts-Strukturanalysen,
- die Suche nach bisher unbekanntem, arzneilichen Wirkstoffen bzw. die Synthese von neuartigen Therapeutika bzw. -Prodrugs und nicht zuletzt –
- die Röntgenkristallstrukturanalyse.

5 Literatur

- ALLEN JG, ATHERTON FR, HALL MJ, HASSALL CH, HOLMES SW, LAMBERT RW, NISBET LJ & RINGROSE PS (1978) Phosphonopeptides, a new class of synthetic antibacterial agents. *Nature* **272**:56-58.
- ALLEN JG, ATHERTON FR, HALL MJ, HASSALL CH, HOLMES SW, LAMBERT RW, NISBET LJ & RINGROSE PS (1979a) Phosphonopeptides as antibacterial agents: alaphosphin and related phosphonopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* **15**:684-695.
- ALLEN JG, HAVAS L, LEICHT E, LENOX-SMITH I & NISBET LJ (1979b) Phosphonopeptides as antibacterial agents: metabolism and pharmacokinetics of alafosfalin in animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother* **16**:306-313.
- ALLEN JG & LEES LJ (1980) Pharmacokinetics of alafosfalin, alone and in combination with cephalexin, in humans. *Antimicrob Agents Chemother* **17**:973-979.
- AMASHEH S, WENZEL U, WEBER WM, CLAUSS W & DANIEL H (1997) Electrophysiological analysis of the function of the mammalian renal peptide transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol (Lond)* **504**:169-174.
- ANAND B, NASHED Y & MITRA A (2003a) Novel dipeptide prodrugs of acyclovir for ocular herpes infections: Bioreversion, antiviral activity and transport across rabbit cornea. *Curr Eye Res* **26**:151-163.
- ANAND BS, PATEL J & MITRA AK (2003b) Interactions of the dipeptide ester prodrugs of acyclovir with the intestinal oligopeptide transporter: competitive inhibition of glycylsarcosine transport in human intestinal cell line-Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:781-791.
- ARANCIBIA A, GUTTMANN J, GONZALEZ G & GONZALEZ C (1980) Absorption and disposition kinetics of amoxicillin in normal human subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **17**:199-202.
- ARISAWA M, OHSHIMA J, OHSAWA E & MARUYAMA HB (1982) *In vitro* potentiation of cephalosporins by alafosfalin against urinary tract bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **21**:706-710.
- ATHERTON FR, HALL JH, HASSALL CH, HOLMES SW, LAMBERT RW, LLOYD WJ, NISBET LJ, RINGROSE PS & WESTMACOTT D (1981) Antibacterial properties of alafosfalin combined with cephalexin. *Antimicrob Agents Chemother* **20**:470-476.
- ATHERTON FR, HALL JH, HASSALL CH, HOLMES SW, LAMBERT RW, LLOYD WJ & RINGROSE PS (1980) Phosphonopeptide antibacterial agents related to alafosfalin: design, synthesis, and structure-activity relationships. *Antimicrob Agents Chemother* **18**:897-905.
- ATHERTON FR, HALL MJ, HASSALL CH, LAMBERT RW, LLOYD WJ, LORD AV, RINGROSE PS & WESTMACOTT D (1983) Phosphonopeptides as substrates for peptide transport systems and peptidases of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **24**:522-528.
- ATHERTON FR, HALL JH, HASSALL CH, LAMBERT RW, LLOYD WJ & RINGROSE PS (1979) Phosphonopeptides as antibacterial agents: mechanism of action of alaphosphin. *Antimicrob Agents Chemother* **15**:696-705.

- AUGUSTIJNS PF & BORCHARDT RT (1995)** Transport and metabolism of delta-sleep inducing peptide in cultured human intestinal epithelial cell monolayers. *Drug Metab Dispos* **23**:1372-1378.
- AUTERHOFF H, KNABE J & HÖLTJE HD (1994)** Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. 13. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- BADALAMENTE MA, HURST LC & STRACHER A (1995)** Neuromuscular recovery after peripheral nerve repair: effects of an orally-administered peptide in a primate model. *J Reconstr Microsurg* **11**:429-437.
- BARR WH, ZOLA EM, CANDLER EL, HWANG SM, TENDOLKAR AV, SHAMBUREK R, PARKER B & HILTY MD (1994)** Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine. *Clin Pharmacol Ther* **56**:279-285.
- BAYS HE (2004)** Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res* **12**:1197-1211.
- BEAUCHAMP LM, ORR GF, DE MIRANDA P, BURNETTE T & KRENITSKY TA (1992)** Amino acid ester prodrugs of acyclovir. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **3**:157-164.
- BEHRENS I, KAMM W, DANTZIG AH & KISSEL T (2004)** Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin. *J Pharm Sci* **93**:1743-1754.
- BERGER UV & HEDIGER MA (1999)** Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* **199**:439-449.
- BERMUDEZ-MORETTI M, CORREA-GARCIA S, PEROTTI C, BATLLE A & CASAS A (2002)** Delta-Aminolevulinic acid transport in murine mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *Br J Cancer* **87**:471-474.
- BERMUDEZ-MORETTI M, CORREA-GARCIA S, RAMOS EH & BATLLE A (1995)** GABA uptake in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41**:843-849.
- BIEGEL A, GEBAUER S, HARTRODT B, BRANDSCH M, NEUBERT K & THONDORF I (2005)** Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses of β -lactam antibiotics and tripeptides as substrates of the mammalian H⁺/peptide cotransporter PEPT1. *J Med Chem* **48**:4410-4419.
- BILL MB (2001)** Yeast – a panacea for the structure-function analysis of membrane proteins? *Curr Genet* **40**:157-171.
- BILL MB, REVERS L & WILSON IBH (1998)** Protein glycosilation. Kluwer, Boston.
- BODDE HE, ROEMELE PE & STAR WM (2002)** Quantification of topically delivered 5-amino-levulinic acid by iontophoresis across *ex vivo* human *stratum corneum*. *Photochem Photobiol* **75**:418-423.
- BODNER K, BODNER-ADLER B, WIERRANI F, KUBIN A, SZOLTS-SZOLTS J, SPANGLER B & GRUNBERGER W (2003)** Cold-knife conization versus photodynamic therapy with topical 5-amino-levulinic acid (5-ALA) in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II with associated human papillomavirus infection: a comparison of preliminary results. *Anticancer Res* **23**:1785-1788.
- BOLL M, HERGET M, WAGENER M, WEBER WM, 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 WM, KORTE H, DANIEL H & MURER H (1994)** Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflugers Arch* **429**:146-149.
- BORNSTEIN JC, PICKETT JB & DIAMOND I (1979)** Inhibition of the evoked release of acetylcholine by the porphyrin precursor delta-aminolevulinic acid. *Ann Neurol* **5**:94-96.
- BOTKA CW, WITTIG TW, GRAUL RC, NIELSEN CU, HIGAKA K, AMIDON GL & SADEE W (2000)** Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS PharmSci* **2**:E16.
- BÖRNER V, FEI YJ, HARTRODT B, GANAPATHY V, LEIBACH FH, 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.
- BRADFORD MM (1976)** A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- BRANDSCH M & BRANDSCH C (2003)** Intestinal transport of amino acids, peptides and proteins. In: Progress in research on energy and protein metabolism [SOUFFRANT WB & METGES CC Eds.]. *EAAP* **109**:667-680, Wageningen.
- BRANDSCH M, BRANDSCH C, PRASAD PD, GANAPATHY V, HOPFER U & LEIBACH FH (1995a)** Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter. *FASEB J* **9**:1489-1496.
- BRANDSCH M, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1995b)** H⁺-peptide cotransport in MADIN-DARBY canine kidney cells: expression and calmodulin-dependent regulation. *Am J Physiol* **268**:F391-F397.
- BRANDSCH M, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1995c)** Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) in intestinal and renal absorption of peptides. In: *Molecular biology intelligence unit. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) in metabolism and the immune response* [FLEISCHER B Ed.]:111-124, Springer-Verlag, Heidelberg.
- BRANDSCH M, KNÜTTER I, HARTRODT B, GEBAUER S, THEIS S, BOLL M, RUBIO-ALLIAGA I, BORN I, THONDORF I, DANIEL H & NEUBERT K (2003)** New Insights into substrate specificity, inhibitors, pharmacophore structure and expression of the mammalian H⁺/peptide transporters. *Nov Act Leopold NF* **87**:75-85.
- BRANDSCH M, KNÜTTER I & LEIBACH FH (2004)** The intestinal H⁺/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships. *Eur J Pharm Sci* **21**:53-60.
- 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.
- BRANDSCH M, MIYAMOTO Y, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1994)** 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.
- BRANDSCH M, THUNECKE F, KÜLLERTZ G, SCHUTKOWSKI M, FISCHER G & NEUBERT K (1999)** Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter, PEPT1. *J Biol Chem* **273**:3861-3864.

