

"STRUKTUR-WIRKUNGSUNTERSUCHUNGEN VON
SUBSTRATEN DER H⁺/PEPTIDSYMPORTER
PEPT1 UND PEPT2"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Annegret Biegel

geb. am: 09.04.1977

in: Freiberg

Gutachter /in

1. PD Dr. Iris Thondorf
2. Prof. Dr. habil Wolfgang Sippl
3. Prof. Dr. Hannelore Daniel

Halle (Saale), 19.07.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012255

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012255>]

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2	GRUNDLAGEN	4
2.1	Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR)	4
2.1.1	Allgemeine Aspekte	4
2.1.2	Voraussetzungen für 3D-QSAR Untersuchungen	5
2.1.3	Generierung von 3D-Strukturen der Liganden	6
2.1.4	Konformationsanalyse der Liganden	7
2.1.5	Strukturelle Überlagerung der Liganden	8
2.1.6	Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)	9
2.1.7	Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA)	11
2.1.8	PLS-Analyse	12
2.2	Peptidtransport.....	15
2.2.1	Lokalisation und Funktion von PEPT1 und PEPT2	15
2.2.2	Transportmechanismus von PEPT1 und PEPT2.....	18
2.2.3	Molekularer Aufbau der H ⁺ /Peptidsympporter	19
2.3	Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Liganden der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2.....	21
2.3.1	Untersuchungsmethoden	21
2.3.1.1	Experimentelle Ansätze	21
2.3.1.2	Computerbasierte Ansätze.....	21
2.3.2	Ergebnisse bisheriger Analysen zu Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Substraten von PEPT1 und PEPT2	23
2.3.2.1	Einteilung der PEPT1/PEPT2-Liganden	23
2.3.2.2	Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Di- und Tripeptiden an PEPT1 und PEPT2.....	24
2.3.2.3	Struktur-Wirkungsuntersuchungen von β -Lactam-Antibiotika an PEPT1 und PEPT2.....	25
2.3.2.4	Essentielle Strukturelemente von PEPT1 und PEPT2 Substraten	27
2.3.2.5	Selektivitätsunterschiede von PEPT1 und PEPT2	29
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Material	31
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	Experimentelle Methoden.....	32
3.2.1.1	Zellkultur	32
3.2.1.2	Kompetitionsexperimente	33
3.2.1.3	Stabilitätsmessungen von Tripeptiden	34
3.2.1.4	Bestimmung des transepithelialen Fluxes durch Caco-2-Monolayer	34
3.2.2	Analytische Methoden	35
3.2.2.1	Flüssigkeits-Scintillationsspektrometrie	35
3.2.2.2	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	35
3.2.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	36
3.2.3	Mathematische Methoden	37
3.2.4	Computergestützte Methoden.....	38
3.2.4.1	Generierung der Datensätze	38
3.2.4.2	Generierung der 3D-Strukturen.....	39
3.2.4.3	Konformationsanalyse	39
3.2.4.4	3D-QSAR-Analyse.....	40

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	41
4.1	Experimentelle Untersuchungen	41
4.1.1	Kompetitionsexperimente	41
4.1.1.1	Dipeptide	41
4.1.1.2	Tripeptide	44
4.1.1.3	β -Lactam-Antibiotika	50
4.1.1.4	Weitere Peptidmimetika	52
4.1.2	Transportuntersuchungen	54
4.2	3D-QSAR	56
4.2.1	3D-QSAR von PEPT1-Liganden: Di- und Tripeptide sowie β -Lactam-Antibiotika (Anlage 7.4 Biegel et al., 2005)	56
4.2.1.1	Der Datensatz	56
4.2.1.2	Konformationsanalyse und strukturelles Alignment	56
4.2.1.3	Ableitung eines Pharmakophormodells	59
4.2.1.4	CoMSIA-Ergebnisse	61
4.2.2	3D-QSAR von PEPT2-Substraten (Anlage 7.4 Biegel et al., 2006b)	76
4.2.2.1	Datensatz und strukturelles Alignment	76
4.2.2.2	CoMSIA Ergebnisse	76
4.2.2.3	Auswertung der CoMSIA Konturdiagramme	82
4.2.3	Anwendung der 3D-QSAR Modelle am Beispiel der 2-Aminothiazol-4-essigsäure (Anlage 7.4 Biegel et al., 2007)	90
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	100
6	LITERATURVERZEICHNIS	104
7	ANLAGEN	118
7.1	Hemmkurven	118
7.2	Datensatz des PEPT1-Modells (nach Anlage 7.4 Biegel et al., 2005)	122
7.2.1	Trainingsdatensatz	122
7.2.2	Testdatensatz	126
7.3	Datensatz des PEPT2-Modells (nach Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b))	128
7.3.1	Trainingsdatensatz	128
7.3.2	Testdatensatz	132
7.4	Veröffentlichte Originalarbeiten	134

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAA	Active Analog Approach
ACE	Acetonitril
ATAA	2-Aminothiazol-4-essigsäure
BBMV	Bürstensaummembran-Vesikel
Caco-2	humane Adenokarzinomzelllinie des Kolons
Ci	Curie
CoMFA	comparative molecular field analysis
CoMSIA	comparative molecular similarity indices analysis
3D	dreidimensional
3D-QSAR	three dimensional quantitative structure activity relationships
DISCO	distance comparison
DMAE	1-(2',5'-Dimethoxyphenyl)-2-aminoethanol
dpm	desintegration per minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>F</i>	Fischer-Test
HPLC	high performance liquid chromatography
<i>J</i>	transepithelialer Flux
<i>IC</i> ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die nötig ist, um 50 % der spezifischen Aufnahme eines Standardsubstrates zu hemmen.
<i>K</i> _i	Inhibierungskonstante
<i>K</i> _t	Affinitätskonstante des Transportes (Michaelis-Menten-Konstante)
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
n.b.	nicht bestimmt
LLC-PK ₁	Zelllinie des proximalen Tubulusabschnitt der Niere aus einem männlichen Hampshire-Schwein
LOO	leave-one-out
Lys(Z)-	Lysylbenzyloxycarbonyl
L5O	leave-five-out
<i>n</i>	Anzahl der Parallelbestimmungen
<i>n</i>	Anzahl der Moleküle in einem Datensatz
Nle	Norleucin
<i>P</i>	Hill-Koeffizient
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PEPT1	protonengekoppelter Di- und Tripeptidsymporter 1
PEPT2	protonengekoppelter Di- und Tripeptidsymporter 2

PDB	Protein Datenbank
PLS	partial least square
<i>PRESS</i>	predicted residual sum of squares
q^2	kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient
r^2	Korrelationskoeffizient
r^2_{pred}	Korrelationskoeffizient für den Testdatensatz
S	Standardabweichung bei der Berechnung der Gesamtkorrelation
<i>SKPT</i>	Zelllinie des renalen proximalen Tubulus der Ratte <i>Rattus norvegicus</i>
S_{PRESS}	Standardabweichung der Vorhersagefehler bei der Kreuzvalidierung
Thia	Thiazolidin
TFA	Trifluoressigsäure
TMD	Transmembrandomänen
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Z	Benzyloxycarbonyl-
ZNS	Zentralnervensystem
[Z(NO ₂)]-	4-Nitrobenzyloxycarbonyl-

Abkürzungen der proteinogenen Aminosäuren:

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

1 Einleitung und Zielstellung

Die orale Applikation von Arzneistoffen ist für den Patienten eine relativ einfache Möglichkeit, Wirkstoffe aufzunehmen. Trotz intensiver Forschung bleibt die Entwicklung oral verfügbarer Arzneimittel eine große Herausforderung für die pharmazeutische Industrie. Dabei geht es nicht nur um das Einschleusen von Makromolekülen in den Organismus, sondern auch um die Verbesserung der Aufnahme kleiner hydrophiler Moleküle mit geringer Membranpermeabilität. Die Nutzung intestinaler Transporter ist eine bereits oft praktizierte Methode zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit von Wirkstoffen. Solche Transporter sind polytope Membranproteine, deren physiologische Bedeutung im spezifischen Transport verschiedener Stoffe, z. B. Metabolite und Nährstoffe, durch biologische Membranen besteht. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass eine enorme Anzahl von Wirkstoffen über solche Nährstofftransporter transportiert werden kann. Es zeigte sich auch, dass einige Membrantransporter (z. B. P-Glycoprotein) die Absorption, Exkretion und Toxizität von Wirkstoffen indirekt kontrollieren.^{1,2} Die meisten Nährstofftransporter sind bezüglich ihrer dreidimensionalen Struktur bisher nur sehr wenig oder nicht charakterisiert. Interaktionen von Wirkstoffen und Transportern sind daher im Allgemeinen bisher nicht voraussagbar.

Es sind zwei Möglichkeiten bekannt, die orale Verfügbarkeit von Wirkstoffen durch Membrantransporter zu erhöhen. Zum einen können Verbindungen entwickelt werden, die die Struktur der endogenen Substrate der Transporter mimen, zum anderen können die Wirkstoffe mit Erkennungsstrukturen der Transporter konjugiert werden. Beide Möglichkeiten setzen jedoch ein detailliertes Wissen der dreidimensionalen Strukturen des Proteins und/oder der Substrate voraus. Die steigende Anzahl von Publikationen beweist, dass aufgrund der geringen Anzahl aufgeklärter dreidimensionaler Strukturen von Membranproteinen die Anwendung von *in silico*-Methoden interessant wird. Die meisten Veröffentlichungen dieser Art befassen sich mit Methoden, die auf einer Kombination von biologischen und Molecular Modelling Methoden zur Ableitung der dreidimensionalen Struktur-Wirkungsbeziehungen von Proteinen bzw. ihrer Substrate basieren (z. B. Homologiemodelling, dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsuntersuchungen (3D-QSAR)). Solche Untersuchungen ermöglichen die Optimierung von Molekülen (Wirkstoffen) als Substrate bestimmter Target-Proteine. Das ligandenbasierte Wirkstoffdesign wurde bereits bei den Integrin-Rezeptor Antagonisten erfolgreich angewendet.³

In der vorliegenden Arbeit wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen von Substraten zweier verschiedener membranständiger Peptidtransporter untersucht. PEPT1 und PEPT2 sind im Säugerorganismus für die Konservierung von peptidgebundenen Stickstoff und damit zur

Aufrechterhaltung des Proteingehaltes verantwortlich. Durch den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 werden hauptsächlich kleine Peptide aus der Nahrung in den Organismus aufgenommen, PEPT2 hingegen entfernt kleine Peptide (z. B. Hydrolyseprodukte bestimmter Peptidasen) aus extrazellulären Flüssigkeiten.⁴⁻⁷ PEPT1 und PEPT2 sind multispezifisch. Geht man nur von ihren physiologischen Substraten, den Di- und Tripeptiden aus, die aus Kombinationen der 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut sind, erhält man theoretisch mehr als 8000 verschiedene Di- und Tripeptide, die unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen. Neben ihren natürlichen Substraten transportieren die Peptidtransporter Peptidmimetika, wie z. B. β -Lactam-Antibiotika, verschiedene ACE-Inhibitoren und Bestatin, aber keine Aminosäuren und Tetrapeptide.⁸ PEPT1 und PEPT2 weisen Gemeinsamkeiten bezüglich ihres Substratspektrums auf, sie unterscheiden sich jedoch in Struktur, Kapazität und Affinität.^{5,9,10} Die 3D-Strukturen der membranständigen Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 konnten bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Durch die Kombination eines breiten Substratspektrums und einer hohen Transportrate ist der intestinale Peptidtransporter PEPT1 besonders gut für die orale Wirkstoffzuführung in den Organismus geeignet. Seit bekannt ist, dass peptidmimetische Wirkstoffe über PEPT1 in den Organismus eingebracht werden können, wurde mit großem Einsatz nach Erkennungsstrukturen gesucht, um den intestinalen Peptidtransporter als so genannte Schleuse für weitere Arzneistoffe zu verwenden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Konjugation von Wirkstoffen mit Aminosäuren Prodrugs gebildet werden konnten, die aktiv von PEPT1 durch das Dünndarmepithel transportiert werden, z. B. Valaciclovir, Valganciclovir, L-DOPA-Phe.¹¹ Nach dem Einschleusen in den Organismus erfolgt die Abspaltung der Aminosäuren, wodurch der Wirkstoff freigesetzt wird. Über das Blut erfolgt der Transport der Pharmazeutika zu den jeweiligen Wirkorten. Die Rückresorption von peptidartigen Verbindungen in der Niere erfolgt geringfügig durch PEPT1, hauptsächlich jedoch durch den nierenspezifischen Peptidtransporter PEPT2. Dieser kommt neben dem Nierenepithel auch in anderen Geweben und Organen vor, darunter Lunge und Gehirn. Durch die Expression in den Bronchien ist PEPT2 möglicherweise ein viel versprechender Angriffspunkt für zukünftige aerosolisch applizierbare peptidähnliche Wirkstoffe bei pulmonaren Krankheiten.¹²

Einige Molecular Modelling Studien zur Erklärung unterschiedlicher biologischer Aktivitäten von Substraten der Peptidtransporter und zur Ableitung von Erkennungsstrukturen sind bereits durchgeführt worden.¹³ Diese Studien basieren jedoch meistens auf Datensätzen mit einer geringen Anzahl von PEPT1/PEPT2-Liganden (Substrate/Inhibitoren), oder beruhen auf biologischen Daten, die mit unterschiedlichen Methoden an verschiedenen Expressionssystemen der Peptidtransporter ermittelt wurden. Solche Daten sind mitunter schwer vergleichbar. Eine 3D-QSAR Studie, deren Grundlage ein Datensatz mit 76 Dipeptiden und Dipeptid-

Derivaten ist, war bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführt worden und bildet den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.¹⁴

Ein Ziel der Arbeit war es, ein 3D-QSAR Modell zu entwickeln, um vor allem Bindungsaffinitäten der β -Lactam-Antibiotika zu erklären und Erkennungsstrukturen von PEPT1 und PEPT2 abzuleiten. Ein weiteres Ziel war es, Unterschiede in der Substraterkennung von PEPT1 und PEPT2 mit Hilfe von 3D-QSAR Modellen zu erklären. Außerdem sollten sich diese Modelle für die Voraussage unbekannter Verbindungen eignen, da dies beim Design neuer Wirkstoffe hilfreich ist. Da β -Lactam-Antibiotika strukturverwandt mit Tripeptiden sind, war es notwendig, diverse Tripeptide in den Datensatz aufzunehmen. Systematische Studien zur Erkennung und zum Transport von Tripeptiden durch PEPT1 waren zu Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation nicht bekannt. Für PEPT2 wurden bisher nur wenige biologische Daten (Bindungsaffinitäten) von Substraten/Inhibitoren ermittelt. Bindungsaffinitäten der Tripeptidmimetika, z. B. β -Lactam-Antibiotika, konnten bislang weder erklärt noch vorausgesagt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher von experimentellen und theoretischen Ansätzen ausgegangen:

- Für die Generierung eines repräsentativen Datensatzes zur Durchführung von 3D-QSAR Untersuchungen von PEPT1-Substraten war es zunächst erforderlich, Bindungsaffinitäten einer Vielzahl von Tripeptiden an PEPT1 zu messen. Anschließend wurden umfangreiche Konkurrenzexperimente mit natürlichen PEPT2-Substraten durchgeführt.
- Im theoretischen Teil der Arbeit wurden repräsentative Trainingsdatensätze für Liganden von PEPT1 und PEPT2 generiert, die für nachfolgende CoMSIA (engl.: comparative molecular field indices analysis) Untersuchungen geeignet waren. Die Validierung der Modelle erfolgte durch die Ermittlung der Voraussagekraft für einen Testdatensatz. Essenzielle Strukturmuster hochaffiner Substrate beider Peptidtransporter wurden abgeleitet und ein Pharmakophormodell entwickelt, das als Basis für ein rationales Wirkstoffdesign verwendet werden kann. Ziel der Arbeit war es außerdem, die Bioverfügbarkeit von niedermolekularen Peptidwirkstoffen und Peptidmimetika zu verbessern. Dies wurde durch Untersuchungen an 2-Aminothiazol-4-essigsäure (ATAA) und deren Derivaten realisiert. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen mit Wirkstoffkandidaten.

2 Grundlagen

2.1 Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR)

2.1.1 Allgemeine Aspekte

Trotz der annähernd exponentiellen Zunahme der in der Proteindatenbank (PDB) abgelegten Strukturen sind 3D-Strukturen von Membranproteinen häufig aufgrund von Schwierigkeiten bei der Isolation, Reinigung und vor allem der Kristallisation unbekannt.^{15*} In solchen Fällen wird bei der rationalen Wirkstoffentwicklung oftmals auf die Analyse der physikochemischen Eigenschaften bekannter Liganden des betreffenden Targetproteins (Rezeptors) zurückgegriffen.¹⁶

Bei 3D-QSAR Methoden werden Kenngrößen, die von der 3D-Struktur der Substrate abgeleitet werden können, mit ihrer biologischen Wirkung quantitativ in Beziehung gesetzt, um vor allem Bindungsaffinitäten zu berechnen. Die Betrachtung der relativen Unterschiede zwischen den Liganden in einem Datensatz, die man durch strukturelle Überlagerungen der Moleküle erhält, steht dabei im Vordergrund. Die Bindung unterschiedlicher Liganden an einen Rezeptor beruht auf bestimmten Anordnungen von gemeinsamen strukturellen oder physikochemischen Merkmalen. Ziel der 3D-QSAR Untersuchungen ist es, statistisch signifikante Modelle mit großer Voraussagekraft zu erstellen, um daraus neue Substanzen mit erhöhter Bindungsaffinität zu entwickeln (Wirkstoffdesign) bzw. die Wirkung von Substanzen mit unbekanntem Affinitäten abzuschätzen. Außerdem können neue Wirkstoffkandidaten, die die dreidimensionale Anordnung der funktionellen Merkmale von natürlichen Substraten mimen, erarbeitet werden.^{17,18} Bei der vergleichenden molekularen Feldanalyse (CoMFA, engl.: comparative molecular field analysis) und der vergleichenden molekularen Ähnlichkeitsindex Analyse (CoMSIA, engl.: comparative molecular similarity indices analysis) werden 3D-Strukturen der Liganden analysiert. Die Moleküleigenschaften werden in Form von elektrostatischen, sterischen, hydrophoben sowie Wasserstoffbrücken-Donor und -Akzeptor Feldern beschrieben. Die Analyse dieser dreidimensionalen Eigenschaftsfelder ermöglicht die Ableitung von günstigen und ungünstigen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor.^{19,20}

Durch die Analyse gemeinsamer Eigenschaften der untersuchten Verbindungen kann ein Pharmakophormodell erstellt werden. Ein solches Modell beschreibt die räumliche Anordnung der für die Wirksamkeit (biologische Aktivität) notwendigen funktionellen Gruppen oder

* Eine Zusammenstellung der bereits aufgeklärten 3D-Strukturen von Membranproteinen befindet sich auf folgender Internetseite: http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html

physikochemischen Eigenschaften und kann anschließend zum Durchsuchen einer Struktur-Datenbank nach potentiellen neuen Wirkstoffen (Liganden[†]) verwendet werden (engl.: virtual screening). Trotz unbekannter Struktur des betreffenden Proteins lassen sich aus solchen ligandenbasierten Modellen oftmals wichtige Informationen zu Merkmalen der hypothetischen Bindetasche ableiten.^{17,18}

3D-QSAR Untersuchungen wurden für die Analyse der Erkennungsstrukturen vieler Transporter angewendet, darunter P-Glycoprotein, organischer Kationentransporter (OCT2), Nucleosid-Transporter (hCNT3), Gallensäuretransporter (ASBT), organischer Anionentransporter (OATP) und PEPT1.^{14,21-27}

2.1.2 Voraussetzungen für 3D-QSAR Untersuchungen

Für 3D-QSAR Untersuchungen mittels CoMFA und CoMSIA werden zwei verschiedene Datensätze, ein Trainings- und ein Testdatensatz, benötigt.

- Der Trainingsdatensatz besteht idealerweise aus 20 bis 50 Molekülen, die eine gewisse strukturelle Vielfalt aufweisen und deren Bindungsaffinitäten mindestens drei Zehnerpotenzen voneinander abweichen. Eine möglichst gleichmäßige Verteilung über den gesamten Wertebereich ist dabei von Vorteil.
- Der Testdatensatz dient der Prüfung der Voraussagekraft des 3D-QSAR Modells. Er sollte Moleküle enthalten, die denen des Trainingsdatensatzes strukturell ähnlich sind. Die 3D-Strukturen der Moleküle im Testdatensatz sollten innerhalb des Bereiches liegen, der von den überlagerten Molekülen des Trainingsdatensatzes ausgefüllt ist.

Prinzipielle Voraussetzung von 3D-QSAR Untersuchungen ist, dass die zu untersuchenden Moleküle am gleichen Wirkort aktiv sind und nach dem selben Bindungsmechanismus an das jeweilige Protein binden.

Biologische Daten, die an unterschiedlichen Expressionssystemen des zu untersuchenden Targets oder mit verschiedenen Methoden gemessen worden sind, können stark schwanken.⁸ Deshalb werden solche Daten, die im gleichen Labor unter identischen Bedingungen gemessen wurden, bevorzugt für 3D-QSAR Modelle verwendet. Mit 3D-QSAR Modellen können Wechselwirkungen zwischen hochaffinen Liganden und dem Rezeptor abgeleitet werden. Konformationsänderungen, die während des Bindungsprozesses seitens des Liganden oder

[†] Im Folgenden wird der Begriff Ligand für die geometrisch und chemisch komplementäre Anlagerung kleiner Moleküle (z. B. Peptide) an biologische makromolekulare Zielstrukturen (z. B. Proteine) verwendet. Diese Zielstrukturen (PEPT1 und PEPT2) werden nachfolgend Rezeptoren genannt

des Proteins eintreten können, können mit dieser Methode nicht analysiert werden. Die Ergebnisse der 3D-QSAR Untersuchungen sind abhängig von den verwendeten Datensätzen und Konformationen der Liganden.^{28,29}

2.1.3 Generierung von 3D-Strukturen der Liganden

Bevor 3D-QSAR Untersuchungen durchgeführt werden können, müssen die zu untersuchenden Moleküle räumlich dargestellt werden. Die Startstrukturen stammen entweder aus 3D-Strukturdatenbanken (z. B. Cambridge-Datenbank, PDB) oder sie werden mit Hilfe verschiedener Programme generiert (z. B. Sybyl, MOE).¹⁻⁴ Anschließend werden die Strukturen energieminiert. Dafür können Methoden der Quantenmechanik oder empirische Kraftfeldmethoden eingesetzt werden.^{5,6}

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kraftfeldmethode angewendet. Die Energie von Molekülen wird in Kraftfeldern durch die Gesetze der klassischen Mechanik beschrieben. Ein Molekül wird dabei als ein System aus Massepunkten (Atomen) im dreidimensionalen Raum angesehen, die durch harmonische Kräfte miteinander wechselwirken. Diese Interaktionen werden in bindende und nichtbindende Wechselwirkungen unterteilt. Die bindenden Interaktionen werden durch Bindungsstreckung, Winkeldeformation und Torsion beschrieben. Die nichtbindenden Kräfte schließen van der Waals und elektrostatische Kräfte ein. Die Gesamtenergie E eines Moleküls setzt sich folgendermaßen zusammen (Gleichung 1):

$$E = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsion}} + E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{Coulomb}} \quad \text{Gleichung 1}$$

Ein Kraftfeld besteht aus den Referenzwerten für ideale Bindungsparameter und nichtkovalente Interaktionen, sowie aus Kraftkonstanten, die empirisch ermittelt wurden. Die Atome werden als Kugeln betrachtet, deren Größe abhängig vom jeweiligen Atomtyp ist. Sie sind modellhaft durch Federn miteinander verbunden, deren Länge hinsichtlich des Bindungstyps variiert. Grundlage der Berechnung der potentiellen Energie des Systems ist das Hooksche Gesetz, mit dem die Federkraft in Abhängigkeit von der Federkonstanten und der Auslenkung berechnet werden kann. Die einzelnen Energiebeiträge werden wie folgt berechnet (Gleichung 2):

$$E(r^N) = \sum_{\text{Bindungslänge}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{Bindungswinkel}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{Torsion}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 r_{ij}} \right) \quad \text{Gleichung 2}$$

$E(r^N)$ beschreibt die potentielle Energie als eine Funktion der Position (r) der Atome (N). Die atomspezifischen Parameter des Kraftfeldes werden durch k , l , θ usw. dargestellt. Im ersten Term werden die Interaktionen zwischen Atomen, die durch eine Atombindung miteinander verknüpft sind, durch ein harmonisches Potential dargestellt. Die Energie ist umso höher, je mehr die Bindungslänge l_i von der Referenzlänge $l_{i,0}$ abweicht. Der zweite Term beschreibt die Summe aller Bindungswinkel θ eines Moleküls, die ebenfalls durch ein harmonisches Potential berechnet wird. Der dritte Term beschreibt das Torsionspotential, das die Energieänderung durch die Drehung von Bindungen angibt. Die nichtbindenden Wechselwirkungen werden durch den vierten Term beschrieben. Sie werden zwischen allen Atompaaren i und j berechnet, die sich entweder in verschiedenen Molekülen befinden, oder die im gleichen Molekül mindestens durch drei Bindungen voneinander getrennt sind. Oftmals werden die elektrostatischen Wechselwirkungen durch das Coulomb-Potential und die van der Waals Wechselwirkungen durch das Lennard-Jones-Potential angegeben.⁷ Die Berechnung der Partialenergieterme erfolgt in den meisten Kraftfeldern nach den gleichen Formeln, die Unterschiede ergeben sich hauptsächlich aus den in den Formeln enthaltenen Konstanten.

In dieser Arbeit wurde zur Geometrieoptimierung kleiner Moleküle das in der Software Sybyl implementierte Tripos-Kraftfeld verwendet.^{4,8}

2.1.4 Konformationsanalyse der Liganden

3D-QSAR Untersuchungen basieren auf dem Vergleich von strukturellen Merkmalen der Liganden eines Rezeptors. Grundlage solcher Analysen ist, dass die rezeptorgebundenen Konformationen der Liganden überlagert werden und somit Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Liganden abgeleitet werden können. Bei unbekannter Rezeptorstruktur ist es jedoch relativ schwierig, die rezeptorgebundene Konformation eines Liganden zu bestimmen. Liegen 3D-Strukturen aus kristallographischen oder NMR-Untersuchungen von freien Liganden vor, so kann möglicherweise auf eine gebundene bzw. aktive Konformation geschlossen werden. 3D-Strukturen von freien und rezeptorgebundenen Liganden können sich jedoch erheblich unterscheiden. Dies wurde u.a. am Beispiel von dreidimensionalen Strukturen von freiem und an Cyclophillin gebundenem Cyclosporin A gezeigt.³⁰ Es ist weiterhin zu beachten, dass Moleküle in Kristallen durch Packungskräfte andere Konformationen einnehmen können als im aquatischen Milieu. Dennoch ist die Verwendung von Kristallstrukturen als Startstruktur für nachfolgende Konformationsanalysen von Vorteil.²⁸

Konformationsanalysen können zum Auffinden von Energieminima der Moleküle verwendet werden. Die Auswahl einer relevanten Konformation aus dem Konformerdatensatz hat einen entscheidenden Einfluss auf die 3D-QSAR Ergebnisse. Die biologisch aktive Konformation

wird in der Regel nicht die energetisch günstigste Konformation sein, aber in einem energetisch günstigen Bereich liegen. Die rezeptorgebundene Konformation der meisten Liganden wird z. B. selten durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert sein, da die wasserstoffbrückenbildenden Gruppen eher der Wechselwirkung mit dem Rezeptor dienen.^{16,17}

Enthalten die Liganden keine flexiblen Ringsysteme und weisen maximal 10 frei rotierbare Einfachbindungen auf, kann eine systematische Konformationssuche durchgeführt werden. Durch die systematische Drehung um frei rotierbare Bindungen eines Moleküls, z. B. in 30° Schritten und anschließende Energieminimierung der erhaltenen Strukturen durch ein Kraftfeld erhält man die relativen Energien aller Konformere. Bei flexiblen Molekülen werden z. T. über 500 000 Konformationen bei der Konformationsanalyse gebildet. Starre Moleküle bzw. Molekülteile schränken die Zahl der möglichen Konformationen stark ein und sind deshalb bei der Suche nach der biologisch aktiven Konformation von großem Vorteil.

Alternative Methoden zur Konformationsanalyse sind z. B. das Monte-Carlo-Verfahren und Moleküldynamik Simulationen (MD).^{31,32}

Sind keine rezeptorgebundenen Kristallstrukturen der zu untersuchenden Liganden bekannt, können biologisch relevante Konformationen durch das Verfahren des Active-Analog-Approaches (AAA) abgeleitet werden.^{33,34} Dabei wird die Konformationsanalyse mit der Suche nach einem Pharmakophor verbunden. Anhand der geometrischen Einschränkungen eines starren Referenzmoleküls werden aktive Konformationen flexibler Liganden aus den Konformerdatenbanken herausgefiltert.

2.1.5 Strukturelle Überlagerung der Liganden

Im Anschluss an die Analyse der bioaktiven Konformationen der zu untersuchenden Moleküle wird das so genannte strukturelle Alignment erstellt, das der wesentlichste Bestandteil einer erfolgreichen 3D-QSAR Untersuchung ist. Unter dem strukturellen Alignment versteht man die Überlagerung aller Strukturen des Trainingsdatensatzes im dreidimensionalen Raum. Die ausgewählten biologisch relevanten Konformationen müssen so überlagert werden, dass sie die rezeptorgebundene Situation widerspiegeln.^{17,20,28} Eine möglichst starre Verbindung, die nur wenige Konformationen bilden kann, aber möglichst viele für die Bindung an den Rezeptor relevante funktionelle Gruppen enthält, sollte als Referenzstruktur verwendet werden. Die bioaktiven Konformationen der Liganden können so überlagert werden, dass vor allem solche funktionellen Gruppen miteinander verglichen werden, die jeweils an der gleichen Stelle mit dem Rezeptor wechselwirken könnten. Verschiedene Methoden zur Überlagerung von Molekülen sind bekannt, eine Zusammenstellung befindet sich im Übersichtsartikel von Klebe 1993.¹⁷

2.1.6 Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)

Die vergleichende molekulare Feldanalyse (CoMFA) kann zur Untersuchung der dreidimensionalen quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen angewendet werden und ist ein anerkanntes Hilfsmittel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe bei unbekannter Rezeptorstruktur.^{13,35,36} Diese Methode beruht auf der Annahme, dass Unterschiede in den Bindungsaffinitäten der Liganden mit unterschiedlicher Form und Stärke der sie umgebenden nichtkovalenten Wechselwirkungsfelder zusammenhängen. Zur Bewertung von sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor, werden die überlagerten aktiven Konformationen der Moleküle eines Datensatzes in ein Gitternetz mit einer Maschenweite von 1 bis 2 Å so eingebettet, dass sie weiträumig umfasst sind (Abbildung 1).

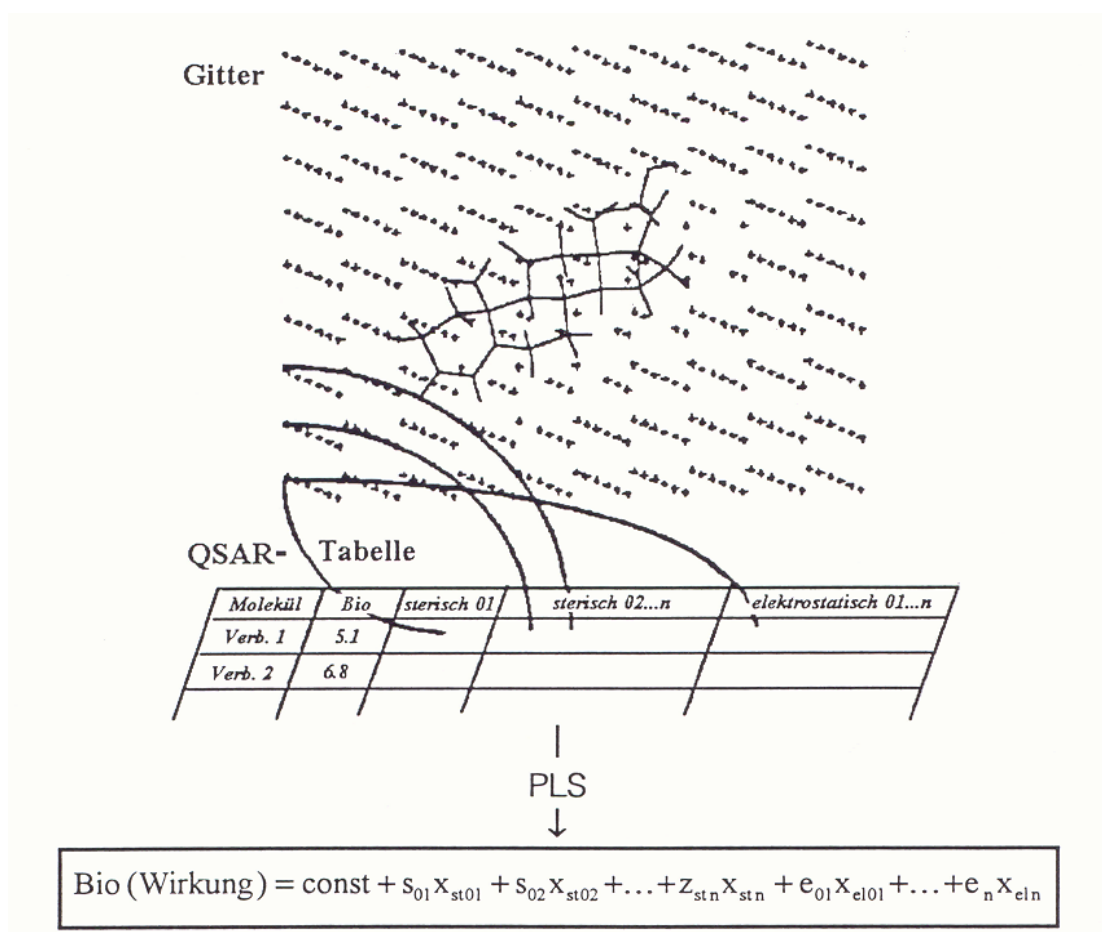


Abbildung 1: Darstellung eines Gitternetzes zur Berechnung der molekularen Felder eines Datensatzes. Für jeden Gitterpunkt werden die Feldbeiträge in eine Tabelle eingetragen. Durch die PLS-Analyse werden die biologischen Daten (z. B. als $\lg 1/K_i$) mit den Feldbeiträgen in Bezug gesetzt. Das Modell gibt in Form einer Gleichung an, an welchen Gitterpunkten die verschiedenen Felder Beiträge zur Erklärung der biologischen Wirkung liefern.¹⁹

Zur Ermittlung der sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungsenergien wird meistens ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom mit einer Ladung von +1 verwendet und auf jeden Gitterpunkt positioniert. Für alle Gitterpunkte werden die Wechselwirkungsenergien zwischen

Sondenatom und jedem Atom der Moleküle im Datensatz berechnet. Die Moleküle werden über ihre Feldeigenschaften definiert. Aufgrund der Vielzahl von Gitterpunkten und einer damit einhergehenden Datenflut wird zur Analyse der gemeinsamen Felder der Moleküle eine multivalente Statistik, die PLS-Analyse[‡] (engl.: partial-least-squares) angewendet, die in Kapitel 2.1.8 beschrieben ist.

Die van der Waals Interaktionen werden mittels des Lennard-Jones Potentials E_S am Gitterpunkt j beschrieben (Gleichung 3). Die Konstanten A_i und C_i hängen jeweils von den van der Waals Radien der Atome ab. Der Abstand zwischen Sonde und Atom wird durch r beschrieben.

$$E_{C,j} = \sum_{i=1}^n \frac{q_i \cdot q_j}{\varepsilon \cdot r_{i,j}} \quad \text{Gleichung 3}$$

Elektrostatische Wechselwirkungen basieren auf dem Coulomb-Potential (E_C). Dabei beschreibt q die Partialladung des Atoms i bzw. des Sondenatoms j und ε die Dielektrizitätskonstante (Gleichung 4).

$$E_{C,j} = \sum_{i=1}^n \frac{q_i \cdot q_j}{\varepsilon \cdot r_{i,j}} \quad \text{Gleichung 4}$$

Aus dem analysierten Modell wird schließlich ersichtlich, an welchen Gitterpunkten Feldbeiträge auftreten, die signifikant zur Erklärung der Bindungseigenschaften beitragen. Die Auswertung der CoMFA-Analyse erfolgt graphisch durch Konturdiagramme, die solche Bereiche der Felder im dreidimensionalen Raum repräsentieren, die signifikante Beiträge zum dargestellten Modell liefern. Diese Konturdiagramme kennzeichnen Regionen, in denen die überlagerten Moleküle eventuell günstig oder ungünstig mit dem möglichen Umfeld (Protein) wechselwirken. Die Interpretation der Konturdiagramme erlaubt Änderungen an der Leitstruktur zur Verbesserung der Affinität eines Moleküls an ein Protein.

Wenn der Abstand zwischen Atom und Sonde gegen Null geht, nehmen Lennard-Jones- und Coulomb-Potential unendlich große Werte an. Daher werden in der CoMFA-Analyse Grenzwerte gesetzt (Abbildung 2), um die hohen Energiewerte an der Oberfläche von Atomen zu vermeiden. Die potentiellen Evaluierungen bei CoMFA sind dadurch auf Bereiche außerhalb der Moleküle beschränkt. Bei der Annäherung der Atome wächst das Lennard-Jones-Potential schneller an, als das Coulomb-Potential. Die festgesetzten Grenzwerte werden daher in unterschiedlicher Entfernung zum Atom bzw. Molekül erreicht, was schwer interpretierbare und oftmals „zerrissene“ molekulare Felder zur Folge hat.^{19,28}

[‡] Methode der kleinsten Fehlerquadrate

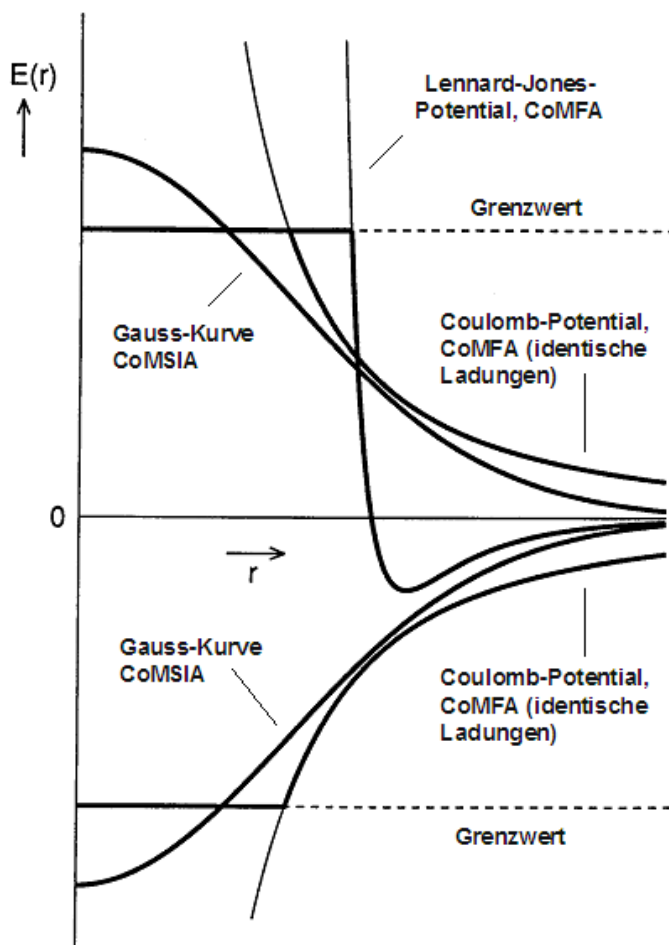


Abbildung 2: Lennard-Jones und Coulomb-Potential (CoMFA) im Vergleich zur Gauss-Funktion (CoMSIA).¹⁹

2.1.7 Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA)

Im Gegensatz zu CoMFA werden bei CoMSIA keine Wechselwirkungsenergien berechnet, sondern die relativen Unterschiede der verschiedenen Moleküle über sterische und physikochemische Eigenschaften im Raum ermittelt.¹⁹ Anstelle von Coulomb- und Lennard-Jones-Potential werden bei CoMSIA Gaußfunktionen verwendet, um Ähnlichkeitsmaße zwischen Sonde und dem Molekül abstandsabhängig zu definieren (Abbildung 2). Im Gegensatz zum hyperbolen Verlauf der Lennard-Jones- und Coulomb-Funktionen strebt die Gaußsche Glockenkurve für kleiner werdende Abstände gegen einen endlichen Wert. Es müssen keine Grenzwerte eingesetzt werden, wodurch auch solche Regionen betrachtet werden können, die nahe an der Atomoberfläche liegen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sich dadurch die molekularen Felder leichter (eindeutiger) als bei der klassischen CoMFA Methode interpretieren lassen.

Auch bei CoMSIA werden die überlagerten Moleküle in ein Gitternetz eingebettet, dessen Gitterpunkte mit geeigneten Sondenatomen besetzt werden. An jedem Gitterpunkt wird der Ähnlichkeitsindex ($A_{F,k}$) für ein Molekül (j) mit der Eigenschaft k berechnet (Gleichung 5).

$$A_{F,k}^q(j) = \sum_{i=1}^n \omega_{probe,k} \omega_{i,k} e^{-\alpha x_{iq}^2} \quad \text{Gleichung 5}$$

Die Ähnlichkeit an den Gitterpunkten q wird durch die Eigenschaften des Sondenatoms ($\omega_{probe,k}$) und durch die physikochemischen Eigenschaften der Atome bestimmt. Der Abstand x_{iq} wird durch die Gaußfunktion beschrieben und legt die Abstandsabhängigkeit zwischen Gitterpunkt q und Atom i fest. Die Breite der Gaußfunktion wird über den Abschwächungsfaktor α bestimmt. Die Ähnlichkeitsindices können durch eine Vielzahl von Eigenschaften k bestimmt werden. Die Beschreibung der Moleküle über atombasierte Eigenschaftswerte $\omega_{i,k}$ bildet dabei die Voraussetzung für die Berechnung.

Die so erhaltenen eigenschaftsspezifischen Ähnlichkeitsfelder werden mit biologischen Aktivitäten korreliert. Durch die Aufteilung des Ähnlichkeitsmaßes in einzelne räumliche und physikochemische Eigenschaften kann genau ermittelt werden, an welcher Stelle im Molekül welche Eigenschaft einen Einfluss auf die biologische Aktivität hat.^{16,19} Die Bewertung der Daten erfolgt wie bei CoMFA mittels der PLS-Methode (Kapitel 2.1.8). Die resultierenden Konturdiagramme kennzeichnen, im Unterschied zu CoMFA, Areale innerhalb der von Liganden besetzten Regionen, die eine bestimmte Gruppe mit den jeweiligen physikochemischen Eigenschaften favorisieren oder meiden. Wenn eine bestimmte Eigenschaft im Bereich der überlagerten Moleküle signifikant mit den Bindungsaffinitäten korreliert, wird diese Region hervorgehoben.¹⁹

Ergebnisse aus CoMFA und CoMSIA Untersuchungen sind vergleichbar.¹⁹ Der Vorteil der CoMSIA-Methode liegt in der eindeutigeren Bewertung der Molekülfelder der graphischen Darstellung. Dies vereinfacht die Entwicklung neuer Wirkstoffstrukturen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb nur die CoMSIA-Methode angewendet.

2.1.8 PLS-Analyse

Bei der Korrelation einer großen Anzahl von Deskriptorvariablen (X , z. B. Feldeigenschaften der Gitterpunkte), mit den Zielvariablen (Y , z. B. biologische Aktivitäten), entsteht eine regelrechte Datenflut. Für die Analyse der gemeinsamen Felder der Moleküle wird daher eine multivalente Statistik angewendet, die PLS-Analyse.³⁷ Aus den vielen X -Variablen werden nach einem bestimmten Algorithmus Gruppen zu einer neuen Variable (einer Hauptkomponente) zusammengefasst. Diese Variablen müssen unabhängig (orthogonal) voneinander sein und

bestmöglich mit der Zielgröße korrelieren. Diese so genannten latenten Variablen sind keiner messbaren Größe zuzuordnen und daher kaum noch interpretierbar. Zur Kontrolle der Qualität des Modells werden verschiedene Validierungsverfahren angewandt. Bei der leave-one-out (LOO) Kreuzvalidierung werden so viele Modelle, wie Datenpunkte (Moleküle) im Datensatz vorhanden sind, erstellt. Für jedes Modell wird jedoch ein Molekül ausgelassen und dessen Aktivität mit dem bereits erstellten Modell vorausgesagt. Nachdem die Aktivitäten jedes Moleküls vorausgesagt worden sind, werden sie mit den experimentellen Werten verglichen. Die Abweichung der vorausgesagten von den experimentellen Daten ist ein Maß für die Güte des Modells. Der quadrierte Korrelationskoeffizient q^2 und der *PRESS*-Wert (Summe der Abweichungsquadrate) sind dabei wichtige statistische Kenngrößen (Gleichung 6 und 7).

$$PRESS = \sum_n (Y_{pred} - Y_{exp})^2 \quad \text{Gleichung 6}$$

$$q^2 = \frac{1 - PRESS}{\text{Varianz}(Y)} = 1 - \frac{\sum_n (Y_{pred} - Y_{exp})^2}{\sum_n (Y_{exp} - Y_{mean})^2} \quad \text{Gleichung 7}$$

Y_{pred} ... vorausgesagte Aktivität; Y_{exp} ... experimentelle Aktivität;
 Y_{mean} ... Mittelwert aller Y_{exp} ; n ... Anzahl der Moleküle im Datensatz

Für CoMFA/CoMSIA-Analysen werden q^2 -Werte über 0,3 als statistisch signifikant akzeptiert.²⁹ Ein q^2 -Wert von +1 entspricht einem perfekten Modell, das die biologischen Aktivitäten der ausgeschlossenen Liganden ohne Abweichung vorhersagen kann. Negative q^2 -Werte bedeuten, dass die Vorhersage des Modells schlechter ist als der einfache Mittelwert aller Aktivitätsdaten. Der gesamte Vorgang besteht aus mehreren PLS-Rechnungen mit jeweils unterschiedlicher Anzahl latenter Komponenten. Die optimale Komponentenzahl ergibt sich aus der Kombination des niedrigsten *PRESS* Wertes mit dem höchsten q^2 -Wert. Die Robustheit des Modells kann durch weitere Kreuzvalidierungen, die mehrere Moleküle ausschließen (z. B. leave-five-out (L5O)) überprüft werden. Damit können auch zufällige Wechselbeziehungen bei der Korrelation erkannt werden. Eine quantitative Fehlerabschätzung bei der Kreuzvalidierung wird durch die statistische Größe s_{PRESS} (kreuzvalidierte Standardabweichung) ermöglicht (Gleichung 8).

$$s_{PRESS} = \sqrt{\frac{PRESS}{n - a - 1}} \quad \text{Gleichung 8}$$

a ... Anzahl der verwendeten Komponenten

Mit steigender Anzahl an Komponenten steigen auch die q^2 -Werte. Allerdings nur so lange, wie die zusätzlichen Komponenten signifikante Informationen enthalten. Werden zu viele Kompo-

nennten benutzt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass irrelevante oder zufällig korrelierte Komponenten einbezogen werden. Dies führt zu einem Sinken des q^2 -Wertes und zu einem Anstieg von S_{PRESS} . Die Zuordnung der resultierenden Felder von Modellen mit geringen Variablenzahlen ist demnach eindeutiger.³⁷

Mit der so erhaltenen optimalen Komponentenzahl wird eine letzte PLS-Analyse (Final Run) durchgeführt, wobei alle Moleküle in die Rechnung eingehen. Der daraus erhaltene Korrelationskoeffizient r^2 ist ein Maß für die Gesamtkorrelation, d. h. für die Vorhersagekraft des Modells. S entspricht der Standardabweichung der Gesamtkorrelation (Gleichung 9 und 10).

$$r^2 = 1 - \frac{(Y_{fit} - Y_{exp})^2}{(Y_{mean} - Y_{exp})^2} \quad \text{Gleichung 9}$$

$$S = \sqrt{\frac{(Y_{fit} - Y_{exp})^2}{n - a - 1}} \quad \text{Gleichung 10}$$

Y_{fit} ... angepasste Bindungsaffinitäten

Mittels des Fischer-Tests (F) wird die statistische Signifikanz überprüft. Je höher der Wert für F , desto höher die statistische Signifikanz (Gleichung 11).

$$F = \frac{r^2}{1 - r^2} \quad \text{Gleichung 11}$$

Die Vorhersagekraft eines Modells kann mit dem Parameter r^2_{pred} bestimmt werden (Gleichung 12). SD ist die Summe der quadrierten Differenzen zwischen den biologischen Aktivitäten der Moleküle aus dem Testdatensatz und dem Mittelwert der biologischen Aktivitäten der Moleküle im Trainingsdatensatz. Der $PRESS$ -Wert (Gleichung 6) gibt hier die Summe der quadrierten Differenzen der gemessenen und der vorausgesagten biologischen Aktivitäten der Verbindungen im Testdatensatz an.

$$r^2_{pred} = 1 - (PRESS / SD) \quad \text{Gleichung 12}$$

2.2 Peptidtransport

2.2.1 Lokalisation und Funktion von PEPT1 und PEPT2

Der enzymatische Abbau von Nahrungsproteinen beginnt im Magen durch Einwirkung von Pepsin. Der Großteil der hydrolytischen Spaltungen erfolgt im Darmlumen unter Einwirkung von Endo- und Exopeptidasen des Pankreassekrets. In der Bürstensaummembran des Jejunums werden diese Spaltprodukte durch Amino- und Oligopeptidasen weiter abgebaut. Zuerst vermutete man, dass Aminosäuren als Spaltprodukte des Proteinverbaus durch den Magen-Darm-Trakt in das Blut aufgenommen werden. In den 1960er Jahren wurde erstmals bewiesen, dass Dipeptide intakt durch das Dünndarmepithel transportiert werden.^{38,39} Die Anreicherung von Dipeptiden, wie z. B. Gly-Sar und Carnosin (β -Alanyl-L-Histidin), in den Epithelzellen des Darmes von Ratten wurde in den 1970er Jahren nachgewiesen.^{40,41} Der Transport von β -Lactam-Antibiotika durch Rattendarm konnte erstmals in den 1970er Jahren gezeigt werden.^{42,43} Heutzutage ist bekannt, dass Di- und Tripeptide durch Epithelzellen mittels des epithelialen Transporters PEPT1 aufgenommen und dort weiter verdaut werden.^{44,45} Die entstandenen Aminosäuren und Dipeptide werden durch Transporter in der basolateralen Membran der Epithelzelle in den extrazellulären Raum und somit ins Blut transportiert (Abbildung 3).

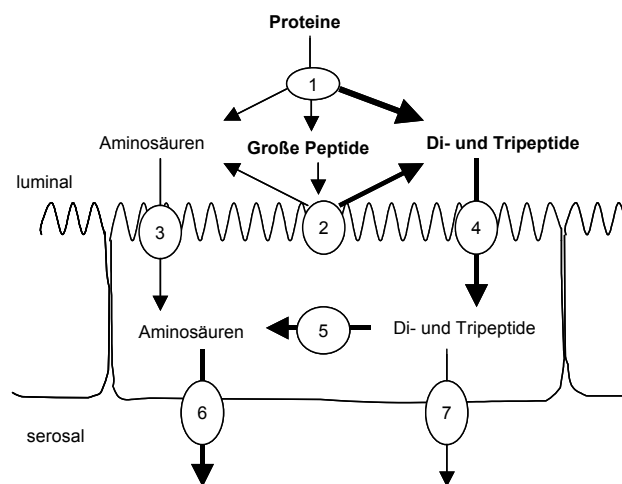


Abbildung 3: Verdauung und Resorption von Proteinen im Dünndarm. 1) Peptidasen im Darmlumen; Peptidasen (2), Aminosäuretransporter (3) und Peptidtransporter (4) in der Luminalmembran; 5) Peptidasen im Cytosol; 6 und 7) Aminosäure und Peptidtransporter in der Serosalmembran.⁴

Ende der 1960er Jahre wurde erstmals über die renale Absorption von hydroxyprolinhaltigen Dipeptiden, die durch den Abbau von Kollagen in den Nephronen der Niere entstehen, berichtet.⁴⁶ Wenig später wurde die L-Carnosin Aufnahme in den Nierenkortex von Ratten gemessen.⁴⁷ In den frühen 1980er Jahren wurde erstmals der Transport von Aminocephalosporinen über die renale Bürstensaummembran durch Peptidtransporter beschrieben.^{48,49}

Der aktive Transport von Dipeptiden gegen das Konzentrationsgefälle in renalen BBMV wurde erstmals anhand hydrolysestabiler Peptide beschrieben.⁵⁰ Seit 1987 ist bekannt, dass im Nierenepithel zwei unterschiedliche Transporter exprimiert werden, die später als PEPT1 und PEPT2 bezeichnet wurden.⁵¹ Drei Jahre später wurde der Transport von intakten Tripeptiden über die renale Bürstensaummembran bewiesen.⁵² In den Nieren erfolgt die Reinigung des Blutes durch glomeruläre Ultrafiltration (Abbildung 4). Das sehr durchlässige Endothel der Blutgefäße in den Glomeruli filtert alle Substanzen aus dem Blut heraus, deren Molekulargewicht kleiner als 65 kDa ist. Neben Harnstoff werden auch Fremdstoffe, wie z. B. Medikamente und Gifte, aber auch Nährstoffe (Aminosäuren, Peptide, Glucose) aus dem Blut entfernt.

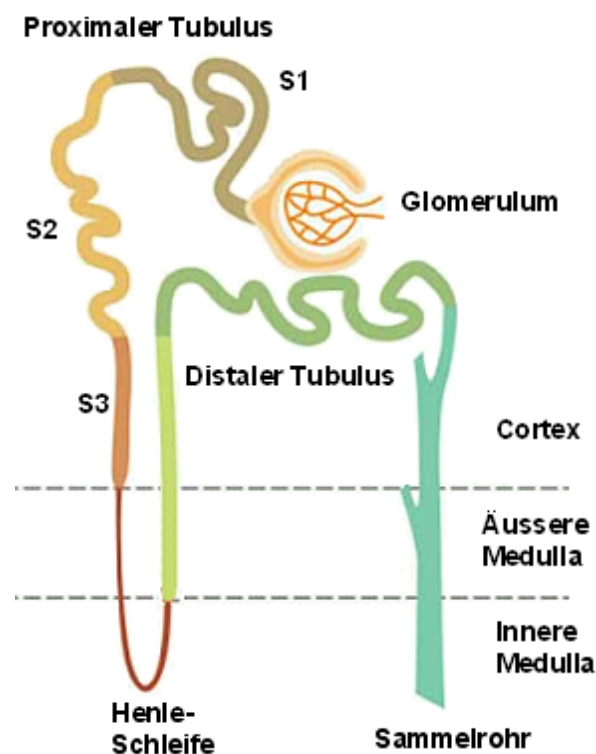


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Nephrons. Das zu reinigende Blut in den Kapillaren des Glomerulums wird durch die Kapillarwände filtriert, so dass größere Bestandteile (z. B. Blutzellen und Proteine) zurückgehalten werden. Das so genannte Ultrafiltrat (Primärharn) wird von der Bowmanschen Kapsel aufgenommen und in die Nierenkanälchen (proximaler Tubulus, Henle Schleife und distaler Tubulus) weitergeleitet. Dort erfolgt die Rückresorption von Soluten und Wasser. Der Endharn wird dem Nierenbecken über das Sammelrohr zugeführt.

Im proximalen Tubulus der Niere werden für den Organismus wichtige Nährstoffe durch membranständige Transporter rückresorbiert. Beide Peptidtransporter (PEPT1 und PEPT2) wurden in der apikalen Membran der epithelialen Zellen des proximalen Tubulus der Niere nachgewiesen. PEPT1 befindet sich im S1-Segment, hingegen kommt PEPT2 im S2- und S3-Segment des proximalen Tubulus vor (Abbildung 4). Durch das Vorhandensein beider Peptidtransporter ist eine effiziente Rückresorption von Di- und Tripeptiden sowie Peptidmimetika aus dem Glomerulärfiltrat der Niere gewährleistet.⁵³

Neuere Ergebnisse von Untersuchungen mit Pept2 (-/-) Knockout Mäusen zeigen, dass PEPT2 der funktionell dominante Peptidtransporter der Niere ist.⁵⁴ Männliche Pept2 (-/-) Knockout Mäuse wiesen außerdem ein geringeres Körpergewicht und niedrigere relative Herzfrequenzraten auf. Bei weiblichen Tieren wurden Nieren mit niedrigerem relativen Gewicht nachgewiesen. Die Mangelmutanten passten ihre Nahrungsaufnahme an den Proteingehalt der Nahrung an. Bei großem Proteinangebot nahmen die Mäuse weniger, bei geringem Proteinangebot deutlich mehr Nahrung auf.⁵⁵

Die Bezeichnungen „intestinaler“ (PEPT1) bzw. „renal“ (PEPT2) Peptidtransporter leiten sich von den ursprünglichen Entdeckungsorten ab. Seither konnten sie in einer Reihe anderer Organe und Gewebe lokalisiert werden. Der Peptidtransporter PEPT1 der Säuger ist hauptsächlich im Dünndarmepithel, in der apikalen Membran der Enterocyten lokalisiert, aber auch in Epithelzellen des Pankreas, der Leber, der Niere und des Gallenganges.⁵⁶⁻⁶² PEPT2 hingegen existiert in einer großen Anzahl von Geweben, wie z. B. Niere, Lunge, Gehirn, laktierende Brustdrüse, Hirnanhangdrüse, Hoden, Prostata, Ovarium, Uterus und Auge.^{59,63-69} Unlängst konnte PEPT2 in Herzzellen sowie im Nervensystem des Darmes nachgewiesen werden.^{70,71}

Die Bedeutung von PEPT1 im Epithel der Bauchspeicheldrüse ist bisher weitestgehend unbekannt. Im Nukleus von Lysosomen des exokrinen Pankreas transportiert PEPT1 vermutlich kleine Peptide aus den Lysosomen, die durch intralysosomalen Proteinabbau entstehen, in das Cytoplasma.⁵⁷ Über die Funktion von PEPT1 im Epithel des Gallenganges ist ebenfalls wenig bekannt. Möglicherweise gelangen potentielle Substrate von PEPT1 durch Sekretion aus den Hepatozyten in die Gallenflüssigkeit oder sie entstehen durch den Abbau von größeren Peptiden aus der Galle.⁶²

Der Choroid Plexus bildet eine epitheliale Barriere zwischen Blut und ZNS und liefert dem Gehirn essentielle Nährstoffe und Vitamine aus dem Blut. Gleichzeitig werden Proteine, Polypeptide und Metabolite aus der Cerebrospinalflüssigkeit entfernt. Das apikale Choroid Plexus Epithel ist neben einer Vielzahl von Membrantransportern auch mit dem Peptidtransporter PEPT2 ausgestattet. PEPT2 agiert dort als Efflux-Transporter und könnte bei der Regulierung des Neuropeptidgehaltes im Gehirn involviert sein.^{54,63,64,72-77} In Pept2 (-/-) Knockout Mäusen wurde der Gly-Sar Transport in Choroid Plexus Zellen beeinträchtigt.^{78,79}

Im Lumen der Alveolen (Lungenbläschen) sind zahlreiche Ectopeptidasen enthalten, die Proteine zu Peptiden metabolisieren. Die physiologische Bedeutung von PEPT2 könnte in der Beseitigung dieser Metabolite aus dem alveolaren Lumen liegen. Begünstigt durch die große Oberfläche, könnte das Vorkommen von PEPT2 in der Lunge der Schlüssel zur Entwicklung

von neuen therapeutischen Strategien sein, um Wirkstoffe durch aerosolische Administration bei der Behandlung von infektiösen und neoplastischen Krankheiten in den Organismus einzuschleusen.^{12,65}

2.2.2 Transportmechanismus von PEPT1 und PEPT2

PEPT1 und PEPT2 sind tertiär aktive Transportsysteme. Die Kombination eines nach innen gerichteten H^+ -Gradienten und eines auf der Innenseite vorhandenen negativen Membranpotentials ist die treibende Kraft des aktiven Peptidtransports (Abbildung 5). Der H^+ -Gradient wird durch die kombinierte Aktivität einer Na^+/K^+ ATPase (1) in der basolateralen Membran und eines Na^+/H^+ -Austauschers (2) in der apikalen Membran aufrechterhalten.⁴ Das extrazelluläre Mikroklima, dicht an der apikalen Zellmembran des Jejunums der Ratte, weist einen pH-Wert von ca. 6,0 bis 6,8 auf.⁸⁰⁻⁸²

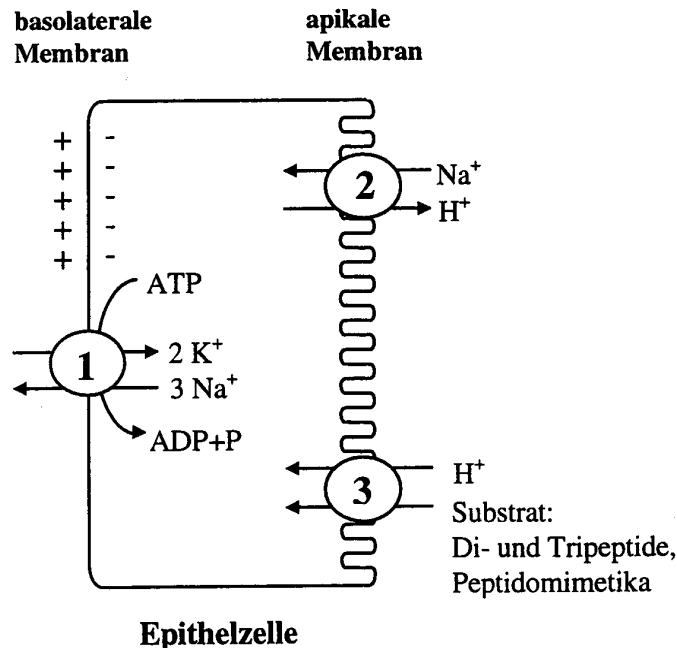


Abbildung 5: Schematische Darstellung an der Peptidaufnahme beteiligter Transportprozesse der Enterocyte. 1) Na^+/K^+ -ATPase; 2) Na^+/H^+ -Austauscher, 3) H^+ /Peptid-symporter.⁴

Der Transport des Substrates verläuft nach einem geordneten, simultanen Mechanismus, indem das Proton zuerst gebunden wird.⁸³ Die extrazellulären Protonen werden dabei mit dem Substrat in die Zellen hinein transportiert.⁸⁴ Die Stöchiometrie des Transports ist bei PEPT1 und PEPT2 verschieden. Bei PEPT1 ist das Verhältnis Proton zu Substrat entweder 1 : 1 oder 2 : 1 und hängt von der Ladung des Substrates sowie der Position der Ladung im Dipeptid ab.^{85,86} Für PEPT2 wurde für neutrale Dipeptide ein H^+ /Substrat-Verhältnis von 2 : 1, für anionische Dipeptide von 3 : 1 und für kationische Dipeptide von 1,4 : 1 ermittelt.⁶¹ Übersichten zum Transportmechanismus sind Bestandteil zahlreicher Artikel.^{5,87-91}

2.2.3 Molekularer Aufbau der H⁺/Peptidsympporter

Durch Expressionsklonierung in *Xenopus laevis* Oozyten ist es 1994 erstmals gelungen, durch Isolierung der cDNA die genetische Information zunächst für den intestinalen Peptidtransporter (PEPT1) und kurz darauf auch für den renalen Peptidtransporter PEPT2 des Kaninchens zu identifizieren.^{44,92,93} H⁺/Peptidsympporter wurden bereits in vielen Organismen nachgewiesen, darunter Mensch, Ratte, Maus, Schwein, Affe, Truthahn und Zebrafisch.⁹⁴⁻¹⁰⁴

PEPT1 (SLC15A1) und PEPT2 (SLC15A2) gehören der SLC-Familie (engl.: solute carrier) der protonenabhängigen Oligopeptidtransporter an. Dieser Familie werden außerdem die Peptid/Histidin Transporter PHT1 (SLC15A3) und PHT2 (SLC15A4) zugeordnet.^{89,90}

Die Primärstruktur von hPEPT1 besteht aus 708 und hPEPT2 aus 729 Aminosäureresten. Das Molekulargewicht beträgt ~79 kDa (PEPT1) und ~82 kDa (PEPT2). Bei beiden Transportern handelt es sich um polytope integrale Membranproteine, die aus 12 Transmembrandomänen (TMD) bestehen. Die N- und C-Termini befinden sich jeweils im Cytosol.^{94,95} Charakteristisch für beide Peptidtransporter ist die große, hydrophile Schleife zwischen der neunten und zehnten TMD (Abbildung 6).

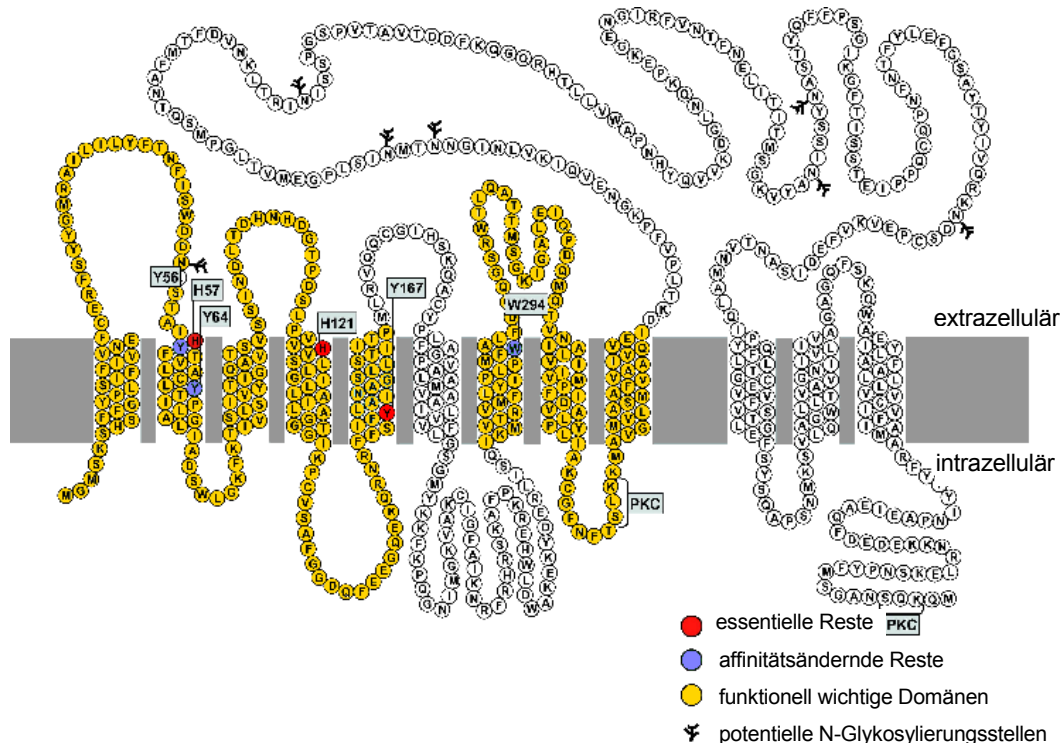


Abbildung 6: Modell der hypothetischen Membrantopologie von PEPT1. Das Protein besteht aus 12 Transmembrandomänen, dessen N- und C-Termini im Cytosol liegen. Die funktionell wichtigen Domänen sind gelb dargestellt. Farbige Aminosäurereste sind für die Funktion essentiell.¹¹

Die Primärstrukturen von PEPT1 und PEPT2 weisen 50 % Identität und 70 % Homologie zueinander auf.⁹³ Die Ähnlichkeit von PEPT1 und PEPT2 ist im Bereich der TMD höher als in der extra- bzw. intrazellulären Schleife. Die größten Unterschiede beider Proteine befinden sich am N- und C-Terminus.¹⁰⁵ Aufgrund der Homologie der Aminosäuresequenzen kann vermutet werden, dass die Bindetaschen von PEPT1 und PEPT2 ebenfalls gewisse Ähnlichkeiten aufweisen, wie es bei anderen peptidbindenden Proteinen (z. B. dem oligopeptidbindenden Protein (OppA) und dem dipeptidbindenden Protein (Dpp) durch Röntgenkristallstrukturen gezeigt worden ist.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹

Die Peptidtransporter weisen mögliche N-Glykosylierungsstellen sowie Erkennungsstellen für Proteinkinasen auf. Dies deutet auf eine mögliche Regulation durch reversible Phosphorylierung hin.^{5,45}

Viele Untersuchungen zur Aufklärung der Substraterkennungsstelle wurden mit Chimären aus PEPT1 und PEPT2 durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der möglichen Funktionen der Transmembrandomänen und einzelner Aminosäurereste befindet sich im Übersichtsartikel von Rubio-Aliaga & Daniel.¹¹ Durch die ortsgerichtete Mutagenese wurden das His57 in PEPT1 und His87 in PEPT2 als mögliche Protonenbindestelle identifiziert.^{61,110,111} Für den Transport der Substrate konnten die hoch konservierten Aminosäurereste Tyr167, Arg282, Trp294 und Glu595, von PEPT1 als essentiell identifiziert werden.¹¹²⁻¹¹⁶ Überdies sind die Aminosäuren 1-59, die die erste und zweite TMD von PEPT1 bilden, möglicherweise an der Substratbindung beteiligt.¹¹⁴ Es wird außerdem vermutet, dass die Substratbindetasche von PEPT1 hauptsächlich aus aromatischen Aminosäureresten besteht.¹¹⁷ Mit dem derzeitigen Kenntnisstand kann nicht unterschieden werden, ob die für die Substratbindung bzw. für die Transportfunktion essentiellen Aminosäuren direkt mit dem Substrat wechselwirken oder ob sie durch intramolekulare Wechselwirkungen die aktive Konformation des Proteins sicherstellen. Die Substratbindestelle setzt sich vermutlich aus Aminosäureresten zusammen, die über die gesamte Länge der Primärstruktur des Proteins verteilt sind. Möglicherweise wird die Substratbindestelle erst durch eine bestimmte Anordnung der Proteindomänen in der dreidimensionalen Struktur gebildet. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur ist daher notwendig, um umfassende und detaillierte Informationen über die Struktur-Funktions-Beziehungen der einzelnen Aminosäurereste zu erhalten.

2.3 Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Liganden der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2

2.3.1 Untersuchungsmethoden

2.3.1.1 Experimentelle Ansätze

Die Interaktion der Peptidtransporter mit verschiedenen Liganden wurde hauptsächlich durch Konkurrenzexperimente ermittelt. Anfängliche Untersuchungen wurden mit *in vivo* und *in vitro* Perfusionsstudien durchgeführt (loops, Dual-Infusions-Technik; zu Übersichten siehe Kararli 1989 und Chesney et al. 1993).^{118,119} Auch Gewebe- und Zellinkubationen wurden angewendet, um den Transport von Substanzen an epithelialen Schranken zu messen („everted sacs“, USSING-Technik, Inkubation von Schnitten, isolierten Zellen, Primärkulturen, Karzinomzellen).¹¹⁹⁻¹²² Später erfolgten Untersuchungen mit isolierten Bürstensaummembran-Vesikeln (BBMV).^{49,123,124} Seit Anfang der 1990er Jahre werden viele Transportstudien an Zelllinien durchgeführt. Die Zelllinie Caco-2 exprimiert hPEPT1 und wurde ursprünglich aus einem menschlichen Dickdarmtumor isoliert.¹²⁵ SKPT-0193 Cl.2 Zellen stammen aus dem proximalen Nierentubulus der Ratte und exprimieren rPEPT2.¹²⁶ Die Klonierung beider Transporter ermöglichte die heterologe Expression von PEPT1 und PEPT2 in geeigneten Zellen, z. B. in Säugierzellen, wie HeLa und LLC-PK₁, aber auch in die Hefe *Pichia pastoris* oder Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*.^{9,93,98,127,128} Letzteres System wird häufig für Messungen des Transmembrantransports verwendet.

2.3.1.2 Computerbasierte Ansätze

Für PEPT1 sind eine Reihe von Molecular Modelling Studien durchgeführt worden, in denen 3D-Strukturen verschiedener Verbindungen miteinander verglichen worden sind. Diese Arbeiten hatten entweder das Ziel, unterschiedliche Bindungsaffinitäten bzw. Transportraten verschiedener Substrate der H⁺/Peptidsympporter zu analysieren oder die Erkennungsstruktur von PEPT1 abzuleiten. Außerdem wurden Wechselwirkungen zwischen Substrat und Protein abgeleitet.^{117,129-133} Ein Ziel von 3D-QSAR Untersuchungen war es, Bindungsaffinitäten bzw. den Transport unbekannter Verbindungen vorauszusagen.^{14,132} In den bisher durchgeführten Molecular Modelling Studien wurden unterschiedliche Datensätze generiert und verschiedene Methoden angewendet.

In den ersten Untersuchungen wurden pharmakophore Muster für PEPT1 mittels Konformationsanalysen und AAA erarbeitet.^{108,109,129,134-136} Da die natürlichen Substrate von PEPT1 und PEPT2 viele frei drehbare Bindungen enthalten, wurden für Konformationsanalysen oftmals die

starreren β -Lactam-Antibiotika oder ACE-Inhibitoren verwendet.^{129,137,138} In einer Studie wurde die dreidimensionale Struktur des β -Lactam-Antibiotikums Cephalexin als Referenzstruktur verwendet, um mögliche Konformationen von Val-Val und Val-Val-Val Stereoisomeren zu untersuchen.¹³⁹ In einer anderen Molecular Modelling Studie wurden mögliche Konformationen der β -Lactam-Antibiotika und von Dipeptid-Derivaten in einem simulierten Proteinumfeld analysiert.¹³¹ Ein Pharmakophor, das anschließend für ein virtuelles Screening von Strukturbanken verwendet wurde, wurde aus Konformationsanalysen von Gly-Sar, Bestatin und Enalapril abgeleitet.¹⁴⁰ Erst kürzlich wurden Konformationsanalysen von 76 Dipeptiden und -Derivaten sowie 5 Tripeptiden durchgeführt, um Merkmale abzuleiten, die günstig für den Transport durch PEPT1 sind.¹¹⁷

Die hypothetische Erkennungsstruktur von PEPT1 wurde erstmals von einem Modell abgeleitet, das auf 24 Verbindungen (Di- und Tripeptide, β -Lactam-Antibiotika, ACE-Inhibitoren usw.) basierte.¹³² Jedoch wurden in diesem Modell biologische Daten von PEPT1 und PEPT2 vermischt, die außerdem mit verschiedenen Methoden an unterschiedlichen Expressionssystemen unter ungleichen Bedingungen (z. B. unterschiedliche pH-Werte) gemessen worden sind. Diese Daten sind deshalb zur Ableitung der Erkennungsstruktur von PEPT1 wenig geeignet. Außerdem wurden die Seitenketten der verwendeten Moleküle nicht in der 3D-Analyse berücksichtigt.

Die erste CoMFA-Analyse von PEPT1 Substraten wurde mit einem Datensatz aus 8 verschiedenen β -Lactam-Antibiotika und 2 ACE-Inhibitoren durchgeführt.¹⁴¹ Die Korrelation der 3D-Strukturen mit den jeweiligen K_t -Werten lieferte negative q^2 -Werte. Die Verwendung der dimensionslosen Transporter-Permeabilität, die aus der Bindungskonstante K_t und dem maximalen Flux der Verbindungen berechnet wurde, lieferte ein CoMFA-Modell mit folgenden statistischen Parametern: $q^2 = 0,754$ und $r^2 = 0,998$. Die Voraussagekraft des Modells wurde nicht getestet.¹⁴¹

Die Aufnahmeleistungen 20 verschiedener β -Lactam-Antibiotika in Caco-2 Zellen wurden in einer 3D- und 2D-QSAR Studie untersucht.¹⁴² Das erstellte CoMFA-Modell wurde mit drei Komponenten berechnet und wies zufrieden stellende statistische Parameter auf ($r_{pred}^2 = q^2 = 0,759$; $r^2 = 0,956$). Das 2D-Modell wurde durch Verwendung eines genetischen Algorithmus erstellt. Verglichen mit dem 3D-Modell, war das 2D-Modell für die Voraussage der Transportraten geeigneter. Der Nachteil des 2D-Modells liegt darin, dass es keine einfach zu interpretierenden Informationen für das Design von hochaffinen Verbindungen liefert.¹⁴²

Ein 3D-QSAR Modell, das aus 79 Dipeptiden und Dipeptid-Analoga ($K_i = 0,01$ bis 100 mM) generiert wurde, zeigte für CoMFA Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,901$ und $q^2 = 0,642$ sowie $r^2 = 0,913$ und $q^2 = 0,776$ für CoMSIA.¹⁴ Beide Modelle wurden anhand eines Testdaten-

satzes, bestehend aus 19 Verbindungen hinsichtlich ihrer Vorhersagekraft getestet und sind für die Prognose von K_i -Werten ähnlicher Verbindungen geeignet. Dieses 3D-QSAR Modell ist auf die Größe von Dipeptiden und Dipeptid-Analoga beschränkt. Die natürlichen Substrate von PEPT1 erstrecken sich jedoch vom kleinsten Dipeptid Gly-Gly bis zum größten Tripeptid Trp-Trp-Trp. Bindungsaffinitäten von Tripeptiden und Tripeptidmimetika, z. B. β -Lactam-Antibiotika, konnten bisher nur ansatzweise erklärt und nicht vorausgesagt werden. Die Erweiterung des zuletzt beschriebenen CoMSIA-Modells mit zahlreichen Tripeptiden und β -Lactam-Antibiotika ermöglicht eine detailliertere räumliche Vorstellung der bislang unbekanntenen Bindetasche von PEPT1. Die Erklärung und Vorhersage von Bindungsaffinitäten der β -Lactam-Antibiotika an PEPT1 war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Eine QSAR-Studie von 25 Tripeptiden und Tripeptidmimetika wurde erst vor kurzer Zeit beschrieben.¹³³ Die Bindungsaffinitäten der verwendeten Moleküle lagen im Bereich von $K_i = 0,15$ bis 25 mM. Grundlage des QSAR-Modells (2 Komponenten, $r^2 = 0,74$ $q^2 = 0,54$) waren bestimmte Deskriptoren (VolSurf[§]) zur Beschreibung der Oberflächeneigenschaften der Moleküle.¹⁴³ Anhand dieses Modells konnten solche strukturellen Eigenschaften abgeleitet werden, die günstig für die Erkennung von PEPT1 sind.

Die Ergebnisse, die mit 3D-QSAR Methoden erarbeitet werden, hängen jeweils vom verwendeten Datensatz ab. Trotz der vielen verschiedenen Methoden ergänzen sich die beschriebenen Resultate. Sie sind neben den experimentellen Ergebnissen in den folgenden Kapiteln zusammengefasst.

2.3.2 *Ergebnisse bisheriger Analysen zu Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Substraten von PEPT1 und PEPT2*

2.3.2.1 *Einteilung der PEPT1/PEPT2-Liganden*

Ein wichtiger Aspekt für die Betrachtung bzw. den Vergleich der Substratspezifität von PEPT1 und PEPT2 ist die Einteilung der Affinitäten der Liganden (Tabelle 1). Sie erfolgte für PEPT1 und PEPT2 nach den vorgeschlagenen Kategorien von Brandsch.^{8,144,145} Die Substanzen werden demnach in hochaffine, mittelaaffine, wenig affine und nichtaffine Verbindungen eingeteilt.

[§] VolSurf: in das Programmpaket SYBYL (Standardsoftware) implementiertes Modul

Tabelle 1: Einteilung der K_i -Werte für Liganden von PEPT1 und PEPT2.^{8,144,145}

	K_i PEPT1 (mM)	K_i PEPT2 (mM)
Hohe Affinität	< 0,5	< 0,1
Mittlere Affinität	0,5 - 5	0,1 - 1
Niedrige Affinität	5 - 15	1 - 5
Keine Affinität	> 15	> 5

2.3.2.2 Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Di- und Tripeptiden an PEPT1 und PEPT2

Die meisten neutralen und geladenen LL-Dipeptide werden von PEPT1 und PEPT2 mit hoher Affinität erkannt. Pro-Xaa, Gly-Xaa Dipeptide und solche, die aus zwei geladenen Aminosäureresten bestehen, zeigen mittlere bis geringe Affinitäten an PEPT1 und PEPT2. Außerdem werden nur Dipeptide mit *trans*-Peptidbindungen von PEPT1 erkannt.^{146,147} Beide H^+ /Peptidsymporter sind stereospezifisch. LD- und DL-Dipeptide werden mit mittlerer bis niedriger Affinität von den H^+ /Peptidsymportern erkannt. DD-Dipeptide werden von PEPT1 und PEPT2 nicht gebunden.^{10,146,148-150} Hochaffine LL-Dipeptide bilden vermutlich an ihren N- und C-Termini Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein aus. DL-, LD- und DD-Dipeptide sind aufgrund ihrer unterschiedlichen Stereochemie an der Ausbildung von optimalen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein gehindert, wodurch deren niedrigere Bindungsaffinitäten erklärt werden können.¹⁴

Es wurde behauptet, dass Dipeptide, die zwei positive Ladungen besitzen, PEPT1-Inhibitoren sind.¹¹⁷ Diese Erkenntnis widerspricht jedoch anderen Studien, in denen für das niedrig affine Dipeptid Lys-Lys ($K_i = 6,7$ mM) ein aktiver Transport durch PEPT1 gemessen wurde.¹⁰ Solche Dipeptide, die voluminöse Seitenketten enthalten, werden nicht von PEPT1 transportiert.¹¹⁷ Neben Dipeptiden mit niedrigen Affinitäten (z. B. Arg-Arg und Arg-Lys) konnte auch für solche mit hohen Affinitäten (z. B. Trp-Trp und Trp-Tyr) kein Transport durch PEPT1 gemessen werden. Die Kombination eines neutralen und eines geladenen Aminosäurerestes wird von PEPT1 toleriert. Liegen jedoch zwei geladene Seitenketten im Dipeptid vor, so wird die Bindungsaffinität des Dipeptids an PEPT1 vermindert.¹¹⁷

In vielen Übersichtsartikeln wurde die Erkennung von Tripeptiden durch PEPT1 und PEPT2 beschrieben. Bisher liegen jedoch nur wenige Studien vor, in denen Bindungsaffinitäten von Tripeptiden gemessen worden sind. Die Untersuchung von Ala-Ala-Ala Stereoisomeren an *Xenopus laevis* Oocyten zeigte, dass LLL-Tripeptide weitaus höhere Affinitäten an PEPT1 zeigen als LLD-, DLL- und LDL-Tripeptide.¹⁵¹ Gly-Gly-Gly ($K_i = 1,3$ mM) und Gly-Phe-Lys

($K_i = 0,61 \text{ mM}$) sind z. B. PEPT1-Substrate mit mittlerer Affinität. Gly-Leu-Tyr wurde als ein hochaffines Substrat beschrieben.¹⁵⁰ Hydrophobe Eigenschaften der Tripeptide in der zweiten Seitenkette sind günstig für hohe Affinitäten an PEPT1. Solche Tripeptide, die eine große hydrophobe Oberfläche aufweisen, werden gegenüber denen mit hydrophileren Oberflächen mit höherer Affinität gebunden. Tripeptide mit neutralen Seitenketten werden von PEPT1 im Vergleich zu geladenen bevorzugt.¹³³ Konformationsanalysen verdeutlichten, dass die Bindungsaffinitäten vom Abstand zwischen der N-terminalen Aminogruppe und der C-terminalen Carboxylgruppe, von der Position der zweiten Peptidbindung und vom Dipolmoment abhängen.¹³⁹

Für die an PEPT2 untersuchten Tripeptide wurden Bindungsaffinitäten zwischen $K_i = 0,008 \text{ mM}$ für Leu-Leu-Leu und $2,4 \text{ mM}$ für Gly-Sar-Sar an unterschiedlichen Expressionssystemen (BBMV, SKPT- und LLC-PK₁-Zellen) gemessen.^{126,149,150}

2.3.2.3 Struktur-Wirkungsuntersuchungen von β -Lactam-Antibiotika an PEPT1 und PEPT2

β -Lactam-Antibiotika werden aufgrund ihrer peptidähnlichen Struktur als Dipeptid-Derivate und Tripeptidmimetika bezeichnet (Abbildung 7). Sie enthalten ein cyclisches Säureamid (Azetidin-2-on) als Grundgerüst (Abbildung 7c und d). Dieser β -Lactamring ist für die antibiotische Wirkung der Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme essentiell.

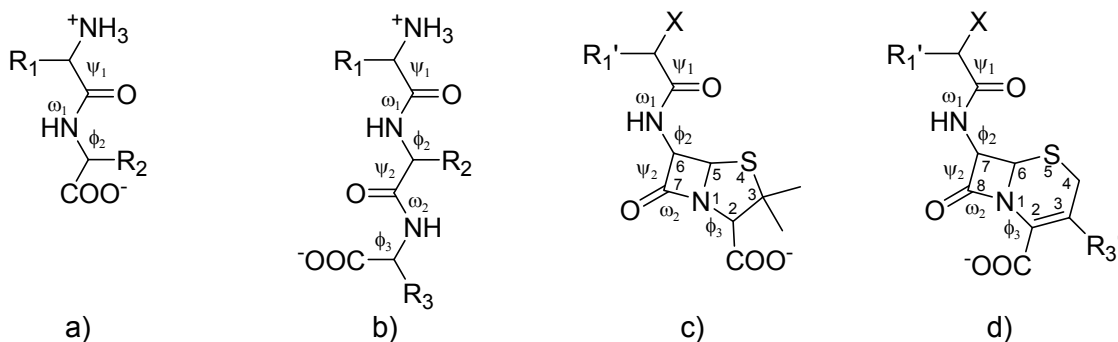


Abbildung 7: Grundgerüste von a) Dipeptiden, b) Tripeptiden, c) Penicillinen und d) Cephalosporinen (nach Anlage 7.4 Biegel et al., 2006a).