- BRETSCHNEIDER B (1999)** Charakterisierung und Beeinflussung des intestinalen Cephalosporin-transportes. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- 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.
- BRODGEN RN & HEEL RC (1986)** Aztreonam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* **31**:96-130.
- BRODIN B, NIELSEN CU, STEFFANSEN B & FROKJAER S (2002)** Transport of peptidomimetic drugs by the intestinal di/tri-peptide transporter, PepT1. *Pharmacol Toxicol* **90**:285-296.
- BYRNES V & AFDHAL N (2002)** Cholangiocarcinoma of the hepatic hilum (KLATSKIN tumor). *Curr Treat Options Gastroenterol* **5**:87-94.
- CARTER RA, YEOMAN KH, KLEIN A, HOSIE AH, SAWERS G, POOLE PS & JOHNSTON AW (2002)** dpp genes of *Rhizobium leguminosarum* specify uptake of delta-aminolevulinic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **15**:69-74.
- CHAN LM, LOWES S & HIRST BH (2002)** The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* **21**:25-51.
- CHEN H, PAN Y, WONG EA, BLOOMQUIST JR & WEBB KE Jr (2002b)** Molecular cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (cPepT1) in *Xenopus* oocytes and Chinese hamster ovary cells. *J Nutr* **132**:387-393.
- CHEN H, PAN YX, WONG EA & WEBB KE Jr (2002a)** Characterization and regulation of a cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (oPepT1) expressed in a mammalian cell line. *J Nutr* **132**:38-42.
- CHEN X, WANG S, WU N & YANG CS (2004)** Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **4**:267-283.
- CHEN XZ, STEEL A & HEDIGER MA (2000)** Functional roles of histidine and tyrosine residues in the H^+ -peptide transporter PepT1. *Biochem Biophys Res Commun* **272**:726-730.
- CHEN XZ, ZHU T, SMITH DE & HEDIGER MA (1999)** Stoichiometry and kinetics of the high-affinity H^+ -coupled peptide transporter PepT2. *J Biol Chem* **274**:2773-2779.
- CHENG YC & PRUSOFF WH (1973)** Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099-3108.
- CHIKUMA T, HAMA T, NAGATSU T, KUMEGAWA M & KATO T (1990)** Purification and properties of dipeptidyl peptidase IV from human urine. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **371**:325-330.
- CUSHMAN DW, CHEUNG HS, SABO EF & ONDETTI MA (1982)** Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting-enzyme. *Am J Cardiol* **49**:1390-1394.
- DALHOFF A, KOEPPE P & VON KOBYLETZKI D (1981)** Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Amoxicillin nach intravenöser, intramuskulärer und oraler Applikation. *Arzneimittelforschung* **31**:1148-1157.

- DALTON JT, MEYER MC & GOLUB AL (1999)** Pharmacokinetics of aminolevulinic acid after oral and intravenous administration in dogs. *Drug Metab Dispos* **27**:432-435.
- DALTON JT, YATES CR, YIN D, SRAUGHN A, MARCUS SL, GOLUB AL & MEYER MC (2002)** Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk bladder cancer. *J Pharmacol Exp Ther* **301**:507-512.
- DANIEL H (1996)** Function and molecular structure of brush border membrane peptide/H⁺symporters. *J Membr Biol* **154**:197-203.
- DANIEL H & KOTTRA G (2004)** The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch* **447**:610-618.
- DANIEL H & RUBIO-ALIAGA I (2003)** An update on renal peptide transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**:F885-F892.
- DANTZIG AH, HOSKINS JA, TABAS LB, BRIGHT S, SHEPARD RL, JENKINS IL, DUCKWORTH DC, SPORTSMAN JR, MACKENSEN D & ROSTECK PR JR (1994)** Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily. *Science* **264**:430-433.
- DE MEESTER I, KOROM S, VAN DAMME J & SCHARPÉ S (1999)** CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* **20**:367-375.
- DEFERME S & AUGUSTIJNS P (2003)** The effect of food components on the absorption of P-gp substrates: a review. *J Pharm Pharmacol* **55**:153-162.
- DEFERME S, TACK J, LAMMERT F & AUGUSTIJNS P (2003)** P-glycoprotein attenuating effect of human intestinal fluid. *Pharm Res* **20**:900-903.
- DEMUTH HU & HEINS J (1995)** Catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. In: *Molecular biology intelligence unit. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) in metabolism and the immune response* [FLEISCHER B Ed.]:1-35, Springer-Verlag, Heidelberg.
- DICKSTEIN K (1986)** Pharmacokinetics of enalapril in congestive heart failure. *Drugs* **32 Suppl 5**:40-44.
- DIECK ST, HEUER H, EHRCHEN J, OTTO C & BAUER K (1999)** The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys- N-epsilon-AMCA in astrocytes. *Glia* **25**:10-20.
- DÖRING F, WALTER J, WILL J, FOCKING M, BOLL M, AMASHEH S, CLAUSS W & DANIEL H (1998a)** 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 (1998b)** Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J Biol Chem* **273**:23211-23218.
- DREYER I, HOREAU C, LEMAILLET G, ZIMMERMAN S, BUSH DR, RODRIGUEZ-NAVARRO A, SCHACHTMAN DP, SPALDING EP, SENTENAC H & GRABER RF (1999)** Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *J Exp Bot* **50**:1073-1087.
- DRINGEN R, HAMPRECHT B & BROER S (1998)** The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* **71**:388-393.