Bei Penicillinen ist der β -Lactamring an ein Thiazolidin- (Penam-Ringsystem) und bei Cephalosporinen an ein Dihydrothiazin-Ringsystem (Cephem-Ringsystem) gebunden. Das Grundgerüst der 6-Aminopenicillansäure (Abbildung 7c) weist 3 Asymmetriezentren (2S, 5R, 6R) und das der 7-Aminocephalosporansäure (Abbildung 7d) 2 Asymmetriezentren (6R, 7R) auf. Das

chirale C-Atom (C_{α})** der Seitenkette, an dem die Gruppen X und R_1' gebunden sind, liegt bei wirksamen β -Lactam-Antibiotika in D-Konfiguration vor.¹⁵²

In den 1980er Jahren wurde erstmals bekannt, dass oral verfügbare β -Lactam-Antibiotika durch die Transportsysteme für Di- und Tripeptide in Niere und Dünndarm transportiert werden.^{48,153} Seither wurden die Zusammenhänge zwischen Struktur und Affinität an PEPT1 und PEPT2 in vielen Studien untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studien kurz zusammengefasst:

Für die Erkennung von PEPT1 und PEPT2 ist die sterische Ähnlichkeit mit dem Peptidrückgrat der Tripeptide und das Vorhandensein der Carboxylgruppe am Dihydrothiazin- bzw. Thiazolidin-Ring wichtig.⁹ Generell werden nur solche β -Lactam-Antibiotika, die in zwitterionischer Struktur vorliegen, als Substrat von PEPT1 an Caco-2 Zellen erkannt.^{152,154} Die Affinität der Wirkstoffe an PEPT1 und PEPT2 ist abhängig von der Größe der jeweiligen Seitenketten. Cephalosporine mit langen Seitenketten in Position R_3' werden mit geringerer Affinität gebunden als solche, die kürzere Seitenketten enthalten.^{137,144,145,152,155-159} β -Lactam-Antibiotika, die hydrophobe Seitenketten enthalten, werden von PEPT2 mit höherer Bindungsaffinität erkannt.¹⁵⁵

Niedrige Bindungsaffinitäten werden an PEPT1 durch eine Sulfonylgruppe an der Seitenkette R_1' oder durch Substitutionen an der C-terminalen Carboxylgruppe hervorgerufen.^{145,160} Cephalosporine und Penicilline, deren K_i -Werte an PEPT1 größer als 14 mM sind, sind nur geringfügig oral verfügbar.¹⁴⁵

Die α -Aminogruppe der Cephalosporine und Penicilline ist für die Erkennung durch PEPT1 nicht absolut notwendig, da z. B. Cefitibuten, das β -Lactam-Antibiotikum mit der bisher höchsten gemessenen Affinität an PEPT1, kein solches Merkmal aufweist (Abbildung 8). Manche β -Lactam-Antibiotika, z. B. Amoxicillin, werden trotz vorhandener α -Aminogruppe nicht von PEPT1 gebunden.^{145,160,161} PEPT2 hingegen erkennt solche β -Lactam-Antibiotika, die eine α -Aminogruppe aufweisen, mit weitaus höherer Affinität, als solche, denen dieses Erkennungsmerkmal fehlt, z. B. Ampicillin $K_i = 1,3$ mM und Benzylpenicillin $K_i > 10$ mM (Abbildung 8).¹⁴⁴

** Obwohl β -Lactam-Antibiotika keinen definierten N- und C-Terminus besitzen, wird diese Beschreibung aus der Peptidchemie im Folgenden zum besseren Verständnis verwendet. Als N-Terminus wird wie bei den Peptiden das Stickstoffatom am C_{α} -Atom der Amidbindung der Seitenkette, die an das Kohlenstoffatom an Position 6 (Penicilline) und 7 (Cephalosporine) gebunden ist, bezeichnet. Der C-Terminus ist demnach die Carboxylgruppe an Position C2 (Abbildung 7).

Eine Hydroxylgruppe am N-terminalen Phenylring, wie z. B. bei Cefadroxil, scheint bei PEPT1 und PEPT2 wichtig für die Erkennung zu sein.^{144,159} Die Bindungsaffinität von z. B. Cefadroxil ist bei beiden Transportern höher als die des strukturell ähnlichen Ampicillins (Abbildung 8).

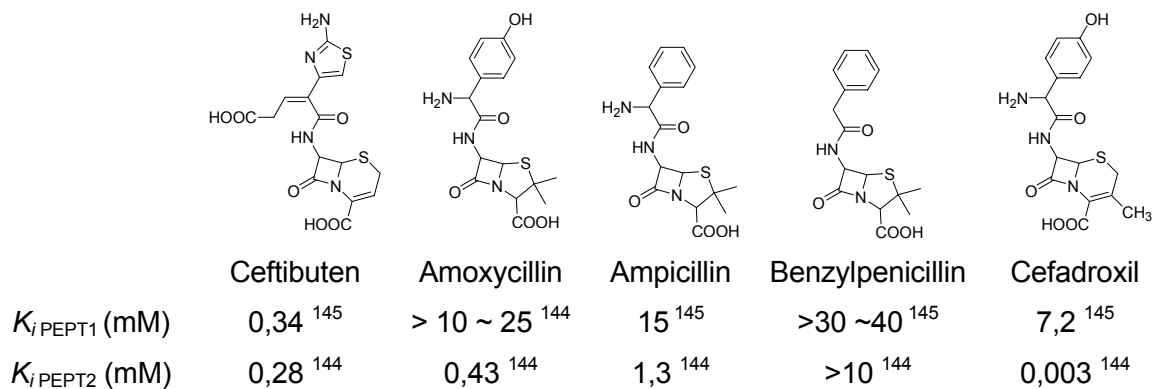


Abbildung 8: Chemische Strukturen ausgewählter β -Lactam-Antibiotika und ihre jeweiligen K_i -Werte an PEPT1 und PEPT2.

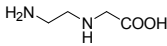
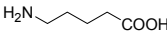
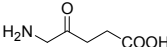
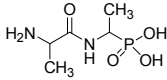
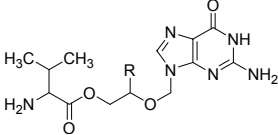
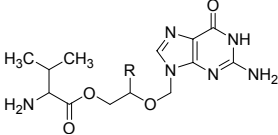
Mittels Konformationsanalysen konnte gezeigt werden, dass β -Lactam-Antibiotika zwei verschiedene bioaktive Rückgratkonformation einnehmen können. Je größer die für die Einstellung der bioaktiven Konformationen erforderlichen Energieänderungen sind, desto geringer ist die Erkennung von PEPT1.^{131,137} Der Abstand zwischen der N-terminalen Aminogruppe und der C-terminalen Carboxylgruppe ist wichtig für die Erkennung durch den Transporter. Er beträgt ca. 7,5 Å für α -Amino-Cephalosporine, die von PEPT1 erkannt werden.¹³⁷

Generell hat die intramolekulare Abschirmung der freien Carboxylgruppe durch Seitenketten in Position R_3' , die eine positiv geladene Stickstofffunktion enthalten bzw. Wasserstoffbrücken-Donoren oder -Akzeptoren aufweisen, eine Verminderung der Bindungsaffinität an PEPT1 zur Folge.¹²⁹ Im Allgemeinen führt die Veresterung der freien Carboxylgruppe sowie die Einführung einer zweiten negativ geladenen Gruppe zu geringer Bindungsaffinität an PEPT1.¹²⁹

2.3.2.4 Essentielle Strukturelemente von PEPT1 und PEPT2 Substraten

Ein hochaffines Substrat von PEPT1 und PEPT2 weist i. d. R. freie N- und C-Termini, *trans*-Peptidbindung(en) und Aminosäuren in L-Konfiguration auf. Jedoch haben auch andere strukturelle Parameter, wie z. B. Molekülgröße, Ladung, Polarität und Hydrophobizität einen Einfluss auf die Substraterkennung. Neben hochaffinen Substraten, die die oben genannten strukturellen Erkennungsmerkmale enthalten, sind auch Substrate bekannt, denen ein oder mehrere dieser Merkmale fehlen, z. B. Valaciclovir und Valganciclovir (Prodrugs der Antiviraleptika Aciclovir und Ganciclovir), δ -Aminolävulinsäure sowie das Antibiotikum Alafosfalin (Tabelle 2).¹⁶²⁻¹⁶⁷

Tabelle 2: Strukturen einiger Peptidmimetika sowie ihre Bindungsaffinitäten an PEPT1 und PEPT2.

Name	Struktur	PEPT1		PEPT2	
		K_i (mM)	Ref.	K_i (mM)	Ref.
N-β-Aminoethyl-Gly		>30	8	>10	168
5-Aminopentansäure		25	8	7,3	168
δ-Aminolävulinsäure*		1,1	169	0,23	166
Alafosfalin*		0,79	8	0,26	166
Valaciclovir* R = H		0,26	167	0,08	167
Valganciclovir* R = CH ₂ OH		0,49	163	0,17	163
		1,7	164	0,04	164

* wird von beiden H⁺/Peptidsymportern transportiert.

Für 5-Aminopentansäure (Tabelle 2) wurden an PEPT1, exprimiert in der Hefe *Pichia Pastoris*, eine mittlere Bindungsaffinität von $K_i = 1,1$ mM gemessen.^{8,169} An Caco-2 Zellen wurde jedoch eine niedrigere Bindungsaffinität von 25 mM gemessen. Obwohl *Pichia pastoris* als ein ideales System zur Expression heterologer Gene gilt, sind die Glykosylierungsmuster der Hefe von denen der Säugetiere möglicherweise verschieden. Da die Funktion von Membranproteinen von vielen Faktoren abhängt, z. B. der Interaktionen mit der nativen Membran und mit anderen Proteinen des homologen Systems, können Wechselwirkungen mit heterologen Proteinen des „Wirts“ unter Umständen zu einem atypischen Verhalten der Membranproteine führen.¹⁷⁰

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse zahlreicher Struktur-Affinitäts/Transport-Untersuchungen zusammengefasst. Berücksichtigt wurden sowohl Resultate aus Bindungs- als auch Transportexperimenten einer Vielzahl von Liganden von PEPT1 und PEPT2 (Di- und Tripeptide, Aminosäure-Derivate, ω-Amino-Fettsäuren und Peptidmimetika).^{11,89,90,132} Die Abbildung verdeutlicht, dass die Interaktionen der Substrate mit den Peptidtransportern aus vielen charakteristischen Merkmalen resultieren, die nicht zu einem einzigen Parameter zusammengefasst werden können. Die relevanten Merkmale eines Substrates sind:

- i) vorzugsweise eine freie Aminogruppe am N-Terminus,
- ii) ein planares Peptidrückgrat einer bestimmten Länge, das eine Carbonylfunktion zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein enthält (eine Peptidbindung ist nicht essentiell),

- iii) L-Konfiguration der Aminosäurereste. Diese Konfiguration ist besonders wichtig an der vorzugsweise hydrophoben Seitenkette R_2 .

Die C-terminale Carboxylgruppe ist nicht essentiell, ist sie vorhanden, muss sie eine bestimmte räumliche Lage innerhalb der Bindetasche einnehmen.

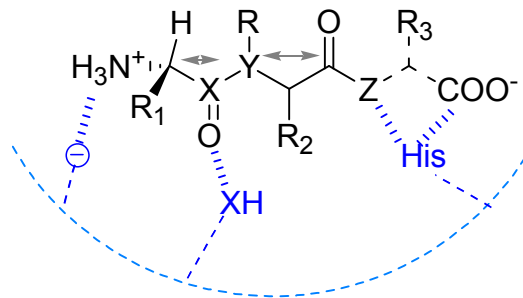


Abbildung 9: Modell der Erkennungsmerkmale von PEPT1 und PEPT2 sowie mögliche Wechselwirkungen in der hypothetischen Bindetasche (blau gekennzeichnet). Das Peptidrückgrat der Dipeptide ($X = C$; $Y-R = N-H$; $Z = O^-$) kann modifiziert sein. Die Pfeile zeigen an, dass der Abstand zwischen C_α -Atom und XO -Gruppe sowie zwischen $Y-R$ und der Carboxylgruppe bei den Dipeptidmimetika flexibel ist. Solche Elemente, die nicht essentiell sind, aber die Bindungsaffinität beeinflussen, sind ebenfalls dargestellt (Carbonylfunktionen der zweiten Peptidbindung sowie die Seitenketten R_1 , R_2 und R_3 der Aminosäurereste).^{11,89,90,132}

Des Weiteren wurden mögliche Interaktionen der Substrate mit dem Protein (PEPT1 und PEPT2) beschrieben. Die hypothetische Bindetasche besteht demnach aus 3 Kavitäten, in denen die Seitenketten R_1 , R_2 und R_3 der Substrate eingebettet sind. Am N- und C-Terminus sowie an der Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung werden elektrostatische Wechselwirkungen (Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen Ligand und Rezeptor beschrieben.^{14,132,137}

Basierend auf einem Molecular Modelling Modell wurde ein einfaches manuelles System zur Abschätzung von Bindungsaffinitäten abgeleitet.^{130,132} Unterschiedlichen Merkmalen werden definierte Zahlenwerte zugewiesen, deren Summe dann den so genannten Gesamtbindungsparameter ergibt (z. B. Vorhandensein einer N-terminalen NH_3^+ -Gruppe (+2) und Fehlen dieses Merkmals (-2)). Durch den Gesamtbindungsparameter werden die Substanzen in hohe, mittlere und niedrige Substrate von PEPT1 eingeteilt. Dies kann als Indikator für den Transport verwendet werden. Genaue Aussagen lassen sich mit dieser Methode jedoch nicht treffen.¹³⁰

2.3.2.5 Selektivitätsunterschiede von PEPT1 und PEPT2

Der intestinale und der nierenspezifische Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 weisen eine ähnliche Substratvielfalt auf, unterscheiden sich allerdings in ihrer Affinität und Kapazität. PEPT2 bindet seine Substrate in der Regel mit höherer Affinität und geringer Kapazität, PEPT1

hingegen wird als niedrig affiner Transporter mit hoher Kapazität bezeichnet. Für viele natürliche Substrate hat PEPT2 gegenüber PEPT1 eine 10- bis 15-fach höhere Affinität. Im Allgemeinen werden hydrophobe Substrate von PEPT1 und PEPT2 bevorzugt.^{8,90}

Beide Peptidtransporter transportieren β -Lactam-Antibiotika. PEPT2 zeigt gegenüber PEPT1 disproportional höhere Affinitäten für solche β -Lactam-Antibiotika, die eine α -Aminogruppe enthalten. Außerdem scheint die Hydroxylgruppe am N-terminalen Phenylring, die bei den von PEPT2 bevorzugten β -Lactam-Antibiotika Cefadroxil, Amoxicillin und Moxalactam vorhanden ist, wichtig für die Erkennung durch PEPT2 zu sein. Diese Verbindungen weisen mittlere Affinitäten an PEPT2 im Bereich von $K_i = 0,3$ bis $K_i = 0,43$ mM auf. Ceftibuten, ein Substrat ohne freie α -Aminogruppe wird hingegen von PEPT1 bevorzugt und mit hoher Affinität gebunden ($K_{i\text{PEPT1}} = 0,34$ mM; $K_{i\text{PEPT2}} = 0,28$ mM).^{144,145}

Die minimale Erkennungsstruktur von PEPT1 exprimiert in *Pichia pastoris* besteht aus einer protonierten Aminogruppe und einer deprotonierten Carboxylgruppe, die durch maximal vier Methylengruppen mit einem Abstand von 5,0 bis 6,3 Å voneinander entfernt sind (z.B. 5-Aminopentansäure, Tabelle 2).¹⁶⁹ Im Gegensatz zu PEPT1 akzeptiert PEPT2 keine ω -Aminofettsäuren. Der Einbau einer Carbonylgruppe (δ -Aminolävulinsäure, $K_{i\text{PEPT2}} = 0,39$ mM), führt zu einem PEPT2-Substrat mit mittlerer Affinität (Tabelle 2).¹⁶⁵

Zusammenfassend handelt es sich bei PEPT2 um den selektiveren Peptidtransporter verglichen mit PEPT1. Höchstwahrscheinlich sind die Bindetaschen der beiden Proteine unterschiedlich beschaffen. Die unterschiedlichen Selektivitäten könnten darin begründet sein, dass die Bindetasche von PEPT1 geräumiger ist als die von PEPT2 und dass Anzahl und Stärke der Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor bei PEPT2 höher sind.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Zelllinien

Die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2, wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig geliefert. Die Zelllinie SKPT-0193 Cl.2, die vom Epithel des proximalen Tubulus der Ratte *Rattus norvegicus* stammt, wurde von Dr. U. Hopper, der Case Western Reserve Universität in Cleveland (Ohio, USA) bereitgestellt.

Di- und Tripeptide sowie Peptidmimetika

Flucloxacillin wurde von GlaxoSmithKline (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Worthing, Großbritannien) und Cefpodoxim von Sanofi-Aventis (Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Cefazolin Cefoxitin, Aspartam und Procainamid wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen. Piperacillin wurde freundlicherweise von der Universitätsapotheke in Halle (Saale) und Acidocillin von InfectoPharm (Heppenheim) bereitgestellt. 2-Aminothiazol-4-essigsäure (ATAA) wurde von Acros Organics (Deutschland) erhalten. AstraZeneca (Mölnal, Schweden) stellte freundlicherweise Ximelagatran und Melagatran bereit. Die Peptide D-A-D-A, AAA, D-AAA, AA-D-A, A-D-AA, A-D-FA, AFP, AG, AP, APL, AR, CG, DG, DK, EFY, EK, GHK, GP, IY, KA-NH₂, KD, KE, KP, LA, LGG, D-LGG, LP, LR, LRP, MM, MMM, D-MMM, PA, PE, PFK, PD, PGG, PR, RP, TKY, VA, VAL, VP, VY, WGY, WW, WWW, Y-D-AG, YGG und D-YVG wurden von Bachem (Weil, Rhein) bezogen. AA, D-AA, A-D-A, AAD, AAE, AAR, ADA, AEA, AFL, AK, ANle, A-D-P, AS, AVL, FA, D-FA, FLL, GA, GG, IPP, IVY, KA, LAR, LPR, LTL, SA, SPI, VPP, VP-D-P, WA, YF, YPI, V-ATAA, F-ATAA, ATAA-V und ATAA-F wurden freundlicherweise von der AG Naturstoffbiochemie bereitgestellt und nach Standardmethoden der Peptidchemie synthetisiert.

Weitere Chemikalien

[¹⁴C]Gly-Sar (spezifische Radioaktivität, 53 mCi x mmol⁻¹) wurde von Amersham Biosciences UK (Limited Little Chalfont, Großbritannien) erhalten. Die Zellkulturmedien und -zusätze wurden von Gibco Life Technologies (Deutschland), Biochrom (Berlin) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen. Das Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung (siehe Methoden), ist ein Produkt der Firma Bio-Rad (München). Der Flüssigkeitsscintillator (rotiscint eco-plus) für die Quantifizierung radioaktiver Substanzen wurde von Roth (Karlsruhe) geliefert.

3.2 Methoden

3.2.1 Experimentelle Methoden

3.2.1.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm² Plastikflaschen (Greiner) in einem Inkubator in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C unter 5 % CO₂-Begasung gezüchtet und während der Kultivierung unter aseptischen Bedingungen in einer Laminarbox (Heraeus, Deutschland) versorgt. Caco-2 und SKPT Zellen bilden einen adhären Zellenrasen auf dem Boden der Plastikflaschen aus. Mit Hilfe eines Umkehrmikroskops (Axiovert 25, Zeiss, Deutschland) wurde sowohl das Wachstum während der Kultivierung als auch das Ablösen der Zellen während der Subkultivierung beobachtet. Tabelle 3 zeigt die zellspezifische Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien

Zelllinie	Zellkulturmedium	Subkultivierung	Wechsel des Mediums
Caco-2	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml Minimum Essential Medium (MEM) - 10 % fötales Kälberserum - 1 % nicht-essentielle Aminosäurelösung - 0,5 % Gentamicin (45 µg/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 ml PBS (calciumfrei) - 3 ml Trypsin 0,05 % mit 0,02 % EDTA 	<ul style="list-style-type: none"> - Tag 1 nach Aussäen, dann zweitägig und am Tag vor dem Versuch
SKPT	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml Dulbecco's modifiziertes EAGLE Medium Nutrient Mixtur F12 (HAM) 1:1, ohne Glutamin - 10 % fötales Kälberserum - 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) - 2 mM Glutamin 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 ml PBS (calciumfrei)/EDTA (1mM) - 3 ml Trypsin 0,1 % mit 0,04 % EDTA 	<ul style="list-style-type: none"> - täglich

Die Aussaat erfolgte je nach den experimentellen Erfordernissen entweder in Polysterol-Petrischälchen mit 35 mm Durchmesser (Falcon[®], Becton Dickinson, Großbritannien) oder in Transwell[®]-Kammern (24-mm Costar, Deutschland) mit permeabler Polycarbonatmembran ($A = 4,71 \text{ cm}^2$, Porendurchmesser $3 \mu\text{m}$). Die Aussaat in Petrischälchen erfolgte mit einer Zelldichte von $0,8 \times 10^6/2 \text{ ml}$ Medium. Am Tag nach der Aussaat zeigten die Zellen Konfluenz. Die Anzuchtdauer beträgt für Caco-2 Zellen 7 und für SKPT-Zellen 4 Tage.

Die Donor- und Akzeptorkompartimente trennende Polycarbonatmembran der Transwell[®]-Kammern befindet sich in einem Filtereinsatz, der wiederum in eine Vertiefung eingehängt ist. In der Transwellkammer befinden sich 6 solcher Vertiefungen, in denen die Zellen wie folgt kultiviert wurden. Zuerst wurde die Luft aus der Polycarbonatmembran durch Vorinkubation mit Medium entfernt. Dabei wird erst das untere Kompartiment (Donor) mit 2,5 ml und danach das obere Kompartiment (Akzeptor) mit 1,5 ml Medium befüllt. Nach der Vorinkubation wird das Medium im unteren Kompartiment durch frisches ersetzt und die Caco-2 Zellen im oberen Kompartiment mit einer Zelldichte von $0,2 \times 10^6/1,5 \text{ ml}$ ausgesät. Die Anzuchtdauer beträgt 21 Tage. Der Mediumwechsel erfolgt zweitägig und am Tag vor dem Versuch. Am Tag des Versuchs wurde die Dichtigkeit des Zellrasens durch Messung des elektrischen Widerstandes an drei Stellen im Medium überprüft.

3.2.1.2 *Kompetitionsexperimente*

Die Bindungsaffinitäten einer Vielzahl von Substanzen wurden an Caco-2 und SKPT-Zellen gemessen, die in Petrischälchen subkultiviert wurden. Die Aufnahmeversuche wurden mit Caco-2 Zellen am Tag 7 und mit SKPT-Zellen am Tag 4 nach Aussaat durchgeführt. Die Messungen der Hemmung der Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar in Caco-2 bzw. SKPT-Zellen durch unterschiedliche Konzentrationen des jeweiligen Substrates liefen nach folgendem Schema ab:

Vor Beginn des Versuchs wurden die Zellen mit 1 ml substratfreiem Versuchspuffer (25 mM Tris/Mes (pH 6,0), 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 5,0 mM Glukose) gewaschen. Danach erfolgte die 10-minütige Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ [¹⁴C]Gly-Sar in 1 ml Versuchspuffer bei Raumtemperatur mit ansteigenden Konzentrationen von unmarkierten Inhibitoren. Der Versuch wurde durch viermaliges Spülen mit eiskaltem Versuchspuffer zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Inhibitoren beendet. Anschließend wurden die Zellen mit Lysispuffer (Igepal[®] Ca 630 (0,5 % v/v) in Puffer (50 mM Tris, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgSO₄, pH 9,0)) solubilisiert und in Messröhrchen überführt. Durch die Zugabe von 2,8 ml Scintillationsflüssigkeit und kräftigem Durchmischen wurden die Proben für die Flüssigkeits-Scintillationsspektrometrie vorbereitet. Mit den Proben wurde ein Standard von 25 μl gemes-

sen, der 10 μM [^{14}C]Gly-Sar enthielt. Aus den dpm-Werten (desintegration per minute) des Standards ergab sich die Gesamtaktivität des Aufnahmebuffers. Über eine Verhältnisgleichung konnte mittels der Gesamtaktivität die in den Zellen vorhandene Stoffmenge der radioaktiven Substanz aus den erhaltenen dpm-Werten errechnet werden. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt.

3.2.1.3 Stabilitätsmessungen von Tripeptiden

Einige Tripeptide können möglicherweise während der 10-minütigen Inkubationszeit eines Aufnahmeversuches durch membranständige Enzyme gespalten werden. Um auszuschließen, dass die ermittelten K_T -Werte von Spaltprodukten der Tripeptide herrühren, wurden die Stabilitäten einiger Tripeptide auf Caco-2 und SKPT-Monolayern mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt (Merck-Hitachi). Genau wie bei den Kompetitionsexperimenten, wurden die Zellen zunächst mit Puffer pH 6,0 gewaschen und für 10 Minuten mit dem jeweiligen Tripeptid (1,0 mM) inkubiert, wobei unmittelbar nach Zugabe des Tripeptids ein Nullwert entnommen wurde. Die Auswertung der Messungen erfolgte mittels HPLC.

3.2.1.4 Bestimmung des transepithelialen Fluxes durch Caco-2-Monolayer

Der Flux durch Caco-2-Zellschichten wurde in Transwells[®] bestimmt. Die Fluxraten der unmarkierten Arzneistoffe Melagatran und Ximelagatran wurden wie folgt bestimmt: Vor Versuchsbeginn erfolgten das Absaugen des Mediums und das zweimalige Waschen der Zellen mit Puffern, deren pH-Werte denen der nachfolgenden Versuche entsprachen. Die Füllvolumina betragen 2,6 ml im unteren (basolateralen) bzw. 1,5 ml im oberen (apikalen) Kompartiment, die Puffertemperatur betrug 37°C. Während dieser 10-minütigen Präinkubationsphase zur Entfernung von Mediumresten erfolgte der Integritätstest des Zellmonolayers durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ durch Dreipunkt-Messung mittels Ag-/AgCl-Chopstick-Elektroden (Millicell[®]-ERS Voltohmmeter, Schwalbach). Anschließend wurde der Versuchspuffer entfernt. Das obere Kompartiment (Donator) wurde mit substrathaltigem Puffer (jeweils 10 mM Melagatran (pH 6,0) und 5 mM Ximelagatran (pH 5,0)) und das untere Kompartiment mit substratfreiem Puffer (Akzeptor) befüllt. Die Kammern wurden während der gesamten Versuchszeit bei 37°C temperiert und kontinuierlich mit 150 U/min geschüttelt (Thermostar, BMG Lab Technologies). Bei $t = 0$ min erfolgte die erste Probenentnahme von 100 μl aus dem Donatorkompartiment für den Bezugswert der Gesamtstoffmenge, die durch die gleiche Menge ersetzt wurde. Vor der Probenentnahme ($t = 10, 30, 60$ und 120 min) aus dem Akzeptorkompartiment erfolgte das Durchmischen der Akzeptorflüssigkeit durch Anheben der Filtereinsätze. Das entnommene Volumen

wurde durch substratfreien Versuchspuffer ergänzt. Anschließend erfolgte ein viermaliges Spülen mit eiskaltem Versuchspuffer zur Beendigung des Versuchs. Nach dem Ausschneiden aus den Einsätzen wurden die Membranen in mit 1 ml destilliertem Wasser in Eppendorfgläsern bei -20°C eingefroren, um die Zellen zu lysieren und den im Zellinnern eingeschlossenen Gehalt an den untersuchten Substanzen mittels HPLC zu analysieren.

Die zu untersuchenden Proben wurden in Eppendorfgläsern mit 8 % Trifluoressigsäure (TFA) zur Fällung der Proteine behandelt und anschließend 45 Minuten bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Deutschland) und bis zur Gehaltsbestimmung bei -20°C gelagert.

3.2.2 Analytische Methoden

3.2.2.1 Flüssigkeits-Scintillationsspektrometrie

Für die Konkurrenzexperimente zur Messung der IC_{50} -Werte wurde das Isotop Kohlenstoff-14 eingesetzt. Beim Zerfall des β -Strahlers (^{14}C) werden Elektronen frei, deren Energie im Flüssigkeitsscintillator Lichtblitze (Lumineszenz) erzeugt. Diese werden in einem Fotovervielfacher in Spannungsimpulse umgewandelt und als cpm (engl.: counts per minute) oder nach Quench-Korrektur als dpm (engl.: desintegrations per minute) gemessen. Die Proben (lysierte Zellen oder substrathaltiger Puffer) wurden nach Überführung in die Messröhrchen mit 2,8 ml Scintillationsflüssigkeit (Rotiscint[®] eco-plus) versetzt und gründlich vermischt. Die Messungen erfolgten im Flüssigkeitsscintillationsspektrometer (Tri-Carb[®] Liquid Scintillation Analyser 2100TR, Packard, Meriden, USA) und dauerten 5 Minuten pro Probe.

3.2.2.2 Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde einerseits zur Ermittlung der Stabilität der Tripeptide auf Monolayern von Caco-2 und SKPT-Zellen und andererseits zur Messung des transepithelialen Fluxes von Melagatran und Ximelagatran durch Caco-2 Monolayer durchgeführt.

Die HPLC-Analyse der Stabilitäten der Tripeptide erfolgte gemäß einer Standardmethode mit einem Dioden-Array Detektor (L 7455) und einer Umkehrphasen-Säule (RP-18, Supersphere 100, endcapped, 125 x 2, Merck, Darmstadt). Für die Untersuchung von PGG wurde zusätzlich eine Chromolith-Säule (RP-18, 120 x 2, Merck, Darmstadt) verwendet. Das Eluent setzte sich aus einem Acetonitril (ACE)-Wasser-Gemisch (pH 2,0) zusammen, wobei der ACE-Anteil zwischen 2 und 40 % variierte. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit TFA. Jeweils 10 μl

(n = 2) der 1:10 verdünnten Proben wurden injiziert und bei 207 nm detektiert. Die Retentionszeiten lagen zwischen 1,3 und 6,45 min bei einer Flussrate von 0,2 ml/min (Tabelle 4).

In Tabelle 4 sind die Retentionszeiten der untersuchten Substanzen als Kapazitätsfaktoren k' angegeben, die nach folgender Formel berechnet wurden (Gleichung 13):

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad \text{Gleichung 13}$$

t_R ... Retentionszeit des Peptids; t_0 ... Retentionszeit des Lösungsmittels

Tabelle 4: HPLC-Bedingungen für die Bestimmung der Wiederfindungsrate der Tripeptide. Die Analyse wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 207$ nm durchgeführt. Der pH-Wert des Eluents wurde auf pH 2,0 eingestellt.

Tripeptid	ACE-Anteil des Eluents (%)	k'	Tripeptid	ACE-Anteil des Eluents (%)	k'
AAA	2	1,1	LPR	12	0,6
AR	5	0,7	MMM	30	1,1
AVL	30	0,8	PFK	15	1,0
D-LGG	10	0,8	PGG [§]	1	0,4
D-MMM	30	1,1	PLG-NH ₂ [*]	15	1,3
D-YVG [*]	15	2,1	TKY	15	1,0
EFY	30	0,7	WWW	40	2,6
IPP	15	0,8	Y-DAG	10	1,1
LAR	7	0,9	YGG	10	0,7
LGG	10	0,8	YPF	30	0,8

^{*} Die Messung erfolgte bei pH = 2,4; [§] Verwendung von zwei hintereinander geschalteten Säulen (Chromolith und Supersphere 100)

Die Quantifizierung von Ximelagatran und Melagatran wurde folgendermaßen durchgeführt: Der Eluent setzte sich aus Acetonitril (2 %) und einem Gemisch aus 20 mM NaH₂PO₄ und 10 mM Tetramethylammoniumchlorid (98 %) (pH 4,5) zusammen. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit TFA. Jeweils 5 μ l (n = 2) der Proben wurden injiziert und bei 238 nm detektiert. Die Retentionszeiten lagen bei 4,96 bis 5,58 min für Ximelagatran und bei 3,7 min für Melagatran. Die Flussrate betrug 0,3 ml/min.

3.2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Im Anschluss an die Versuche zur Ermittlung der IC_{50} -Werte erfolgte die sofortige Aufbereitung einer Probe zur Bestimmung des Proteingehaltes. Für die Quantifizierung der Proteine wurden

Zellen unter denselben Bedingungen, wie die für das jeweilige Experiment, kultiviert. Mediumrückstände wurden durch viermaliges Spülen der Zellen mit Puffer entfernt. Anschließend wurde 1 ml destilliertes Wasser zugegeben und die Petrischälchen bei -20°C eingefroren. Eine Homogenisierung des Zell-Wasser-Gemisches erfolgte nach dem Auftauen durch mehrmaliges Aufziehen der Proben mit einer $150\ \mu\text{m}$ -Kanüle (Omnican[®] 100, Fa. Braun, Deutschland). Nachfolgend wurde das Lysat 15 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anteilig im Verhältnis 1:5 (Caco-2) bzw. 1:2 (SKPT) verdünnt. Je $20\ \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden mit je $180\ \mu\text{l}$ 1:5 verdünnter Bradford Reagenz in 96-Well Platten gegeben und 5 Minuten bei 300 U/min inkubiert. Als Blindwert wurde anstelle der proteinhaltigen Verdünnungen destilliertes Wasser eingesetzt. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte in einem Fluostar[®] Gerät (BMG Lab Technologies, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

3.2.3 Mathematische Methoden

Die mathematische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte unter Verwendung der Programme Microsoft[®] Excel (Office 2000, Microsoft Cooperation, USA) und Sigma Plot für Windows (Version 8.0 SPSS Inc., USA)

Bestimmung der Halbhemmkonzentration IC_{50} durch nichtlineare Regression

Die Halbhemmkonzentration IC_{50} (engl.: inhibition constant) ist die Konzentration eines Hemmstoffes, die benötigt wird, um die Aufnahme eines Substrates einer bestimmten Konzentration auf 50 % zu senken. Die gemessene Menge an radioaktiver Substanz Y wurde gegen die Hemmstoffkonzentration (halblogarithmisch) aufgetragen. Den Messpunkten wurde die Hemmkurve jeweils bestmöglich durch nichtlineare Regression angepasst. Dazu wurde die Gleichung der allosterischen Hill-Kinetik in der folgenden Form angewendet (Gleichung 14).

$$Y = \frac{Min + (Max - Min)}{1 + \left(\frac{S}{IC_{50}}\right)^P} \quad \text{Gleichung 14}$$

Die im Verhältnis zur Kontrollgruppe prozentual aufgenommene Menge Y des radioaktiven Substrates in die Zellen wird aus folgenden Parametern berechnet: Min ist die minimal und Max die maximal aufgenommene Menge des radioaktiven Substrates in die Zellen. S ist die Konzentration des Inhibitors und P der Hill-Koeffizient.

Bei festgelegtem Minimum und Maximum (= 100 %) wird das Minimum (nichthemmbarer Anteil, bestehend aus passiver Diffusion und unspezifischer Bindung) durch die Verdrängung des radioaktiv markierten Substrates zuvor durch einen Überschuss derselben, jedoch unmarkierten 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.

Durch die IC_{50} -Bestimmung wird eine Aussage über die Affinität des Hemmstoffes zum Transporter in Abhängigkeit von der Substratkonzentration getroffen. Die Hemmkonstante K_i (Gleichung 15) kann bei kompetitiver Hemmung durch Umrechnung aus dem IC_{50} -Wert ermittelt werden. Somit ist K_i unabhängig von der Substratkonzentration des Referenzsubstrates.¹⁷¹

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_t}} \quad \text{Gleichung 15}$$

K_t Michaelis-Menten-Konstante des Referenzsubstrates

Berechnung des transepithelialen Fluxes

Die Fluxraten J ([% / Akzeptor * h] bzw. [% / cm² * h]) wurden wie folgt berechnet:

$$J[\%] = \frac{\left(c_{t_n} + c_{t_{n-1} \text{kor}} \cdot \frac{V_{Pr}}{V_A} \right) \cdot V_A \cdot 100\%}{c_0 \cdot V_D} \quad \text{Gleichung 16}$$

V_A entspricht dem Gesamtvolumen im Akzeptorkompartiment, und V_D dem Gesamtvolumen im Donorkompartiment. V_{Pr} ist das entnommene Volumen aus dem Akzeptorkompartiment und c_{t_n} die Substratkonzentration im Akzeptor zur Zeit t_n . Die durch die Verdünnung korrigierte Substratkonzentration im Akzeptorkompartiment zur Zeit t_{n-1} wird durch $c_{t_{n-1} \text{kor}}$ angegeben. Die Substratkonzentration im Donorkompartiment zur Zeit t_0 wird durch c_0 dargestellt.

3.2.4 Computergestützte Methoden

3.2.4.1 Generierung der Datensätze

PEPT1. Der Trainingsdatensatz für die CoMSIA Untersuchungen des PEPT1-Modells enthält 98 Verbindungen (35 Dipeptide, 28 Tripeptide, 12 Dipeptid-Derivate und 23 β -Lactam-Antibiotika; siehe Anlage 7.2). 26 Verbindungen wurden bereits in einer vorhergehenden Studie zu PEPT1 verwendet.¹⁴ Für den Trainingsdatensatz wurden Di- und Tripeptide gesucht, die eine große Diversität in den Seitenketten (z. B. positiv und negativ geladene, neutrale und aromatische Seitenketten) aufweisen und deren Bindungsaffinitäten einen großen Bereich von 0,01 bis 100 mM aufweisen (Anlage 7.2.1). Außerdem wurde auf eine einheitliche Verteilung aller möglichen Seitenketten der Di- und Tripeptide geachtet. Alle K_i -Werte wurden durch die Verwendung des gleichen Kompetitionsassays in unserem Labor gemessen. In den CoMSIA Studien wurden $\lg 1/K_i$ -Werte verwendet. Die Bewertung der Modelle erfolgte durch

die Verwendung eines Testdatensatzes, dessen 24 Verbindungen so ausgewählt dass die Bindungsaffinitäten von hoch-, mittel- und nichtaffinen PEPT1-Liganden vom Modell vorausgesagt werden (siehe Anlage 7.2.2).

PEPT2. Der für PEPT1 beschriebene Datensatz wurde für PEPT2 geringfügig modifiziert. Der Datensatz (siehe Anlage 7.3.1) für PEPT2 enthält 83 Verbindungen (24 β -Lactam-Antibiotika, 27 Tripeptide und 32 Dipeptide- und -Derivate). Für eine gleichmäßige Verteilung der Bindungsaffinitäten im Bereich (0,3 μ M bis 42 mM) wurden zusätzlich folgende Verbindungen verwendet: Trp-Trp, Ala-Val-Leu, Lys-Lys, Lys-Pro, Ala-Ala-Glu, Ala-Ala-Asp, Met-Met, Leu-Arg, Leu-Thr-Leu, Ala-Pro, Ala-Pro-Gly, Asp-Gly, Tyr-Arg. Der Testdatensatz wurde aus 25 Verbindungen generiert (15 Dipeptide, 4 Tripeptide und 6 β -Lactam-Antibiotika; siehe Anlage 7.3.2).

3.2.4.2 Generierung der 3D-Strukturen

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Molecular Modelling und 3D-QSAR Studien an einer SGI Octane2 R12000 Workstation mit Hilfe des Programms SYBYL (Version 6.9 und 7.0) durchgeführt.¹⁷² Die Startstrukturen wurden mit geladenen N- und C-Termini, ausgenommen die Aminogruppe der thiazolhaltigen β -Lactam-Antibiotika, sowie mit Peptidbindungen in *trans*-Konformation aufgebaut. Die β -Lactam-Antibiotika wurden in 2*S*, 5*R* und 6*R* Konfiguration für Penicilline und 6*R*, 7*R* für Cephalosporine (Abbildung 7, Kapitel 2.3.2.3), ausgenommen Cefoxitin und Cefmetazol mit 6*R*, 7*S* Konfiguration, aufgebaut.¹⁷³ Das chirale Kohlenstoffatom, an dem die X und R₁' Reste gebunden sind, wurde als *R* konfiguriert betrachtet.¹⁵² Die jeweiligen Fragmente der β -Lactam-Antibiotika wurden aus der Cambridge Strukturdatenbank (CSD) entnommen.¹⁷⁴ Die R₁' Reste (Butenylcarboxyl- und Oximgruppen) der β -Lactam-Antibiotika, die einen Aminothiazolring enthalten, wurden als *Z*-Isomere aufgebaut.¹⁷⁵ Die Partialladungen wurden entsprechend der Gasteiger-Marsili-Methode berechnet.¹⁷⁶ Die Energien wurden mit dem Standard Tripos Krafffeld und einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 80$ (konstant) berechnet, um die elektrostatischen Interaktionen in der wässrigen Umgebung zu imitieren.^{177,178}

3.2.4.3 Konformationsanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Strukturen einer systematischen Konformationssuche unterzogen, in der alle frei rotierbaren Bindungen in 30° Schritten gedreht wurden. Ausgehend von der Struktur mit der niedrigsten potentiellen Energie wurden die Konformationen gelöscht, deren Energien mehr als 10 kcal x mol⁻¹ über dem globalen Minimum lagen, um die Anzahl der Konformationen zu reduzieren. Anschließend erfolgte eine weitere Selektion durch Anwendung

eines Algorithmus zur Suche nach den lokalen Energieminima.¹⁷⁹ Die Konformere wurden mit Hilfe der Methode nach Powell energieminiert (Gradient termination: rms (root mean square) < 0,001 kcal/(mol*Å); Dielektrizitätskonstante $\epsilon = 80$). Die verbleibenden Strukturen wurden anschließend nach ihren Energien sortiert. Zur Entfernung identischer Konformere aus den Datenbanken wurden alle Strukturen gegeneinander gefittet (rms-Grenzwert 0,3 Å).¹⁴ Die so ausgewählten Konformere wurden in Datenbanken gespeichert.

3.2.4.4 3D-QSAR-Analyse

Die 3D-QSAR Untersuchungen wurden mittels des Programms CoMSIA durchgeführt. Mit CoMSIA werden physikochemischen Eigenschaften (sterische, elektrostatische, hydrophobe, Wasserstoffbrücken-Donor und -Akzeptor Eigenschaften) der Substanzen untersucht. Die molekularen Felder wurden mit Standard Parametern (sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom als Sondenatom, Ladung +1, Hydrophobizität +1, Wasserstoffbrückenbindungs-Eigenschaften +1, Radius 1 Å) berechnet. Der Abschwächungsfaktor α wurde auf 0,3 gesetzt.¹⁸⁰ Die Abstandsabhängigkeit wurde mittels einer Gaußfunktion zwischen jedem Gitterpunkt und jedem Atom eines Moleküls im Trainingsdatensatz berechnet. Dafür wurde zunächst ein Gitter mit der Maschenweite von 2 Å erstellt. Das Ausmaß des Gitters wurde automatisch so gewählt, dass alle überlagerten Moleküle weiträumig im Gitter eingeschlossen sind. Die anschließende PLS-Analyse wurde nach den Standardeinstellungen in SYBYL durchgeführt. Die statistische Signifikanz der 3D-QSAR Modelle wurde mit Hilfe der LOO-Kreuzvalidierung und der SAMPLS (Sample-distance PLS) überprüft. Die optimale Komponentenzahl wurde aus der Kombination des kleinsten Standard-Vorhersagefehlers (s_{PRESS}) und des größten q^2 -Wertes ermittelt. Anschließend erfolgte die endgültige PLS-Analyse zur Berechnung der Gesamtkorrelation r^2 . Der Minimum σ -Wert (Spaltenfilter) wurde so variiert, dass jeweils 10 % der Variablen in die PLS-Rechnung eingehen. Er lag zwischen 1,0 und 2,5.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Experimentelle Untersuchungen

4.1.1 *Kompetitionsexperimente*

4.1.1.1 *Dipeptide*

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten 3D-QSAR Untersuchungen war es zuerst erforderlich, K_T -Werte von Substraten der H^+ /Peptidsymporter PEPT1 und PEPT2 zu messen. Die dafür notwendigen Kompetitionsexperimente wurden an den Karzinom-Zelllinien Caco-2 (PEPT1) und SKPT-0193 Cl.2 (PEPT2) durchgeführt. Da beide Zelllinien von unterschiedlichen Spezies (Mensch und Ratte) stammen, könnten die erhaltenen Bindungsaffinitäten spezifisch für Ratte oder Mensch und weniger charakteristisch für PEPT1 und PEPT2 sein. Viele der mit Caco-2 und SKPT Zellen gemessenen K_T -Werte wurden jedoch durch heterologe Expressionssysteme für hPEPT1 und hPEPT2 in HeLa und LLC-PK₁-Zellen bestätigt. Der Vergleich der an Caco-2 und SKPT Zellen gemessenen K_T -Werte, ist daher zur Untersuchung der Substratspezifität beider Peptidtransporter geeignet.^{9,144,162,181,182}

Für das **PEPT1-Modell** standen bereits zahlreiche, an Caco-2 Zellen gemessene K_T -Werte zur Erstellung eines 3D-QSAR Modells zur Verfügung, so dass schwerpunktmäßig Bindungsaffinitäten der Tripeptide gemessen wurden (siehe Kapitel 4.1.1.2). Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Bindungsaffinitäten möglicher Spaltprodukte an PEPT1 wurden K_T -Werte von Ala-Arg, Leu-Arg, Met-Met und Trp-Trp untersucht.

Die Ergebnisse der Verdrängungsexperimente zur Bestimmung der Hemmkonstanten (K_i) der Dipeptide gegen die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar bei pH 6,0 an Caco-2 Zellen sind in Abbildung 10 dargestellt. Dabei wurden die Konzentrationen an unmarkiertem Inhibitor gegen die [¹⁴C]Gly-Sar Aufnahme (10 μ M) logarithmisch aufgetragen. Aus den erhaltenen Verdrängungskurven konnten die entsprechenden IC_{50} -Werte durch nichtlineare Regression ermittelt werden.

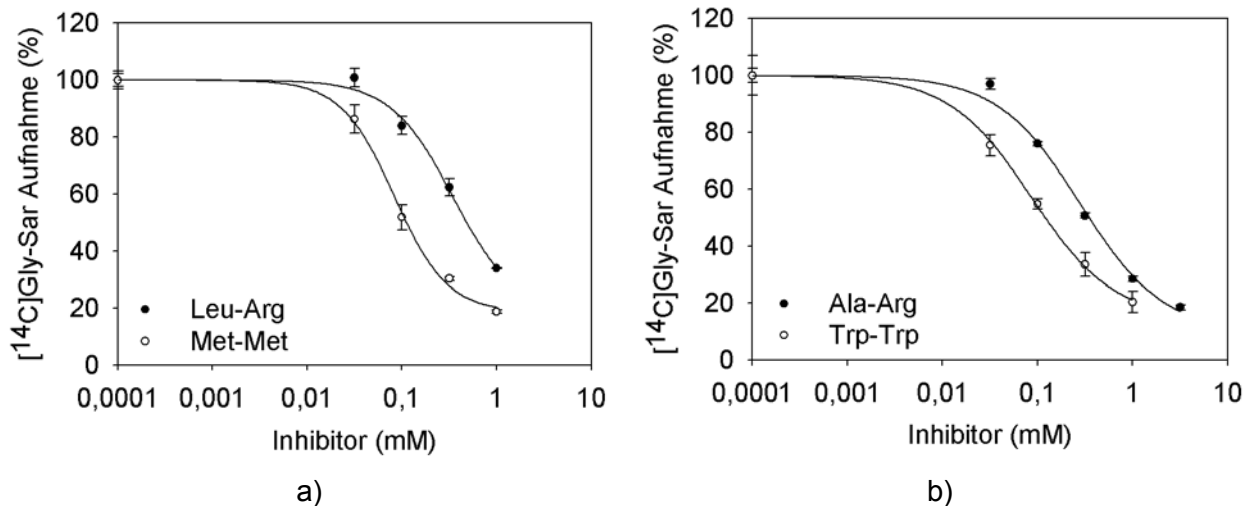


Abbildung 10: Substratspezifität der $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar Aufnahme in Caco-2 Zellen. Die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar ($10\ \mu\text{M}$) wurde unter Koinkubation mit verschiedenen Dipeptiden in ansteigenden Konzentrationen bei 37°C und pH 6,0 nach 10 min gemessen ($n = 4$).

In Tabelle 5 sind die aus den IC_{50} -Werten berechneten Hemmkonstanten (K_i) zusammenfassend dargestellt. Die gemessenen Bindungsaffinitäten von Ala-Arg und Leu-Arg waren niedriger, als die von Met-Met und Trp-Trp. Insgesamt handelt es sich jedoch um hochaffine Liganden von PEPT1.

Tabelle 5: Ermittelte K_i -Werte von Dipeptiden an PEPT1. Die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar ($10\ \mu\text{M}$) in konfluente Monolayer der Zelllinie Caco-2 wurde bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach Zusatz von unmarkierten Dipeptiden in ansteigenden Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Die Inhibitionskonstanten wurden aus den IC_{50} -Werten erhalten, die aus den Verdrängungskurven durch nichtlineare Regression bestimmt wurden ($n = 4$).

Dipeptid	K_i PEPT1 (mM)
Ala-Arg	$0,23 \pm 0,03$
Leu-Arg	$0,41 \pm 0,05$
Met-Met	$0,08 \pm 0,007$
Trp-Trp	$0,09 \pm 0,014$

Der bisher einzige publizierte K_i -Wert von Xaa-Arg Verbindungen ist der von Pro-Arg ($K_i = 2,5\ \text{mM}$).¹⁴⁶ Die niedrige Bindungsaffinität resultiert dabei vermutlich aus dem N-terminalen Prolinrest. Andere Dipeptide, die eine positiv geladene C-terminale Seitenkette enthalten, wie z. B. Ala-Lys ($K_i = 0,21\ \text{mM}$) werden mit hoher Bindungsaffinität an PEPT1 gebunden.¹⁰ Die beiden in dieser Arbeit gemessenen K_i -Werte von Ala-Arg und Leu-Arg liegen in einem vergleichbaren Bereich.

Für Dipeptide mit hydrophoben voluminösen Seitenketten wurden ähnlich hohe Bindungsaffinitäten an PEPT1 gemessen wie für Trp-Trp, z. B. Phe-Phe ($K_i = 0,11 \text{ mM}$).¹⁴

Bindungsaffinitäten von Dipeptiden, die einen Methionin-Rest enthalten, wurden bisher noch nicht an Caco-2 Zellen untersucht. An LLC-PK₁-Zellen wurde für Met-Ala ein K_i -Wert von 0,15 mM gemessen, der in einem vergleichbaren Bereich liegt wie der für Met-Met.¹⁵⁰ Die in dieser Arbeit ermittelten K_i -Werte (Tabelle 5) stimmen demnach mit den bisherigen Kenntnissen überein.

Im Gegensatz zu PEPT1 waren nur wenige K_i -Werte für 3D-QSAR Untersuchungen an **PEPT2** verfügbar. Damit ein ausgewogener Datensatz generiert werden konnte, wurden Bindungsaffinitäten von 34 Dipeptiden, die aus Aminosäuren mit möglichst unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften aufgebaut sind und verschiedenen Konfigurationen aufweisen, an SKPT-Zellen gemessen (Tabelle 6). Die Hemmkurven der einzelnen Konkurrenzexperimente sind in Anlage 7.1 dargestellt. Die in dieser Arbeit gemessenen K_i -Werte haben die Kenntnisse der möglichen Bindungsaffinitäten natürlicher Substrate erweitert. Folgende Ergebnisse konnten abgeleitet werden:

- Die K_i -Werte der untersuchten Dipeptide lagen im Bereich von 0,8 μM für Trp-Trp bis ~42 mM für D-Ala-D-Ala.
- Dipeptide mit hydrophoben Seitenketten wurden von PEPT2 mit höherer Affinität gebunden als hydrophile Substanzen.
- Dipeptide mit geladenen Seitenketten zeigten tendenziell niedrigere Affinitäten als neutrale Dipeptide.
- Prolin in N-terminaler Position verringert die Bindungsaffinität.
- PEPT2 ist stereoselektiv. LL-Dipeptide wurden mit höherer Affinität gebunden als DL- und DD-Dipeptide. Letztere werden nicht mehr von PEPT2 erkannt (LL > DL > LD > DD).

Die K_i -Werte von Dipeptiden an PEPT2, die in vorangegangenen Studien an BBMV und LLC-PK₁-Zellen gemessen worden sind, bestätigen die an SKPT-Zellen gemessenen Bindungsaffinitäten.^{149,150}

Tabelle 6: Inhibitionskonstanten (K_i) verschiedener Dipeptide an PEPT2. Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) in konfluente Monolayer der Zelllinie SKPT wurde bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach Zusatz von unmarkierten Dipeptiden in ansteigenden Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Die Inhibitionskonstanten wurden aus den IC_{50} -Werten erhalten, die aus den Verdrängungskurven durch nichtlineare Regression bestimmt wurden ($n = 4$); modifiziert aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006a).

Dipeptid	K_i PEPT2 (μM)	Dipeptid	K_i PEPT2 (μM)	Dipeptid	K_i PEPT2 (μM)
Trp-Trp	$0,80 \pm 0,17$	Leu-Pro	$10 \pm 1,8$	Gly-Gly	$54 \pm 7,6$
Val-Tyr	$2,5 \pm 0,10$	Ala-Pro	$12 \pm 3,0$	D-Phe-Ala	$97 \pm 7,7$
Ala-Nle	$3,1 \pm 0,21$	Arg-Pro	$12 \pm 0,80$	D-Ala-Ala	$133 \pm 4,4$
Met-Met	$3,2 \pm 0,26$	Ala-Arg	$16 \pm 2,6$	Ala-D-Ala	270 ± 35
Val-Phe	$3,8 \pm 0,12$	Phe-Ala	$16 \pm 2,8$	Pro-Arg	$1,6 \pm 0,10 \text{ mM}$
Trp-Ala	$4,0 \pm 0,21$	Asp-Gly	$19 \pm 3,6$	Pro-Asp	$2,1 \pm 0,30 \text{ mM}$
Val-Ala	$4,0 \pm 0,27$	Ala-Lys	$23 \pm 1,9$	Pro-Ala	$2,6 \pm 0,30 \text{ mM}$
Ala-Ser	$6,2 \pm 0,80$	Gly-Pro	$27 \pm 6,6$	Pro-Glu	$2,6 \pm 0,60 \text{ mM}$
Ser-Ala	$7,2 \pm 0,67$	Cys-Gly	$29 \pm 5,0$	Ala-D-Pro	$15 \pm 1,4 \text{ mM}$
Ile-Tyr	$8,3 \pm 0,40$	Phe-Phe	$37 \pm 3,9$	D-Ala-D-Ala	>10 (~ 42) mM^*
Leu-Arg	$9,0 \pm 1,15$	Val-Pro	$39 \pm 5,0$		
Tyr-Phe	$9,0 \pm 0,71$	Lys-Ala	41 ± 11		

* Aufgrund geringer Löslichkeit oder niedriger Bindungsaffinität liegen die K_i -Werte außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden.

4.1.1.2 Tripeptide

Für die Durchführung von 3D-QSAR Untersuchungen wurde eine Vielzahl von K_i -Werten von Tripeptiden an PEPT1 und PEPT2 gemessen. Die Hemmkurven der einzelnen Kompetitions-experimente sind in Anlage 7.1 dargestellt. Diese systematische Untersuchung ergab folgende Resultate für **PEPT1** (Tabelle 7):

- Tripeptide in LLL-Konfiguration weisen K_i -Werte im Bereich von 0,06 mM (Val-Pro-Pro) bis 16 mM (Pro-Gly-Gly) auf
- Tripeptide, die neutrale Seitenketten enthalten, zeigen geringfügig höhere Affinitäten ($0,1 < K_i < 0,2 \text{ mM}$), als solche mit geladenen Seitenketten (z. B. Glu-Phe-Tyr $K_i = 0,2 \text{ mM}$; Ala-Ala-Asp $K_i = 0,82 \text{ mM}$).

- In Übereinstimmung mit den Bindungsaffinitäten der Dipeptide weisen Tripeptide, die Prolin in N-terminaler Position enthalten, hohe K_i -Werte auf, z. B. Pro-Phe-Lys ($K_i = 2,0$ mM) und Pro-Gly-Gly ($K_i = 16$ mM).
- Tripeptide in DLL, LDL und LLD-Konfiguration zeigen niedrigere Bindungsaffinitäten $K_i > 5$ mM, mit Ausnahme von D-Met-Met-Met ($K_i = 0,52$ mM).
- Tripeptide mit modifiziertem C-Terminus (Pro-Leu-Gly-NH₂) werden nicht von PEPT1 erkannt ($K_i > 31$ mM).

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurden 24 weitere Tripeptide und Tripeptidmimetika hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten an PEPT1 untersucht. Die dort beschriebenen K_i -Werte an Caco-2 Zellen liegen in einem ähnlichen Bereich, wie die in Tabelle 7 dargestellten Werte. Für Ala-Ala-Ala wurde ein vergleichbarer K_i -Wert von 0,35 mM beschrieben.¹³³

Tabelle 7: Inhibitionskonstanten (K_i) verschiedener Tripeptide an PEPT1 und PEPT2. Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar (10 μ M) in konfluente Monolayer der Zelllinien Caco-2 und SKPT wurde bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach Zusatz von unmarkierten Tripeptiden in ansteigenden Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Die Inhibitionskonstanten wurden aus den IC_{50} -Werten erhalten, die aus den Verdrängungskurven durch nichtlineare Regression bestimmt wurden (n = 4-6); modifiziert aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006a).

Tripeptid	K_i PEPT1 (mM)	K_i PEPT2 (mM)	$\frac{K_i \text{ PEPT1}}{K_i \text{ PEPT2}}$
Ala-Ala-Ala	0,18 \pm 0,02	0,018 \pm 0,004	11
D-Ala-Ala-Ala	4,5 \pm 0,5 ^a	1,0 \pm 0,1	8
Ala-D-Ala-Ala	8,4 \pm 0,6 ^a	4,2 \pm 0,20	2
D-Ala-D-Ala-D-Ala	> 30 (~150) ^{a*}	> 31,6 (~160)*	1
Tyr-D-Ala-Gly	> 10 (~14)*	> 3,16 (~6,5)*	2
D-Tyr-Val-Gly	14 \pm 2	0,72 \pm 0,05	19
Ala-D-Phe-Ala	19 \pm 4	n.b.	-
Leu-Gly-Gly	0,39 \pm 0,06	0,018 \pm 0,002	22
D-Leu-Gly-Gly	25 \pm 1,5	0,59 \pm 0,02	42
Met-Met-Met	0,10 \pm 0,09	0,002 \pm 0,0008	50
D-Met-Met-Met	0,52 \pm 0,08	0,006 \pm 0,0004	88
Ala-Glu-Ala	0,48 \pm 0,05	0,046 \pm 0,009	10
Ala-Ala-Glu	0,81 \pm 0,1	0,069 \pm 0,001	12
Ala-Asp-Ala	0,72 \pm 0,04	0,079 \pm 0,005	9
Ala-Ala-Asp	0,82 \pm 0,12	0,16 \pm 0,02	5

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 7

Leu-Pro-Arg	0,10 ± 0,01 ^{b,c}	1,1 ± 0,20 mM	0,1
Leu-Ala-Arg	0,11 ± 0,01 ^{b,c}	1,2 ± 0,10 mM	0,1
Leu-Arg-Pro	0,30 ± 0,06 ^b	0,001 ± 0,0003	300
Ala-Ala-Arg	1,2 ± 0,22	1,3 ± 0,10	1
Val-Pro-Pro	0,06 ± 0,002 ^b	0,023 ± 0,003	3
Ile-Pro-Pro	0,28 ± 0,06 ^b	0,027 ± 0,001	10
Ala-Pro-Leu	0,10 ± 0,01	n.b.	-
Ser-Pro-Ile	0,17 ± 0,03 ^b	0,019 ± 0,002	8
Tyr-Pro-Ile	0,25 ± 0,04 ^b	0,0054 ± 0,0001	46
Ala-Phe-Pro	0,11 ± 0,01	n.b.	-
Pro-Phe-Lys	2,0 ± 0,19	0,09 ± 0,002	2
Pro-Gly-Gly	16 ± 2,0 ^b	11 ± 1,3 mM	1
Leu-Thr-Leu	0,11 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,001	11
Ala-Val-Leu	0,14 ± 0,01 ^b	0,012 ± 0,001	12
Val-Ala-Leu	0,14 ± 0,02	0,009 ± 0,0002	16
Trp-Trp-Trp	0,17 ± 0,03 ^{b,c}	0,3 ± 0,03 μM ^c	567
Ile-Val-Tyr	0,20 ± 0,01 ^b	0,014 ± 0,001	14
Glu-Phe-Tyr	0,20 ± 0,01	0,052 ± 0,005	4
Trp-Gly-Tyr	0,24 ± 0,05	0,0017 ± 0,0003	141
Thr-Lys-Tyr	1,1 ± 0,10 ^b	0,039 ± 0,003	28
Gly-His-Lys	4,1 ± 0,60	3,1 ± 0,40	1
Pro-Leu-Gly-NH ₂	> 31 ^{b,*}	> 31 (~38) ^{b,*}	-

^a gemessen von Ilka Knütter und ^b Mandy Bruch; ^c Aufgrund einer geringen Wiederfindungsrate (siehe nächster Abschnitt) kann eine Aufspaltung des Tripeptids während der Versuchsdauer nicht ausgeschlossen werden. Die gemessenen K_i -Werte sind wahrscheinlich durch die Spaltprodukte beeinflusst worden. * Aufgrund geringer Bindungsaffinität liegen die K_i -Werte außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden.

An **PEPT2** wurde die höchste Affinität von $K_i = 0,3 \mu\text{M}$ für das größte Tripeptid Trp-Trp-Trp gemessen. Transportuntersuchungen an *Xenopus laevis* Oocyten^{††} zeigten jedoch, dass es sich um einen PEPT2-Inhibitor handelt.

^{††} AG Ernährungsphysiologie der TU-München, Prof. Daniel

Wie bereits für die Dipeptide beobachtet, zeigen auch hydrophobe Tripeptide vergleichsweise höhere Bindungsaffinitäten an PEPT2 als hydrophile Moleküle. PEPT2 differenziert außerdem zwischen geladenen und ungeladenen Tripeptiden. Für solche Verbindungen, die geladene Aminosäurereste am C-Terminus enthalten, wurden höhere K_i -Werte im Vergleich zu solchen mit neutralen Seitenketten gemessen (z. B. Ala-Ala-Ala $K_i = 0,018$ mM und Ala-Ala-Asp $K_i = 0,16$ mM). Positive Ladungen in der dritten Seitenkette führen zu niedriger Bindungsaffinität an PEPT2 (z. B. Leu-Pro-Arg $K_i = 1,1$ mM; Leu-Ala-Arg $K_i = 1,2$ mM; Ala-Ala-Arg $K_i = 1,3$ mM).

Pro-Xaa-Xaa Tripeptide zeigen niedrige Bindungsaffinitäten an PEPT2 (z. B. Pro-Gly-Gly $K_i = 11$ mM).

DLL-Tripeptide und LDL-Tripeptide werden mit geringeren Affinitäten als LLL-Tripeptide von PEPT2 erkannt. Für D-Met-Met-Met wurde jedoch eine außerordentlich hohe Bindungsaffinität von 0,006 mM an PEPT2 gemessen, die im Bereich der LLL-Tripeptide liegt. DDD-Tripeptide werden nicht von PEPT2 erkannt.

Die Carboxylgruppe scheint ebenfalls ein wichtiges Erkennungsmerkmal von PEPT2 zu sein, da Tripeptid-Derivate, die eine C-terminale Säureamidgruppe enthalten (z. B. Pro-Leu-Gly-NH₂ und Tyr-Pro-Phe-NH₂), hohe K_i -Werte an PEPT2 aufweisen. Im Fall von Alafosfalin ($K_{i\text{ PEPT2}} = 0,08$ mM) konnte jedoch gezeigt werden, dass die C-terminale Carboxylgruppe auch durch eine Phosphonogruppe ausgetauscht sein kann.¹⁶⁷

Es ist bekannt, dass hydrophobe Substrate von PEPT1 und PEPT2 bevorzugt werden.^{149,183} PEPT2 bindet Tripeptide mit hydrophoben Seitenketten jedoch mit weitaus höherer Affinität als PEPT1. Die Bindungsaffinität von Trp-Trp-Trp ($K_i = 0,3$ μ M) ist 567-fach höher an PEPT2 als an PEPT1 ($K_i = 170$ μ M). Diese Affinitätsunterschiede zwischen beiden Peptidtransportern wurden auch für verschiedene seitenkettenblockierte Dipeptid-Derivate gemessen, z. B. zeigt Lys(Z)-Lys(Z) eine 27400-fach höhere Affinität an PEPT2 im Vergleich zu PEPT1.¹⁰ Bei den natürlichen Dipeptiden sind bisher bezüglich der Hydrophobizität von Substraten keine Erkennungsunterschiede in solchen Dimensionen gemessen worden. Eine Ausnahme bildet das Dipeptid Trp-Trp, das eine 113-fach höhere Affinität an PEPT2 gegenüber PEPT1 zeigt ($K_{i\text{ PEPT1}} = 90$ μ M; $K_{i\text{ PEPT2}} = 0,8$ μ M). Da es sich bei den beschriebenen Verbindungen um relativ hydrophobe Moleküle handelt, können möglicherweise auch Löslichkeitsprobleme der Verbindungen bei den Konkurrenzexperimenten zu den hohen Werten für die $K_{i\text{ PEPT1}}/K_{i\text{ PEPT2}}$ -Quotienten beitragen.

Tripeptide, die eine geladene dritte Seitenkette enthalten, werden von PEPT2 mit geringer Affinität gebunden. PEPT1 hingegen ist tolerant gegenüber dieser Ladung und erkennt diese

Substrate mit hoher bzw. mittlerer Affinität. Aus diesen Erkennungsunterschieden resultieren K_i PEPT1/ K_i PEPT2-Quotienten im Bereich von 1 bis 0,1 (z. B. Gly-His-Lys und Leu-Ala-Arg).

Es ist weiterhin bekannt, dass PEPT1 nur solche Dipeptide bindet, die eine *trans*-Peptidbindung aufweisen.¹⁴⁶ Bisher ist nicht untersucht worden, ob dies a) für PEPT2 und b) für die beiden Peptidbindungen der Tripeptide ebenfalls zutrifft. Val-Pro-Pro kann diesbezüglich theoretisch in vier verschiedenen Konformationen (*cis-cis*, *cis-trans*, *trans-cis* und *trans-trans*) vorliegen. Möglicherweise sind die tatsächlichen Bindungsaffinitäten von Xaa-Pro-Xaa, Xaa-Pro-Pro und Xaa-Xaa-Pro Tripeptiden höher, d.h. die K_i -Werte niedriger, als in Tabelle 7 angegeben.

Stabilitätstests einiger Tripeptide

Die verwendeten Zelllinien Caco-2 und SKPT verfügen über eine Vielzahl metabolisierender Enzyme. Daher können Tripeptide von membranständigen Enzymen zu Dipeptiden und Aminosäuren metabolisiert werden. Die Konzentration der jeweiligen Tripeptide kann zum einen durch Metabolisierung vermindert werden, zum anderen könnte auch eine Immobilisierung der Substanz durch unspezifische Bindung an die Zelloberfläche erfolgen. Die Stabilität einiger Tripeptide während der 10-minütigen Aufnahmeexperimente wurde durch die Messung der Wiederfindungsraten bestimmt. Die Wiederfindungsrate der meisten Tripeptide betrug 86 bis 98 % (Tabelle 8). Bei manchen Messungen wurden nach 10 Minuten höhere Konzentrationen ermittelt, als anfänglich eingesetzt worden sind. Verdunstungseffekte könnten möglicherweise der Grund für solche Werte sein.

Nur 74 % des Tripeptids Trp-Trp-Trp ($K_i = 0,17$ mM) konnten im Versuchspuffer nach der 10-minütigen Inkubation auf Caco-2 Zellen detektiert werden. Das Spaltprodukt Trp-Trp (K_i PEPT1 = 0,09 mM) weist eine ähnliche Affinität wie das Tripeptid auf. Die Aminosäure Tryptophan zeigte keine Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar Aufnahme bis 10 mM. Den Ergebnissen zufolge konnte kein eindeutiger K_i -Wert für das Tripeptid ermittelt werden, da auch das während der Versuchsdurchführung abgespaltene Dipeptid in der Lösung vorliegt. Transportuntersuchungen an *Xenopus laevis* Oocyten^{‡‡} zeigten, dass Trp-Trp aktiv von PEPT1 transportiert wird. Die in einer kürzlich erschienenen Studie dargestellten Resultate widersprechen diesem Ergebnis jedoch.¹¹⁷ In vorangegangenen Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass andere hydrophobe Dipeptide (Lys-Lys) aktiv von PEPT1 transportiert werden.¹⁰ Die Translokation hydrophober Di- und Tripeptide durch PEPT1 und PEPT2 sollte daher Thema weiterführender Studien sein.

^{‡‡} AG Ernährungsphysiologie TU-München, Prof. Daniel

Tabelle 8: Wiederfindungsrate von Tripeptiden nach 10-minütiger Inkubation auf Caco-2 und SKPT Zellen. Die Messungen erfolgten an konfluenten Monolayern der Zelllinien Caco-2 und SKPT bei Raumtemperatur und pH 6,0. Sofort nach Zugabe der unmarkierten Tripeptide (1,0 mM) wurde ein Nullwert entnommen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde der Überstand entfernt und mittels HPLC-Analyse die Konzentration der Tripeptide ermittelt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SE angegeben (n = 3).

Tripeptid	Wiederfindungsrate		Tripeptid	Wiederfindungsrate	
	nach 10 min			nach 10 min	
	Caco-2	SKPT		Caco-2	SKPT
Ala-Ala-Ala	96 \pm 2	91 \pm 1	Pro-Gly-Gly	93 \pm 6	97 \pm 12
Ala-Phe-Leu	94 \pm 1	n.b.	Pro-Leu-Gly-NH ₂	93 \pm 6	n.b.
Ala-Val-Leu	90 \pm 2	108 \pm 3	Pro-Phe-Lys	104 \pm 5	98 \pm 3
D-Leu-Gly-Gly	98 \pm 2	93 \pm 2	Ser-Pro-Ile	93 \pm 1	n.b.
D-Met-Met-Met	96 \pm 3	99 \pm 8	Thr-Lys-Tyr	94 \pm 2	107 \pm 10
D-Tyr-Val-Gly	95 \pm 9	97 \pm 12	Trp-Trp-Trp	74 \pm 1	87 \pm 6
Glu-Phe-Tyr	95 \pm 3	90 \pm 4	Tyr-D-Ala-Gly	91 \pm 10	110 \pm 6
Ile-Pro-Pro	93 \pm 5	93 \pm 11	Tyr-Gly-Gly	98 \pm 2	89 \pm 7
Leu-Ala-Arg	79 \pm 2	92 \pm 1	Tyr-Pro-Ile	88 \pm 2 ^a	n.b.
Leu-Gly-Gly	86 \pm 3	96 \pm 4	Tyr-Pro-Phe	n.b.	103 \pm 4
Leu-Pro-Arg	75 \pm 5	96 \pm 1	Val-Pro-Pro	101 \pm 1 ^a	n.b.
Met-Met-Met	93 \pm 6	97 \pm 12			

^a gemessen von Mandy Bruch

Auch an SKPT-Zellen wurden nur 87 % der Ausgangskonzentration von Trp-Trp-Trp wieder gefunden. Das Dipeptid wies ebenfalls eine sehr hohe Bindungsaffinität an PEPT2 auf ($K_i = 0,8 \mu\text{M}$), hingegen konnte für die Aminosäure keine Bindung an den Transporter ermittelt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Tripeptid Trp-Trp-Trp mit einer sehr hohen Affinität an PEPT2 gebunden wird, ein genauer K_i -Wert kann nicht angegeben werden.

Auf Caco-2 Zellen wurden für die hochaffinen Tripeptide Leu-Pro-Arg ($K_i = 0,1 \text{ mM}$) und Leu-Ala-Arg ($K_i = 0,11 \text{ mM}$) nur je 75 % und 79 % der Ausgangskonzentrationen nach 10-minütiger Inkubation ermittelt (Tabelle 8). Die Spaltprodukte Leu-Pro ($K_i = 0,26 \text{ mM}$), Leu-Ala ($K_i = 0,12 \text{ mM}$) sowie Ala-Arg ($K_i = 0,23 \text{ mM}$) zeigen an PEPT1 hohe Bindungsaffinitäten. Pro-Arg hingegen wird mit geringer Bindungsaffinität ($K_i = 2,5 \text{ mM}$) an PEPT1 gebunden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Bindungsaffinitäten der Tripeptide Leu-Pro-Arg und Leu-Ala-Arg auf den Affinitäten der Spaltprodukte beruhen. Dies würde auch die gemessene Bindungsaffinität von Ala-Ala-Arg von $K_i = 1,2 \text{ mM}$ erklären, welche um ein Vielfaches niedriger ist als die von Leu-Ala-Arg und Leu-Pro-Arg.

4.1.1.3 β -Lactam-Antibiotika

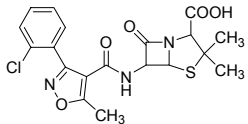
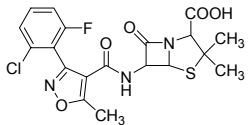
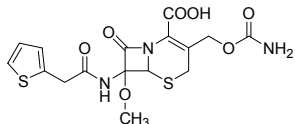
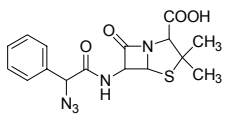
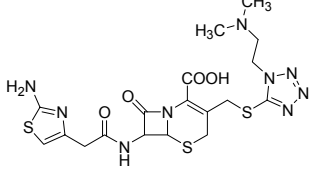
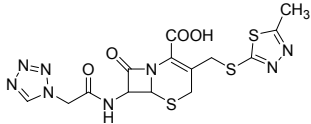
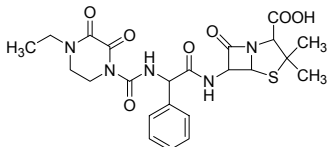
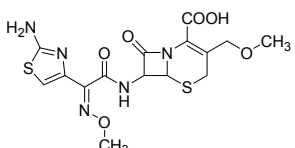
Die Datensammlung, der Arbeitsgruppe Membrantransport der Martin-Luther-Universität Halle, der verschiedenen Inhibierungskonstanten der β -Lactam-Antibiotika an PEPT1 und PEPT2, konnte um die in Tabelle 9 dargestellten K_i -Werte erweitert werden. Die Hemmkurven der einzelnen Konkurrenzexperimente sind in Anlage 7.1 dargestellt. Es bestätigte sich, dass voluminöse Seitenketten am N- und C-Terminus der Cephalosporine ungünstig für die Erkennung durch die H^+ /Peptidsymporter sind, z. B. Cefazolin und Cefotiam.^{137,144,145,155} Die oral verfügbaren Wirkstoffe Acidocillin, Flucloxacillin und Cloxacillin zeigen mittlere bis niedrige Bindungsaffinitäten an PEPT1. Für die strukturell ähnlichen β -Lactam-Antibiotika Oxacillin und Dicloxacillin, die am Benzol-Ring jeweils keinen Substituenten (Oxacillin), bzw. zwei Chloratome (Dicloxacillin) enthalten, wurden niedrige K_i -Werte (7,2 bis 12 mM) an PEPT1 gemessen.¹⁴⁴ Cloxacillin weist in dieser Reihe die höchste Bindungsaffinität an PEPT1 von $K_i = 2,6$ mM auf.

Piperacillin, das ebenfalls oral verfügbar ist, ist kein Substrat von PEPT1 und PEPT2. Aufgrund seiner Struktur, die eher einem Tetrapeptid ähnlich ist, wurden K_i -Werte > 31 mM gemessen (Tabelle 9). Cefoxitin ($K_i = 10$ mM) wird von PEPT1 erkannt, ist jedoch nicht oral verfügbar, und wird intravenös bzw. intramuskulär appliziert. Vermutlich ist Cefoxitin nicht pH-stabil oder wird im Magen-Darm Trakt durch Verdauungsenzyme gespalten.

Bisher sind keine weiteren K_i -Werte der in Tabelle 9 dargestellten β -Lactam-Antibiotika an anderen Expressionssystemen für PEPT1 und PEPT2 gemessen worden.

Die $K_{i\text{PEPT1}}/K_{i\text{PEPT2}}$ Quotienten der untersuchten β -Lactam-Antibiotika liegen mit Ausnahme von Acidocillin im Bereich von 1 bis 4. Auch in einer früheren Studie wurde beobachtet, dass bei β -Lactam-Antibiotika nur in Einzelfällen mit 10- bis 15-fach höherer Bindungsaffinität von PEPT2 verglichen mit PEPT1 gebunden werden.¹⁴⁴

Tabelle 9: Strukturen der untersuchten β -Lactam-Antibiotika und ihre Bindungsaffinitäten an PEPT1 und PEPT2. Die Aufnahme von [14 C]Gly-Sar (10 μ M) in konfluente Monolayer der Zelllinien Caco-2 und SKPT wurde bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach Zusatz von unmarkierten Substanzen in ansteigenden Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Die Inhibitionskonstanten wurden aus den IC_{50} -Werten, die aus den Verdrängungskurven durch nichtlineare Regression bestimmt wurden, berechnet (n = 4); modifiziert aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006a).

Name	Struktur	K_i PEPT1 (mM)	K_i PEPT2 (mM)	$\frac{K_i \text{ PEPT1}}{K_i \text{ PEPT2}}$
Cloxacillin		$2,6 \pm 0,3$	$0,95 \pm 0,17^a$	3
Flucloxacillin		$7,0 \pm 4,6$	$1,6 \pm 0,2$	4
Cefoxitin		10 ± 2^a	$8,6 \pm 2,0$	1
Acidocillin		15 ± 3	$0,71 \pm 0,1$	21
Cefotiam		30 ± 5	13 ± 2	2
Cefazolin		$31 \pm 2,1^b$	$27,4 \pm 2,8$	1
Piperacillin		$> 31,6$ (~61)*	$> 31,6$ (~58)*	1
Cefpodoxim		$> 31,6$ (~110)*	$> 31,6$ (~46)*	2

^a Luckner & Brandsch 2005¹⁴⁴; ^b Biegel 2002¹⁸⁴; * Aufgrund niedriger Bindungsaffinität liegen die K_i -Werte außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden.

4.1.1.4 Weitere Peptidmimetika

Neben den natürlichen Substraten und den bereits beschriebenen β -Lactam-Antibiotika wurden weitere, im Promotionszeitraum verfügbare, Peptidmimetika bezüglich ihrer Bindungsaffinität an PEPT1 und PEPT2 untersucht. Dadurch wurde der Kenntnisstand der Liganden von PEPT1 und PEPT2 erweitert.

Über die Erkennung und den Transport der ACE-Inhibitoren an PEPT1 sind z.T. unterschiedliche Ergebnisse publiziert worden. Die Bindungsaffinitäten wurden an unterschiedlichen Systemen unter verschiedenen Bedingungen gemessen.^{60,93,162,185,186} K_i -Werte an Caco-2 und SKPT Zellen sind bisher nur wenige bekannt. Lisinopril zeigte eine niedrige Bindungsaffinität ($K_i = 31$ mM) und ist somit kein Substrat von PEPT1 (Tabelle 10). In einer vorangegangenen Studie wurde ebenfalls festgestellt, dass Lisinopril die Gly-Sar Aufnahme in Caco-2 Zellen nur geringfügig hemmte. Außerdem konnte kein Transport von Lisinopril durch Caco-2 Monolayer gemessen werden.¹⁸⁷ In anderen Studien wurden für den strukturell ähnlichen ACE-Inhibitor Enalapril ebenfalls niedrige Bindungsaffinitäten an PEPT1 gemessen.^{60,186}

Die Bindungsaffinität des oral verfügbaren Antiarrhythmikums Procainamid wurde an PEPT2 getestet. Der ermittelte K_i -Wert von 22 mM lässt darauf schließen, dass es nicht von PEPT2 erkannt wird (Tabelle 10).

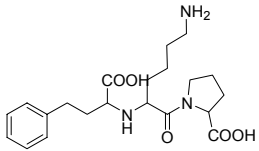
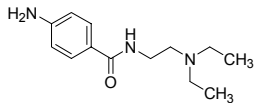
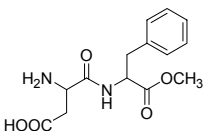
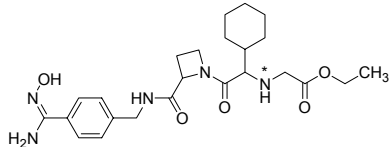
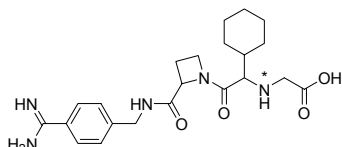
Lisinopril und Procainamid weisen peptidähnliche Strukturen auf. Lisinopril verfügt über keine N-terminale α -Aminogruppe und Procainamid enthält keine C-terminale Carboxylgruppe. Das Fehlen dieser Merkmale könnte die geringe Bindungsaffinität an die H^+ /Peptidsymporter erklären (Tabelle 10).

Der Zuckeraustauschstoff Aspartam, der weitreichende Verwendung in der Lebensmittelindustrie findet, steht im Verdacht, krebserregend zu sein. An mit Aspartam gefütterten Ratten wurde bereits gezeigt, dass dieses Dipeptid-Derivat viele verschiedene Krebserkrankungen begünstigt.¹⁸⁸ Aspartam (Tabelle 10) wird von PEPT1 mit niedriger Bindungsaffinität gebunden ($K_i = 5,4$ mM). Möglicherweise gelangt Aspartam durch den intestinalen H^+ /Peptidsymporter in den Organismus. Mit Hilfe des virtuellen Screenings von Strukturdatenbanken anhand eines Pharmakophormodells wurde Aspartam als möglicher Ligand von PEPT1 beschrieben.¹⁴⁰

Ximelagatran ist ein oral verfügbares Prodrug des Thrombin-Inhibitors Melagatran.^{189,190} Aufgrund der peptidähnlichen Struktur vermuteten wir, dass Ximelagatran von PEPT1 erkannt wird. Die ermittelten K_i -Werte an PEPT1 und PEPT2 (bei pH 5,0) zeigen, dass Ximelagatran von beiden H^+ /Peptidsymportern mit mittlerer Bindungsaffinität erkannt wird. Der Wirkstoff Melagatran ist kein Substrat der beiden Peptidtransporter (Tabelle 10). In Anbetracht des bisherigen Kenntnisstandes der Substratspezifität der H^+ /Peptidsymporter, wäre zu erwarten gewesen, dass Melagatran mit höherer Affinität von PEPT1 gebunden wird, da es im Gegen-

satz zu Ximelagatran über eine freie Carboxylgruppe verfügt. Beide Moleküle sind jedoch durch unterschiedliche physikochemische Eigenschaften gekennzeichnet.¹⁹⁰ Melagatran weist bei physiologischen pH-Werten eine deprotonierte Carboxylgruppe und eine protonierte Amidgruppe auf. Der pK_a -Wert des sekundären Amins, das in Tabelle 10 mit einem Sternchen gekennzeichnet ist, liegt bei 7,0. Bei pH 6,0 ist diese Gruppe zu 90 % protoniert und positiv geladen.¹⁹⁰ Ximelagatran liegt bei pH 7,0 als ungeladenes Molekül vor. Die Hydroxyamidgruppe ($pK_a = 5,2$) liegt beim verwendeten pH-Wert des Versuchspuffers (pH 5,0) zu 62 % protoniert und bei pH 6 zu 98,5 % deprotoniert vor. Das sekundäre Amin (*) weist einen pK_a -Wert von 4,5 auf und liegt bei pH 5,0 zu 24 % in protonierter Form vor.¹⁹⁰ Die unterschiedlichen Protonierungszustände dieses sekundären Amins haben unterschiedliche 3D-Strukturen zur Folge, in denen die unterschiedliche Erkennung der Peptidtransporter begründet sein kann.

Tabelle 10: K_i -Werte einiger peptidähnlicher Wirkstoffe an PEPT1 und PEPT2. Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) in konfluente Monolayer der Zelllinien Caco-2 und SKPT wurde bei Raumtemperatur und pH 6,0 (Ximelagatran pH 5,0) nach Zusatz von unmarkierten Substanzen in ansteigenden Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Die Inhibitionskonstanten wurden aus den IC_{50} -Werten, die aus den Verdrängungskurven durch nichtlineare Regression bestimmt wurden, ermittelt ($n = 4$). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SE angegeben.

Name	Struktur	K_i PEPT1 (mM)	K_i PEPT2 (mM)	$\frac{K_i \text{ PEPT1}}{K_i \text{ PEPT2}}$
Lisinopril		$31 \pm 3,1$	n.b.	-
Procainamid		> 31 (~ 135) [#]	> 10 (~22) [#]	6
Aspartam		$5,4 \pm 0,5$	n.b.	-
Ximelagatran		$3,0 \pm 0,5$	$0,93 \pm 0,04$	3
Melagatran		> 10 (~ 26) [#]	$15,7 \pm 1,2$	2

[#] Aufgrund geringer Löslichkeit bzw. niedriger Bindungsaffinität liegen die K_i -Werte außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden.* Ximelagatran pK_a 4,5; Melagatran pK_a 7,0

4.1.2 Transportuntersuchungen

Die Ergebnisse von Konkurrenzexperimenten geben Auskunft über die Bindung eines Substrates an PEPT1 oder PEPT2. Die Frage, ob diese Liganden auch durch die Membran transportiert werden, kann z. B. mit Fluxstudien untersucht werden. Dafür wurden Monolayer der Zelllinie Caco-2 auf permeablen Membranen in Transwell-Kammern kultiviert. In das obere Kompartiment wurden jeweils 1 mM der Peptidmimetika zugegeben. Die transportervermittelte Translokation von Ximelagatran und Melagatran wurde von der apikalen zur basolateralen Seite der Caco-2 Zellen ermittelt. Aus dem unteren Kompartiment wurden nach 10, 30, 60 und 120 min Proben entnommen, und die Konzentrationen der Arzneistoffe mittels HPLC bestimmt. Die Fluxstudien führten zu dem Ergebnis, dass innerhalb von 2 Stunden bei pH 5,0 ca. 4 % der Ausgangskonzentration von Ximelagatran durch die Membran transportiert wurden (Abbildung 11). Dies entspricht einer Fluxrate von $0,37 \text{ \%}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

Mannitol gelangt ausschließlich durch Diffusion durch die Caco-2 Monolayer und weist eine Fluxrate von $0,07 - 0,08 \text{ \%}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ auf.^{145,167} Das peptidasestabile PEPT1-Substrat Gly-Sar wird mit einer Fluxrate von $1,4 \text{ \%}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ durch Caco-2 Monolayer transportiert.^{145,167} Der Flux von Ximelagatran liegt damit genau zwischen diesen beiden Vergleichswerten. Es kann abgeleitet werden, dass die Translokation von Ximelagatran transportervermittelt erfolgt. Die in dieser Arbeit ermittelten Bindungsaffinitäten an PEPT1 und die Fluxwerte durch Caco-2 Monolayer weisen darauf hin, dass Ximelagatran möglicherweise aktiv durch PEPT1 transportiert wird. Derzeit kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das oral verfügbare Prodrug Ximelagatran auch ein Substrat anderer Transporter im Dünndarm sein könnte.