- DRUGGAN P (2002)** Improvements in or relating to selective agents for biological cultures. *PCT Int Appl*, Patent no WO 2002022785.
- DUCHIN KL, SINGHVI SM, WILLARD DA, MIGDALOF BH & MCKINSTRY DN (1982)** Captopril kinetics. *Clin Pharmacol Ther* **31**:452-458.
- DYER J, BEECHEY RB, GORVEL JP, SMITH RT, WOOTTON R & SHIRAZI-BEECHEY SP (1990)** Glycyl-L-proline transport in rabbit enterocyte basolateral-membrane vesicles. *Biochem J* **269**:565-571.
- EHRNEBO M, NILSSON SO & BOREUS LO (1979)** Pharmacokinetics of ampicillin and its prodrugs bacampicillin and pivampicillin in man. *J Pharmacokinet Biopharm B* **7**:429-451.
- ELLIOTT T (1993)** Transport of 5-aminolevulinic acid by the dipeptide permease in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **175**:325-331.
- ENDEGE WO, LONSDALE-ECCLES JD, OLEMBO NK, MOLOO SK & OLE-MOIYOI OK (1989)** Purification and characterization of two fibrinolysins from the midgut of adult female *Glossina morsitans centralis*. *Comp Biochem Physiol B* **92**:25-34.
- ENGEL M, HOFFMANN T, WAGNER L, WERMANN M, HEISER U, KIEFERSAUER R, HUBER R, BODE W, DEMUTH HU & BRANDSTETTER H (2003)** The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *PNAS* **100**:5063-5068.
- ENNIS SR, NOVOTNY A, XIANG J, SHAKUI P, MASADA T, STUMMER W, SMITH DE & KEEP RF (2003)** Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain. *Brain Res* **959**:226-234.
- EZAKI J, TAKEDA-EZAKI M & KOMINAMI E (2000)** Tripeptidyl peptidase I, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene product, initiates the lysosomal degradation of subunit c of ATP synthase. *J Biochem (Tokyo)* **128**:509-516.
- EZRA A, HOFFMANN A, BREUER E, ALFERIEV IS, MONKKONEN J, HANANY-ROZEN N, WEISS G, STEPENSKY D, GATI I, COHEN H, TORMALEHTO S, AMIDON GL & GOLOMB G (2000)** A peptide prodrug approach for improving bisphosphonate oral absorption. *J Med Chem* **43**:3641-3652.
- FARIA TN, TIMOSZYK JK, STOUCH TR, VIG BS, LANDOWSKI CP, AMIDON GL, WEAVER CD, WALL DA & SMITH RL (2004)** A novel high-throughput PepT1 transporter assay differentiates between substrates and antagonists. *Mol Pharm* **1**:67-76.
- FEI YJ, FUJITA T, LAPP DF, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1998a)** Two oligopeptide transporters from *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning and functional expression. *Biochem J* **332**:565-572.
- FEI YJ, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1998b)** Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol J* **58**:239-261.
- FEI YJ, KANAI Y, NUSSBERGER S, GANAPATHY V, LEIBACH FH, ROMERO MF, SINGH SK, BORON WF & HEDIGER MA (1994)** Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* **368**:563-566.
- FEI YJ, LIU W, PRASAD PD, KEKUDA R, OBLAK TG, GANAPATHY V & LEIBACH FH (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 YJ, ROMERO MF, KRAUSE M, LIU JC, HUANG W, GANAPATHY V & LEIBACH FH (2000a)** A novel H⁺-coupled oligopeptide transporter (OPT3) from *Caenorhabditis elegans* with a predominant function as a H(+) channel and an exclusive expression in neurons. *J Biol Chem* **275**:9563-9571.
- FEI YJ, SUGAWARA M, LIU JC, LI HW, GANAPATHY V, GANAPATHY ME & LEIBACH FH (2000b)** cDNA structure, genomic organization, and promotor analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochim Biophys Acta* **1492**:145-154.
- FISCHER SM, BALDWIN JK & ADAMS LM (1986)** Effects of anti-promoters and strain of mouse on tumor promotor-induced oxidants in murine epidermal cells. *Carcinogenesis* **7**:915-918.
- FLEISCHER B (1994)** CD 26: A surface protease involved in T-cell activation. *Immunol Today* **15**:180-184.
- FOGH J, FOGH JM & ORFEO T (1977)** One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**:221-226.
- FOLTZ M, MEYER A, THEIS S, DEMUTH HU & DANIEL H (2004)** A rapid *in vitro* screening for delivery of peptide-derived peptidase inhibitors as potential drug candidates via epithelial peptide transporters. *J Pharmacol Exp Ther* **27**:432-435.
- FUJITA T, KISHIDA T, WADA M, OKADA N, YAMAMOTO A, LEIBACH FH & GANAPATHY V (2004)** Functional characterization of brain peptide transporter in rat cerebral cortex: identification of the high-affinity type H⁺/peptide transporter PEPT2. *Brain Res* **997**:52-61.
- FUKUDA H, CASAS A & BATLLE A (2005)** Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:272-276.
- GAN LS, NIEDERER T, EADS C & THAKKER D (1993)** Evidence for predominantly paracellular transport of thyrotropin releasing hormone across CACO-2 cell monolayers. *Biochem Biophys Res Commun* **197**:771-777.
- GANAPATHY ME, BRANDSCH M, PRASAD PD, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1995)** Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J Biol Chem* **270**:25672-25677.
- GANAPATHY ME, HUANG W, WANG H, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1998)** Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun* **19**:470-475.
- GANAPATHY V & LEIBACH FH (1983)** Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycyl-L-proline. *J Biol Chem* **258**:14189-14192.
- GARDLO K, HORSKA Z, ENK CD, RAUCH L, MEGAHED M, RUZICKA T & FRITSCH T (2003)** Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol* **48**:893-896.
- GEBAUER S, KNÜTTER I, HARTRODT H, BRANDSCH M, NEUBERT K & THONDORF I (2003)** Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses of peptide substrates of the mammalian H⁺/peptide cotransporter PEPT1. *J Med Chem* **46**:5725-5734.
- GEDERAAS OA, HOLROYD A, BROWN SB, VERNON D, MOAN J & BERG K (2001)** 5-Amino-laevulinic acid methyl ester transport on amino acid carriers in a human colon adenocarcinoma cell line. *Photochem Photobiol* **73**:164-169.

- GHARTEY-TAGOE EB, MORGAN JS, AHMED K, NEISH AS & PRAUSNITZ MR (2004)** Electroporation-mediated delivery of molecules to model intestinal epithelia. *Int J Pharm* **270**:127-138.
- GIBSON MM, ELLIS EM, GRAEME-COOK KA & HIGGINS CF (1987)** OmpR and EnvZ are pleiotropic regulatory proteins: positive regulation of the tripeptide permease (tppB) of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **207**:120-129.
- GIBSON MM, PRICE M & HIGGINS CF (1984)** Genetic characterization and molecular cloning of the tripeptide permease (tpp) genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **160**:122-130.
- GIBSON SL, NGUYEN ML, HAVENS JJ, BARBARIN A & HILF R (1999)** Relationship of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels to mitochondrial content in neoplastic cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **19**:315-321.
- GOSSNER L, STOLTE M, SROKA R, RICK K, MAY A, HAHN EG & ELL C (1998)** Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in BARRETT's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid. *Gastroenterology* **114**:448-455.
- GRAPPEL SF, GIOVENELLA AJ & NISBET LJ (1985)** Activity of a peptidyl prodrug, alafosfalin, against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **27**:961-963.
- GREINER B, EICHELBAUM M, FRITZ P, KREICHGAUER HP, VON RICHTER O, ZUNDLER J & KROEMER HK (1999)** The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* **104**:147-153.
- GRONEBERG DA, DÖRING F, EYNOTT PR, FISCHER A & DANIEL H (2001a)** Intestinal peptide transport: ex vivo uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**:G697-G704.
- GRONEBERG DA, DÖRING F, NICKOLAUS M, DANIEL H & FISCHER A (2001b)** Expression of PEPT2 peptide transporter mRNA and protein in glial cells of rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* **304**:181-184.
- GRONEBERG DA, DÖRING F, THEIS S, NICKOLAUS M, FISCHER A & DANIEL H (2002)** Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein. *Am J Physiol* **282**:E1172-E1179.
- GRONEBERG DA, NICKOLAUS M, SPRINGER J, DÖRING F, DANIEL H & FISCHER A (2001c)** Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake. *Am J Pathol* **158**:707-714.
- GROZIAK MP (2001)** Boron therapeutics on the horizon. *Am J Ther* **8**:321-328.
- HALL MJ, MIDDLETON RF & WESTMACOTT D (1983)** The fractionary inhibitory concentration (FIC) as a measure of synergy. *J Antimicrob Chemother* **11**:427-433.
- HAN H, DE VRUEH RL, RHIE JK, COVITZ KM, SMITH PL, LEE CP, OH DM, SADEE W & AMIDON GL (1998)** 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm Res* **15**:1154-1159.
- HELLER R, GILBERT R & JAROSZESKI MJ (1999)** Clinical applications of electrochemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* **35**:119-129.