Wie zu erwarten war wurde Melagatran, das keine Affinität zu PEPT1 und PEPT2 zeigte, nicht durch die Zellschicht transportiert (Abbildung 11). Aufgrund geringer Substanzmenge konnte diese Messung nur mit $n = 2$ durchgeführt werden. Die hier dargestellten Fluxwerte stimmen weitestgehend mit Ergebnissen früherer Studien überein.¹⁹⁰

Ximelagatran ist aufgrund unerwarteter Nebenwirkungen nicht mehr als Arzneimittel zugelassen. Dennoch sind die Bindungsaffinitäten an PEPT1 und PEPT2 sowie die Fluxwerte durch Caco-2 Monolayer wegen der interessanten chemischen Struktur für die Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen wertvoll.¹⁸⁹

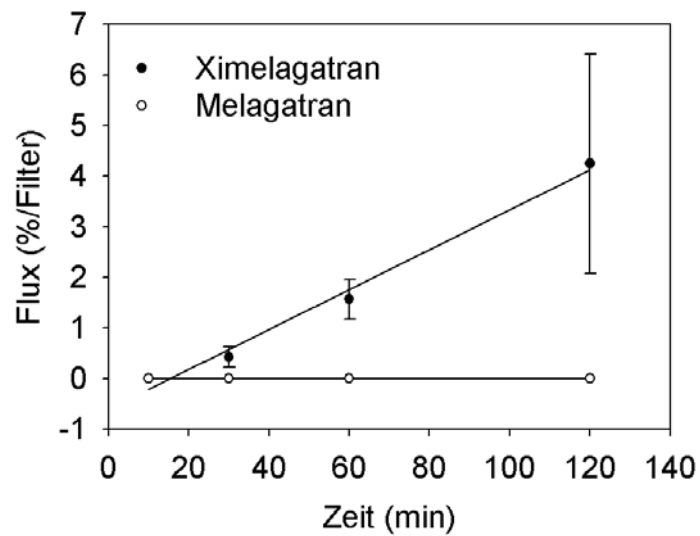


Abbildung 11: Permeation von Melagatran und Ximelagatran aus dem Donator durch Caco-2 Monolayer in den Akzeptor der Transwell[®]-Kammern. Bei 37°C wurde der transepitheliale Flux der Wirkstoffe (1 mM) über einen Zeitraum von 2 Stunden unter Anwesenheit eines pH-Gradienten (Melagatran: pH = 6,0 (Donator) : 7,5 (Akzeptor); Ximelagatran: pH = 5,0 (Donator) : 7,5 (Akzeptor)) gemessen. Die Anstiege der linearen Regressionen dienen zur Fluxbestimmung mittels Gleichung (14) ($r > 0,9279$). Die Analytik erfolgte anschließend durch HPLC.

4.2 3D-QSAR

4.2.1 3D-QSAR von PEPT1-Liganden: Di- und Tripeptide sowie β -Lactam-Antibiotika (Anlage 7.4 Biegel et al., 2005)

4.2.1.1 Der Datensatz

Zur Erklärung der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von Di- und Tripeptiden sowie β -Lactam-Antibiotika an PEPT1 wurde ein 3D-QSAR Modell aufgestellt, das aus 98 Verbindungen (35 Di- und 28 Tripeptide, 12 Dipeptid-Derivate sowie 23 β -Lactam-Antibiotika) besteht. Aufgrund der Substratvielfalt des H⁺/Peptidsymporters war es erforderlich, eine so große Anzahl von Verbindungen in den Datensatz aufzunehmen. Für den Trainingsdatensatz wurden Di- und Tripeptide ausgesucht, die eine große Diversität in den Seitenketten (z. B. positiv und negativ geladene, neutrale und aromatische Seitenketten) aufweisen und deren Bindungsaffinitäten in einem großen Bereich von $K_i = 0,01$ bis 100 mM liegen. Dadurch können möglichst viele physikochemische Eigenschaften der Liganden innerhalb des Modells betrachtet werden. Alle K_i -Werte wurden in der Arbeitsgruppe Membrantransport der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg durch die Verwendung eines einheitlichen Wettbewerbsassays an der Zelllinie Caco-2 gemessen (Kapitel 4.1.1).^{10,14,144-146,183,191} Die Bewertung des Modells erfolgte durch die Verwendung eines Testdatensatzes, dessen 24 Verbindungen so ausgewählt wurden, dass hoch-, mittel-, wenig- und nichtaffine Verbindungen getestet werden. Tabellen, in denen alle Verbindungen mit den dazugehörigen K_i -Werten aufgelistet sind, befinden sich in Anlage 7.2.

4.2.1.2 Konformationsanalyse und strukturelles Alignment

Das strukturelle Alignment von Dipeptiden einer vorangegangenen Studie bildete die Grundlage der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen.¹⁴ Für Ala-Ala wurden bei der Durchführung einer Konformationsanalyse sechs verschiedene Konformere mit *trans*-Peptidbindungen erhalten. Die Auswahl der bioaktiven Konformation erfolgte durch den Vergleich der Ala-Ala Konformere mit dem relativ starren hochaffinen Dipeptid-Derivat Ala- ψ [CS-N]-Pro ($K_i = 0,33$ mM). Nur die Konformation mit den Torsionswinkeln $\psi_1 = 165^\circ$; $\omega_1 = 178^\circ$ und $\phi_2 = 295^\circ$ sowie einem N..C Abstand von 5,3 Å war in beiden Konformerdatenbanken enthalten und wurde als Referenzstruktur für alle weiteren Verbindungen des Datensatzes verwendet.¹⁴ Diese Konformation wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Vorlage für die Auswahl der bioaktiven Konformationen von Dipeptiden, Tripeptiden und β -Lactam-Antibiotika verwendet. Ähnliche Konformationen für bioaktive Konformationen von Dipeptiden wurden auch in anderen Studien beschrieben.^{131,132}

Die Konformationsanalyse für das relativ starre Tripeptid Val-Pro-Pro, das zudem eine hohe Affinität an PEPT1 zeigt ($K_i = 0,10$ mM), ergab nur drei verschiedene Konformere mit *trans*-Peptidbindungen bei der systematischen Konformationsuche. Bei der Überlagerung dieser Strukturen auf das Rückgrat der vermeintlich bioaktiven Konformation von Ala-Ala ($C_{\alpha 1}$ -C-N- $C_{\alpha 2}$), wurde die Konformation von Val-Pro-Pro, mit dem kleinsten rms-Wert (kleinste Fehlerquadrate) ausgewählt und als Vorlage für alle weiteren Tripeptide im Datensatz verwendet (Abbildung 12a). Diese Konformation weist folgende Torsionswinkel auf: $\psi_1 = 145^\circ$; $\omega_1 = 180^\circ$, $\phi_2 = 286^\circ$, $\psi_2 = 172^\circ$, $\omega_2 = 180^\circ$ und $\phi_3 = 309^\circ$. Der N...C Abstand beträgt 7,4 Å und ist mit dem anderer Konformationsanalysen von Tripeptiden vergleichbar.^{108,135-137,139} In einer vor kurzem erschienenen Studie wurde ein N...C Abstand von 8,6 Å für bioaktive Konformationen der Tripeptide beschrieben, die angegebenen Bindungswinkel des Peptidrückgrates sind jedoch ähnlich ($\psi_1 = 165^\circ$; $\omega_1 = 180^\circ$, $\phi_2 = 280^\circ$, $\psi_2 = 180^\circ$).¹³³

Konformationsanalysen der β -Lactam-Antibiotika wurden im Rahmen der Diplomarbeit der Autorin durchgeführt.¹⁸⁴ Die systematische Suche mit anschließender Minimierung der Datenbanken ergab zahlreiche Minimumskonformationen der untersuchten Moleküle, die sich besonders im Bereich der flexiblen Seitenketten unterscheiden. Die Möglichkeiten der Überlagerung der hypothetischen aktiven Konformation von Ala-Ala und der β -Lactam-Antibiotika wurden mit dem Programm DISCO erarbeitet.¹⁹² Die Amidbindungen (C_{α} -C-N-C-) der Konformere der β -Lactam-Antibiotika wurden dabei entlang der Peptidbindung von Ala-Ala ($C_{\alpha 1}$ -C-N- $C_{\alpha 2}$) überlagert. Aufgrund der Tatsache, dass Dipeptide in DL-Konfiguration weitaus geringere Bindungsaffinitäten an PEPT1 zeigen als LL-Dipeptide (z. B. Ala-Ala $K_i = 0,1$ mM, D-Ala-Ala $K_i = 2,1$ mM) wurde das zuvor in der Arbeitsgruppe erstellte 3D-QSAR Modell so aufgebaut, dass N-terminale Aminogruppen von D-konfigurierten N-terminalen Aminosäureresten in einer anderen Position im strukturellen Alignment liegen als die Aminogruppen der hochaffinen L-Aminosäurereste.¹⁴ Ausgehend von diesem Modell wurden auch die Aminogruppen der β -Lactam-Antibiotika mit denen der D-konfigurierten N-terminalen Aminosäurereste überlagert. Aufgrund des relativ starren Ringsystems der β -Lactam-Antibiotika wurden nur drei verschiedene Konformationen bezüglich der räumlichen Lage der Peptidbindung und des Ringsystems gefunden. Aus diesen drei räumlichen Strukturen wurden Modelle entwickelt und analysiert: Diejenige Konformation, die zum Modell mit der höchsten Voraussagekraft führte, wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Sie ist gekennzeichnet durch folgende Torsionswinkel: $\psi_1 = 70^\circ$; $\omega_1 = 180^\circ$ und $\phi_2 = 30^\circ$. In Abbildung 12b ist die strukturelle Überlagerung von Cefadroxil mit Val-Pro-Pro dargestellt.

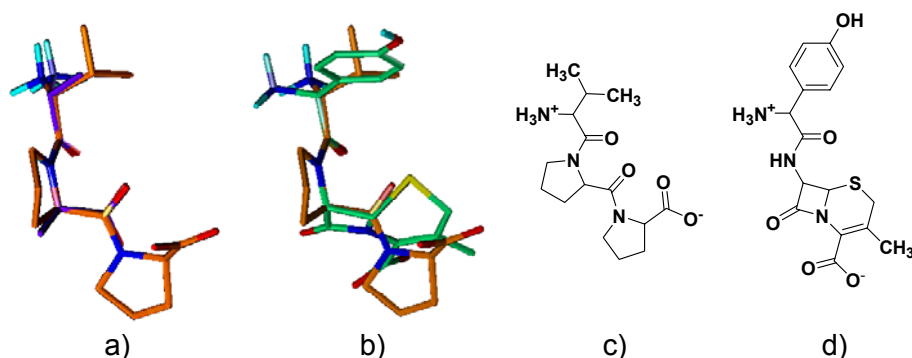


Abbildung 12: Strukturelle Überlagerung von Val-Pro-Pro (orange) mit a) Ala-Ala (blau) und b) Cefadroxil (grün) entlang des Peptidrückgrates, nach Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005). Die Sauerstoffatome sind jeweils rot, Stickstoffatome blau, Schwefelatome gelb und Wasserstoffatome hellblau dargestellt. Zu Gunsten besserer Übersichtlichkeit sind nur die Wasserstoffatome von funktionellen Gruppen dargestellt. Die Kohlenstoffatome sind jeweils in unterschiedlichen Farben abgebildet. Zum besseren Verständnis sind die 2D-Strukturen von c) Val-Pro-Pro und d) Cefadroxil abgebildet.

Obwohl Molecular Modelling Studien bei der Analyse der bioaktiven Konformation der Di- und Tripeptide weitestgehend ähnliche Ergebnisse zeigten, weichen die beschriebenen Erkennungsstrukturen für β -Lactam-Antibiotika im Bereich der Torsionswinkel ψ_1 und φ_2 voneinander ab. Ergebnisse von Konformationsanalysen zeigten, dass β -Lactam-Antibiotika im Energieminimum in zwei verschiedenen Konformationen A und B vorkommen können.^{131,137} Die angegebenen Torsionswinkel beider Studien sind jedoch unterschiedlich (ψ_1 (A)~ 65-90°, ψ_1 (B) ~ 270° und φ_2 ~ 100-150°¹³⁷ sowie ψ_1 ~210, φ_2 (A)~ 180°; φ_2 (B)~ 280°.¹³¹ Letztere Analyse erfolgte mit Parametern für des Vakuum, so dass intramolekulare Wechselwirkungen begünstigt werden. In einer weiteren Konformationsanalyse wurden Torsionswinkel für β -Lactam-Antibiotika von ψ_1 ~ 165° und φ_2 ~ 120° beschrieben.¹³² Andere Studien enthalten keine Daten über die verwendeten Torsionswinkel der hypothetischen Erkennungsstrukturen.^{129,140,142} Ein Vergleich der Strukturen ist daher schwierig. In den meisten Studien wurden globale Minimumskonformationen der β -Lactam-Antibiotika als aktive Konformationen beschrieben.^{129,131,132,139,141}

Niedermolekulare Peptidmimetika existieren in Lösung unter physiologischen Bedingungen in einer Vielzahl von Konformationen. Es wurde berichtet, dass die vom Rezeptor gebundene Konformation nicht unbedingt mit der berechneten Minimumskonformation eines freien Liganden übereinstimmt.^{17,28,30,31} Es gibt bisher keinen Beweis dafür, dass Rezeptoren die thermodynamisch stabilste Konformation als bioaktive Konformation erkennen und binden.³¹ Welche Konformation der β -Lactam-Antibiotika tatsächlich vom Peptidtransporter gebunden wird kann erst festgestellt werden, wenn eine Kristallstruktur mit einem gebundenem Liganden vorliegt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete hypothetische bioaktive Konformation der β -Lactam-Antibiotika unterscheidet sich hauptsächlich von den anderen beschriebenen dadurch, dass die Aminogruppe am D-konfigurierten C_{α} -Atom in eine andere Richtung zeigt, als die Aminogruppe an L-konfigurierten C_{α} -Atomen von Di- und Tripeptiden. Die Seitenketten befinden sich im gleichen Bereich wie die der Di- und Tripeptide.

4.2.1.3 Ableitung eines Pharmakophormodells

Nachdem alle Moleküle des Trainingsdatensatzes überlagert worden sind, wurde eine CoMSIA-Analyse durchgeführt. Die statistischen Parameter ($q^2 = 0,844$; $r^2 = 0,928$) ließen auf statistische Signifikanz des Modells schließen. Der Vergleich, der vorausgesagten und tatsächlichen $\lg 1/K_i$ -Werte bei der PLS-Analyse zeigte, dass alle vorausgesagten Werte weniger als eine logarithmische Einheit vom gemessenen Wert abwichen (Daten nicht dargestellt). Die Voraussage von K_i -Werten unbekannter Verbindungen im Testdatensatz führte ebenfalls zu zufrieden stellenden Ergebnissen. Bei der Analyse der von CoMSIA errechneten Eigenschaftsfelder wurde die außergewöhnlich hohe Affinität von Ceftributen ($K_i = 0,34$ mM) der Butenylcarboxylsäure-Gruppe zugeschrieben, die von einem sterisch günstigen Feld umschlossen wurde. Da keine weiteren funktionellen Gruppen anderer Moleküle in dieser Region enthalten waren, verschwand das molekulare Feld, als Ceftributen aus dem Modell entfernt wurde. Außerdem waren die Konturdiagramme widersprüchlich zu vorhergehenden Ergebnissen.¹⁴

Aufgrund dieser Erkenntnisse schlussfolgerten wir, dass Ceftributen und solche Cephalosporine, die einen Aminothiazolring enthalten, anders mit dem Templat überlagert werden müssen. Wir vermuteten, dass möglicherweise die Aminogruppe am Thiazolring von Ceftributen mit dem Protein interagiert. Diese Aminogruppe wurde daher mit der N-terminalen Aminogruppe von Val-Pro-Pro überlagert. Die erste Amidbindung von Ceftributen wurde entlang der zweiten Peptidbindung des Tripeptids überlagert (Abbildung 13a). In dieser Anordnung ist die Carbonylgruppe des β -Lactam-Ringes in der gleichen Region, wie die Carboxylgruppe der Tripeptide. Im Folgenden werden Cephalosporine, die einen Aminothiazolring enthalten als Typ I β -Lactam-Antibiotika zusammengefasst.

Alle anderen Cephalosporine und Penicilline, die keinen Aminothiazolring an der ersten Amidbindung enthalten, werden nachfolgend als Typ II β -Lactam-Antibiotika bezeichnet. Die Überlagerungen erfolgten wie bereits in Abbildung 12b dargestellt.

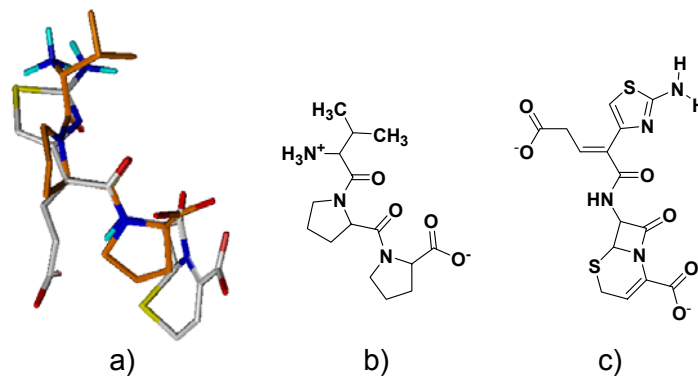


Abbildung 13: Unterschiedliche strukturelle Überlagerung der Typ I β-Lactam-Antibiotika. a) Überlagerung von Val-Pro-Pro (orange), $K_i = 0,06$ mM, mit Ceftibuten (grau), $K_i = 0,34$ mM. Die 2D-Strukturen beider Moleküle sind jeweils in b) und c) dargestellt; nach Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

Aus dem so erstellten Trainingsdatensatz konnte ein Pharmakophormodell abgeleitet werden (Abbildung 14). Damit können die Möglichkeiten der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Rezeptor beschrieben werden. Jedoch sind auch andere Wechselwirkungen (z. B. Salzbrücken) zwischen Protein und Ligand wahrscheinlich. Das Pharmakophor besteht aus einer Donorgruppe (D) und drei Akzeptorfunktionen (A_1 , A_2 , A_3). D, A_1 und A_2 stimmen mit früheren Ergebnissen überein.¹⁴

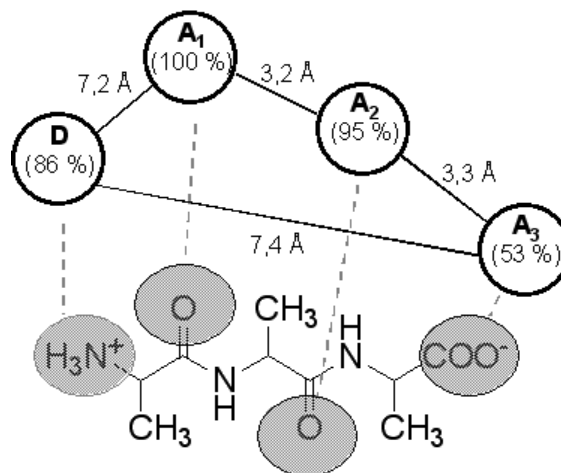


Abbildung 14: Aus dem Trainingsdatensatz abgeleitetes Pharmakophormodell für PEPT1-Liganden. Die Prozentwerte geben an, wie viele Moleküle im Datensatz diese Funktion enthalten. D: Wasserstoffbrücken-Donor, A_1 , A_2 und A_3 sind Wasserstoffbrücken-Akzeptoren eines PEPT1-Substrates. Die Abstände zwischen den pharmakophoren Gruppen sind als Mittelwerte dargestellt. Zur besseren Anschaulichkeit wurde das Tripeptid Ala-Ala-Ala zusätzlich dargestellt; modifiziert aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

Folgende funktionelle Gruppen sind am Pharmakophor beteiligt:

- Die Donorgruppe D wird meist durch eine N-terminale Aminogruppe gebildet und ist in 86 % der Moleküle des Trainingsdatensatzes enthalten.

- Jedes Molekül im Trainingsdatensatz enthält die Akzeptorgruppe A_1 . Sie kann durch die Carbonylgruppen der ersten Peptidbindung von Di- und Tripeptiden, die Carbonylgruppen der ersten Amidbindung der Typ II β -Lactam-Antibiotika sowie durch den Thiazolstickstoff der Typ I β -Lactam-Antibiotika dargestellt sein. Letzterer ist jedoch ein sehr schwacher Akzeptor.
- Die Akzeptorgruppe A_2 wird durch die Carboxylgruppen der Dipeptide, die Carbonylgruppen der zweiten Peptidbindung der Tripeptide sowie der Carbonylgruppen der ersten Amidbindung der Typ I β -Lactam-Antibiotika gebildet.
- Nur 53 % der Moleküle des Trainingsdatensatzes weisen die Akzeptorgruppe A_3 auf. Sie wird durch die Carboxylgruppen der Tripeptide und die der Typ I β -Lactam-Antibiotika ausgebildet.

Pharmakophormodelle, die in der Literatur beschrieben sind, weisen den hier dargestellten funktionellen Gruppen vergleichbare pharmakophore Eigenschaften zu.^{129,132,140}

4.2.1.4 CoMSIA-Ergebnisse

Das strukturelle Alignment wurde anschließend mit CoMSIA untersucht. Die Linearisierung der K_r -Werte erfolgte durch die Umrechnung in $\lg 1/K_r$ -Werte. Die LOO-Kreuzvalidierung ergab eine optimale Komponentenzahl von 8. Kleinere Komponentenzahlen vermindern das so genannte Rauschen, d.h. Bildung von Variablen (Feldern), die keine verwendbaren Informationen zur Voraussage von Bindungsaffinitäten liefern. Modelle, die geringere Komponentenzahlen aufweisen, sind robuster und die resultierenden molekularen Felder eindeutiger interpretierbar.²⁸ In Abbildung 15 sind die kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten (q^2) dargestellt, die aus Modellen mit unterschiedlichen Komponentenzahlen resultieren. Die q^2 -Werte, die mit 5 bis 8 Komponenten berechnet worden sind, unterscheiden sich kaum. Da auch die s_{PRESS} -Werte weniger als 5 % voneinander abweichen, wurde die Gesamtkorrelation des Modell mit 5 Komponenten berechnet. Es zeigte sich auch, dass die Voraussagen der Bindungsaffinitäten des Testdatensatzes mit dem Modell, das auf einer Komponentenzahl von 5 basierte, weniger fehlerbehaftet waren, als die Voraussagen des Modells, das mit 8 Komponenten berechnet wurde (Daten nicht dargestellt).

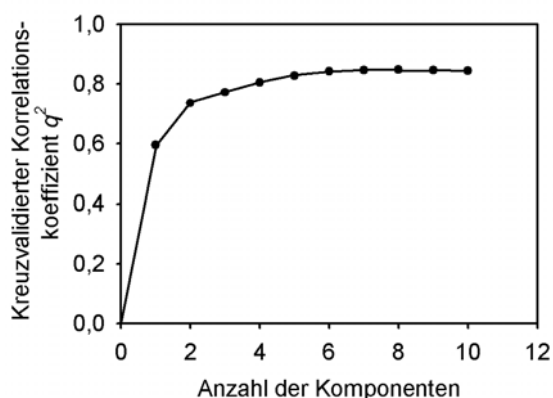


Abbildung 15: Darstellung der kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten (q^2) bei verschiedenen Komponentenzahlen. Die Berechnung erfolgte bei einem Gitterabstand von 1 Å und einem Spaltenfilter von 1,0; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

CoMSIA lieferte ein Modell mit statistischer Signifikanz und hoher Vorhersagekraft ($q^2 = 0,828$, $r^2 = 0,937$). Die erhaltenen statistischen Parameter, die bei der PLS-Analyse mit 5 Komponenten erhalten wurden, sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der CoMSIA-Analyse. Der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient q^2 und die dazugehörige Standardabweichung der Vorhersagefehler s_{PRESS} wurden mit der LOO-Methode ermittelt. Die Berechnung der Gesamtkorrelation r^2 erfolgte mit 5 Komponenten bei einem Gitterabstand von 1 Å und einem Spaltenfilter von 1,0. S: Standardabweichung der Gesamtkorrelation; F: Fischer-Test; modifiziert aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

q^2	s_{PRESS}	r^2	S	F
0,828	0,420	0,937	0,254	274

Die Korrelationen der vorausgesagten und gemessenen Werte der Moleküle des Trainingsdatensatzes sind in Abbildung 16a dargestellt. Die Moleküle des Testdatensatzes wurden in gleicher Weise im strukturellen Alignment angeordnet, wie strukturell ähnliche Moleküle des Trainingsdatensatzes. Die Bindungsaffinitäten für die Moleküle des Testdatensatzes wurden zuerst vom Modell vorausgesagt und anschließend mit den gemessenen Werten verglichen. Alle vorausgesagten $\lg 1/K_i$ -Werte weichen weniger als eine logarithmische Einheit von den gemessenen Werten ab. Dies wird als ein zufrieden stellendes Ergebnis gewertet (Abbildung 16b).^{29,180} Der ermittelte r^2_{pred} -Wert von 0,55 verdeutlicht, dass die $\lg 1/K_i$ -Werte unbekannter Verbindungen mit relativ hoher Genauigkeit durch dieses Modell berechnet werden können.

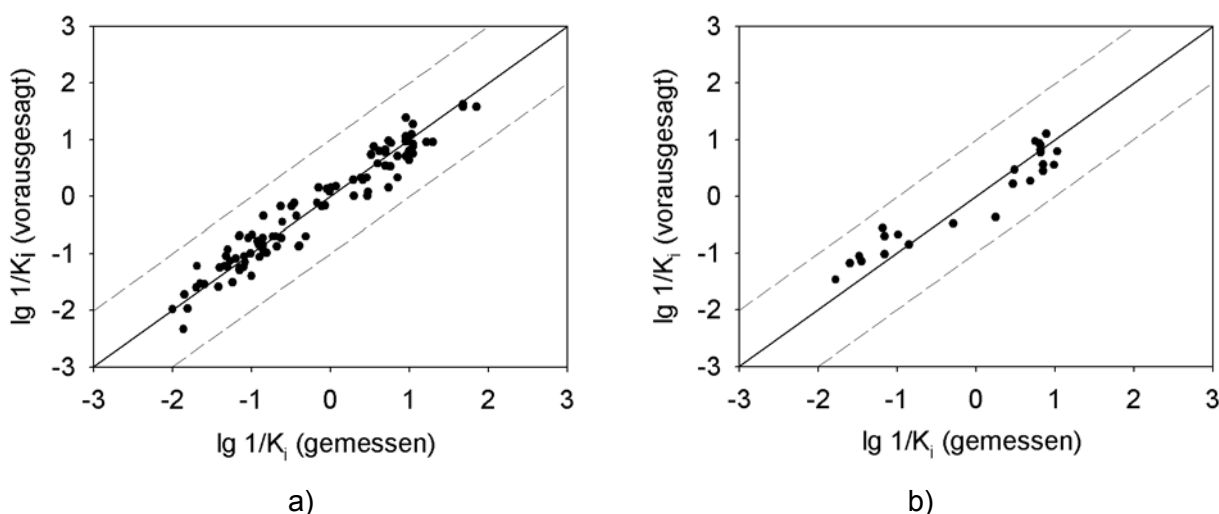


Abbildung 16: Auftragung der vorausgesagten und gemessenen Bindungsaffinitäten ($\lg 1/K_i$) a) für den Trainingsdatensatz; b) für den Testdatensatz. Die vorausgesagten Werte in a) wurden bei der PLS-Analyse durch die LOO-Methode berechnet (5 Komponenten, Spaltenfilter 1,0). Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Toleranzbereich von einer logarithmischen Einheit; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

Auswertung der CoMSIA-Konturdiagramme

CoMSIA generiert sterische, elektrostatische und hydrophobe Felder, sowie Wasserstoffbrücken-Donor und -Akzeptorfelder. Die prozentualen Anteile der Eigenschaftsfelder des erstellten Modells sind in Tabelle 12 dargestellt. Die molekularen Felder umschließen spezifische Regionen von Liganden, deren jeweilige physikochemische Eigenschaften sich als günstig oder ungünstig für eine hohe Affinität zum Protein auszeichnen. Zählt man Wasserstoffbrücken-Donor sowie -Akzeptorfunktionen hinzu, ist der größte Anteil am Gesamtmodell den elektrostatischen Eigenschaften zuzuordnen. Die sterischen und hydrophoben Eigenschaften haben jeweils einen geringeren Anteil am Modell. Die Informationen über Struktur-Affinitäts-Wechselwirkungen im Bereich der Dipeptide stimmen mit denen des vorangegangenen PEPT1-Modells der Dipeptide und Dipeptid-Derivate weitestgehend überein.¹⁴ In Tabelle 12 ist außerdem dargestellt, mit welchen Parametern die Größe der Konturbereiche dargestellt wurde. Die molekularen Felder wurden so generiert, dass sie bestmöglich durch die Eigenschaften der PEPT1-Liganden interpretierbar waren.

Tabelle 12: Anteile der verschiedenen Feldeigenschaften am CoMSIA-Modell für PEPT1-Liganden. Die graphische Darstellung der Felder erfolgte mit den angegebenen Parametern für jeweils günstige und ungünstige Bereiche für hohe Affinität.

Eigenschaftsfelder	%	Parameter der Konturbereiche	
		Günstig für hohe Affinität	Ungünstig für hohe Affinität
Sterische	11	0,0008	-0,0005
Elektrostatische	21	0,0037	-0,0030
Hydrophobe	25	0,0040	-0,0027
Wasserstoffbrücken-Donor	29	0,0068	-0,0024
Wasserstoffbrücken-Akzeptor	14	0,00235	-0,0012

In den Abbildungen 17 bis 24 sind die jeweiligen Konturdiagramme verschiedener molekularer Felder dargestellt. Das hier beschriebene 3D-QSAR Modell für PEPT1-Liganden ist zum einen geeignet, um Bindungsaffinitäten von Di- und Tripeptiden sowie β -Lactam-Antibiotika vorauszusagen. Zum anderen ist es ein hilfreiches Mittel, um Bindungsaffinitäten vieler Liganden an PEPT1 zu erklären. Da die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Dipeptide bereits hinreichend in der Literatur erklärt worden sind, werden diese im Folgenden nicht betrachtet.¹⁴ Zuerst werden unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Tripeptide anhand relevanter Eigenschaftsfelder analysiert. Anschließend erfolgt die systematische Untersuchung der molekularen Felder zur Erklärung unterschiedlicher Bindungsaffinitäten der Typ I und Typ II β -Lactam-Antibiotika.

Tripeptide

Das Ausmaß der Bindetasche von PEPT1 lässt sich durch die Betrachtung der sterischen Felder abschätzen (Abbildung 17). Die Seitenketten der meisten natürlichen Substrate (Di- und Tripeptide) befinden sich in den sterisch günstigen Feldern **S1-S4**, die in Abbildung 17 grün dargestellt sind. Die Felder **S1-S3** stellen drei Kavitäten innerhalb der Bindetasche von PEPT1 dar, die von Seitenketten hochaffiner Substrate von PEPT1 gebildet werden. Auch in anderen Studien wurden bereits drei Kavitäten vermutet, in denen sich die Seitenketten der PEPT1-Substrate befinden.^{11,90,132} Gelbe Felder (**S5** und **S6**) kennzeichnen solche Bereiche, in denen sich Teile von nichtaffinen oder wenig affinen PEPT1-Substraten innerhalb des strukturellen Alignments befinden. Pro-Xaa Dipeptide sowie Pro-Xaa-Xaa Tripeptide weisen niedrige Affinitäten an PEPT1 auf. Das lässt sich dadurch erklären, dass Teile des Pyrrolidin-Ringes in einem sterisch ungünstigen gelben Feld **S5** liegen (Abbildung 17b). Bei der Entwicklung neuer

Substrate für PEPT1 sollte darauf geachtet werden, dass keine Teile dieser Moleküle in gelben Bereichen liegen.

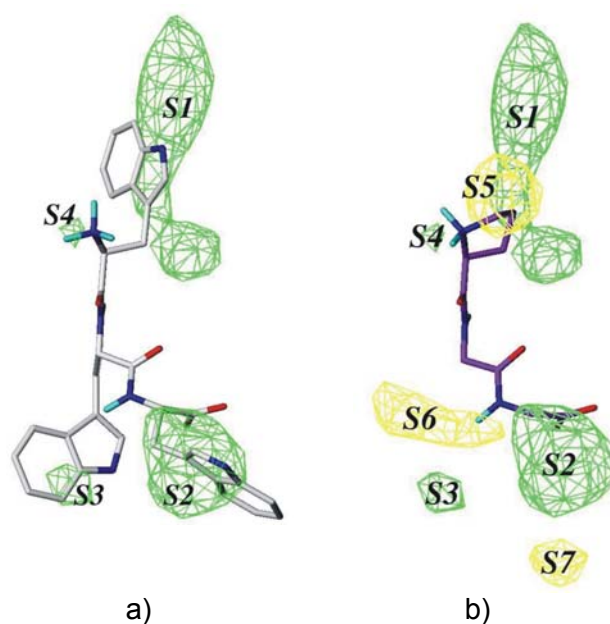


Abbildung 17: CoMSIA Konturdiagramme für sterische Eigenschaften. Molekülteile hochaffiner Substrate innerhalb des strukturellen Alignments befinden sich in den grün dargestellten Bereichen **S1-S4**. Gelbe Felder (**S5-S7**) werden von Teilen der Moleküle besetzt, die niedrige oder keine Bindungsaffinität an PEPT1 zeigen, **a)** Trp-Trp-Trp, $K_i = 0,17$ mM **b)** Pro-Gly-Gly, $K_i = 16$ mM. In **a)** sind die gelben Felder zugunsten besserer Übersichtlichkeit nicht dargestellt. In den Abbildungen sind nur Wasserstoffatome von funktionellen Gruppen der Moleküle abgebildet; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

Die im Trainingsdatensatz enthaltenen Tripeptide unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Bindungsaffinitäten aufgrund ihrer unterschiedlichen Stereochemie. Tripeptide in LLL-Konfiguration zeigen höhere Bindungsaffinitäten an PEPT1 als solche in DLL-Konfiguration (z. B. Leu-Gly-Gly, $K_i = 0,39$ mM im Vergleich zu D-Leu-Gly-Gly, $K_i = 25$ mM). Die Stereoselektivität des H^+ /Peptidsymporters bezüglich des N-terminalen C_α -Atoms kann folgendermaßen mit den molekularen Feldern erklärt werden: Die Aminogruppe am L-konfigurierten C_α -Atom befindet sich in einem sterisch günstigen Feld **S4**. Dies ist in Abbildung 17a am Beispiel von Trp-Trp-Trp erkennbar. Die Aminogruppe der Tripeptide in DLL- und DDD-Konfiguration liegt nicht in diesem Feld. Die Wichtigkeit der Ausrichtung der N-terminalen Aminogruppe wird durch die elektrostatischen, hydrophoben und vor allem durch die Wasserstoffbrücken-Donor Felder veranschaulicht (Abbildung 18-19). Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse gelten in gleichem Maße auch für LL und DL-Dipeptide und bestätigen die Ergebnisse der vorangegangenen 3D-QSAR Studie.¹⁴

Besonders verschieden sind die Möglichkeiten der LLL- und DLL-Stereoisomere, Wasserstoffbrückenbindungen am N-Terminus mit dem Protein (PEPT1) auszubilden (Abbildung 18a und b). Tripeptide, die am N-Terminus in L-Konfiguration vorliegen, können daher theoretisch

mit den drei Wasserstoffatomen der Aminogruppe Wasserstoffbrücken mit PEPT1 ausbilden (Abbildung 18a). Die Wasserstoffatome der Aminogruppe der Liganden sind auf die hellblauen Bereiche **D1-D3** ausgerichtet, die hypothetische Wasserstoffbrücken-Akzeptorgruppen des Proteins PEPT1 markieren. Die Überlagerung der Aminogruppen im strukturellen Alignment erfolgte so, dass die Wasserstoffatome ebenfalls überlagert sind. Da die Aminogruppe frei drehbar ist, sind die resultierenden Felder **D1-D3** jedoch modellhaft zu betrachten.

Durch die unterschiedliche Positionierung der freien Aminogruppe der DLL-Tripeptide können die Aminogruppen (Wasserstoffbrücken-Donoren) mit den seitens des Proteins vorhandenen Wasserstoffbrücken-Akzeptorgruppen im Vergleich zu den LLL-Tripeptiden nur eingeschränkt wechselwirken (Abbildung 18b). Diese Wasserstoffatome sind auf violette Bereiche (**D4-D7**) ausgerichtet. Sie zeigen an, dass dadurch die Bindungsaffinität an PEPT1 vermindert wird.

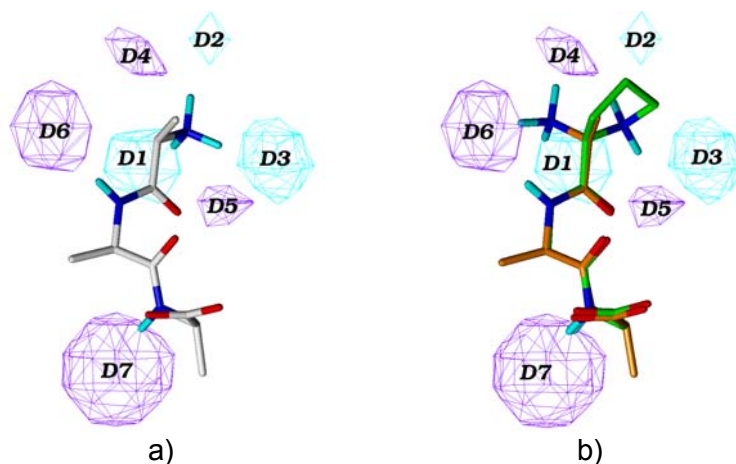


Abbildung 18: CoMSIA Konturdiagramme für Wasserstoffbrücken-Donor Eigenschaften. Wasserstoffbrücken-Donorgruppen hochaffiner Substrate bilden mit -Akzeptorgruppen seitens des Rezeptors Wasserstoffbrückenbindungen aus. Bereiche, in denen sich solche Akzeptorgruppen befinden könnten, sind schematisch durch die hellblauen Felder **D1-D3** dargestellt. Sind Wasserstoffbrücken-Donorgruppen auf violette Bereiche (**D4-D7**) ausgerichtet, so führt dies zu Affinitätsverlusten. In **a**) ist Ala-Ala-Ala und in **b**) D-Ala-Ala-Ala (orange) und Pro-Gly-Gly (grün) dargestellt.

Auch Prolinreste in N-terminaler Position weisen eingeschränkte Wasserstoffbrücken-Donor Eigenschaften im Vergleich zu hochaffinen Substraten auf. Die verminderte Bindungsaffinität solcher Verbindungen an PEPT1 wird in Abbildung 18b durch die Ausrichtung der beiden Wasserstoffe der N-terminalen Aminogruppe von Pro-Gly-Gly auf die beiden ungünstigen Felder **D4** und **D5** erklärt.

Die Analyse der elektrostatischen und hydrophoben Eigenschaftsfelder zeigt, dass die protonierte α -Aminogruppe natürlicher Tripeptide erwartungsgemäß in einem Bereich liegt, der für positive Ladungen (**E1**, blau) und hydrophile Eigenschaften (**H1**, hellblau) von Molekülen

günstig ist (Abbildung 19a und b). Auch in diesem Fall befinden sich die Aminogruppen der DLL-Tripeptide außerhalb dieser Regionen.

Die hydrophoben Eigenschaftsfelder verdeutlichen außerdem, dass PEPT1 im Bereich der zweiten Seitenkette R_2 hydrophobe Eigenschaften bevorzugt (**H3**, Abbildung 19b). In Abbildung 19b sind die Tripeptide Gly-His-Lys ($K_i = 4,1$ mM) und Glu-Phe-Tyr ($K_i = 0,2$ mM) dargestellt. Die niedrige Bindungsaffinität von Gly-His-Lys ist u.a. auf die hydrophilen Eigenschaften des Histidinrestes, der im für hydrophile Eigenschaften ungünstigen Feld **H3** liegt, zurückzuführen.

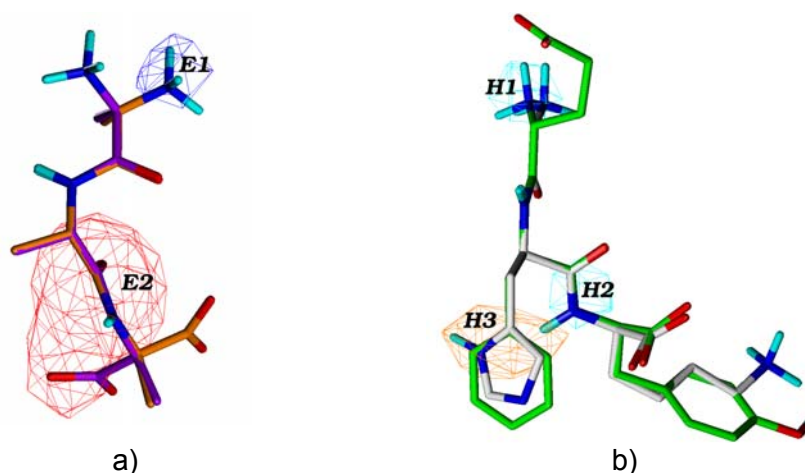


Abbildung 19: CoMSIA Konturdiagramme für a) elektrostatische und b) hydrophobe Eigenschaften. a) Das Feld **E1** zeigt an, dass hochaffine Substrate in diesem Bereich positive Ladungen aufweisen. Das elektrostatische Feld **E2** begrenzt einen Bereich innerhalb des strukturellen Alignments, in dem hohe Elektronendichten des Liganden für die Erkennung von PEPT1 günstig sind. In der Abbildung sind Ala-Ala-D-Ala (orange) und D-Ala-Ala-Ala (violett) dargestellt. (b), Hochaffine Substrate weisen hydrophobe R_2 -Seitenketten auf, was durch das orangefarbene Feld **H3** gekennzeichnet ist. Hydrophile Eigenschaften hochaffiner Substrate von PEPT1 befinden sich innerhalb der Felder **H1** und **H2**. Die Abbildung zeigt Glu-Phe-Tyr (grün) und Gly-His-Lys (grau).

Die geringere Bindungsaffinität von LLD- im Vergleich zu LLL-Tripeptiden kann zum einen durch die elektrostatischen Felder, zum anderen durch die Wasserstoffbrücken-Akzeptor Felder erklärt werden. Entsprechend den elektrostatischen Feldern liegt die negativ geladene Carboxylgruppe von LLD-Tripeptiden außerhalb des für solche Ladungen günstigen roten Bereiches **E2** (Abbildung 19a).

Die niedrigere Bindungsaffinität von LDL-Tripeptiden, verglichen mit LLL-Tripeptiden, kann durch die molekularen Felder erklärt werden. Durch die D-Konfiguration des mittleren Aminosäurerestes befindet sich der C-Terminus dieser Tripeptide an einer anderen Stelle im strukturellen Alignment, als die C-Termini hochaffiner Substrate. Somit können von der C-terminalen Carboxylgruppe keine Wasserstoffbrückenbindungen mit PEPT1 ausgebildet werden. Außer-

dem befindet sich die Carboxylgruppe der LDL-Tripeptide außerhalb des Bereiches, der für negative Ladungen bzw. hohe Elektronendichten günstig ist (nicht dargestellt).

Tripeptide in DDD-Konfiguration werden nicht von PEPT1 erkannt. Für die Erkennung notwendige Wasserstoffbrücken mit dem Proteins in den Bereichen **A1** und **A2** können im Vergleich zu den LLL-Tripeptiden nicht ausgebildet werden. Die molekularen Felder **A3-A5** wurden aufgrund von Tripeptiden mit D-konfigurierten mittleren oder C-terminalen Aminosäureresten gebildet. Diese Bereiche verdeutlichen, dass die Ausrichtung von Akzeptorgruppen in Richtung der Felder **A3**, **A4** oder **A5** eine Verringerung der Bindungsaffinität zur Folge hat (Abbildung 20).