- HERMES-LIMA M, CASTILHO RF, VALLE VG, BECHARA EJ & VERCESI AE (1992)** Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta* **1180**:201-206.
- HERMES-LIMA M, VALLE VG, VERCESI AE & BECHARA EJ (1991)** Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim Biophys Acta* **1056**:57-63.
- HERRADA G, PUPPO A & RIGAUD J (1992)** Delta-aminolevulinate uptake by *Rhizobium* bacteroids and its limitation by the peribacteroid membrane in legume nodules. *Biochem Biophys Res Commun* **184**:1324-1330.
- HERRERA-RUIZ D & KNIPP GT (2003)** Current perspectives on established and putative mammalian oligopeptide transporters. *J Pharm Sci* **92**:691-714.
- HERRERA-RUIZ D, WANG Q, GUDMUNDSSON OS, COOK TJ, SMITH RL, FARIA TN & KNIPP GT (2001)** Spatial expression patterns of peptide transporters in the human and rat gastrointestinal tracts, Caco-2 *in vitro* cell culture model, and multiple human tissues. *AAPS PharmSci* **3**:E9.
- HILBI H, PURO RJ & ZYCHLINSKY A (2000)** Tripeptidyl peptidase II promotes maturation of caspase-1 in *Shigella flexneri*-induced macrophage apoptosis. *Infect Immun* **68**:5502-5508.
- HINKLE PM, PEKARY AE, SENANAYAKI S & SATTIN A (2002)** Role of TRH receptors as possible mediators of analeptic actions of TRH-like peptides. *Brain Res* **935**:59-64.
- HOFFMEYER S, BURK O, VON RICHTER O, ARNOLD HP, BROCKMÖLLER J, JOHNE A, CASCORBI I, GERLOFF T, ROOTS I, EICHELBAUM M & BRINKMANN U (2000)** Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vitro*. *PNAS* **97**:3473-3478.
- HU M & AMIDON GL (1988)** Passive and carrier-mediated intestinal absorption components of captopril. *J Pharm Sci* **77**:1077-1011.
- HU M, CHEN J, TRAN D, ZHU Y & LEONARDO G (1994)** The Caco-2 cell monolayers as an intestinal metabolism model: metabolism of dipeptide Phe-Pro. *J Drug Target* **2**:79-89.
- HU M, ZHENG L, CHEN J, LIU L, LI Y, DANTZIG A & STRATFORD RE Jr (1995)** Peptide transporter function and prolidase activities in Caco-2 cells: a lack of coordinated expression. *J Drug Target* **3**:291-300.
- IRIE M, TERADA T, SAWADA K, SAITO H & INUI K (2001)** Recognition and transport characteristics of nonpeptidic compounds by basolateral peptide transporter in Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:711-717.
- ISHIKAWA T, HIRANO H, ONISHI Y, SAKURAI A & TARUI S (2004)** Functional evaluation of ABCB1 (P-glycoprotein) polymorphisms: high-speed screening and structure-activity relationship analyses. *Drug Metab Pharmacokin* **19**:1-14.
- ITOH T, TANNO M, LI YH & YAMADA H (1998)** Transport of pheneticillin into rat intestinal brush border membrane vesicles: Role of the monocarboxylic acid transport system. *Int J Pharm* **172**:103-112.
- IWATA S & MORIMOTO C (1999)** CD26/dipeptidyl peptidase IV in the context: the different role of a multifunctional ectoenzyme in malignant transformation. *J Exp Med* **190**:301-305.

- JOHNSON G, HUI SW & OSEROFF AR (2002)** Electrically enhanced percutaneous delivery of delta-aminolevulinic acid using electric pulses and a DC potential. *Photochem Photobiol* **75**:534-540.
- JOHNSON LA, MOON KE & EISENBERG M (1988)** Inactivation of chymotrypsin and human skin chymase: kinetics of time-dependent inhibition in the presence of substrate. *Biochim Biophys Acta* **953**:269-279.
- KAFARSKI P & LEJCZAK B (2001)** Aminophosphonic acids of potential medical importance. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **1**:301-312.
- KAFARSKI P, LEJCZAK B & MASTALERZ P (1985)** Phosphonopeptides – Synthesis and biological activity -. *Beitr Wirkst forsch* **25**, Inst f Wirkstofforsch, Berlin.
- KAFARSKI P & MASTALERZ P (1984)** Aminophosphonates. Natural occurrence, biochemistry and biological properties. *Beitr Wirkst forsch* **21**, Inst f Wirkstofforsch, Berlin.
- KAMEOKA J, TANAKA T, NOJIMA Y, SCHLOSSMAN SF & MORIMOTO C (1993)** Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* **261**:466-469.
- KENNEDY DJ, LEIBACH FH, GANAPATHY V & THWAITES DT (2002)** Optimal absorptive transport of the dipeptide glycylsarcosine is dependent on functional Na⁺/H⁺ exchange activity. *Pflügers Arch* **445**:139-146.
- KEPPLER D, CUI Y, KONIG J, LEIER I & NIES A (1999)** Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes. *Adv Enzyme Regul* **39**:237-246.
- KIM RB, WANDEL C, LEAKE B, CVETKOVIC M, FROMM MF, DEMPSEY PJ, RODEN MM, BELAS F, CHAUDHARY AK, RODEN DM, WOOD AJ & WILKINSON GR (1999)** Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* **16**:408-414.
- KNUTH A, GABBERT H, DIPPOLD W, KLEIN O, SACHSSE W, BITTER-SUERMAN D, PRELLWITZ W & MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH (1985)** Biliary adenocarcinoma. Characterisation of three new human tumor cell lines. *J Hepatol* **1**:579-596.
- KNÜTTER I (1998)** Einige Aspekte zu den strukturellen Anforderungen an den intestinalen PEPT1-Transporter. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- KNÜTTER I (2003)** Strukturelle Anforderungen an Substrate und Inhibitoren epithelialer H⁺/Peptidsymporter. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- KNÜTTER I, HARTRODT B, THEIS S, FOLTZ M, RASTETTER M, DANIEL H, NEUBERT K & BRANDSCH M (2004)** Analysis of the transport properties of side chain modified dipeptides at the mammalian peptide transporter PEPT1. *Eur J Pharm Sci* **21**:61-67.
- KNÜTTER I, RUBIO-ALLIAGA I, BOLL M, HAUSE G, DANIEL H, NEUBERT K & BRANDSCH M (2002)** H⁺-peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**:G222-229.
- KOGA K, KAWASHIMA S & MURAKAMI M (2002)** *In vitro* and *in situ* evidence for the contribution of Labrasol and Gelucire 44/14 on transport of cephalixin and cefoperazone by rat intestine. *Eur J Pharm Sci* **54**:311-318.

- KONTNY E, KVANTA A, FREDHOLM BB (1992)** Activation of proteinkinase C and elevation of cAMP interact synergistically to raise c-Fos and AP-1 activity in Jurkat cells. *Eur J Pharmacol* **227**:333-338.
- KOROM S, DE MEESTER I, STADLBAUER THW, CHANDRAKER A, SCHAUB M, SAYAGH MH, BELYAEV A, HAEMERS H, SCHARPÉ S & KUPIEC-WEGLINSKI JW (1997)** Inhibition of CD26/Dipeptidyl peptidase IV activity *in vivo* prolongs cardiac allograft heart survival in rat recipients. *Transplantation* **63**:1495-1500.
- KOTTRA G, STAMFORD A & DANIEL H (2002)** PEPT1 as a paradigm for membrane carriers that mediate electrogenic bidirectional transport of anionic, cationic, and neutral substrates. *J Biol Chem* **277**:32683-32691.
- KUKHAR VP & HUDSON HR (Ed) (2000)** Aminophosphonic and aminophosphinic acids. Chemistry and biological activity. 1. Aufl, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- LANDOWSKI CP, HAN HK, LEE KD & AMIDON GL (2003)** A fluorescent hPept1 transporter substrate for uptake screening. *Pharm Res* **20**:1738-1745.
- LANGER S, ABELS C, BOTZLAR A, PAHERNIK S, RICK K, SZEIMIES RM & GOETZ AE (1999)** Active and higher intracellular uptake of 5-aminolevulinic acid in tumors may be inhibited by glycine. *J Invest Dermatol* **112**:723-728.
- LEE CP, DE VRUEH RL & SMITH PL (1996)** Transport of a prodrug acyclovir, L-Valacyclovir, via the oligopeptide transporter. *Proceed Inter Symp Control Rel Bioact Mater* **23**:47-48.
- LEE H, LEE JS & LEE HS (1995)** Simultaneous determination of ampicillin and metampicillin in biological fluids using high-performance liquid chromatography with column switching. *J Chromatogr B Biomed Appl* **664**:335-340.
- LEONARD GD, FOJO T & BATES SE (2003)** The role of ABC transporters in clinical practise. *Oncologist* **8**:411-424.
- LI YH, ITO K, TSUDA Y, KOHDA R, YAMADA H & ITOH T (1999)** Mechanism of intestinal absorption of an orally active β -lactam prodrug: uptake and transport of carindacillin in Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* **290**:958-964.
- LI Q, SAI Y, KATO Y, TAMAI I & TSUJI A (2003)** Influence of drugs and nutrients on transporter gene expression levels in Caco-2 and LS180 intestinal epithelial cell lines. *Pharm Res* **20**:1119-1124.
- LIANG R, FEI YJ, PRASAD PD, RAMAMOORTHY S, HAN H, YANG-FENG TL, HEDIGER MA, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1995)** Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* **270**:6456-6463.
- LIU W, LIANG R, RAMAMOORTHY S, FEI YJ, GANAPATHY ME, HEDIGER MA, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1995)** Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim Biophys Acta* **1235**:461-466.
- LOPEZ RF, BENTLEY MV, DELGADO-CHARRO MB & GUY RH (2001)** Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. *Pharm Res* **18**:311-315.
- LOPEZ RF, BENTLEY MV, DELGADO-CHARRO MB & GUY RH (2003)** Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. *J Control Release* **88**:65-70.

- LOPEZ RF, BENTLEY MV, DELGADO-CHARRO MB, SALOMON D, VAN DEN BERG H, LANGE N & GUY RH (2003b)** Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis *in vitro*. *Photochem Photobiol* **77**:304-308.
- LUCKNER P & BRANDSCH M (2005)** Interaction of 31 β -lactam antibiotics with the H⁺/peptide symporter PEPT2: analysis of affinity constants and comparison with PEPT1. *Eur J Pharm Biopharm* **59**:17-24
- MACKENZIE B, FEI YJ, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1996)** A study of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester used in *in vitro* and *in vivo* systems of human bladder cancer. *Biochim Biophys Acta* **1284**:125-128.
- MANIVASAGER V, HENG PW, HAO J, ZHENG W, SOO KC & OLIVO M (2003)** A study of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester used in *in vitro* and *in vivo* systems of human bladder cancer. *Int J Oncol* **22**:313-318.
- MARUYAMA HB, ARISAWA M & SAWADA T (1979)** Alafosfalin, a new inhibitor of cell wall biosynthesis: *in vitro* activity against urinary isolates in Japan and potentiation with β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* **16**:444-451.
- MATHÉ G (1991)** Bestatin, an aminopeptidase inhibitor with a multi-pharmacological function. *Biomed & Pharmacother* **45**:49-54.
- McLOUGHLIN JL & CANTRILL RC (1984)** The effect of delta-aminolevulinic acid on the high affinity uptake of aspartic acid by rat brain synaptosomes. *Gen Pharmacol* **15**:553-555.
- MENON RM & BARR WH (2002)** Transporters involved in apical and basolateral uptake of ceftibuten into Caco-2 cells. *Biopharm Drug Dispos* **23**:317-326.
- MEYER A (2004)** DP IV-Inhibitoren als orale Antidiabetika: Untersuchungen zu Transport, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- MOORE VA, IRWIN WJ, TIMMINS P, LAMBERT PA, CHONG S, DANDO SA & MORRISON RA (2000)** A rapid screening system to determine drug affinities for the intestinal dipeptide transporter 2: affinities of ACE inhibitors. *Int J Pharm* **210**:29-44.
- MOULY S & PAYNE MF (2003)** P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res* **20**:1595-1599.
- NAKAMATSU Y & TANAKA T (2004)** The function of a trypsin-like enzyme in the saliva of *Euplectrus separatae* larvae. *J Insect Physiol* **50**:847-854.
- NEUMANN J & BRANDSCH M (2003)** δ -Aminolevulinic acid transport in cancer cells of the human extrahepatic biliary duct. *J Pharmacol Exp Ther* **305**:219-224.
- NEUMANN J, BRUCH M, GEBAUER S & BRANDSCH M (2004)** Transport of the phosphonodipeptide alafosfalin by the H⁺/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2 in intestinal and renal epithelial cells. *Eur J Biochem* **271**:2012-2017.
- NIELSEN CU & BRODIN B (2003)** Di/tri-peptide transporters as drug delivery targets: regulation of transport under physiological and patho-physiological conditions. *Curr Drug Targets* **4**:373-388.

- NIELSEN CU, BRODIN B, JORGENSEN FS, FROKJAER S & STEFFANSEN B (2002)** Human peptide transporters: therapeutic applications. *Expert Opin Ther Patents* **12**:1329-1349.
- NISBET TM & PAYNE JW (1982)** The characteristics of peptide uptake in *Streptococcus faecalis*: studies on the transport of natural peptides and antibacterial phosphono-peptides. *J Gen Microbiol* **128**:1357-1364.
- NOODT BB, BERG K, STOKKE T, PENG Q & NESLAND JM (1996)** Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br J Cancer* **74**:22-29.
- NOVOTNY A, XIANG J, STUMMER W, TEUSCHER NS, SMITH DE & KEEP RF (2000)** Mechanisms of 5-aminolevulinic acid uptake at the choroid plexus. *J Neurochem* **75**:321-328.
- OCHELTREE SM, KEEP RF, SHEN H, YANG D, HUGHES BA & SMITH DE (2003)** Preliminary investigation into the expression of proton-coupled oligopeptide transporters in neural retina and retinal pigment epithelium (RPE): lack of functional activity in RPE plasma membranes. *Pharm Res* **20**:1364-1372.
- OCHELTREE SM, SHEN H, HU Y, XIANG J, KEEP RF & SMITH DE (2004)** Role of PEPT2 in the choroid plexus uptake of glycylsarcosine and 5-aminolevulinic acid: studies in wild-type and null-mice. *Pharm Res* **21**:1680-1685.
- OGIHARA H, SAITO H, SHIN BC, TERADO T, TAKENOSHITA S, NAGAMACHI Y, INUI K & TAKATA K (1996)** Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem Biophys Res Commun* **220**:848-852.
- OKUHARA M, KURODA Y, GOTO T, OKAMOTO M, TERANO H, KOHSAKA M, AOKI H & IMANAKA H (1980)** Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *J Antibiot (Tokyo)* **33**:24-28.
- ORNING L, KRIVI G, BILD G, GIERSE J, AYKENT S & FITZPATRICK FA (1991)** Inhibition of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase by captopril. *J Biol Chem* **266**:16507-16511.
- OVERBOSCH D, MATTHIE H & VAN FURTH R (1985)** Comparative pharmacodynamics and clinical pharmacokinetics of phenoxymethylpenicillin and pheneticillin. *Br J Clin Pharmacol* **19**:657-668.
- PALM K, LUTHMAN K, ROS J, GRÅSJO J & ARTURSSON P (1999)** Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:435-443.
- PAN Y, WONG EA, BLOOMQUIST JR & WEBB KE Jr (1985)** Expression of a cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (oPepT1) in *Xenopus* oocytes induces uptake of oligopeptides *in vitro*. *J Nutr* **131**:1264-1270.
- PARIKH AA, MOON MR, PRITTS TA, FISCHER JE, SZABO C, HASSELGREN PO & SALZMAN AL (2000)** IL-1beta induction of NF-kappaB activation in human intestinal epithelial cells is independent of oxyradical signaling. *Shock* **13**:8-13.
- PAULSEN IT & SKURRAY RA (1994)** The POT family of transport proteins. *Trends Biochem Sci* **19**:404.
- PECH O, NAGY CD, GOSSNER L, MAY A & ELL C (2002)** Photodynamic therapy of human BARRETT's cancer using 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX: an *in-vivo* dosimetry study in athymic nude mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **14**:657-662.