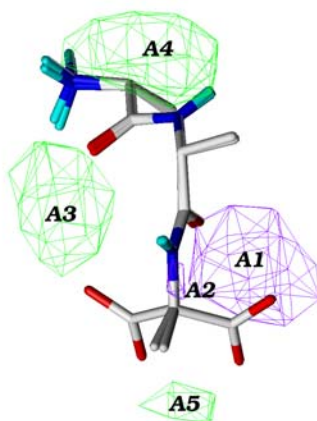
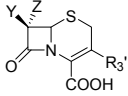
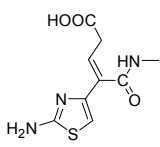
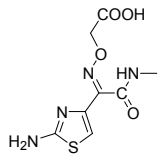
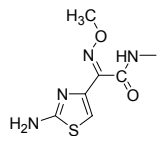
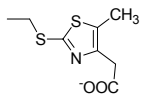
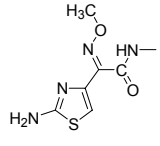
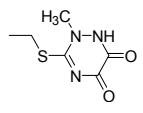
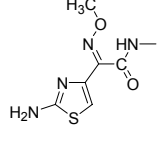
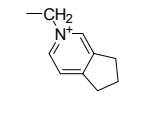
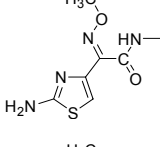
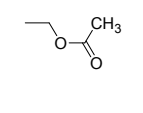
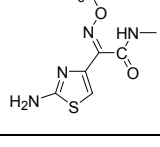
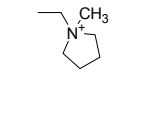


Abbildung 20: CoMSIA Konturdiagramme für Wasserstoffbrücken-Akzeptorfelder. Die beiden violetter Felder **A1** und **A2** kennzeichnen solche Bereiche in denen sich hypothetische Wasserstoffbrücken-Donoren des Proteins befinden, die mit Wasserstoffbrücken-Akzeptoren des Liganden wechselwirken. Sind Wasserstoffbrücken-Akzeptoren der Liganden auf grüne Felder (**A3-A5**) gerichtet, wird die Bindungsaffinität an PEPT1 vermindert. In der Abbildung sind Ala-Ala-Ala und Ala-Ala-D-Ala dargestellt.

Typ I β -Lactam-Antibiotika

Zu dieser Gruppe gehören neben Ceftibuten ($K_i = 0,34$ mM) u. a. auch Cefixim ($K_i = 12$ mM), Cefodizim ($K_i = 22$ mM), Ceftriaxon ($K_i = 28$ mM) und Cefpirom ($K_i \sim 45$ mM) (siehe Tabelle 13). Ceftibuten ist das Cephalosporin mit der höchsten Affinität an PEPT1. Die meisten Substanzen dieser Gruppe sind keine PEPT1-Substrate bzw. werden von PEPT1 nur mit geringer Affinität gebunden. Diese Unterschiede bezüglich der Erkennung von PEPT1 können mit Hilfe der molekularen Felder erklärt werden.

Tabelle 13: Strukturen und zugehörige Bindungsaffinitäten an PEPT1 Typ I β -Lactam-Antibiotika des Trainingsdatensatzes. $K_{i, \text{exp}}$: gemessene Bindungsaffinitäten; $K_{i, \text{pred}}$: vorausgesagte Bindungsaffinitäten bei der LOO-Kreuzvalidierung (Gitterabstand 1Å; Spaltenfilter 1,0); modifiziert aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

Cephalo- sporin				$K_{i, \text{exp}}$ (mM)	Ref.	$K_{i, \text{pred}}$ (mM)
	Y	Z	R ₃ '			
Ceftibuten		—H	—H	0,34	145	0,98
Cefixim		—H	—CH ₂	12	145	14
Cefodizim		—H		22	145	17
Ceftriaxon		—H		> 31,6 (~40) *	145	35
Cefpirom		—H		> 31,6 (~45) *	145	34
Cefotaxim		—H		> 31,6 (~50) *	145	40
Cefepim		—H		> 31,6 (~70) *	145	53

* Aufgrund geringer Bindungsaffinität liegen die K_i -Werte außerhalb des Messbereiches von maximal 31,6 mM und wurden aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeschätzt.

Mit Ausnahme von Ceftibuten weisen alle Vertreter dieser Gruppe einen Substituenten an der R₃'-Position auf. Abgesehen von dem R₃'-Substituenten von Cefixim handelt sich dabei um relativ voluminöse Reste (Tabelle 13). Anhand der sterischen Felder (Abbildung 21a) wird deutlich, dass große Seitenketten an der R₃'-Position der Cephalosporine in einem ungünstigen gelben Feld **S5** liegen. Die Länge bzw. das Volumen der Seitenkette in R₃'-Position

scheint daher einen großen Einfluss auf die Bindung an PEPT1 zu haben. Möglicherweise ist die Bindetasche von PEPT1 an dieser Stelle nicht groß genug für voluminöse Substituenten.

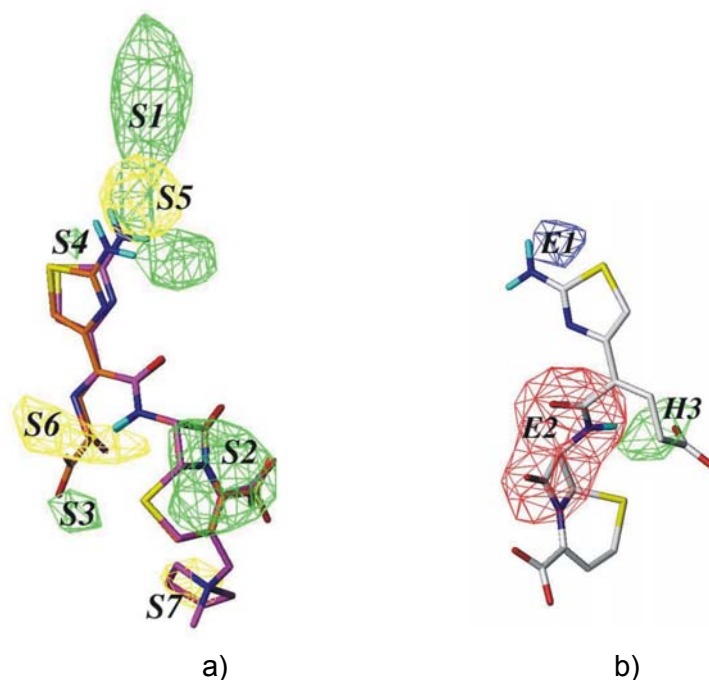


Abbildung 21: CoMSIA Konturdiagramme für a) sterische und b) elektrostatische sowie hydrophobe Eigenschaften. a) Molekülteile hochaffiner Substrate befinden sich in den grün dargestellten Bereichen **S1-S4**. Gelbe Felder (**S5-S7**) werden von Teilen der Moleküle besetzt, die niedrige oder keine Bindungsaffinität an PEPT1 zeigen. In **a)** sind Ceftibuten (orange, $K_i = 0,34$ mM) und Cefepim (lila, $K_i \sim 70$ mM) dargestellt, **b)** Das elektrostatische Feld **E2** begrenzt einen Bereich, in dem hochaffine Substrate hohe Elektrodichten enthalten. Das Feld **E1** hingegen zeigt an, dass in diesem Bereich positive Ladungen günstig für die Erkennung von PEPT1 sind. Das Feld **H3** kennzeichnet eine Region, in der hydrophobe Molekülteile hochaffiner PEPT1-Liganden innerhalb des strukturellen Alignments liegen. In der Abbildung ist Ceftibuten dargestellt; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

Ceftibuten und Cefixim sind die einzigen Typ I Cephalosporine, die von PEPT1 erkannt werden. Alle anderen Vertreter dieser Gruppe enthalten keine Carboxylgruppe in der Y-Seitenkette (Tabelle 13). Ceftibuten hingegen weist eine Butenylcarboxylgruppe an dieser Stelle auf. Der hydrophobe Teil ($-C=CH-CH_2-$) dieser Seitenkette befindet sich in einem für solche Eigenschaften günstigen Feld **H3** (Abbildung 21b). In diesem Bereich des strukturellen Alignments befinden sich die zweiten Seitenketten R_2 der hochaffinen natürlichen Substrate von PEPT1. Die hydrophile Carboxylgruppe dieser Butenylcarboxylgruppe liegt außerhalb dieses Areal. Da die Seitenketten der anderen Typ I Cephalosporine eine eher hydrophile Seitenkette an dieser Position enthalten, könnte die Butenylcarboxylgruppe von Ceftibuten in geringen Maße zur hohen Affinität dieser Verbindung beitragen.

Die β -Lactam-Ringe sowie die Amidbindungen der Typ I β -Lactam-Antibiotika befinden sich innerhalb des rot umrandeten Bereiches **E2**. Solche elektronenreichen Molekülteile begünstigen in dieser Region die Erkennung durch PEPT1 (Abbildung 21b).

In Abbildung 22a sind Wasserstoffbrücken-Donor Felder dargestellt. Die Aminogruppe am Thiazolring von Cefitibuten ist auf ein hellblaues Donorfeld D3 ausgerichtet. In diesen Bereichen befinden sich hypothetische Wasserstoffbrücken-Akzeptoren des Proteins, die mit dem Liganden durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken wechselwirken. Cefitibuten kann entsprechend dem Modell als einziges Typ I β -Lactam-Antibiotikum mit PEPT1 an dieser Stelle Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, da das sp^2 -C-Atom in der Seitenkette eine etwas andere Ausrichtung des Aminothiazolringes im Vergleich zu den weniger affinen Cephalosporinen zur Folge hat.

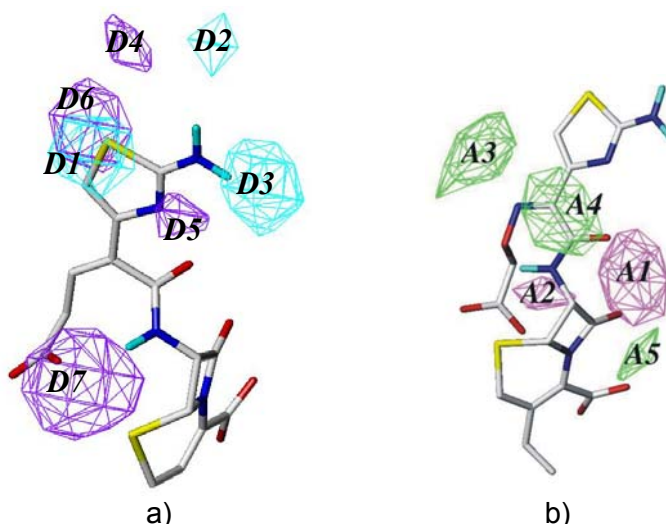


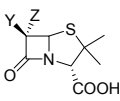
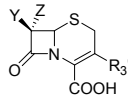
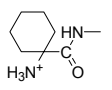
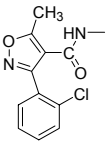
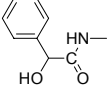
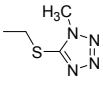
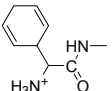
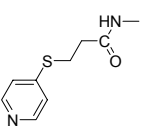
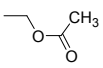
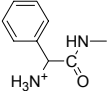
Abbildung 22: CoMSIA Konturdiagramme für a) Wasserstoffbrücken-Donorfelder und b) Wasserstoffbrücken-Akzeptorfelder. a) Hellblaue Bereiche (**D1-D3**) kennzeichnen mögliche Positionen von Wasserstoffbrücken-Akzeptoren des den Liganden umgebenden Proteins. Die Ausrichtung von Wasserstoffbrücken-Donoren des Liganden auf diese hellblauen Bereiche begünstigt die Bindungsaffinität an PEPT1. Sind die Wasserstoffbrücken-Donoren auf lilafarbene Regionen (**D4-D8**) ausgerichtet, hat dies niedrige Affinität an PEPT1 zur Folge. Die Abbildung zeigt Cefitibuten. b) Die magentafarbenen Felder **A1** und **A2** kennzeichnen solche Bereiche, in denen sich hypothetische Wasserstoffbrücken-Donoren des Proteins befinden und mit -Akzeptoren des Liganden wechselwirken. Sind Wasserstoffbrücken-Akzeptoren der Liganden auf grüne Felder (**A3-A5**) gerichtet, wird die Bindungsaffinität an PEPT1 vermindert. In **b)** ist Cefixim dargestellt; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

In Abbildung 22a sind die Wasserstoffbrücken-Akzeptorfelder dargestellt. Das Carbonylsauerstoffatom der β -Lactam-Antibiotika, sowie das Amidsauerstoffatom sind auf das violette Feld **A1** ausgerichtet. Dort befindet sich eine Wasserstoffbrücken-Donorgruppe seitens des Proteins PEPT1. Cephalosporine dieser Gruppe können an dieser Stelle mit PEPT1 wechselwirken und Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Diese Interaktionen können zur Erkennung der Typ I β -Lactam-Antibiotika an PEPT1 beitragen.

Typ II β -Lactam-Antibiotika

Unter den Typ II β -Lactam-Antibiotika weist Cyclocillin mit $K_i = 0,5$ mM die höchste Affinität an PEPT1 auf (Tabelle 14). Die Analyse der molekularen Felder kann auch in diesem Falle zur Erklärung dieser Affinität im Vergleich zu den anderen Penicillinen und Cephalosporinen herangezogen werden. Cyclocillin unterscheidet sich von den anderen β -Lactam-Antibiotika, da es als einzige Verbindung kein chirales C_α -Atom besitzt. Dadurch nimmt die Aminogruppe eine andere Position ein und ist deckungsgleich mit den N-terminalen Aminogruppen der natürlichen Substrate.

Tabelle 14: Strukturen und zugehörige Bindungsaffinitäten einiger Vertreter der Typ II β -Lactam-Antibiotika an PEPT1. $K_{i, \text{exp}}$: gemessene Bindungsaffinitäten; $K_{i, \text{pred}}$: vorausgesagte Bindungsaffinitäten bei der LOO-Kreuzvalidierung (Gitterabstand 1Å; Spaltenfilter 1,0); aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

β -Lactam-Antibiotikum	Grundgerüst	 P		 C		$K_{i, \text{exp}}$ (mM)	Ref.	$K_{i, \text{pred}}$ (mM)
		Y	Z	$R_{3'}$				
Cyclocillin	P		—H		0,50	145	0,98	
Cloxacillin	P		—H		2,5	144	7,4	
Cefamandol	C		—H		8,1	145	6,9	
Cephradin	C		—H	—CH ₃	9,8	145	4,7	
Cefapirin	C		—H		> 10 (~14)*	145	17	
Ampicillin	P		—H		15	145	5,0	

* Aufgrund geringer Löslichkeit liegen die K_i -Werte außerhalb des Messbereiches von maximal 31,6 mM und wurden aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeschätzt.

Dies wird besonders deutlich bei der Betrachtung der Wasserstoffbrücken-Donorfelder. In Abbildung 23a sind Cyclacillin ($K_i = 0,5 \text{ mM}$) und Ampicillin ($K_i = 15 \text{ mM}$) dargestellt. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit werden beide Penicilline mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von PEPT1 erkannt. Die Aminogruppe von Cyclacillin ist auf die drei blauen Felder **D1-D3** ausgerichtet und kann demnach Wasserstoffbrücken mit den hypothetischen Wasserstoffbrücken-Akzeptoren von PEPT1 ausbilden. Die Aminogruppe von Ampicillin kann nur mit einem dieser Bereiche (**D1**) Wasserstoffbrücken ausbilden. Dies scheint die Ursache für die geringe Bindungsaffinität von Ampicillin im Vergleich zu hochaffinen Substraten zu sein. Solche Typ II β -Lactam-Antibiotika, die keine Aminogruppe aufweisen, z. B. Benzylpenicillin ($K_i \sim 40 \text{ mM}$), dessen Struktur bis auf dieses Merkmal strukturgleich mit Ampicillin ($K_i = 15 \text{ mM}$) ist (Abbildung 23b), zeigen keine Affinität an PEPT1. Die Wichtigkeit dieser Aminogruppe für die Erkennung von Typ II β -Lactam-Antibiotika wird damit erkennbar. Die hydrophoben (bzw. hydrophilen) Felder verdeutlichen den Effekt des achiralen C_α -Atoms von Cyclacillin noch weiter (Abbildung 23d). Die Aminogruppe befindet sich innerhalb des Bereiches **H1**, der anzeigt, dass hydrophile Molekülteile in dieser Region hohe Affinitäten an PEPT1 begünstigen.

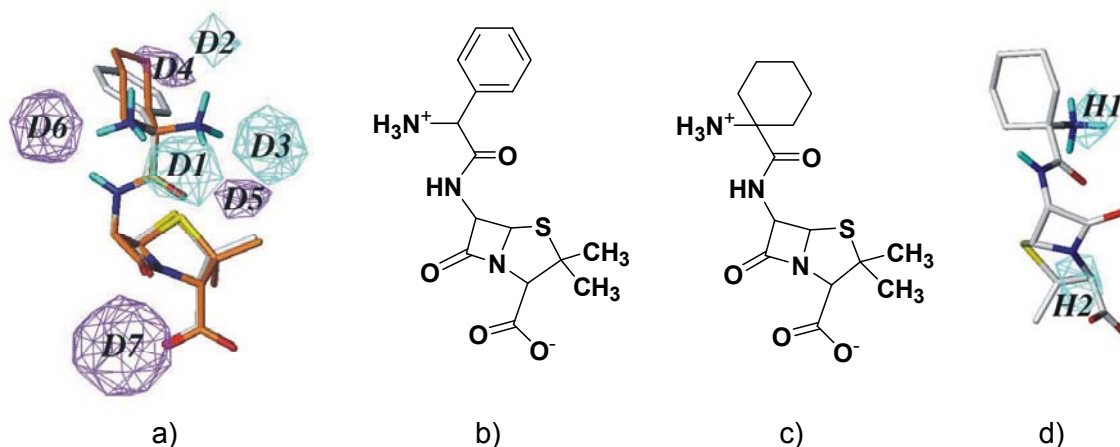


Abbildung 23: CoMSIA Konturdiagramme für a) Wasserstoffbrücken-Donorfelder und d) hydrophile Felder. a) Hellblaue Bereiche (**D1-D3**) kennzeichnen mögliche Positionen von Wasserstoffbrücken-Akzeptoren des den Liganden umgebenden Proteins. Die Ausrichtung von Wasserstoffbrücken-Donoren des Liganden auf diese hellblauen Bereiche begünstigt die Bindungsaffinität an PEPT1. Sind die Wasserstoffbrücken-Donoren auf lilafarbene Regionen (**D4-D8**) ausgerichtet, hat dies niedrige Affinität an PEPT1 zur Folge. Orange: Cyclacillin ($K_i = 0,5 \text{ mM}$); grau: Ampicillin ($K_i = 15 \text{ mM}$). b) 2D-Struktur von Ampicillin und c) Cyclacillin. d) Hydrophile Eigenschaften hochaffiner Substrate von PEPT1 befinden sich im strukturellen Alignment innerhalb der Felder **H1** und **H2**. Das hydrophobe Feld H3 ist hier nicht dargestellt. In d) ist Cyclacillin ($K_i = 0,5 \text{ mM}$) abgebildet; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

In Abbildung 24a sind sterische Konturdiagramme sowie die beiden überlagerten Penicilline Cyclacillin und Ampicillin dargestellt. Die aromatische Seitenkette am N-Terminus von Ampicillin liegt in einem sterisch günstigen Bereich **S1**, während der Cyclohexan-Ring von Cyclacillin dieses Feld nicht erreicht. Damit trägt die voluminöse Seitenkette von z. B. Ampicillin zur Erkennung von PEPT1 bei.

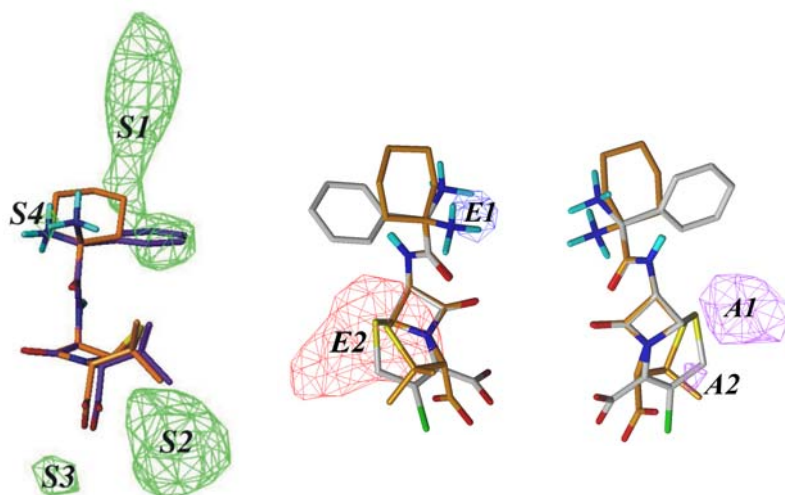


Abbildung 24: CoMSIA Konturdiagramm für a) sterische Eigenschaften, b) elektrostatische Eigenschaften und c) Wasserstoffbrücken-Akzeptoreigenschaften. a) Molekülteile hochaffiner Substrate innerhalb des strukturellen Alignments befinden sich in den grün dargestellten Bereichen **S1-S4**. Gelbe Felder, die von Teilen der Moleküle besetzt sind, die niedrige oder keine Bindungsaffinität an PEPT1 zeigen, sind nicht dargestellt. Orange: Cyclacillin ($K_i = 0,50$ mM), Violett: Ampicillin ($K_i = 15$ mM); **b)** Das elektrostatische Feld **E2** begrenzt einen Bereich, in dem hochaffine Substrate hohe Elektronendichten enthalten. Das Feld **E1** hingegen zeigt an, dass in diesem Bereich positive Ladungen günstig für die Erkennung von PEPT1 sind. Grau: Cefaclor, Orange: Cyclacillin; **c)** Die beiden violetten Felder **A1** und **A2** kennzeichnen solche Bereiche in denen sich hypothetische Wasserstoffbrücken-Donoren des Proteins befinden, die mit Wasserstoffbrücken-Akzeptoren des Liganden wechselwirken. Grau: Cefaclor, Orange: Cyclacillin; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2005).

Die Cephem- bzw. Penamgerüste der Typ II β -Lactam-Antibiotika liegen in einem für negative Ladungen bzw. hohe Elektronendichten günstigen Feld E2. Der für positive Ladungen günstige Bereich **E1** wird nur von der Aminogruppe von Cyclacillin ausgefüllt, wodurch dessen hohe Bindungsaffinität weiter erklärt werden kann (Abbildung 24b). Die Carboxylgruppen der Typ II β -Lactam-Antibiotika können keine für die Erkennung von PEPT1 günstige Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein ausbilden (Abbildung 24c). Das Schwefelatom des Penam- bzw. Cephemringsystems befindet sich jedoch in der gleichen Position, wie die Carboxylgruppe der Tripeptide und ist auf das Akzeptorfeld **A1** ausgerichtet (Abbildung 24c). Möglicherweise fungiert das Schwefelatom geringfügig als Wasserstoffbrücken-Akzeptor.

Zusammenfassung

Das in diesem Abschnitt beschriebene CoMSIA-Modell für PEPT1 zeichnet sich durch seine hohe statistische Signifikanz und seine Robustheit aus. Erstmals können unterschiedliche Bindungsaffinitäten von β -Lactam-Antibiotika und Tripeptiden anhand verschiedener Eigenschaftsfelder erklärt werden. Die Analyse der zusätzlichen Felder, die durch die Tripeptide und β -Lactam-Antibiotika entstanden sind, erweitern die Kenntnisse der Bindungsspezifität von PEPT1 in großem Maße. Die β -Lactam-Antibiotika wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Zu den

Typ I β -Lactam-Antibiotika werden jene Cephalosporine gezählt, die wie Ceftributen keine α -Aminogruppe sondern einen Aminothiazolring in der Y-Seitenkette enthalten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aminogruppen am Thiazolring mit PEPT1 so interagieren, wie die α -Aminogruppen hochaffiner Substrate. Alle anderen β -Lactam-Antibiotika wurden dem Typ II zugeordnet. Ableitend von den Ergebnissen der molekularen Feldanalyse weist ein hochaffines Substrat von PEPT1 folgende Eigenschaften auf:

- N-Terminus:
- Wasserstoffbrücken-Donor Funktion
 - hydrophile Eigenschaften
 - positive Ladung
 - L-Konfiguration
- Seitenketten:
- die Seitenketten müssen sich in bestimmten Regionen befinden
 - Die zweite Seitenkette R_2 der Di- und Tripeptide hat vorzugsweise hydrophobe Eigenschaften
- C-Terminus:
- elektronenreiche Gruppe(n)
 - negative Ladung
 - hydrophile Eigenschaften
 - Wasserstoffbrücken-Akzeptor Funktion
 - L-Konfiguration

Die Bindungsaffinität hängt in starkem Maße von der Position der funktionellen Gruppen am N- und C-Terminus ab. Moleküle die einige der oben genannten Eigenschaften nicht aufweisen, zeigen niedrige oder keine Affinität an PEPT1.

Aufgrund seiner hohen Voraussagekraft ist das Modell geeignet, bisher unbekannte Bindungsaffinitäten von strukturell ähnlichen Verbindungen vorauszusagen. Über den Transport durch PEPT1 sind jedoch keine Aussagen aus dem Modell ableitbar.

Obwohl ACE-Inhibitoren (z. B. Fosinopril, Enalapril) genau wie die β -Lactam-Antibiotika zu den Peptidmimetika gehören, können ihre K_i -Werte nicht von diesem Modell vorausgesagt werden. Der Grund dafür ist, dass deren Seitenketten im strukturellen Alignment in Bereichen liegen, die von keinem Molekül des Trainingsdatensatzes besetzt sind. Liegen jedoch in Zukunft geeignete K_i -Werte einiger ACE-Inhibitoren vor, könnten Vertreter in den Trainingsdatensatz aufgenommen werden. Dies würde die Voraussage weiterer strukturell ähnlicher Verbindungen ermöglichen.

4.2.2 3D-QSAR von PEPT2-Substraten (Anlage 7.4 Biegel et al., 2006b)

4.2.2.1 Datensatz und strukturelles Alignment

PEPT1 und PEPT2 weisen ein vergleichbares Substratspektrum auf. Aufgrund der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen kann vermutet werden, dass die Substratbindetaschen ebenfalls gewisse Ähnlichkeiten aufweisen. Für die Erklärung unterschiedlicher Bindungsaffinitäten der Liganden von PEPT2 wurde daher das strukturelle Alignment der PEPT1-Liganden (Kapitel 4.2.1) übernommen. Einige Moleküle wurden aus dem Datensatz entfernt und andere eingefügt, um ein ausgewogenes Verhältnis zwischen struktureller Diversität und den K_i -Werten der Moleküle an PEPT2 zu erhalten. Insbesondere wurden Tripeptide in den Datensatz aufgenommen, die geladene Seitenketten enthalten (Ala-Ala-Glu, Ala-Glu-Ala, Ala-Ala-Asp, Ala-Asp-Ala sowie Pro-Phe-Lys). Der Trainingsdatensatz bestand aus 83 Substanzen, darunter 32 Dipeptide und -Derivate, 27 Tripeptide und 24 β -Lactam-Antibiotika (siehe Tabelle 26 und 26 in Anlage 1.1). Die K_i -Werte der Verbindungen des Trainingsdatensatzes liegen in einem breiten Bereich von $K_i = 0,3 \mu\text{M}$ bis 42 mM. Der Testdatensatz bestand aus 24 Molekülen (darunter 15 Dipeptide, 4 Tripeptide und 6 β -Lactam-Antibiotika), deren K_i -Werte zwischen $3,0 \mu\text{M}$ und 11 mM liegen (siehe Tabelle 28 und 28 in Anlage 7.3.2). K_i -Werte der meisten β -Lactam-Antibiotika standen bereits zur Verfügung, die Bindungsaffinitäten diverser Di- und Tripeptide wurden zuvor an SKPT-Zellen gemessen (siehe Kapitel 4.1.1).¹⁴⁴

Ein Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war es, die Unterschiede der Substratbindung von PEPT1 und PEPT2 erklären zu können. Die Ergebnisse einer 3D-QSAR Analyse beziehen sich jeweils auf den zugrunde liegenden Datensatz. Der Trainingsdatensatz für PEPT2 weicht zwar kaum von dem im vorangegangenen Kapitel für PEPT1 ab, um jedoch eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse für PEPT1 und PEPT2 abzusichern, wurde der in diesem Kapitel beschriebene Trainingsdatensatz zusätzlich mit K_i -Werten für PEPT1 korreliert. Es wird im Folgenden durch die Anzahl der Moleküle im Trainingsdatensatz gekennzeichnet: PEPT1(83).

4.2.2.2 CoMSIA Ergebnisse

Der mit der LOO-Kreuzvalidierung erhaltene Korrelationskoeffizient $q^2 = 0,769$ (5 Komponenten) für **PEPT2** wurde auch durch die L5O-Kreuzvalidierungen bestätigt ($q^2 = 0,760$; 5 Komponenten). Bei der L5O-Kreuzvalidierung werden Gruppen von fünf Verbindungen aus dem Modell entfernt und deren Bindungsaffinitäten anhand der verbleibenden Informationen im Datensatz vorausgesagt. Bei jeder Analyse werden unterschiedliche Moleküle ausgelassen, daher sind die erhaltenen Ergebnisse nicht reproduzierbar und

weichen voneinander ab. Aus diesem Grund wurden 20 L5O-Berechnungen durchgeführt. Die Mittelwerte wurden zum Vergleich mit den Ergebnissen der LOO-Kreuzvalidierung verwendet (Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnisse der LOO- und L5O-Kreuzvalidierungen. Die Berechnungen erfolgten bei einem Gitterabstand von 1 Å und einem Spaltenfilter von 2,0. Die dargestellten Werte für die L5O-Kreuzvalidierung sind als Mittelwerte \pm S.D. von 20 Berechnungen dargestellt. q^2 : Korrelationskoeffizient der Kreuzvalidierung; S_{PRESS} : Standardabweichung der Vorhersagefehler; K: optimale Komponentenzahl.

Nr.:	PEPT2			PEPT1(83)		
	S_{press}	q^2	K	S_{press}	q^2	K
1	0,667	0,757	5	0,414	0,831	4
2	0,671	0,754	5	0,424	0,827	6
3	0,680	0,750	6	0,411	0,833	4
4	0,656	0,764	5	0,424	0,827	6
5	0,641	0,775	5	0,450	0,805	6
6	0,641	0,775	5	0,412	0,833	4
7	0,648	0,770	5	0,425	0,822	4
8	0,651	0,768	5	0,421	0,827	5
9	0,645	0,769	4	0,418	0,827	4
10	0,667	0,756	5	0,418	0,828	4
11	0,638	0,777	5	0,417	0,828	4
12	0,654	0,766	5	0,425	0,826	4
13	0,667	0,756	5	0,436	0,821	5
14	0,655	0,765	5	0,419	0,826	4
15	0,667	0,756	5	0,417	0,828	4
16	0,654	0,766	5	0,437	0,812	4
17	0,682	0,745	5	0,423	0,826	5
18	0,721	0,715	5	0,417	0,831	5
19	0,638	0,777	5	0,41	0,834	4
20	0,674	0,748	4	0,418	0,828	4
Mittelwert	0,661	0,760	5	0,421	0,826	4
S.D.	0,02	0,01	0,39	0,01	0,01	0,76
LOO	0,650	0,769	5	0,414	0,831	4

Die mit beiden Kreuzvalidierungen errechneten q^2 -Werte sind vergleichbar und verdeutlichen damit die Robustheit des erstellten Modells. Die Ähnlichkeit dieser Werte lässt den Schluss zu, dass keine zufälligen Wechselbeziehungen zwischen biologischen Aktivitäten und strukturellen Parametern bei der Korrelation der Daten entstanden sind.

Die Ergebnisse der LOO und L5O-Kreuzvalidierungen für das **PEPT1(83)**-Modell zeigen ebenfalls zufrieden stellende Übereinstimmungen (Tabelle 15). Die Werte zeigen an, dass das Modell auch bei der Entfernung einiger Verbindungen eine ähnliche Voraussagekraft für die Moleküle des Trainingsdatensatzes aufweist.

Modelle mit geringerer Komponentenzahl führen in der Regel zu weniger komplexen 3D-QSAR Modellen, deren molekulare Felder oftmals eindeutiger zu interpretieren sind.³⁷ Daher wurde überprüft, ob das Modell für PEPT2 auch mit 4 Komponenten berechnet werden kann, um vergleichbare molekulare Felder zum PEPT1(83)-Modell zu erhalten. In Abbildung 25 sind die q^2 -Werte angegeben, die bei verwendeten Komponentenzahlen von 1-10 berechnet worden sind.

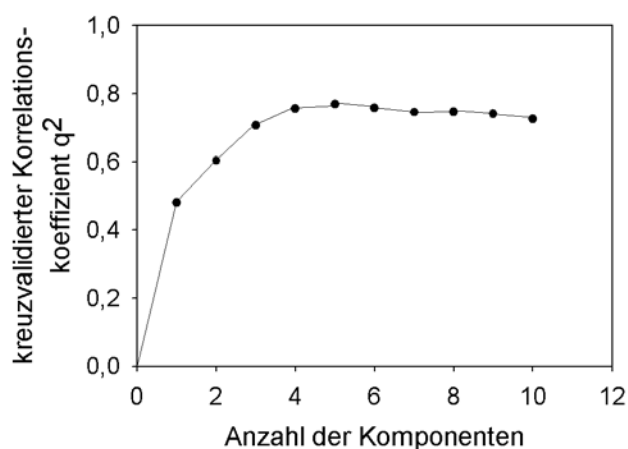


Abbildung 25: Auftragung der Komponentenzahl und der dazugehörigen q^2 -Werte der LOO-Kreuzvalidierung (PEPT2); aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

Bei 4 Komponenten sind die q^2 -Werte des PEPT2-Modells geringfügig niedriger und die s_{PRESS} -Werte geringfügig höher als bei 5 Komponenten, jedoch beträgt der Unterschied weniger als 5 % (Abbildung 25). Aus diesem Grund wurde das im Folgenden beschriebene PEPT2-Modell mit 4 Komponenten berechnet.

Die statistischen Parameter der beiden 3D-QSAR Modelle für PEPT1 und PEPT2 sind in Tabelle 16 dargestellt und deuten auf statistische Signifikanz hin. Die q^2 -Werte ($q^2_{PEPT1} = 0,831$; $q^2_{PEPT2} = 0,755$) sind bei PEPT2 niedriger als bei PEPT1(83). Die statistischen Parameter s_{PRESS} , S , F sowie der Korrelationskoeffizient r^2 sind höher bei dem

PEPT1(83)-Modell. Interessanterweise ist der r^2_{pred} -Wert, der ein Maß für die Vorhersagekraft des Modells ist, für das PEPT2-Modell geringfügig höher als für das PEPT1(83)-Modell. Es wurde schon oft berichtet, dass 3D-QSAR Modelle mit geringerer Korrelation genauere Voraussagen für biologische Aktivitäten unbekannter Verbindungen erzielen.^{20,28} Insgesamt sind die Ergebnisse für das PEPT1(83)-Modell ähnlich denen des bereits beschriebenen Modells in Kapitel 4.2.1.4.

Tabelle 16: Ergebnisse der PLS-Analyse für die 3D-QSAR Modelle für PEPT2 und PEPT1(83). Der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient q^2 und die dazugehörige Standardabweichung der Vorhersagefehler s_{PRESS} wurden mit der LOO-Methode ermittelt. Die Berechnung der Gesamtkorrelation r^2 erfolgte mit 4 Komponenten bei einem Gitterabstand von 1 Å und einem Spaltenfilter von 2,0. *S*: Standardabweichung der Gesamtkorrelation; *F*: Fischer-Test; modifiziert aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

	CoMSIA Ergebnisse	
	PEPT2	PEPT1(83)
q^2	0,755	0,831
s_{press}	0,665	0,414
Komponentenzahl	4	4
r^2	0,893	0,928
<i>S</i>	0,440	0,271
<i>F</i>	162	250
r^2_{pred}	0,794	0,736

Den größten Anteil am 3D-QSAR Modell für **PEPT2** bilden die Wasserstoffbrücken-Donor Eigenschaften (32 %) und die hydrophoben Eigenschaften mit 25 % (Tabelle 17). Elektrostatische Eigenschaften gehen zu 16 % in das Modell ein. Sterische und Wasserstoffbrücken-Akzeptoreigenschaften sind nur zu 13 bzw. 14 % beteiligt. Diese Ergebnisse sind weitestgehend vergleichbar mit denen für das PEPT1(83)-Modell (Tabelle 17).

Tabelle 17: Anteil der jeweiligen Feldeigenschaften an dem CoMSIA-Modell für PEPT2 und PEPT1(83); aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

Eigenschaftsfelder	Anteil (%)	
	PEPT2	PEPT1(83)
Sterische	13	11
Elektrostatische	16	17
Hydrophobe	25	24
Wasserstoffbrücken-Donor	32	35
Wasserstoffbrücken-Akzeptor	14	13

Die graphische Darstellung der Voraussagefehler der $\lg 1/K_i$ -Werte der Verbindungen bei der Kreuzvalidierung des Trainingsdatensatzes für **PEPT2** befindet sich in Abbildung 26a. Die vorausgesagten Werte weichen auch bei diesem Modell weniger als eine logarithmische Einheit von den gemessenen Werten ab. Die Bindungsaffinitäten der Moleküle des Testdatensatzes werden ebenfalls zufrieden stellend vorausgesagt (Abbildung 26b). Die Voraussagekraft des Modells wird außerdem durch den ermittelten r^2_{pred} -Wert von 0,794 hervorgehoben. In Abbildung 26a ist erkennbar, dass die Bindungsaffinitäten der PEPT2-Liganden im Trainingsdatensatz über einen breiten Bereich von $\lg 1/K_i = -1,8$ bis $\lg 1/K_i = 3,5$ verteilt sind. Die Darstellung der $\lg 1/K_i$ -Werte des Testdatensatzes (Abbildung 26b) verdeutlicht, dass die Bindungsaffinitäten der verwendeten Moleküle stark variieren. Dadurch ist sichergestellt, dass die Vorhersagekraft des 3D-QSAR Modells sowohl für hochaffine, mittelfine als auch für niedrig affine Substanzen getestet wird.

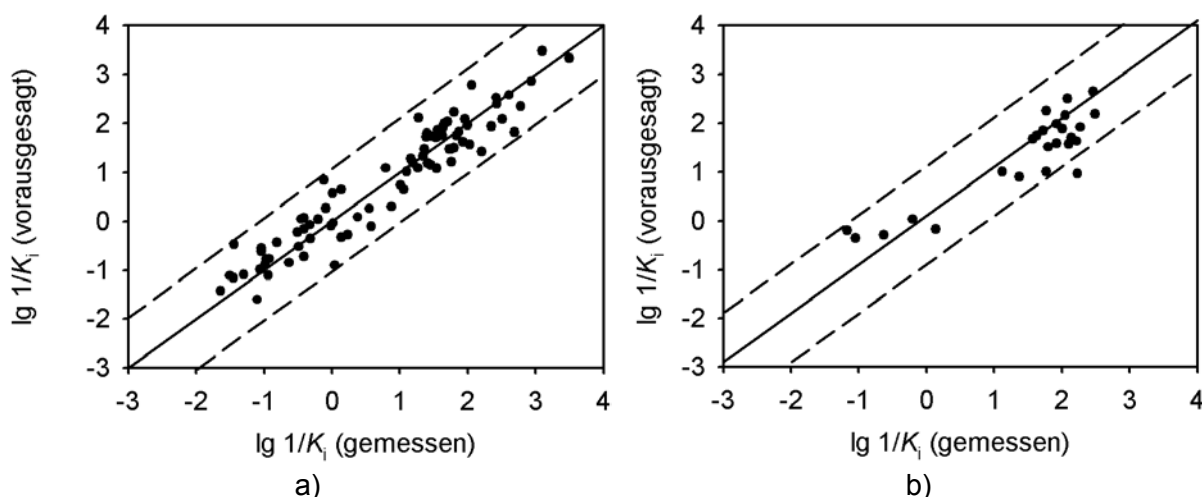


Abbildung 26: Auftragung der vorausgesagten und gemessenen Bindungsaffinitäten a) für den Trainingsdatensatz und b) für den Testdatensatz von PEPT2-Liganden. Die vorausgesagten Werte in a) wurden bei der PLS-Analyse durch die LOO-Methode berechnet (4 Komponenten, Spaltenfilter 2,0). Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Toleranzbereich von einer logarithmischen Einheit; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

Der vorausgesagte $\lg 1/K_i$ -Wert von D-Met-Met-Met (Testdatensatz) liegt außerhalb des Toleranzbereiches von einer logarithmischen Einheit (Abbildung 26b). Dieses Tripeptid ($K_i = 5,9 \mu\text{M}$) weist eine so hohe Affinität an PEPT2 auf, die mit einem LLL-Tripeptid vergleichbar ist und kann derzeit nicht erklärt werden. Das Modell schätzt die Affinität von D-Met-Met-Met auf $74 \mu\text{M}$ und bewertet sie damit weitaus höher, als die anderer D-Xaa-Xaa-Xaa Tripeptide des Trainingsdatensatzes, wie z. B. D-Leu-Gly-Gly ($K_{i,pred} = 1,9 \text{ mM}$), D-Tyr-Val-Gly ($K_{i,pred} = 0,22 \text{ mM}$) und D-Ala-Ala-Ala ($K_{i,pred} = 1,2 \text{ mM}$). Die dargestellten Werte in Tabelle 18 verdeutlichen außerdem, dass das Modell die Affinität von Met-Met-Met, verglichen mit dem experimentell bestimmten Wert, 7,5-fach geringer berechnet. Dennoch ist diese prognostizierte

Affinität an PEPT2 höher, als die anderer Tripeptide (z. B. Leu-Gly-Gly ($K_{i\text{ pred}} = 0,033\text{ mM}$) und Ala-Ala-Ala ($K_{i\text{ pred}} = 0,060\text{ mM}$)).

Tabelle 18: Experimentelle (exp) und bei der Kreuzvalidierung vorausgesagte (pred) K_i -Werte einiger Tripeptide des Trainingsdatensatzes von PEPT2.

Tripeptid	$K_{i\text{ (exp)}}$ (mM)	$K_{i\text{ (pred)}}$ (mM)	Tripeptid	$K_{i\text{ exp}}$ (mM)	$K_{i\text{ pred}}$ (mM)
Leu-Gly-Gly	0,018	0,033	D-Tyr-Val-Gly	0,72	0,22
Ala-Ala-Ala	0,017	0,060	D-Ala-Ala-Ala	1,0	1,2
Met-Met-Met	0,002	0,015	D-Leu-Gly-Gly	0,59	1,9

In Abbildung 27 ist die Korrelation der gemessenen und vorausgesagten $\lg 1/K_i$ -Werte des PEPT1(83)-Modells dargestellt. Auch hier stimmen die während der LOO-Kreuzvalidierung vorausgesagten Werte zufrieden stellend mit den tatsächlichen Bindungsaffinitäten der PEPT1-Liganden im Trainingsdatensatz überein (Abbildung 27a). Im Vergleich zu Abbildung 26 liegen die Bindungsaffinitäten von PEPT1-Liganden in einem kleineren Wertebereich ($\lg 1/K_i = -2,1$ bis $\lg 1/K_i = 1,8$) als bei PEPT2 (Abbildung 27a). Dadurch wird verdeutlicht, dass der Bereich der Bindungsaffinitäten der Moleküle im Trainingsdatensatz an PEPT2 weitaus größer ist als bei PEPT1. Die Voraussagen der $\lg 1/K_i$ -Werte für die Verbindungen des Testdatensatzes liegen ebenfalls innerhalb des Toleranzbereiches von einer logarithmischen Einheit (Abbildung 27b).