- PEDICORD DL, SEIFFERT D & BLAT Y (2004)** Substrate-dependent modulation of the mechanism of factor XIa inhibition. *Biochemistry* **43**:11883-11888.
- PENG Q, WARLOE T, BERG K, MOAN J, KONGSHAUG M, GIERCKSKY KE & NESLAND JM (1997)** 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* **79**:2282-2308.
- PERRY JD, RILEY G, GOULD FK, PEREZ JM, BOISSIER E, OUEDRAOGO RT & FREYDIÈRE AM (2002)** Alafosfalin as a selective agent for isolation of *Salmonella* from clinical samples. *J Clin Microbiol* **40**:3913-3916.
- PIERRE MB, TEDESCO AC, MARCHETTI JM & BENTLEY MV (2001)** *Stratum corneum* lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. *BMC Dermatol* **1**:5.
- POTOKA DA, NADLER EP, ZHOU X, ZHANG XR, UPPERMAN JS & FORD HR (2000)** Inhibition of NFkappaB by IkappaB prevents cytokine-induced NO production and promotes enterocyte apoptosis *in vitro*. *Shock* **14**:366-373.
- RAMAMOORTHY S, LIU W, MA YY, YANG-FENG TL, GANAPATHY V & LEIBACH FH (1995)** Proton/peptide cotransporter (PEPT2) from human kidney: functional characterization and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* **1240**:1-4.
- RASMUSSEN HB, BRANNER S, WIBERG FC & WAGTMANN N (2003)** Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nat Struct Biol* **10**:19-25.
- REINHOLD D, KÄHNE T, STEINBRECHER A, WRENGER S, NEUBERT K, ANSORGE S & BROCKE S (2002)** The role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) enzymatic activity in T cell activation and autoimmunity. *Biol Chem* **383**:1133-1138.
- RODRIGUEZ E, BAAS P & FRIEDBERG JS (2004)** Innovative therapies: photodynamic therapy. *Thorac Surg Clin* **14**:557-566.
- ROMAN G, MELLER V, WU KH & DAVIS RL (1998)** The *opt1* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a proton-dependent dipeptide transporter. *Am J Physiol* **275**:C857-C869.
- ROSENBLUM JS & KOZARICH JW (2003)** Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **7**:496-504.
- ROTH KS, CARTER BE, MOSES LC & SPENCER PD (1990)** On rat renal aminolevulinic acid transport and metabolism in experimental FANCONI syndrome. *Biochem Med Metab Biol* **44**:238-246.
- RUBIO-ALIAGA I, BOLL M & DANIEL H (2000)** Cloning and characterization of the gene encoding the mouse peptide transporter PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun* **276**:734-741.
- RUBIO-ALIAGA I & DANIEL H (2002)** Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol Sci* **23**:434-440.
- RUD E, GEDERAAS O, HOGSET A & BERG K (2000)** 5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochem Photobiol* **71**:640-647.
- RUMALLA A, BARON TH, WANG KK, GORES GJ, STADHEIM LM & DE GROEN PC (2001)** Endoscopic application of photodynamic therapy for cholangiocarcinoma. *Gastrointest Endosc* **53**:500-504.

- RUSSELL VA, LAMM MC & TALJAARD JJ (1982)** Effects of delta-aminolevulinic acid, porphobilinogen and structurally related amino acids on 2-deoxy-glucose uptake in cultured neurons. *Neurochem Res* **7**:1009-1022.
- 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, MOTOHASHI H, MUKAI M & INUI K (1997)** Cloning and characterization of a pH-sensing regulatory factor that modulates transport activity of the human H⁺/peptide cotransporter, PEPT1. *Biochim Biophys Res Commun* **237**:577-582.
- 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.
- SAKATA K, YAMASHITA T, MAEDA M, MORIYAMA Y, SHIMADA S & TOHYAMA M (2001)** Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochem J* **356**:53-60.
- SAWADA K, TERADA T, SAITO H, HASHIMOTO Y & INUI K (1999)** Recognition of L-amino acid ester compounds by rat peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:705-709.
- SCHIERBEEK H, BEUKEVELD GJ, VAN FAASSEN H, VAN SPRONSEN FJ, BIJSTERVELD K, VENEKAMP-HOOLSEMA EE, WOLTERS BG & SMIT GP (1993)** Hereditary tyrosinaemia type I: a long-term study of the relationship between the urinary excretions of succinylacetone and delta-aminolevulinic acid. *J Inherit Metab Dis* **16**:1034-1040.
- SCHLENZIG D (2001)** Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und ihre Anwendung zur Beeinflussung der Glukosetoleranz in einem Tiermodell des Diabetes Typ 2. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- SCHOENMAKERS RG, STEHOUWER MC & TUKKER JJ (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 HU, 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.
- SENTEN K, VAN DER VEKEN P, DE MEESTER I, LAMBEIR AM, SCHARPÉ S, HAEMERS A & AUGUSTYNS K (2003)** Design, synthesis, and SAR of potent and selective dipeptide-derived inhibitors for dipeptidyl peptidases. *J Med Chem* **46**:5005-5014.
- SHEN H, SMITH DE, YANG T, HUANG YG, SCHNERMANN JB & BROSIUS FC III (1999)** Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *Am J Physiol* **276**:F658-F665.
- 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.

- SHU C, SHEN H, HOPFER U & SMITH DE (2001)** Mechanism of intestinal absorption and renal reabsorption of an orally active Ace inhibitor: uptake and transport of fosinopril in cell cultures. *Drug Metab Dispos* **29**:1307-1315.
- SILBERNAGEL S & DESPOPOULOS A (1991)** Taschenatlas der Physiologie. 4. Aufl, GEORG THIEME Verlag u. Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co. KG, Stuttgart & München.
- SINKO PJ & BALIMANE PV (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 MW & PAYNE JW (1990)** Simultaneous exploitation of different peptide permeases by combinations of synthetic peptide smugglins can lead to enhanced antibacterial activity. *FEMS Microbiol Lett* **58**:311-316.
- SPIRLI C, GRANATO A, ZSEMBERY K, ANGLANI F, OKOLICSANYI L, LARUSSO NF, CREPALDI G & STRAZZABOSCO M (1998)** Functional polarity of Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers in a rat cholangiocyte cell line. *Am J Physiol* **275**:G1236-G1245.
- STEFFANSEN B, NIELSEN CU, BRODIN B, ERIKSSON AH, ANDERSEN R & FROKJAER S (2004)** Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci* **21**:3-16.
- STEINER HY, NAIDER F & BECKER JM (1995)** The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol Microbiol* **16**:825-834.
- STEINER HY, SONG W, ZHANG L, NAIDER F, BECKER JM & STACEY G (1994)** An *Arabidopsis* peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *Plant Cell* **6**:1289-1299.
- STEINBRECHER A, REINHOLD D, QUIGLEY L, GADO A, TRESSER N, IZIKSON L, BORN I, FAUST J, NEUBERT K, MARTIN R, ANSORGE S & BROCKE S (2001)** Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and upregulates TGF-β1 secretion *in vivo*. *J Immunol* **166**:2041-2048.
- STRAZZABOSCO M, POCI C, SPIRLI C, SARTORI L, KNUTH A & CREPALDI G (1994)** Effect of ursodeoxycholic acid on intracellular pH in a bile duct epithelium-like cell line. *Hepatology* **19**:145-154.
- STRYER L (1991)** Biochemie. 5. Aufl, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York.
- SUGAWARA M, HUANG W, FEI Y-J, LEIBACH FH, GANAPATHY V & GANAPATHY ME (2000)** Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharm Sci* **89**:781-789.
- SUGAWARA M, OGAWA T, KOBAYASHI M & MIYAZAKI K (2003)** Uptake of dipeptide and beta-lactam antibiotics by the basolateral membrane vesicles prepared from rat kidney. *Biochim Biophys Acta* **1609**:39-44.
- SUN J, HE ZG, CHENG G, WANG SJ, HAO XH & ZOU MJ (2004)** Multidrug resistance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit* **10**:RA5-14.

- SWABB EA, SUGERMAN AA & STERN M (1983)** Oral bioavailability of the monobactam aztreonam (SQ 26,776) in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **23**:548-550.
- SZEIMIES RM, KARRER S, RADAKOVIC-FIJAN S, TANEW A, CALZAVARA-PINTON PG, ZANE C, SIDOROFF A, HEMPEL M, ULRICH J, PROEBSTLE T, MEFFERT H, MULDER M, SALOMON D, DITTMAR HC, BAUER JW, KERNLAND K & BRAATHEN L (2002)** Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: a prospective randomized study. *J Am Acad Dermatol* **47**:258-262.
- TAIPALENSUU J, TORNBLOM H, LINDBERG G, EINARSSON C, SJOQVIST F, MELHUS H, GARBERG P, SJOSTROM B, LUNDGREN B & ARTURSSON P (2001)** Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:164-170.
- TAKI Y, SAKANE T, NADAI T, SEZAKI H, AMIDON GL, LANGGUTH P & YAMASHITA S (1995)** Gastrointestinal absorption of peptide drug: quantitative evaluation of the degradation and the permeation of metkephamid in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **274**:373-377.
- TAMAI I, NAKANISHI T, NAKAHARA H, SAI Y, GANAPATHY V, LEIBACH F & TSUJI A (1998)** Improvement of L-dopa absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PepT1. *J Pharm Sci* **87**:1542-1546.
- TANAKA S, MURAKAMI T, HORIKAWA H, SUGIURA M, KAWASHIMA K & SUGITA T (1997)** Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Int J Immunopharmacol* **19**:15-24.
- TEMPLE CS & BOYD CA (1998)** Proton-coupled oligopeptide transport by rat renal cortical brush border membrane vesicles: a functional analysis using ACE inhibitors to determine the isoform of the transporter. *Biochim Biophys Acta* **1373**:277-281.
- 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, SAWADA K, ITO T, SAITO H, HASHIMOTO Y & INUI K (2000)** Functional expression of novel peptide transporter in renal basolateral membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**:F851-F857.
- TERADA T, SAWADA K, SAITO H, HASHIMOTO Y & INUI K (1999)** Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am J Physiol* **276**:G1435-G1441.
- THAMOTHARAN M, BAWANI SZ, ZHOU X & ADIBI SA (1999)** Hormonal regulation of oligopeptide transporter PepT1 in a human intestinal cell line. *Am J Physiol* **276**:C821-C826.
- THAMOTHARAN M, LOMBARDO YB, BAWANI SZ & ADIBI SA (1997)** An active mechanism for completion of the final stage of protein degradation in the liver, lysosomal transport of dipeptides. *J Biol Chem* **272**:11786-11790.
- THEIS S (2002)** Heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung intestinaler und renaler Peptidtransporter in der methylothropen Hefe *Pichia pastoris*. Dissertation A, Technische Universität, München.
- THEIS S, KNÜTTER I, HARTRODT B, BRANDSCH M, KOTTRA G, NEUBERT K & DANIEL H (2002)** Synthesis and characterization of high affinity inhibitors of the H⁺/peptide transporter PEPT2. *J Biol Chem* **277**:7287-7292.

- THOMAS H & COLEY HM (2003)** Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* **10**:159-165.
- THUMMEL KE & WILKINSON GR (1998)** *In vitro* and *in vivo* drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol* **38**:389-430.
- THWAITES DT, BROWN CD, HIRST BH & SIMMONS NL (1993a)** H⁺-coupled dipeptide (glycylsarcosine) transport across apical and basal borders of human intestinal Caco-2 cell monolayers display distinctive characteristics. *Biochim Biophys Acta* **1151**:237-245.
- THWAITES DT, CAVET M, HIRST BH & SIMMONS NL (1995)** Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol* **114**:981-986.
- THWAITES DT, HIRST BH & SIMMONS NL (1993c)** Passive transepithelial absorption of thyrotropin-releasing hormone (TRH) via a paracellular route in cultured intestinal and renal epithelial cell lines. *Pharm Res* **425**:178-180.
- THWAITES DT, MCEWAN GT, HIRST BH & SIMMONS NL (1993b)** Transepithelial dipeptide (glycylsarcosine) transport across epithelial monolayers of human Caco-2 cells is rheogenic. *Pflügers Arch* **10**:674-681.
- TRAUB WH (1980)** *In vitro* evaluation of alaphosphin (Ro 03-7008) against *Serratia marcescens*. *J Chemotherapy* **26**:103-110.
- TREMME P & GEYER A (2002)** An oligomeric Ser-Pro dipeptide mimetic assuming the polyproline II helix conformation. *J Am Chem Soc* **124**:8548-8549.
- TSOPELAS C, PENGLIS S & BARTHOLOMEUSZ FD (2002)** Comparison of [^{99m}Tc]alafosfalin and [⁶⁷Ga]citrate in a mouse model of bacterial infection. *Nucl Med Rev Cent East Eur* **5**:93-97.
- TSOPELAS C, PENGLIS S, RUSZKIEWICZ A & BARTHOLOMEUSZ FD (2003)** [^{99m}Tc]Alafosfalin: an antibiotic peptide infection imaging agent. *Nucl Med Biol* **30**:169-175.
- TSUJI A (2002)** Transporter-mediated drug interactions. *Drug Metabol Pharmacokinet* **17**:253-274.
- TSUJI A, TAMAI I, NAKANISHI M, TERASAKI T & HAMANO S (1993)** Intestinal brush-border transport of the oral cephalosporin antibiotic, cefdinir, mediated by dipeptide and monocarboxylic acid transport systems in rabbits. *J Pharm Pharmacol* **45**:996-998.
- USSING HH & ZEHRAN K (1951)** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* **23**:110-127.
- VERKAMP E, BACKMAN VM, BJORNSSON JM, SOLL D & EGGERTSSON G (1993)** The periplasmic dipeptide permease system transports 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:1452-1456.
- WALKER D, THWAITES DT, SIMMONS NL, GILBERT HJ & HIRST BH (1998)** Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J Physiol Lond* **507**:697-706.
- WALTER E & KISSEL T (1994)** Transepithelial transport and metabolism of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): evidence for an active transport component? *Pharm Res* **11**:1575-1580.