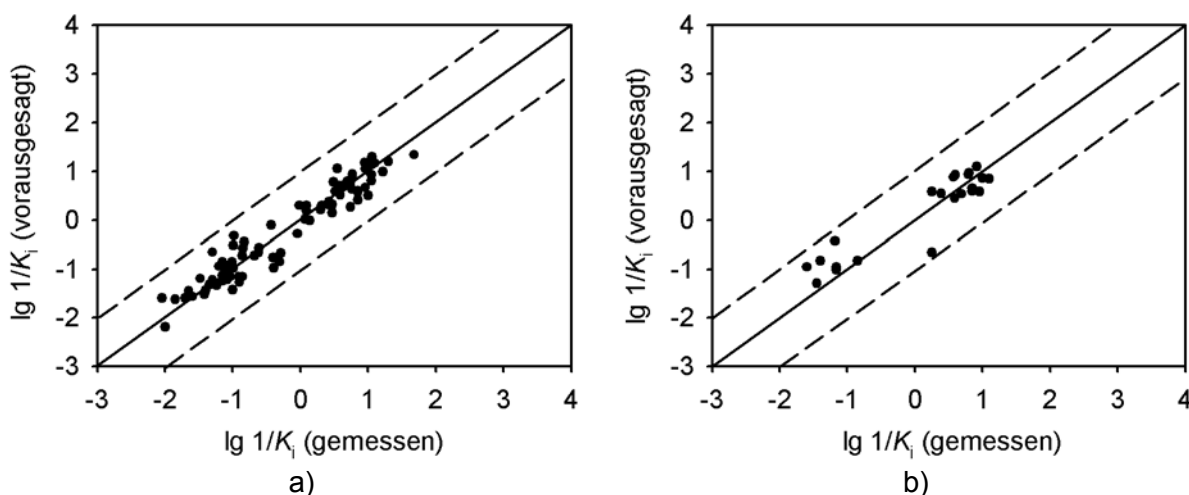


Abbildung 27: Auftragung der vorausgesagten und gemessenen Bindungsaffinitäten a) für den Trainingsdatensatz PEPT1(83) und b) für den Testdatensatz von PEPT1-Liganden. Die vorausgesagten Werte in a) wurden bei der PLS-Analyse durch die LOO-Methode berechnet (4 Komponenten, Spaltenfilter 2,0). Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Toleranzbereich von einer logarithmischen Einheit; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

4.2.2.3 Auswertung der CoMSIA Konturdiagramme

Damit ein direkter Vergleich der molekularen Felder von PEPT1 und PEPT2 möglich ist, wurden die Konturbereiche der Felder mit den gleichen Parametern berechnet (Tabelle 19). Die Felder wurden so dargestellt, dass sie für beide Modelle interpretierbar sind.

Tabelle 19: Verwendete Konturbereiche zur graphischen Darstellung der molekularen Felder

Eigenschaftsfelder	Parameter der Konturbereiche	
	Günstig für hohe Affinität	Ungünstig für hohe Affinität
Sterische	0,0015	-0,00073
Elektrostatische	0,0030	-0,00150
Hydrophobe	0,0020	-0,00230
Wasserstoffbrücken-Donor	0,0070	-0,00290
Wasserstoffbrücken-Akzeptor	0,0023	-0,00080

Sterische Felder

Die Ausmaße der Bindetasche von **PEPT2** werden durch die sterischen Felder erkennbar (Abbildung 28a). Das Tripeptid Trp-Trp-Trp ($K_i = 0,3 \mu\text{M}$), das die höchste Affinität im Datensatz aufweist, ist in Abbildung 28a dargestellt. Die Seitenketten R_1 und R_2 liegen jeweils in sterisch günstigen Bereichen **S1** und **S3**. Das sterisch günstige Feld **S2** ist durch die zweite Peptidbindung der Tripeptide und die Penam- und Cephem-Ringsysteme der Typ I β -Lactam-Antibiotika besetzt (Abbildung 28b). Das sterisch ungünstige orangefarbene Feld **S4** in Abbildung 28a wurde durch den Pyrrolidin-Ring N-terminaler Prolinreste generiert.

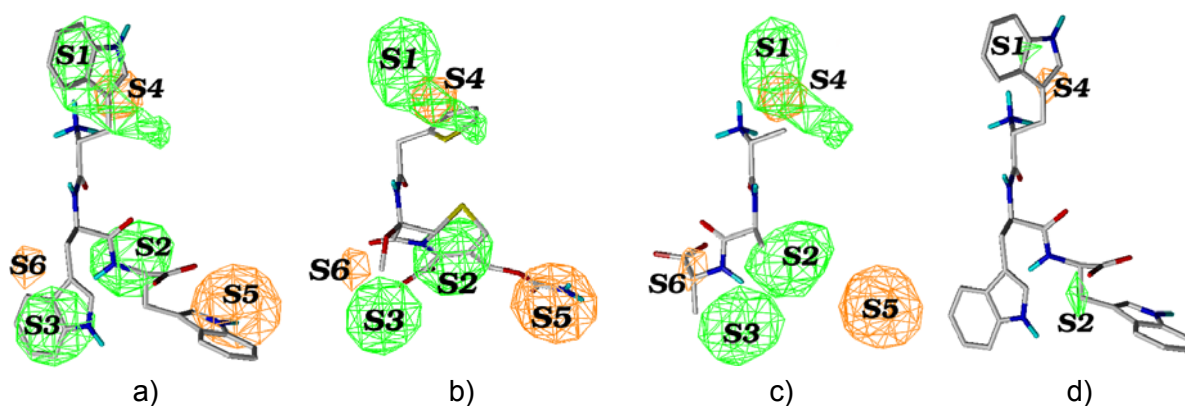


Abbildung 28: CoMSIA Konturdiagramme für sterische Eigenschaften. Grüne Bereiche (**S1-S3**) kennzeichnen Regionen, innerhalb des strukturellen Alignments, die von Molekülteilen hochaffiner Substrate besetzt sind. Die orangefarbenen Bereiche (**S4-S6**) werden von Molekülteilen von weniger affinen bzw. nichtaffinen Verbindungen generiert. **PEPT2**: a) Trp-Trp-Trp, b) Cefoxitin, c) Ala-D-Ala-Ala; d) **PEPT1(83)**: Trp-Trp-Trp; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

Solche Cephalosporine, die lange Seitenketten an der Position R_3' enthalten, zeigen i. d. R. geringere Bindungsaffinitäten an PEPT2 als solche mit kürzeren Ketten an dieser Stelle. Die Seitenkette in Position R_3' von Cefoxitin ($K_i = 8,6$ mM) befindet sich im ungünstigen sterischen Feld **S5** und trägt damit zur geringen Affinität an PEPT2 bei (Abbildung 28b). Genau wie bei PEPT1 scheint auch bei PEPT2 der Raum innerhalb der Bindetasche in diesem Bereich relativ begrenzt zu sein.¹³⁷ Diese Hypothese wird durch das gelbe Feld **S5** in Abbildung 28a gestärkt. Unerklärlich ist, dass auch die Seitenkette R_3 des hochaffinen PEPT2-Substrates Trp-Trp-Trp in dem orangefarbenen Feld **S5** liegt. Auch bei Verkleinerung der orangefarbenen Felder liegt diese Seitenkette innerhalb dieses Bereiches.

Der für hohe Bindungsaffinitäten ungünstige Bereich **S6** (orange) wurde durch den C-Terminus der LDL-Tripeptide gebildet (Abbildung 28c). Ähnlich wie bei PEPT1, werden Pro-Xaa Dipeptide und Pro-Xaa-Xaa Tripeptide auch von PEPT2 mit geringerer Affinität gebunden.

Der Vergleich der sterischen Konturdiagramme beider Peptidtransporter zeigt, dass die Felder von PEPT2 viel kleiner sind, als die von PEPT1. Möglicherweise ist die Bindetasche von PEPT1 geräumiger, so dass die sterischen Parameter weniger wichtig für die Affinität sind, als bei PEPT2. Dies könnte eventuell auch damit zusammenhängen, dass PEPT1 der niedrig affine Transporter ist, PEPT2 seine Substrate hingegen mit hoher Affinität bindet. Die Felder **S1**, **S2** und **S4** sind bei beiden Modellen vorhanden (Abbildung 28a-d). Vergrößert man die Konturflächen des PEPT1(83)-Modells, dann werden auch die Felder **S3** und **S6** generiert. **S5** jedoch ist spezifisch für PEPT2. Besetzt ein Molekül die für hohe Affinität günstigen Felder **S1-S3**, so erhöht sich die Bindungsaffinität für PEPT1 im gleichen Verhältnis wie für PEPT2. Daraus ergeben sich $K_{i\text{ PEPT1}}/K_{i\text{ PEPT2}}$ - Quotienten von 10-15. Wird jedoch das Feld **S5** bei PEPT2 ausgefüllt, so ist der Quotient kleiner (z. B. Leu-Ala-Arg $K_{i\text{ PEPT1}}/K_{i\text{ PEPT2}} = 0,1$; Cefoxitin $K_{i\text{ PEPT1}}/K_{i\text{ PEPT2}} = 1$).

Elektrostatistische Felder

Der Vergleich der elektrostatischen Felder der CoMSIA-Modelle für PEPT1(83) und PEPT2 verdeutlicht die Ähnlichkeit der Anforderungen beider H^+ /Peptidsymporter an ihre Substrate (Abbildung 29). Hochaffine Substrate beider Peptidtransporter weisen einen positiv geladenen N-Terminus und einen negativ geladenen C-Terminus auf. Dies wird durch die Existenz der beiden Felder **E1** (blau, günstig für positive Ladungen) und **E3** (rot, günstig für negative Ladungen), in denen diese funktionellen Gruppen liegen, bildlich dargestellt (Abbildung 29a und b). Die Ausmaße dieser Bereiche sind jedoch bei PEPT1 und PEPT2 unterschiedlich. PEPT2 bindet Typ II β -Lactam-Antibiotika, die eine D-konfigurierte Aminosäure am N-Terminus enthalten, im Gegensatz zu PEPT1, mit hoher Affinität (z. B. Cefadroxil $K_{i\text{ PEPT1}} = 7,2$ mM;

$K_{i\text{PEPT2}} = 0,003 \text{ mM}$; Cefaclor $K_{i\text{PEPT1}} = 11 \text{ mM}$; $K_{i\text{PEPT2}} = 0,029 \text{ mM}$). Im Vergleich zu PEPT1 ist das Feld **E1** des PEPT2-Modells größer. Daher befinden sich auch diese Aminogruppen in dem für positive Ladungen günstigen blauen Feld (**E1**). Bei PEPT1 weisen fast alle bisher untersuchten Verbindungen mit D-konfiguriertem N-Terminus geringere Affinitäten auf als solche in L-Konfiguration (eine Ausnahme bildet D-Met-Met-Met mit $K_{i\text{PEPT1}} = 0,52 \text{ mM}$). Diese positiv geladenen funktionellen Gruppen befinden sich in dem PEPT1(83)-Modell innerhalb des roten Feldes **E5** und zeigen an, dass dadurch die Bindungsaffinität des Moleküls an PEPT1 durch die D-Konfiguration des C_{α} -Atoms vermindert wird (Abbildung 29b).

Im roten Bereich **E3** befinden sich Teile von hochaffinen Molekülen mit hoher Elektronendichte z. B. Carboxylgruppen der Dipeptide und die zweite Peptidbindung der Tripeptide. Offensichtlich bevorzugt PEPT2 auch eine hohe Elektronendichte im Bereich der ersten Seitenkette R_1 der Di- und Tripeptide. In dem roten Bereich **E2** befinden sich daher Hydroxyl- und Carboxylgruppen verschiedener N-terminaler Aminosäurereste.

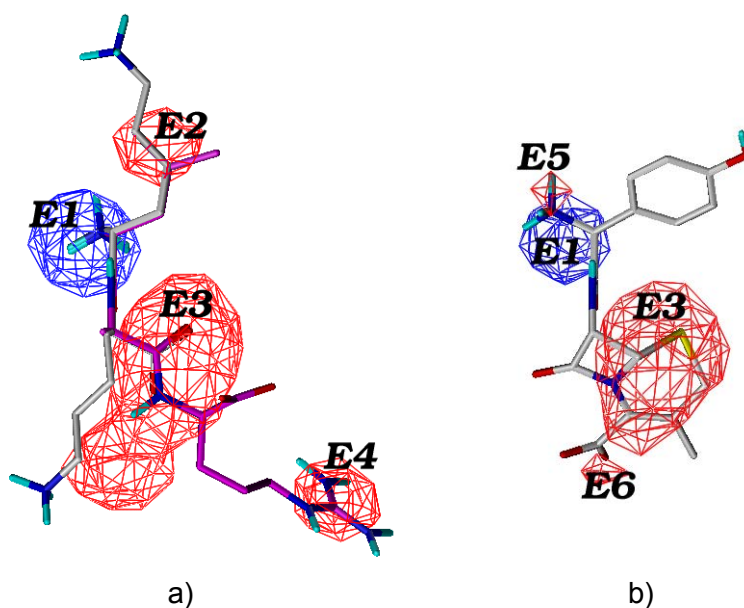


Abbildung 29: CoMSIA Konturdiagramme für elektrostatische Eigenschaften. Die Felder kennzeichnen Regionen, in denen positive (blau) oder negative Ladungen (rot) für hohe Affinität zum Protein notwendig sind. **a) PEPT2:** Lys-Lys (grau) und Leu-Ala-Arg (violett); **b) PEPT1(83):** Cephadrin; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

Tripeptide, die am C-Terminus einen Argininrest enthalten, werden von PEPT2 mit geringer Affinität gebunden (z. B. Ala-Ala-Arg $K_i = 1,3 \text{ mM}$). Solche Tripeptide, deren C-terminale Aminosäurereste elektronenreich sind (z. B. Ala-Ala-Glu, $K_i = 0,069 \text{ mM}$), werden dagegen mit weitaus höherer Bindungsaffinität von PEPT2 erkannt. Die elektrostatischen Felder zeigen an, dass diese Seitenketten in einem Bereich liegen, der für negative Ladungen bzw. elektronenreiche Molekülteile günstig ist (**E4**, Abbildung 29a). An PEPT1 binden Tripeptide, die basische oder saure Gruppen am C-Terminus enthalten, mit mittleren Bindungsaffinitäten (z. B. Ala-Ala-

Arg $K_{iPEPT1} = 1,2$ mM, Ala-Ala-Glu, $K_{iPEPT1} = 0,82$ mM, Ala-Ala-Asp $K_{iPEPT1} = 0,81$ mM). Da das molekulare Feld **E4** bei PEPT1 auch bei Vergrößerung der Felder nicht existiert, scheint die Ladung der dritten Seitenkette die Erkennung von PEPT1 kaum zu beeinträchtigen.

Es muss angemerkt werden, dass die beiden Tripeptide Leu-Ala-Arg ($K_i = 0,11$ mM) und Leu-Pro-Arg ($K_i = 0,10$ mM), die jeweils hohe Bindungsaffinitäten an PEPT1 zeigten, im Trainingsdatensatz enthalten sind. Jedoch zeigte sich, dass diese Tripeptide möglicherweise während der Versuchsdauer durch membranständige Peptidasen aufgespaltet werden könnten (siehe Kapitel 4.1.1.2). Daher ist es nicht auszuschließen, dass beide Tripeptide mit geringerer Bindungsaffinität an PEPT1 gebunden werden. Die Verwendung höherer K_i -Werte dieser beiden Tripeptide könnte zur Generierung unterschiedlicher molekulare Felder führen.

Hydrophobe Felder

Es ist bekannt, dass hydrophobe Substrate mit weitaus höherer Affinität an PEPT2 binden als solche mit hydrophilen Seitenketten. Anhand der hydrophoben Felder in Abbildung 30 wird deutlich, dass hochaffine PEPT2-Substrate hydrophobe Seitenketten aufweisen, die sich innerhalb der orangefarbenen Felder **H3-H7** befinden. Im Bereich der N- und C-Termini der Dipeptide sowie im Bereich der zweiten Peptidbindung der Tripeptide (**H1** und **H2**) werden von PEPT2 erwartungsgemäß hydrophile Eigenschaften der Substrate bevorzugt. **H1** und **H2** sind außerdem deckungsgleich mit den elektrostatischen Feldern **E1** und **E3** (Abbildung 29). Dies war aufgrund der Ladungen der N- und C-Termini hochaffiner Substrate zu erwarten. Die Amidbindung der Typ I β -Lactam-Antibiotika befindet sich ebenfalls innerhalb des für hydrophile Eigenschaften günstigen blauen Feldes **H2**. Allerdings liegen auch die hydrophoben Molekülteile der Penam- und Cephemringe der Typ II β -Lactam-Antibiotika in dem für hydrophobe Eigenschaften ungünstigen Feld **H2**. Darin könnte möglicherweise ihre geringere Bindungsaffinität an PEPT2 begründet sein.

Bei PEPT1 hingegen wirkt sich die Hydrophobizität in geringerem Maße auf die Bindungsaffinität aus (Abbildung 30b). Im Falle Trp-Trp-Trp resultiert dieser Unterschied in einem großen K_{iPEPT1}/K_{iPEPT2} -Quotienten von ~ 560 . Wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, wirkt sich vermutlich die hydrophobere Butenylcarboxylgruppe von Ceftributen im Bereich des Feldes **H7** günstig auf dessen Bindung an PEPT1 aus (Abbildung 30b). Im PEPT1(83)-Modell wurde ein zusätzliches hydrophiles Feld **H8** generiert, das im PEPT2-Modell nicht vorhanden ist.

Anhand der hydrophoben Felder können demnach unterschiedliche Bindungsaffinitäten an PEPT1 und PEPT2 von Substraten mit hydrophoben Seitenketten erklärt werden. Der große Anteil von ca. 25 % dieser Felder an beiden Modellen unterstreicht die Wichtigkeit dieser Eigenschaften zusätzlich.

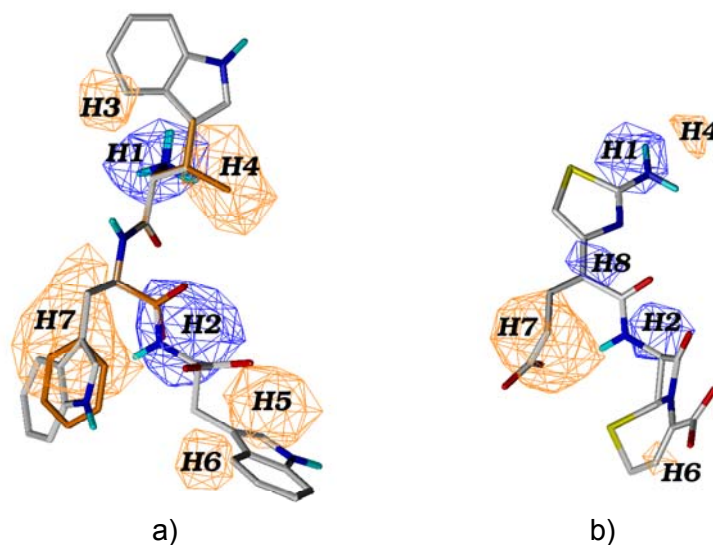


Abbildung 30: CoMSIA Konturdiagramme für hydrophobe Eigenschaften. Blaue Regionen (H1, H2 und H8) kennzeichnen Bereiche innerhalb des strukturellen Alignments, in denen hochaffine Substrate hydrophile Eigenschaften aufweisen. Die orangefarbenen Bereiche H3-H7 werden von hochaffinen Substraten mit hydrophoben Seitenketten ausgefüllt. **a) PEPT2:** Trp-Trp-Trp (grau) und Val-Phe (orange); **b) PEPT1(83):** Ceftibuten; aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

Wasserstoffbrücken-Donorfelder

Die Wasserstoffbrücken-Donorfelder der 3D-QSAR Modelle für PEPT1 und PEPT2 Liganden unterscheiden sich kaum und verdeutlichen damit die Ähnlichkeit der Wechselwirkungen in den hypothetischen Bindetaschen (Abbildung 31).

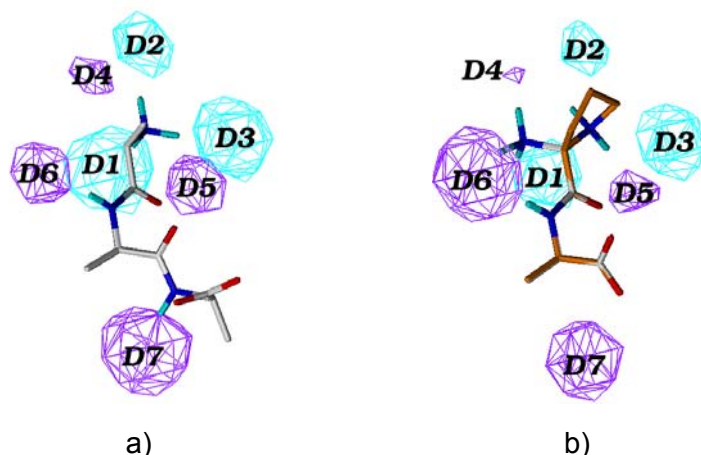


Abbildung 31: CoMSIA Konturdiagramme für Wasserstoffbrücken-Donorfelder. Wasserstoffbrücken-Donorgruppen hochaffiner Substrate bilden mit Wasserstoffbrücken-Akzeptorgruppen seitens des Rezeptors Wasserstoffbrückenbindungen aus. Bereiche, in denen sich solche Akzeptorgruppen befinden könnten, sind schematisch durch die hellblauen Bereiche D1-D3 dargestellt. Sind Wasserstoffbrücken-Donorgruppen auf violette Bereiche (D4-D7) ausgerichtet, so führt dies zu Affinitätsverlusten. **a) PEPT2:** Ala-Ala-Ala, **b) PEPT1(83):** Pro-Ala (orange) und D-Ala-Ala (grau); aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b).

Die Wasserstoffbrücken-Donorfelder bilden den größten Anteil der Modelle von ca. 30 % aus. Die Wichtigkeit der richtigen Position der N-terminalen Wasserstoffbrücken-Donorgruppe wird durch die Felder **D1-D3** verdeutlicht. Die räumliche Fixierung der α -Aminogruppe wie im Pyrrolidin-Ring von Prolin führt zur Verminderung der Affinität. Genau wie bei PEPT1 stammen die violetten Felder **D4** und **D5** bei PEPT2 von der Iminogruppe der Pro-Xaa Dipeptide und Pro-Xaa-Xaa Tripeptide. Auch die α -Aminogruppen von DL-Dipeptiden und DLL-Tripeptiden führen bei beiden Transportern aufgrund von eingeschränkten Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rezeptor zur Verringerung der Bindungsaffinitäten (Abbildung 31b). Donorgruppen solcher Moleküle sind auf das violette Feld **D6** ausgerichtet. Die Herkunft des Feldes **D7** kann nicht erklärt werden.

Wasserstoffbrücken-Akzeptorfelder

Auch die Wasserstoffbrücken-Akzeptorfelder beider Modelle unterscheiden sich nur geringfügig. Akzeptorgruppen, wie z. B. die Carboxylgruppen hochaffiner Substrate, sind auf das Feld **A1** ausgerichtet. Dadurch ist die Ausbildung hypothetischer Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rezeptor möglich. Die C-Termini von Dipeptiden in LD- oder DD-Konfiguration sowie Tripeptiden in LDL-, LDD- und DDD-Konfiguration können keine Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein ausbilden. Sie sind auf die roten Bereiche **A2** und **A3** (Abbildung 32a) ausgerichtet und vermindern die Affinität an PEPT2. Das Feld **A3** wurde für PEPT1 nicht generiert.

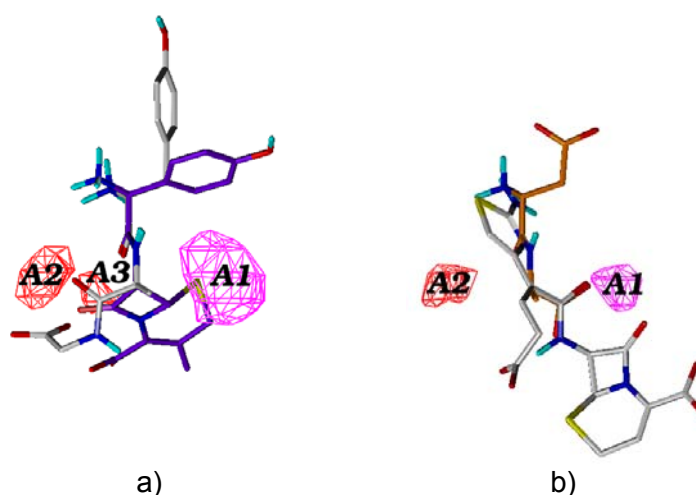


Abbildung 32: CoMSIA Konturdiagramme für Wasserstoffbrücken-Akzeptorfelder. Das magentafarbene Feld **A1** kennzeichnet einen Bereich seitens des Proteins, mit dem Wasserstoffbrücken-Akzeptoren hochaffiner Substrate hypothetische Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Zeigen Wasserstoffbrücken-Akzeptoren auf die roten Felder **A2** und **A3**, so führt dies zur Verminderung der Bindungsaffinität an PEPT1 und PEPT2. **a) PEPT2:** Tyr-D-Ala-Gly (grau) und Cefadroxil (violett); **b) PEPT1(83):** Cefitibuten (grau) und Asp-Ala (orange).

Zusammenfassung

Das hier dargestellte 3D-QSAR Modell für Liganden des H⁺/Peptidsymporters PEPT2 ermöglicht erstmals die Erklärung unterschiedlicher Bindungsaffinitäten verschiedener Moleküle. Das CoMSIA-Modell eignet sich außerdem zur Voraussage von K_i -Werten strukturell ähnlicher Verbindungen. Der Vergleich der molekularen Felder des PEPT2-Modells mit denen für PEPT1 ermöglicht zum ersten Mal die graphische Darstellung von Unterschieden aber auch Gemeinsamkeiten der Anforderungen beider Transporter an ihre Substrate.

Ein hochaffines Substrat von PEPT2 weist folgende Eigenschaften auf:

- | | |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| N-Terminus: | <ul style="list-style-type: none">- Wasserstoffbrücken-Donor Funktion,- hydrophile Eigenschaften, sowie- positive Ladung |
| Seitenketten: | <ul style="list-style-type: none">- Seitenketten müssen sich in bestimmten Regionen befinden- hydrophobe Eigenschaften- keine positive Ladung an der R₃-Seitenkette |
| Peptidrückgrat | <ul style="list-style-type: none">- hydrophile Eigenschaften im Bereich der zweiten Peptidbindung der Tripeptide; in dieser Region liegen auch Penam- und Cephemringe der β-Lactam-Antibiotika |
| C-Terminus: | <ul style="list-style-type: none">- elektronenreiche Gruppe(n)- negative Ladung- hydrophile Eigenschaften- Wasserstoffbrücken-Akzeptor Funktion- L-Konfiguration |

Die größten Unterschiede zwischen den 3D-QSAR Modellen für PEPT1- und PEPT2-Liganden weisen die sterischen, elektrostatischen und hydrophoben Eigenschaften der Moleküle auf. Die Informationen, die daraus abgeleitet werden können, stimmen mit dem bisherigen Kenntnisstand überein. PEPT2 bindet seine Substrate mit höherer Affinität als PEPT1. Das Volumen der Bindetasche von PEPT2 ist vermutlich kleiner als das von PEPT1. Daher sind möglicherweise die sterisch günstigen Bereiche für PEPT1 bei gleicher Größe der Felder kleiner als bei PEPT2.

Es ist außerdem bekannt, dass PEPT2 hydrophobe Substrate mit weitaus höherer Affinität bindet als PEPT1. Tripeptide, die hydrophobe Seitenketten enthalten, werden z. B. mit einer mehr als 100-fach höheren Bindungsaffinität von PEPT2 gebunden. Diese Tatsache wird durch die hydrophoben Felder untermauert. Im Vergleich zu PEPT1 wurden für PEPT2 weitaus mehr Bereiche innerhalb des strukturellen Alignments identifiziert, in denen hydrophobe Molekülteile für eine hohe Affinität an PEPT2 wichtig sind.

Die experimentelle Bestimmung der K_T -Werte von Tripeptiden, die einen negativ geladenen Aminosäurerest in der R_3 -Seitenkette enthalten, zeigte, dass PEPT2 diese Verbindungen mit deutlich geringerer Affinität im Vergleich zu neutralen Seitenketten bindet. Die Bindungsaffinitäten an PEPT1 hingegen weichen kaum von den K_T -Werten der Tripeptide mit neutralen Seitenketten ab (Tabelle 7, Kapitel 4.1.1.2). Die elektrostatischen Felder verdeutlichen diesen Unterschied der Substraterkennung beider Transporter.

Beide Peptidtransporter binden Di- und Tripeptide in LL- und LLL-Konfigurationen mit höheren Bindungsaffinitäten als solche mit D-konfigurierten Aminosäureresten. PEPT2 erkennt Di- und Tripeptide mit D-konfigurierten N-terminalen Aminosäuren mit hoher Affinität während PEPT1 solche Verbindungen mit niedriger Affinität bindet.

PEPT1 und PEPT2 scheinen ähnliche Wasserstoffbrücken mit dem Substrat auszubilden. Die Wasserstoffbrücken-Donor- und -Akzeptorfelder sind bei beiden Modellen weitestgehend gleich. In diesen Feldern zeigt sich besonders die Ähnlichkeit der beiden Peptidtransporter.

4.2.3 Anwendung der 3D-QSAR Modelle am Beispiel der 2-Aminothiazol-4-essigsäure (Anlage 7.4 Biegel et al., 2007)

Die Analyse der molekularen Felder des erstellten CoMSIA-Modells für PEPT1 (Kapitel 4.2.1) ließ darauf schließen, dass solche β -Lactam-Antibiotika, die einen Aminothiazolring enthalten, wie z. B. Ceftibuten, anders als jene β -Lactam-Antibiotika, die diese Gruppe nicht aufweisen, im strukturellen Alignment angeordnet werden müssen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aminogruppe am Thiazolring ähnlich wie die N-terminale Aminogruppe hochaffiner Substrate zur Bindung an PEPT1 beiträgt. Ausgehend von dieser Annahme konnte ein neuer Ligand für PEPT1 und PEPT2, 2-Aminothiazol-4-essigsäure (ATAA), abgeleitet werden (Abbildung 33a). Es weist eine für ein Substrat ungewöhnliche Struktur auf, da es weder eine Amidbindung noch eine bei physiologischen pH-Werten protonierte Aminogruppe enthält.^{§§}

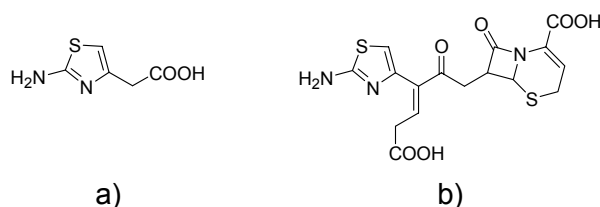


Abbildung 33: Strukturen von a) ATAA und b) Ceftibuten.

In der Literatur sind bereits ähnliche PEPT1-Liganden beschrieben worden (Abbildung 34). Bei 4-Aminomethylbenzoesäure handelt es sich um ein PEPT1-Substrat, während 4-Aminophenylessigsäure von PEPT1 gebunden, jedoch nicht transportiert wird.^{193,194}



Abbildung 34: Chemische Strukturen von a) 4-Aminophenylessigsäure und b) 4-Aminomethylbenzoesäure

ATAA wird von PEPT1 mit niedriger Affinität ($K_i = 4,9$ mM) gebunden und zeigt keine Affinität an PEPT2 ($K_i = 6,6$ mM). Außerdem wird es nicht durch die H^+ /Peptidsymporter transportiert.^{***} Dieses Dipeptid-Derivat weist vielfältige Funktionalisierungsmöglichkeiten auf und ist möglicherweise ein ideales Fragment zur Entwicklung von Prodrugs, da ATAA ein Bestandteil vieler Wirkstoffe ist. Interessanterweise entsteht aus der C-terminalen Verlängerung von ATAA das hochaffine PEPT1-Substrat Ceftibuten.

^{§§} Der pK_a -Wert der Aminogruppe liegt bei $\sim 5,4$. Bei pH 6,0 liegen ca. 3 % der Aminogruppen in protonierter Form vor.

^{***} AG Ernährungsphysiologie der TU-München

Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es, die Bindungsaffinität von ATAA an PEPT1 und PEPT2 durch verschiedene Modifizierungen an der Amino- und der Carboxylgruppe zu erhöhen. Dafür wurden folgende Derivate der ATAA untersucht: ATAA-Ala, ATAA-Phe, ATAA-Val, Ala-ATAA, Phe-ATAA, Val-ATAA, Ala-Ala-ATAA, ATAA-Ala-Ala sowie Ala-ATAA-Ala. Außerdem sollte überprüft werden, ob die beiden CoMSIA-Modelle für PEPT1- und PEPT2-Substrate (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) für die Anwendung eines gezielten Wirkstoffdesigns geeignet sind.

Zunächst wurden die 3D-Strukturen der ATAA-Derivate generiert, Konformationsanalysen durchgeführt. Geeignete Konformationen wurden mit Strukturen im Alignment überlagert und in einem Testdatensatz gespeichert. Nachfolgend wurden die K_i -Werte der ATAA-Derivate von den 3D-QSAR Modellen für PEPT1- und PEPT2-Liganden vorausgesagt.^{†††} Anschließend wurden die Derivate in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie synthetisiert und die Bindungsaffinitäten durch Konkurrenzexperimente an Caco-2- und SKPT-Zellen gemessen.

Die Überlagerung des Dipeptidmimetikums ATAA mit Ala-Ala-Ala ist in Abbildung 35 dargestellt. Die Aminogruppe von ATAA ist deckungsgleich mit der Aminogruppe hochaffiner Substrate. Die Carboxylgruppe von ATAA ist mit der Carboxylgruppe von hochaffinen Dipeptiden und mit der Carbonylgruppe der zweiten Peptidbindung hochaffiner Tripeptide überlagert. Der im Aminothiazolring gebundene Stickstoff besitzt nur schwache Wasserstoffbrücken-Akzeptoreigenschaften. Die Bindungsaffinität von ATAA wurde von dem **PEPT1**-Modell mit $K_i = 1,9$ mM vorausgesagt. Der experimentell ermittelte K_i -Wert beträgt 4,9 mM und liegt damit annähernd in dem Bereich der Vorhersage. Für **PEPT2** wurde ein K_i -Wert von 0,8 mM für ATAA vorausgesagt, der experimentell bestimmte K_i -Wert liegt jedoch weitaus höher und beträgt 6,6 mM.

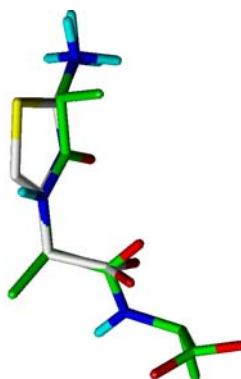


Abbildung 35: Überlagerung von ATAA (grau) mit Ala-Ala-Ala (grün).

^{†††} Für die Voraussagen wurde das in Kapitel 4.2.2 beschriebene Modell für PEPT1 und PEPT2 verwendet.

Im ersten Teil der Untersuchungen wurden die ATAA-Derivate betrachtet, die an der Carboxylgruppe von ATAA mit einer Aminosäure verlängert wurden. Die Anordnung der Tripeptidmimetika ATAA-Val, ATAA-Ala und ATAA-Phe im strukturellen Alignment erfolgte so, dass das Peptidrückgrat der konjugierten Aminosäuren mit der zweiten Peptidbindung der Tripeptide überlagert wurde. Der Aminothiazolring ist dadurch in ähnlicher Position, wie derjenige der Typ I β -Lactam-Antibiotika (Abbildung 36).

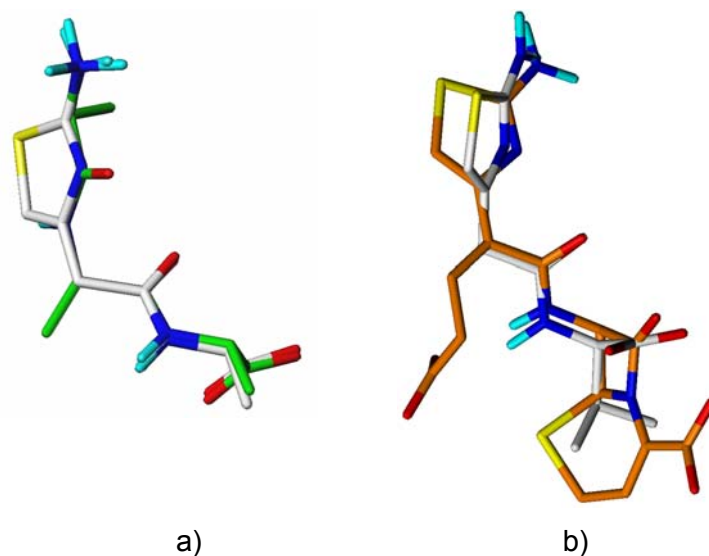


Abbildung 36: Überlagerung von a) ATAA-Ala (grau) mit Ala-Ala-Ala (grün; aus Anlage 7.4 Biegel et al., 2007) und b) ATAA-Val (grau) mit Ceftibuten (orange).

Die vorausgesagten K_i -Werte von ATAA-Val, ATAA-Ala und ATAA-Phe für **PEPT1** lagen im Bereich von 2 mM, und sind damit dem vorausgesagten Wert für ATAA relativ ähnlich (Tabelle 20). Konkurrenzexperimente an Caco-2 Zellen ergaben für ATAA-Val Bindungsaffinitäten von $K_i \sim 3,3$ mM und für ATAA-Phe $K_i \sim 7,3$ mM und bestätigen die vorausgesagten K_i -Werte weitestgehend. Für ATAA-Ala wurde jedoch ein weitaus höherer K_i -Wert von 28 mM gemessen. Dieses ATAA-Derivat wird nicht von PEPT1 erkannt. Die Bindungsaffinität von ATAA konnte durch die Konjugation von Aminosäuren an die Carboxylgruppe nicht (bzw. im Fall von ATAA-Val nur geringfügig) erhöht werden (Tabelle 20).

Die vorausgesagten K_i -Werte des **PEPT2**-Modells betragen für ATAA-Val $K_i = 0,55$ mM, für ATAA-Phe $K_i = 0,54$ mM und für ATAA-Ala $K_i = 1,2$ mM. Die durch Konkurrenzexperimente gemessenen Bindungsaffinitäten liegen in einem vergleichbaren Bereich (ATAA-Val 0,17 mM, für ATAA-Phe 0,35 mM und für ATAA-Ala 4,7 mM; Tabelle 20). Im Gegensatz zu PEPT1 konnte die Bindungsaffinität von ATAA durch die Anknüpfung von Aminosäuren an der Carboxylgruppe von ATAA erhöht werden, im Fall von ATAA-Val sogar um das 39-fache.

In einem weiteren Versuch wurde das Dipeptid Ala-Ala mit der Carboxylgruppe von ATAA verbunden. Im strukturellen Alignment wurde ATAA-Ala-Ala so angeordnet, dass die Amino-

und Carboxylgruppen jeweils in der gleichen Region liegen, wie die von Ceftibuten (Abbildung 37a und b). Der vorausgesagte K_i -Wert für **PEPT1** beträgt 1,8 mM. Die tatsächliche Bindungsaffinität an Caco-2 Zellen weicht jedoch mit $K_i \sim 23$ mM stark ab. Für **PEPT2** wurde ein K_i -Wert von 1,5 mM vorausgesagt. Der an SKPT-Zellen gemessene K_i -Wert von 5,5 mM stimmt zufrieden stellend mit dem theoretischen Wert überein (Tabelle 20). Die niedrige Bindungsaffinität von ATAA-Ala-Ala an beiden Peptidtransportern ist in soweit nicht überraschend, da es sich im Vergleich zu Ala-Ala-Ala (Abbildung 37b) um eine Verbindung handelt, die eher einem Tetrapeptid entspricht. Solche Verbindungen werden nicht von PEPT1 und PEPT2 erkannt. Ceftibuten (Abbildung 37a) kann wahrscheinlich weitere Wechselwirkungen mit dem Protein ausbilden und wird daher mit höherer Affinität gebunden.

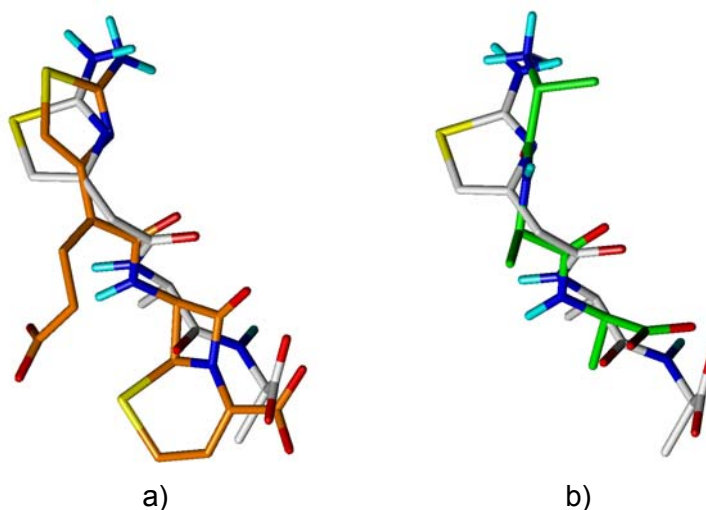


Abbildung 37: Überlagerung von ATAA-Ala-Ala (grau) mit a) Ceftibuten (orange) und b) Ala-Ala-Ala (grün).

Anschließend wurde ATAA in den Trainingsdatensatz aufgenommen und die Bindungsaffinitäten der in Tabelle 20 dargestellten Derivate nochmals berechnet (pred (ATAA)). Für **PEPT1** konnten geringfügig kleinere Vorhersagefehler festgestellt werden. Die Bindungsaffinität von ATAA-Ala-Ala wurde weitaus genauer eingeschätzt und stimmt mit dem gemessenen K_i -Wert zufrieden stellend überein. Für **PEPT2** wurden aufgrund der niedrigen Affinität von ATAA die Bindungsaffinitäten für ATAA-Val und ATAA-Phe geringer vom Modell eingeschätzt. Dadurch entstand ein größerer Vorhersagefehler (Tabelle 20). Die K_i -Werte der anderen Derivate ATAA-Ala und ATAA-Ala-Ala wurden mit kleineren Fehlern als zuvor berechnet.

Tabelle 20: Gemessene und von den 3D-QSAR-Modellen vorausgesagte Bindungsaffinitäten von ATAA und deren Derivate an PEPT1 und PEPT2 im Vergleich zu Ceftibuten.

Die Voraussagen der K_f -Werte (Pred.) erfolgte mit den im Kapitel 4.2.2 beschriebenen 3D-QSAR Modellen von PEPT1- und PEPT2-Liganden. Die Trainingsdatensätze wurden anschließend mit ATAA erweitert, um erneut K_f -Werte der Derivate zu berechnen (Pred. ATAA). Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) in konfluente Monolayer der Zelllinien Caco-2 und SKPT wurde bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach Zusatz von unmarkierten Substanzen in ansteigenden Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Die Inhibitionskonstanten (K_i) wurden aus den IC_{50} -Werten erhalten, die aus den Verdrängungskurven durch nichtlineare Regression bestimmt wurden ($n = 4$). Die Hemmkurven sind in Anlage 7.1 dargestellt. Die Tabelle ist aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2007) modifiziert.