- WEBER AE (2004)** Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *J Med Chem* **47**:4135-4141.
- WELLING PG, KENDALL MJ & DEAN S (1980)** Effect of food on the bioavailability of alafosfalin, a new antibacterial agent. *J Antimicrob Chemother* **6**:373-379.
- WENZEL U, GEBERT I, WEINTRAUT H, WEBER WM, 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 Pharmacol Exp Ther* **277**:831-839.
- WESTMACOTT D, HALL M, HASSALL C, LEES L, ROWE B & WARD L (1981)** Activity of alafosfalin against bacterial pathogens of the gastrointestinal tract *in vitro* and *in vivo*. *Proc 12th Int Congr Chemother* **1**:340-342.
- WIERRANI F, KUBIN A, JINDRA R, HENRY M, GHAREHBAGHI K, GRIN W, SOLTZ-SZOTZ J, ALTH G & GRUNBERGER W (1999)** 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of intraepithelial neoplasia and human papillomavirus of the uterine cervix - a new experimental approach. *Cancer Detect Prev* **23**:351-355.
- WRENGER S, FAUST J, MRESTANI-KLAUS C, FENGLER A, STÖCKEL-MASCHEK A, LOREY S, KÄHNE T, BRANDT W, NEUBERT K, ANSORGE S & REINHOLD D (2000)** Down-regulation of T cell activation following inhibition of dipeptidyl peptidase IV/CD26 by the N-terminal part of the thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* **275**:22180-22186.
- WRENGER S, HOFFMANN T, FAUST J, MRESTANI-KLAUS C, BRANDT W, NEUBERT K, KRAFT M, OLEK S, FRANK R, ANSORGE S & REINHOLD D (1997)** The N-terminal structure of the HIV-1 Tat is required for suppression of CD26-dependent T cell growth. *J Biol Chem* **272**:30283-30288.
- XIA CQ, LIU N, YANG D, MIWA G & GAN LL (2005)** Expression, localization and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* **33**:637-643.
- YAMAMOTO A (1998)** Improvement of intestinal absorption of peptide and protein drugs by chemical modification with fatty acids. *Nippon Rinsho* **56**:601-607.
- 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.
- YOKOHAMA S, YAMASHITA K, TOGUCHI H, TAKEUCHI J & KITAMORI N (1984a)** Absorption of thyrotropin-releasing hormone after oral administration of TRH tartrate monohydrate in the rat, dog and human. *J Pharmacobiodyn* **7**:101-111.
- YOKOHAMA S, YOSHIOKA T, YAMASHITA K & KITAMORI N (1984b)** Intestinal absorption mechanisms of thyrotropin-releasing hormone. *J Pharmacobiodyn* **7**:445-451.
- ZHANG EY, EMERICK RM, PAK YA, WRIGHTON SA & HILLGREN KM (2004)** Comparison of human and monkey peptide transporters: PEPT1 and PEPT2. *Mol Pharm* **1**:201-210.
- ZHOU X, THAMOTHARAN M, GANGOPADHYAY A, SERDIKOFF C & ADIBI SA (2000)** Characterization of an oligopeptide transporter in renal lysosomes. *Biochim Biophys Acta* **1466**:372-378.
- ZHU T, CHEN XZ, STEEL A, HEDIGER MA & SMITH DE (2000)** Differential recognition of ACE inhibitors in *Xenopus laevis* oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2. *Pharm Res* **17**:526-532.

-
- ZOEPF T, JAKOBS R, ARNOLD JC, APEL D, ROSENBAUM A & RIEMANN JF (2001a)** Photodynamic therapy for palliation of nonresectable bile duct cancer - preliminary results with a new diode laser system. *Am J Gastroenterol* **96**:2093-2097.
- ZOEPF T, JAKOBS R, ROSENBAUM A, APEL D, ARNOLD JC & RIEMANN JF (2001b)** Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid is not effective in bile duct cancer. *Gastrointest Endosc* **54**:763-766.
- ZÖPF T & RIEMANN JF (1997)** The change in laser usage in gastroenterology - the status in 1997. *Z Gastroenterol* **35**:987-997.

Danksagung

Mein allerherzlichster Dank gilt Herrn PD Dr. habil. MATTHIAS BRANDSCH, AG Membrantransport des Biozentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas und die hervorragende Betreuung, insbesondere seiner steten Hilfsbereitschaft und den zahlreichen inspirativen Fachgesprächen, die wesentlich zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beitrugen. Ebenfalls herzlichst für die Betreuung der Promotionsarbeit danken, möchte ich Herrn Prof. Dr. KLAUS NEUBERT, welcher mir jederzeit zur Seite stand.

Zutiefst dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. MARTIN LUCKNER (†) und Herrn Dr. habil. REINHARD PASCHKE für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Protektion bezüglich der Bereitstellung und Finanzierung eines befristeten Anstellungsverhältnisses und die Schaffung guter Arbeitsbedingungen in den Räumlichkeiten der BioService Halle GmbH. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. BARBARA KAMPA. Im Labor standen mir CLAUDIA WEBER und Dr. CHRISTIAN PÄTZ mit Rat und Tat zur Seite, wann immer dies nötig war – ganz lieben Dank!

Danken möchte ich den Mitarbeitern der Probiodrug AG für die gute Zusammenarbeit, ganz speziell Dr. HANS-ULRICH DEMUTH und Dr. TORSTEN HOFFMANN für die Gewährung der Teilthematik zum Transport von DP IV-Inhibitoren sowie Dr. ANTJE MEYER, DIANE MEITZNER und UNA MÄDER für die Probenanalytik mittels HPLC-MS.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich bei allen meinen Kollegen der AG Membrantransport und den übrigen Mitarbeitern des Biozentrums der Universität für die kooperative Arbeitsatmosphäre. Mein spezieller Dank gilt INGELORE HAMANN und Dr. SABINE GEBAUER für die Unterstützung bei der HPLC-Analytik, ILKA RUNKEL für ihre Hilfsbereitschaft bei der Zellkultivierung, MANDY BRUCH und ANDRÉ KACHOLDT für ihre Mitarbeit bei elektrophysiologischen Messungen an der USSING-Kammer und nicht zuletzt KATHRIN HOFFMANN und Dr. ILKA KNÜTTER für die Einführung in Zellkultivierungs- und Experimentiertechniken.

Meiner gesamten Familie, speziell meinem lieben Ehemann DIRK, danke ich von ganzem Herzen für ihre Geduld und ihr Verständnis sowie die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen. Ganz spezieller Dank gebührt meinen Eltern für die Ermöglichung meines Werdeganges.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literaturquellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommenes Gedankengut aus wissenschaftlichen Schriften wurde als solches gekennzeichnet.

Halle (Saale), 6. Juli 2005

Lebenslauf

Name: Jana Neumann, geb. Weinhold
Geburtsdatum: 15. Mai 1972
Geburtsort: Halle (Saale)
Familienstand: verheiratet
Kinder: Robin Richard Neumann, 22. Januar 1997
Julia Jasmin Neumann, 9. September 1998

Schulbildung

09/1978 - 08/1988 Polytechnische Oberschule in Halle (Saale)
09/1988 - 08/1990 Erweiterte Polytechnische Oberschule in Halle (Saale)

Studium

10/1990 - 09/1991 Studium der Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/1991 - 04/1998 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/1993 - 05/1996 Langzeitstudie zur Diplomarbeit „Analyse des Sozialverhaltens von Blaustirnamazonen *Amazona aestiva* (LINNÉ 1758) in Gemeinschaftshaltung“
04/1998 Diplom im Fach Biologie

Tätigkeiten

1995 - 1999 redaktionelle Mitarbeit am *Jahrbuch für Papageienkunde* (ab 1997: *Papageienkunde – Parrot Biology*)
01/2000 - 05/2000 Mitarbeiterin bei der BBI Bildungs- und Beratungsinstitut GmbH
06/2000 - 10/2000 freiberufliche, wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der BioService Halle GmbH, Abt. Zellkultur/Wirkstofftransport
11/2000 - 10/2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin der BioService Halle GmbH mit dem Ziel der Promotion (zeitlich befristetes ESF-Projekt der Europäischen Union und des Landes Sachsen/Anhalt)
11/2003 – 06/2005 Promotionsstudentin
seit 07/2005 Laborleiterin im Bereich Zellkultur der Scil Proteins GmbH

Halle (Saale), 6. Juli 2005