Verbindung	PEPT1			PEPT2			$\frac{K_{i,PEPT1}}{K_{i,PEPT2}}$
	Pred.	Pred. (ATAA)	Exp.	Pred.	Pred. (ATAA)	Exp.	
Ceftibuten	0,89	0,93	$0,34 \pm 0,03^{145}$	0,55	0,93	$0,28 \pm 0,01^{144}$	4
ATAA	1,3	2,1	$4,9 \pm 0,6$	0,80	4,5	$6,6 \pm 0,1$	0,7
ATAA-Val	1,1	1,7	> 3 (~3,3)	0,55	1,7	$0,17 \pm 0,03$	19
ATAA-Phe	1,4	2,2	> 3 (~7,3)	0,54	2,0	$0,35 \pm 0,05$	21
ATAA-Ala	2,0	3,1	>10 (~28 \pm 2) *	1,2	3,9	$4,7 \pm 0,35^*$	6
ATAA-Ala-Ala	2,2	12	>10 (~23 \pm 2) *	1,5	1,7	$5,5 \pm 0,4^*$	4

* gemessen von Ilka Knütter

Aus dem Vergleich der Bindungsaffinitäten von ATAA mit den in Tabelle 20 dargestellten ATAA-Derivaten kann folgende Hypothese abgeleitet werden:

- Im Allgemeinen bestimmt der N-terminale Teil eines Moleküls die Bindungsaffinität an PEPT1. Die mittlere bis niedrige Bindungsaffinität eines Dipeptidmimetikums an PEPT1 kann durch Einführung weiterer funktioneller Gruppen am C-Terminus nicht signifikant erhöht werden.
- Im Unterschied zu PEPT1, kann bei PEPT2 die Bindungsaffinität eines Dipeptidmimetikums mit niedriger Bindungsaffinität durch Konjugation mit hydrophoben Aminosäureresten am C-Terminus wesentlich erhöht werden. Möglicherweise ist das Vorhandensein einer C-terminalen hydrophoben Seitenkette dieser Tripeptidmimetika wichtiger für die Erkennung, als die Position der C-terminalen Carboxylgruppe.

Auch in anderen Studien wurde festgestellt, dass strukturelle Unterschiede am N-Terminus der Liganden für die unterschiedliche Substraterkennung von PEPT1 und PEPT2 verantwortlich sind.^{144,155,195}

In einem weiteren Ansatz wurden ATAA-Derivate untersucht, die an der Aminogruppe durch Substitution eines Aminosäurerestes verlängert wurden. In Abbildung 38a ist die Überlagerung

von Ala-ATAA und Ala-Ala-Ala dargestellt. Der ATAA-Rest des Moleküls befindet sich in der Region der zweiten Seitenkette von Di- und Tripeptiden. Daher handelt es sich bei ATAA-Xaa Derivaten eher um Dipeptidmimetika. Die vorausgesagten Bindungsaffinitäten von Val-ATAA, Phe-ATAA und Ala-ATAA lagen für **PEPT1** im Bereich von $K_i = 0,2$ und $0,45$ mM und ließen darauf schließen, dass diese Verbindungen mit relativ hoher Affinität von PEPT1 gebunden werden (Tabelle 21). Die Konkurrenzexperimente bestätigten, dass diese ATAA-Derivate von PEPT1 erkannt werden. Die Bindungsaffinität von Val-ATAA ist jedoch um ein Vielfaches höher als vorausgesagt. Die Bindungsaffinität von ATAA konnte durch die N-terminale Substitution mit Valin 73-fach an PEPT1 erhöht werden. Die Bindungsaffinität für Phe-ATAA ist niedriger als vorausgesagt. Der vorausgesagte K_i -Wert von Ala-ATAA stimmt zufrieden stellend mit dem gemessenen überein.

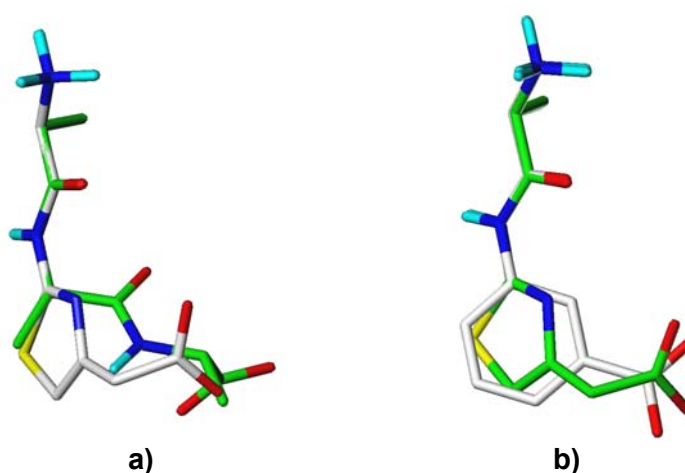


Abbildung 38: Überlagerung von Ala-ATAA (grau) mit a) Ala-Ala-Ala (grün) und b) Ala-Arylamid; nach Anlage 7.4 (Biegel et al., 2007).

Die Xaa-ATAA-Derivate sind den Aminosäure-Arylamiden strukturverwandt, die auch von PEPT1 erkannt werden (Abbildung 38a).¹⁹¹ Die hohe Affinität solcher Verbindungen wurde in einer vorangegangenen Studie mit der erhöhten Elektronendichte am C-Terminus erklärt.¹⁴ Dies könnte auch für die Xaa-ATAA-Derivate zutreffen.

Tabelle 21: Gemessene und von den Modellen vorausgesagte Bindungsaffinitäten von Xaa-ATAA-Derivaten an PEPT1 und PEPT2. Die Voraussagen der K_i -Werte (Pred.) erfolgte mit den in Kapitel 4.2.2 beschriebenen 3D-QSAR Modellen von PEPT1- und PEPT2-Liganden. Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) in konfluente Monolayer der Zelllinien Caco-2 und SKPT wurde bei Raumtemperatur und pH 6,0 nach Zusatz von unmarkierten Substanzen in ansteigenden Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 10 min gemessen. Die Inhibitions-konstanten (K_i) wurden aus den IC_{50} -Werten erhalten, die aus den Verdrängungskurven durch nichtlineare Regression bestimmt wurden ($n = 4$); modifiziert aus Anlage 7.4 (Biegel et al., 2007).

Verbindung	K_i PEPT1 (mM)			K_i PEPT2 (mM)			$\frac{K_i^{\text{PEPT1}}}{K_i^{\text{PEPT2}}}$
	Pred.	Pred. (ATAA)	Exp.	Pred.	Pred. (ATAA)	Exp.	
Val-ATAA	0,28	0,30	0,067 \pm 0,004	0,03	0,05	0,011 \pm 0,001	6
Phe-ATAA	0,25	0,22	0,95 \pm 0,12	0,02	0,05	0,24 \pm 0,01	4
Ala-ATAA	0,45	0,49	0,51 \pm 0,18*	0,06	0,09	0,19 \pm 0,004*	3
Ala-Ala-ATAA	0,66	0,75	4,9 \pm 1,5*	0,11	0,12	9,7 \pm 2,0*	0,5
Ala-ATAA-Ala	1,1	1,4	7,9 \pm 0,5*	0,27	0,38	1,3 \pm 0,04*	6

* gemessen von Ilka Knütter

Auch für **PEPT2** wurden hohe Bindungsaffinitäten für Val-ATAA, Phe-ATAA und Ala-ATAA vorausgesagt (Tabelle 21). Die gemessene Bindungsaffinität von Val-ATAA stimmt zufrieden stellend mit dem vorausgesagten Wert überein, hingegen sind die gemessenen K_i -Werte von Phe-ATAA und Ala-ATAA höher als die Prognosen.

Anhand dieser Xaa-ATAA-Derivate konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von ATAA durch Derivatisierung an der Aminogruppe des Thiazolringes erhöht werden kann. Warum Valin in N-terminaler Position von beiden Transportern im Vergleich zu anderen ähnlich aufgebauten Aminosäureresten bevorzugt gebunden wird, kann an dieser Stelle nicht erklärt werden. Dieses Phänomen wurde jedoch schon häufig beobachtet und für die Entwicklung von Prodrugs angewendet.^{139,163,164,196,197}

Ala-Ala-ATAA wurde im strukturellen Alignment so angeordnet, dass beide Peptidbindungen mit dem Peptidrückgrat der Tripeptide deckungsgleich sind (Abbildung 39). Bei Ala-Ala-ATAA handelt es sich um eine Verbindung, die einem Tetrapeptid ähnlich ist. Beide Modelle berechneten hohe Bindungsaffinitäten für dieses ATAA-Derivat an PEPT1 und PEPT2. Den experimentellen Werten nach führt die Verlängerung von ATAA mit einem Dipeptid am N-Terminus bei beiden Peptidtransportern im Vergleich zu Ala-ATAA zum Verlust der Affinität (Tabelle 21). Die Voraussagefehler können dadurch begründet sein, dass der C-Terminus des Derivates in einem Bereich liegt, der von keinem anderen Molekül des Trainingsdatensatzes eingenommen wird. Daher sind diese Voraussagen in Frage zu stellen.

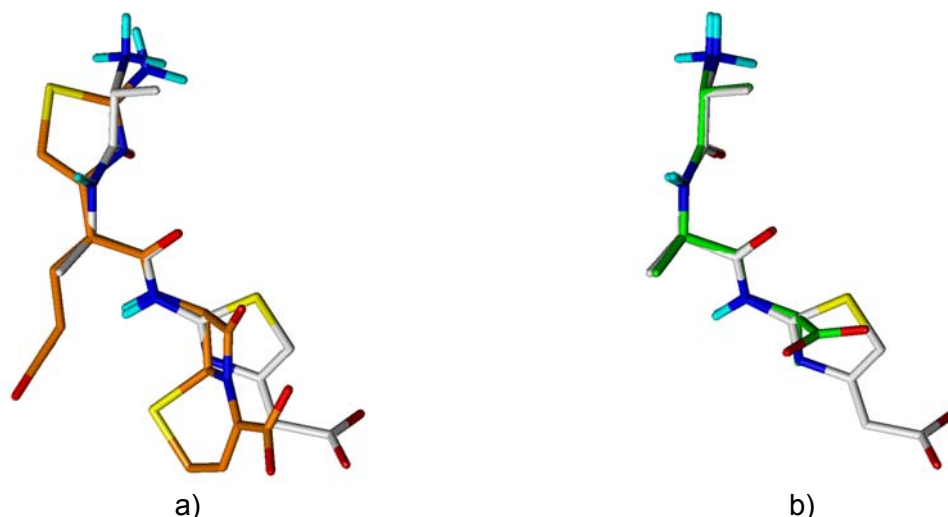


Abbildung 39: Überlagerung von Ala-Ala-ATAA (grau) mit a) Ceftributen (orange) und b) Ala-Ala-Ala (grün).

Ein weiteres Derivat, Ala-ATAA-Ala, wurde bezüglich seiner Bindungsaffinität an PEPT1 und PEPT2 untersucht. Die Überlagerung dieses Derivates erfolgte, wie in Abbildung 40 dargestellt, entlang der ersten Peptidbindung der Di- und Tripeptide. Der C-Terminus ist ähnlich, wie die Carboxylgruppe von Ceftributen ausgerichtet (Abbildung 40a). An **PEPT1** wurde eine mittlere Affinität von 1,1 mM vorausgesagt, die jedoch experimentell nicht bestätigt wurde ($K_{i\text{ exp}} = 7,9\text{ mM}$). Für **PEPT2** wurde eine hohe Affinität von Ala-ATAA-Ala vorausgesagt ($K_{i\text{ pred}} = 0,38\text{ mM}$), der gemessene K_i -Wert weicht jedoch auch hier stark ab und beträgt 1,3 mM. Ala-ATAA-Ala wird demnach sowohl von PEPT1 als auch von PEPT2 mit niedriger Affinität gebunden.

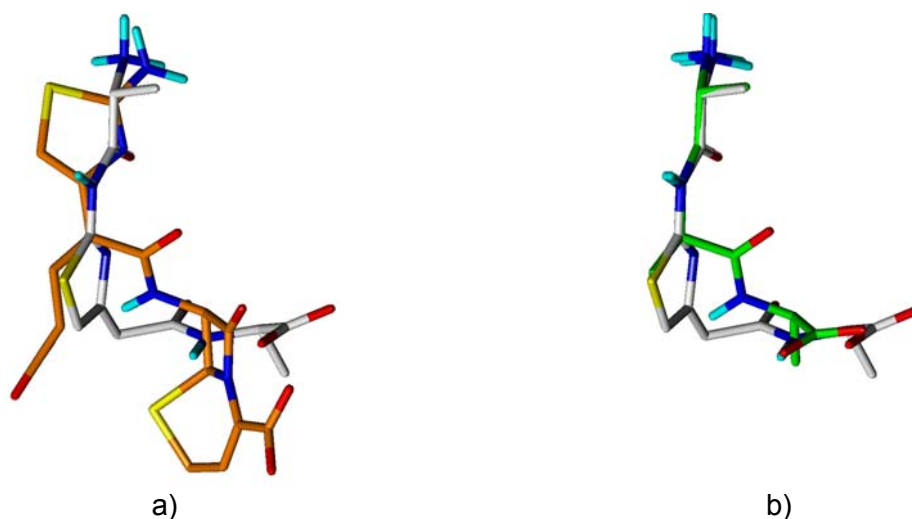


Abbildung 40: Überlagerung von Ala-ATAA-Ala mit a) Ceftributen (orange) und b) Ala-Ala-Ala (grün).

Im Allgemeinen sind die Voraussagen der CoMSIA-Modelle für PEPT1 genauer als für PEPT2. In Abbildung 41a und b sind die vorausgesagten gegen die gemessenen $\lg 1/K_j$ -Werte aufgetragen. Die zur Voraussage verwendeten Modelle sind in Kapitel 4.2.2 beschrieben. Die Bindungsaffinitäten vieler ATAA-Derivate werden zufrieden stellend vorausgesagt. Die Differenz der vorausgesagten und gemessenen $\lg 1/K_j$ -Werte von ATAA-Ala und ATAA-Ala-Ala sind für PEPT1 größer als eine logarithmische Einheit. Für PEPT2 wurden große Voraussagefehler für Phe-ATAA, Ala-Ala-ATAA und Ala-ATAA-Ala beobachtet.

Für die in Tabelle 21 dargestellten Verbindungen wurden erwartungsgemäß keine nennenswerten Verbesserungen der vorausgesagten Bindungsaffinitäten erhalten, da ATAA im strukturellen Alignment anders positioniert ist als die Xaa-ATAA Derivate. Die Voraussagen sind jedoch insgesamt genauer, wenn ATAA im Trainingsdatensatz vorhanden ist (Abbildung 41a). Die Bindungsaffinitäten von Ala-ATAA-Ala und Ala-Ala-ATAA an PEPT2 werden jedoch auch dann um ein Vielfaches zu hoch eingeschätzt, wenn ATAA im Trainingsdatensatz vorhanden ist. Trotz dieser Fehler eignen sich die Modelle, um die Bereiche, in denen die Affinitäten solcher Substanzen liegen, abzuschätzen. Es wird besonders deutlich, dass strukturell ähnliche Moleküle im Trainingsdatensatz enthalten sein müssen, um zufrieden stellende Bindungsaffinitäten anderer Moleküle vorauszusagen.

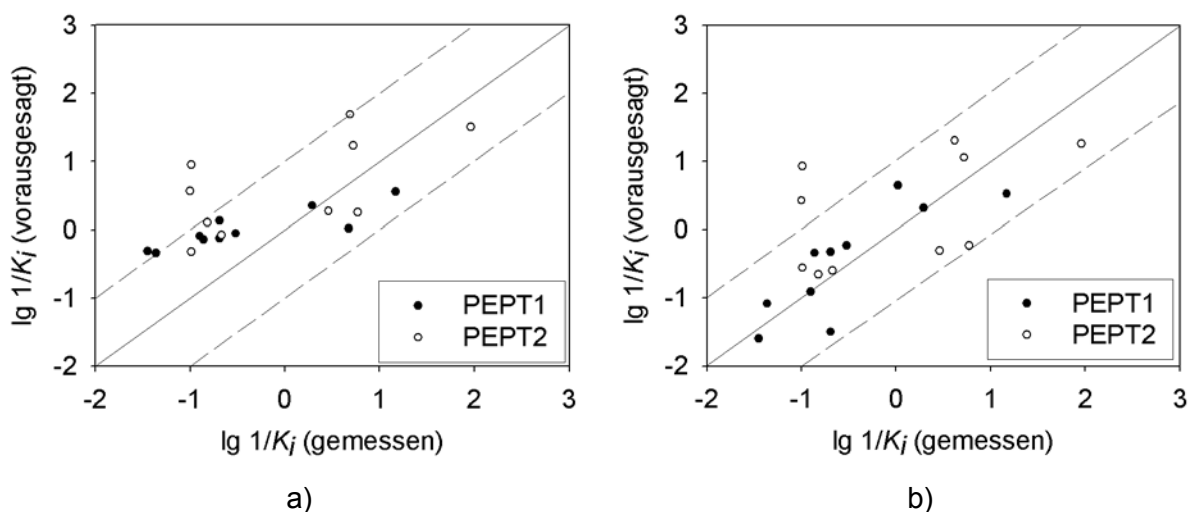


Abbildung 41: Auftragung der vorausgesagten und gemessenen Bindungsaffinitäten der ATAA Derivate. a) die Voraussagen erfolgten mit den in Kapitel 4.2.2 dargestellten 3D-QSAR Modellen für PEPT1 und PEPT2. b) die Bindungsaffinitäten wurden vorausgesagt, nachdem ATAA in den Trainingsdatensatz beider CoMSIA-Modelle aufgenommen wurde. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Toleranzbereich von einer logarithmischen Einheit.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von ATAA durch Konjugation mit Aminosäuren an der Aminogruppe des Thiazolringes sowohl an PEPT1 als auch an PEPT2 erhöht werden kann. Die Verlängerung von ATAA an der Carboxylgruppe führte nur bei PEPT2

zu deutlich höheren Bindungsaffinitäten. Jedoch sind hydrophobe Seitenketten des Konjugates erforderlich. Bei ATAA-Val und ATAA-Phe wurden für PEPT2 K_i -Werte gemessen, die ähnlich dem von Ceftributen sind. Ceftributen wird mit hoher Affinität von PEPT1 erkannt, die ATAA-Xaa Derivate werden jedoch mit weitaus geringerer Affinität an PEPT1 gebunden.

Die Untersuchungen zeigten, dass die in dieser Arbeit erstellten 3D-QSAR Modelle für ein gezieltes Wirkstoffdesign verwendet werden können. Es wurde jedoch deutlich, dass die Voraussagen unbekannter K_i -Werte von neuen Verbindungen genauer werden, wenn strukturell ähnliche Verbindungen im Trainingsdatensatz vorhanden sind.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es 3D-QSAR Modelle zu generieren, mit denen Bindungsaffinitäten diverser Substrate von PEPT1 und PEPT2 erklärt werden können. Ein weiteres Ziel bestand darin, Unterschiede in der Substratbindung beider H^+ /Peptidsymporter durch die Analyse von molekularen Feldern der CoMSIA-Modelle herauszuarbeiten.

Im ersten Teil der Arbeit wurden in umfangreichen experimentellen Untersuchungen Bindungsaffinitäten zahlreicher natürlicher Substrate von PEPT1 und PEPT2 gemessen. Erstmals wurden systematische Studien zur Untersuchung der Bindungsaffinitäten von Tripeptiden an PEPT1 und PEPT2 durchgeführt. Für PEPT2 wurde zudem eine Vielzahl von K_T -Werten von Dipeptiden an SKPT-Zellen gemessen.

Die Bindungsaffinitäten der Tripeptide liegen in einem ähnlichen Bereich wie die der Dipeptide. Es bestätigte sich, dass L-Aminosäuren sowie freie N- und C-Termini für hohe Affinitäten an PEPT1 und PEPT2 wichtig sind. Tripeptide mit hydrophoben Seitenketten werden von PEPT2 mit weitaus höherer Affinität gebunden als solche mit hydrophilen Seitenketten. Im Unterschied zu PEPT1 toleriert PEPT2 keine positive Ladung in der dritten Seitenkette R_3 der Tripeptide. Außerdem wurden einige peptidmimetische Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten an PEPT1 und PEPT2 untersucht.

3D-QSAR Untersuchungen von Liganden des intestinalen H^+ /Peptidsymporters PEPT1

Ausgehend von einem 3D-QSAR Modell, das zuvor in der Arbeitsgruppe generiert worden war, konnte ein Modell entwickelt werden, das neben Dipeptiden auch Tripeptide und β -Lactam-Antibiotika im Trainingsdatensatz enthält. Aus den Analysen der molekularen Felder konnte abgeleitet werden, dass solche β -Lactam-Antibiotika, die einen Aminothiazolring in der N-terminalen Seitenkette enthalten, anders im strukturellen Alignment angeordnet werden müssen. Daher wurden die β -Lactam-Antibiotika in zwei Gruppen eingeteilt, die Typ I und Typ II β -Lactam-Antibiotika. Letztere enthalten keinen solchen Aminothiazolring. Das erstellte CoMSIA-Modell zeichnet sich durch statistische Signifikanz mit hohen q^2 - und r^2 -Werten ($q^2 = 0,828$, $r^2 = 0,937$) aus. Anhand dieses Modells können erstmals unterschiedliche Bindungsaffinitäten von Tripeptiden und β -Lactam-Antibiotika erklärt werden und K_T -Werte strukturell ähnlicher Verbindungen vorausgesagt werden.

3D-QSAR Untersuchungen von Liganden des renalen H⁺/Peptidsymporters PEPT2 und Vergleiche mit PEPT1

Bestehend aus 83 Substanzen (β -Lactam-Antibiotika, Di- und Tripeptide), wurde erstmalig ein 3D-QSAR Modell für PEPT2 entwickelt. Dabei wurde das Alignment der PEPT1-Substrate übernommen und mit den Bindungsaffinitäten für PEPT2 korreliert. Das so erstellte Modell ist gekennzeichnet durch statistische Signifikanz ($q^2 = 0,755$; $r^2 = 0,893$) und ermöglicht es erstmals, Bindungsaffinitäten von Di- und Tripeptiden, sowie β -Lactam-Antibiotika zu erklären. Des Weiteren kann das Modell zur Voraussage von K_T -Werten unbekannter Verbindungen mit ähnlichen Strukturen herangezogen werden.

Der renale Peptidtransporter PEPT2 weist gegenüber PEPT1 ein ähnliches Substratspektrum auf, unterscheidet sich allerdings in Substrataffinität und Kapazität. Vergleiche der Bindungsaffinitäten und der 3D-QSAR Modelle von PEPT1 und PEPT2 Substraten konnten Aufschluss über Unterschiede in der Substrat-Bindetasche geben bzw. Selektivitätsunterschiede der beiden Transporter erklären.

Zum Vergleich der Ergebnisse der 3D-QSAR-Analysen beider Modelle für PEPT1 und PEPT2, wurde der Trainingsdatensatz des PEPT1-Modells an den des PEPT2-Modells angeglichen. Der Vergleich der molekularen Felder der beiden Modelle lieferte viele Erklärungen für die unterschiedlichen Substratspezifitäten von PEPT1 und PEPT2. Erstmals konnten Unterschiede der Substraterkennung zwischen PEPT1 und PEPT2 graphisch dargestellt werden. Folgende Ergebnisse konnten abgeleitet werden:

- die Substratbindetasche von PEPT2 weist vermutlich ein kleineres Volumen auf als die von PEPT1
- Hochaffine Liganden von PEPT1 enthalten eine hydrophobe Seitenkette R_2 . PEPT2 hingegen bevorzugt Liganden, die zusätzlich hydrophobe Eigenschaften in den R_1 und R_3 -Seitenketten aufweisen.
- PEPT1 ist tolerant gegenüber positiven und negativen Ladungen in den Seitenketten der Liganden. Für PEPT2 wurden Regionen im Bereich der R_1 und R_3 -Seitenketten identifiziert, in denen elektronenreiche Gruppen der Substrate im Vergleich zu elektronenarmen zu höherer Bindungsaffinität führen.
- Di- und Tripeptide mit D-konfigurierten C_α -Atom werden von PEPT1 mit niedriger Bindungsaffinität gebunden, während PEPT2 D-konfigurierte Aminosäurereste am N-Terminus toleriert.

Untersuchungen zur 2-Aminothiazol-4-essigsäure (ATAA)

Aus der Interpretation der molekularen Felder der erstellten 3D-QSAR Modelle konnte 2-Aminothiazol-4-essigsäure (ATAA) als neues untypisches Substrat für PEPT1 abgeleitet werden. Dieses Molekül ist Bestandteil vieler Wirkstoffe und weist viele Funktionalisierungsmöglichkeiten auf. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie wurde ATAA mit verschiedenen Aminosäuren an Amino- und Carboxylgruppe konjugiert. Anschließend erfolgten Konkurrenzexperimente an Caco-2 und SKPT Zellen, um K_i -Werte der ATAA-Derivate zu messen.

Vor allem die N-terminale Derivatisierung von ATAA (K_i PEPT1 = 4,9 mM; K_i PEPT2 = 6,6 mM) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Affinität bei beiden Peptidtransportern. Die Bindungsaffinität von Val-ATAA ist 73-fach höher an PEPT1 als ATAA bzw. 600-fach höher an PEPT2. Ein unerwartetes Resultat lieferte dagegen die Verlängerung des C-Terminus, die bei PEPT1 im Gegensatz zu PEPT2 zu keiner Erhöhung der Affinität führte. Daraus konnten zwei Schlussfolgerungen abgeleitet werden: A) Bei PEPT1-Liganden erfolgt die Bindung an den Transporter primär durch den N-Terminus. Kann ein Molekül Wechselwirkungen, die für eine Bindung mit hoher Affinität an PEPT1 notwendig sind, nicht ausbilden, können sie durch funktionelle Gruppen am C-Terminus nicht ausgeglichen werden. B) Sind am N-Terminus eines Liganden keine optimalen Eigenschaften für die Bindung an PEPT2 vorhanden, sind Wechselwirkungen durch hydrophobe Seitenketten am C-Terminus wichtig. Diese Ergebnisse sind hinsichtlich des Wirkstoffdesigns von großer Bedeutung.

Am Beispiel der Untersuchungen der Bindungsaffinitäten von ATAA-Derivaten an PEPT1 und PEPT2 konnte außerdem festgestellt werden, dass sich die in dieser Arbeit erstellten 3D-QSAR Modelle für die Voraussage von Bindungsaffinitäten strukturell ähnlicher Moleküle eignen.

In nachfolgenden Analysen könnten weitere Derivate von ATAA bezüglich ihrer Bindungsaffinität an PEPT1 und PEPT2 untersucht werden. Es könnten z. B. verschiedene hydrophobe Gruppen an der C-terminalen Methylgruppe substituiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob die ATAA-Derivate aktiv von PEPT1 und PEPT2 transportiert werden.

In weiterführenden Untersuchungen wäre es sinnvoll, die Trainingsdatensätze der 3D-QSAR Modelle für PEPT1 und PEPT2 mit geeigneten ACE-Inhibitoren und anderen peptidmimetischen Wirkstoffen zu erweitern.

Interessant wäre es auch, zu untersuchen, ob auch PEPT2 spezifisch für *trans*-Peptidbindungen ist und ob Tripeptide von beiden Transportern in *trans-trans*-Konformation

bevorzugt gebunden werden. In diesem Zusammenhang sollten die *cis-trans*-Gehalte von Tripeptiden unter physiologischen Bedingungen analysiert werden.

Außerdem könnten Modelle erstellt werden, die den aktiven Transport durch die H⁺/Peptidsymporter widerspiegeln (z.B. durch Verwendung von Fluxwerten, Transportraten, Strömen).

6 Literaturverzeichnis

- 1 Bodo, A., Bakos, E., Szeri, F., Varadi, A. & Sarkadi, B., **2003**. *The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity*. Toxicol. Lett., 11, 133-143.
- 2 Sai, Y. & Tsuji, A., **2004**. *Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches*. Drug Discov.Today, 9, 712-720.
- 3 Kubinyi, H., **1999**. *Chance favors the prepared mind--from serendipity to rational drug design*. J. Recept. Signal Transduct. Res., 19, 15-39.
- 4 Ganapathy, V., Brandsch, M. & Leibach, F. H., **1994**. *Intestinal transport of amino acids and peptides.*, in *Physiology of the gastrointestinal tract.*, L.R. Johnson (Hrsg.). Raven Press: Ltd., New York. 1773-1794.
- 5 Daniel, H., **1996**. *Function and molecular structure of brush border membrane peptide/H⁺ symporters*. J. Membrane Biol., 154, 197-203.
- 6 Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1996**. *Peptide transporters*. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens, 5, 395-400.
- 7 Adibi, S. A., **1997**. *Renal assimilation of oligopeptides: physiological mechanisms and metabolic importance*. Am. J. Physiol., 272, E723-E736.
- 8 Brandsch, M., Knütter, I. & Leibach, F. H., **2004**. *The intestinal H⁺/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships*. Eur. J. Pharm. Sci., 21, 53-60.
- 9 Ganapathy, M. E., Brandsch, M., Prasad, P. D., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1995**. *Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2*. J. Biol. Chem., 270, 25672-25677.
- 10 Brandsch, M., Knütter, I., Hartrodt, B., Gebauer, S., Theis, S., Boll, M., Rubio-Aliaga, 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*. Nova Acta Leopold., 87, 75-85.
- 11 Rubio-Aliaga, L. & Daniel, H., **2002**. *Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery*. Trends Pharmacol. Sci., 23, 434-440.
- 12 Groneberg, D. A., Fischer, A., Chung, F. & Daniel, H., **2004**. *Molecular mechanisms of pulmonary peptidomimetic drug and peptide transport*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 30, 251-260.
- 13 Chang, C. & Swaan, P. W., **2006**. *Computational approaches to modeling drug transporters*. Eur. J. Pharm. Sci., 27, 411-424.
- 14 Gebauer, S., Knütter, I., Hartrodt, B., 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.
- 15 Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E., **2000**. *The protein data bank*. Nucleic Acids Res., 28, 235-242.

- 16 Böhm, H.-J., Klebe, G. & Kubinyi, H., **1996**. *Wirkstoffdesign*. Heidelberg - Berlin - Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- 17 Klebe, G., **1993**. *Structural alignment of molecules.*, in *3D-QSAR in drug design.*, H. Kubinyi (Hrsg.). ESCOM: Leiden. 173-199.
- 18 Wermuth, C.-G. & Langer, T., **1993**. *Pharmacophore identification.*, in *3D QSAR in drug design.*, H. Kubinyi (Hrsg.). ESCOM: Leiden. 117-136.
- 19 Klebe, G., **1998**. *Comparative molecular similarity indices analysis: CoMSIA*. *Perspect. Drug Discov. Des.*, 12, 87-104.
- 20 Cramer III, R. D., DePriest, S. A., Patterson, D. E. & Hecht, P., **1993**. *The developing practice of comparative molecular field analysis.*, in *3D QSAR in drug design*, H. Kubinyi (Hrsg.). ESCOM: Leiden. 443-485.
- 21 Kim, K. H., **2001**. *3D-QSAR analysis of 2,4,5- and 2,3,4,5-substituted imidazoles as potent and nontoxic modulators of P-glycoprotein mediated MDR*. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 1517-1523.
- 22 Yates, C. R., Chang, C., Kearbey, J. D., Yasuda, K., Schuetz, E. G., Miller, D. D., Dalton, J. T. & Swaan, P. W., **2003**. *Structural determinants of P-glycoprotein-mediated transport of glucocorticoids*. *Pharm. Res.*, 20, 1794-1803.
- 23 Yarim, M., Moro, S., Huber, R., Meier, P. J., Kaseda, C., Kashima, T., Hagenbuch, B. & Folkers, G., **2005**. *Application of QSAR analysis to organic anion transporting polypeptide 1a5 (Oatp1a5) substrates*. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 463-471.
- 24 Suhre, W. M., Ekins, S., Chang, C., Swaan, P. W. & Wright, S. H., **2005**. *Molecular determinants of substrate/inhibitor binding to the human and rabbit renal organic cation transporters hOCT2 and rbOCT2*. *Mol. Pharmacol.*, 67, 1067-1077.
- 25 Viswanadhan, V. N., Ghose, A. K. & Weinstein, J. N., **1990**. *Mapping the binding site of the nucleoside transporter protein: a 3D-QSAR study*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1039, 356-366.
- 26 Hu, H., Endres, C. J., Chang, C., Umapathy, N. S., Lee, E. W., Fei, Y. J., Itagaki, S., Swaan, P. W., Ganapathy, V. & Unadkat, J. D., **2006**. *Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3)*. *Mol. Pharmacol.*, 69, 1542-1553.
- 27 Baringhaus, K.-H., Matter, H., Stengelin, S. & Kramer, W., **1999**. *Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na⁺/bile acid cotransporters of the rabbit. II. A reliable 3D QSAR pharmacophore model for the ileal Na⁺/bile acid cotransporter*. *J. Lipid Res.*, 40, 2158-2168.
- 28 Folkers, G., Merz, A. & Rognan, D., **1993**. *CoMFA: Scope and limitations.*, in *3D QSAR in drug design: theory, methods and applications*, H. Kubinyi (Hrsg.). ESCOM: Leiden, The Netherlands. 583-618.
- 29 Kim, K. H., Greco, G. & Novellino, E., **1998**. *A critical review of recent CoMFA applications*. *Perspect. Drug Discov. Des.*, 12-14, 257-315.
- 30 Weber, C., Wider, G., von Freyberg, B., Traber, R., Braun, W., Widmer, H. & Wüthrich, K., **1991**. *The NMR structure of cyclosporin A bound to cyclophilin in aqueous solution*. *Biochemistry*, 30, 6563-6574.

- 31 Nikiforovich, G. V., **1994**. *Computational molecular modeling in peptide drug design*. Int. J. Peptide Protein Res., 44, 513-531.
- 32 Leach, A. R., **1996**. *Molecular modelling - principles and applications*. Harlow: Addison Wesley Longman Limited.
- 33 Marshall, N. J., **1987**. *Computer-aided drug design*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 27, 193-213.
- 34 Marshall, N. J., Barry, C. D., Bosshard, H. E., Dammkoehler, R. A. & Dunn, D. A., **1979**. *The conformational parameter in drug design: the active analog approach, in Computer-assisted drug design, ACS Symp. Series 112*, E.C. Olsen & R.E. Christofersen (Hrsg.). American Chemical Society: Washington, DC. 205-226.
- 35 Cramer III, R. D., Patterson, D. E. & Bunce, J. D., **1989**. *Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA)*. Prog. Clin. Biol. Res. , 291, 161-165.
- 36 Gohlke, H. & Klebe, G., **2002**. *Ansätze zur Beschreibung und Vorhersage der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren*. Angew. Chem. Weinheim Bergstr. Ger., 114, 2764-2798.
- 37 Wold, S., Johansson, E. & Cocchi, M., **1993**. *PLS-partial least-squares projections to latent structures.*, in *3D QSAR in drug design.*, H. Kubinyi (Hrsg.). ESCOM: Leiden. 523-550.
- 38 Newey, H. & Smyth, D. H., **1959**. *The intestinal absorption of some dipeptides*. J. Physiol., 4, 48-56.
- 39 Newey, H. & Smyth, D. H., **1962**. *Cellular mechanisms in intestinal transfer of amino acids*. J. Physiol., 164, 527-551.
- 40 Addison, J. M., Burston, D. & Matthews, D. M., **1972**. *Evidence for the active transport of the dipeptide glycylsarcosine by hamster jejunum in vitro*. Clin. Sci., 43, 907-911.
- 41 Addison, J. M., Burston, D. & Matthews, D. M., **1973**. *Carnosine transport by hamster jejunum in vitro and its inhibition by other di- and tripeptides*. Clin. Sci. Mol. Med., 45, 3P-4P.
- 42 Penzotti, S. C., Jr. & Poole, J. W., **1974**. *Transport mechanisms of beta-lactam antibiotics across everted rat gut*. J. Pharm. Sci., 63, 1803-1806.
- 43 Dixon, C. & Mizen, L. W., **1977**. *Absorption of amino penicillins from everted rat intestine*. J. Physiol., 269, 549-559.
- 44 Fei, Y. J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F. H., Romero, M. F., Singh, S. K., Boron, W. F. & Hediger, M. A., **1994**. *Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter*. Nature, 368, 563-566.
- 45 Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **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.
- 46 Benoit, F. L. & Watten, R. H., **1968**. *Renal tubular transport by hydroxyproline peptides: Evidence for reabsorption and secretion*. Metabolism, 17, 20-33.
- 47 Nutzenadel, W. & Scriver, C. R., **1976**. *Uptake and metabolism of β -alanine and L-carnosine by rat tissue in vitro: role in nutrition*. Am. J. Physiol., 230, 643-651.

- 48 Inui, K., Okano, T., Takano, M., Saito, H. & Hori, R., **1984**. *Carrier-mediated transport of cephalixin via the dipeptide transport system in rat renal brush-border membrane vesicles*. *Biochim. Biophys. Acta*, 769, 449-454.
- 49 Inui, K., Okano, T., Takano, M., Kitazawa, S. & Hori, R., **1983**. *Carrier-mediated transport of amino-cephalosporins by brush border membrane vesicles isolated from rat kidney cortex*. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 621-626.
- 50 Adibi, S. A., Krzysik, B. A. & Drash, A. L., **1977**. *Metabolism of intravenously administered dipeptides in rats: effects on amino acid pools, glucose concentration and insulin and glucagon secretion*. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 52, 193-204.
- 51 Silbernagl, S., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1987**. *H⁺ gradient driven dipeptide reabsorption in proximal tubule of rat kidney. Studies in vivo and in vitro*. *Am. J. Physiol.*, 253, F448-F457.
- 52 Tirupathi, C., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1990**. *Evidence for tripeptide-proton symport in renal brush border membrane vesicles*. *J. Biol. Chem.*, 265, 2048-2053.
- 53 Daniel, H. & Rubio-Aliaga, I., **2003**. *An update on renal peptide transporters*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 284, F885-F892.
- 54 Ocheltree, S. M., Shen, H., Hu, Y., Keep, R. F. & Smith, D. E., **2005**. *Role and relevance of PEPT2 in the kidney and choroid plexus: in vivo studies with glycylsarcosine in wild-type and PEPT2 knockout mice*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315, 240-247.
- 55 Frey, I. M., Rubio-Aliaga, I., Klempt, M., Wolf, E. & Daniel, H., **2006**. *Phenotype analysis of mice deficient in the peptide transporter PEPT2 in response to alterations in dietary protein intake*. *Pflugers Arch.*, V452, 300-306.
- 56 Ogihara, H., Saito, H., Shin, B. C., Terada, T., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Inui, K. & Takata, K., **1996**. *Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 220, 848-852.
- 57 Bockman, D. E., Ganapathy, V., Oblak, T. G. & Leibach, F. H., **1997**. *Localization of peptide transporter in nuclei and lysosomes of the pancreas*. *Int. J. Pancreatol.*, 22, 221-225.
- 58 Thamotharan, M., Lombardo, Y. B., Bawani, S. Z. & Adibi, S. A., **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.
- 59 Shen, H., Smith, D. E., Yang, T., Huang, Y. G., Schnermann, J. B. & Brosius, F. C., 3rd., **1999**. *Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney*. *Am. J. Physiol.*, 276, F658-F665.
- 60 Zhu, T., Cheng, X. Z., Steel, A., Hediger, M. A. & Smith, D. E., **2000**. *Differential recognition of ACE inhibitors in Xenopus laevis oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2*. *Pharm. Res.*, 17, 526-532.
- 61 Chen, X. Z., Zhu, T., Smith, D. E. & Hediger, M. A., **1999**. *Stoichiometry and kinetics of the high-affinity H⁺-coupled peptide transporter PepT2*. *J. Biol. Chem.*, 274, 2773-2779.

- 62 Knütter, I., Rubio-Aliaga, 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-G229.
- 63 Berger, U. V. & Hediger, M. A., **1999**. *Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system*. Anat. Embryol., 199, 439 - 449.
- 64 Groneberg, D. A., Döring, F., Nickolaus, M., Daniel, H. & Fischer, A., **2001**. *Expression of PEPT2 peptide transporter mRNA and protein in glial cells of rat dorsal root ganglia*. Neurosci. Lett., 304, 181-184.
- 65 Groneberg, D. A., Nickolaus, M., Springer, J., Döring, F., Daniel, H. & Fischer, A., **2001**. *Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake*. Am. J. Pathol., 158, 707-714.
- 66 Groneberg, D. A., 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. Endocrinol. Metab., 282, E1172 - E1179.
- 67 Ocheltree, S. M., Keep, R. F., Shen, H., Yang, D., Hughes, B. A. & Smith, D. E., **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., 9, 1364-1372.
- 68 Fujita, T., Kishida, T., Wada, M., Okada, N., Yamamoto, A., Leibach, F. H. & 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.
- 69 Lu, H. & Klaassen, C., **2005**. *Tissue distribution and thyroid hormone regulation of Pept1 and Pept2 mRNA in rodents*. Peptides, 27, 850-857.
- 70 Rühl, A., Hoppe, S., Frey, I., Daniel, H. & Schemann, M., **2005**. *Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system*. J. Comp. Neurol., 490, 1-11.
- 71 Lin, H. & King, N., **2006**. *Demonstration of functional dipeptide transport with expression of PEPT2 in guinea pig cardiomyocytes*. Pflugers Arch., 453, 915-922.
- 72 Dringen, R., Hamprecht, B. & Bröer, S., **1998**. *The peptide transporter PEPT2 mediates the uptake of the glutathione precursor Cys-Gly in astroglia-rich primary cultures*. J. Neurochem., 71, 388-393.
- 73 Dieck, T. S., 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 β -Ala-Lys-N_ε-AMCA in astrocytes*. Glia, 25, 10-20.
- 74 Teuscher, N. S., Keep, R. F. & Smith, D. E., **2001**. *PEPT2-mediated uptake of neuropeptides in rat choroid plexus*. Pharm. Res., 18, 807-813.
- 75 Shu, C., Shen, H., Teuscher, N. S., Lorenzi, P. J., Keep, R. F. & Smith, D. E., **2002**. *Role of PEPT2 in peptide/mimetic trafficking at the blood-cerebrospinal fluid barrier: studies in rat choroid plexus epithelial cells in primary culture*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 301, 820-829.

-
- 76 Hu, Y., Ocheltree, S. M., Xiang, J., Keep, R. F. & Smith, D. E., **2005**. *Glycyl-L-glutamine disposition in rat choroid plexus epithelial cells in primary culture: role of PEPT2*. *Pharm. Res.*, 22, 1281-1286.
- 77 Shen, H., Keep, R. F., Hu, Y. & Smith, D. E., **2005**. *PEPT2 (Slc15a2)-mediated unidirectional transport of cefadroxil from CSF into choroid plexus*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315, 1101-1108.
- 78 Rubio-Aliaga, I., Frey, I., Boll, M., Groneberg, D. A., Eichinger, H. M., Balling, R. & Daniel, H., **2003**. *Targeted disruption of the peptide transporter Pept2 gene in mice defines its physiological role in the kidney*. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 3247-3252.
- 79 Shen, H., Smith, D. E., Keep, R. F., Xiang, J. & Brosius, F. C. r., **2003**. *Targeted disruption of the PEPT2 gene markedly reduces dipeptide uptake in choroid plexus*. *J. Biol. Chem.*, 278, 4786-4791.
- 80 Lucas, M., **1983**. *Determination of acid surface pH in vivo in rat proximal jejunum*. *Gut*, 24, 734-739.
- 81 Daniel, H., Fett, C. & Kratz, A., **1989**. *Demonstration and modification of intervillous pH profiles in rat small intestine in vitro*. *Am. J. Physiol.*, 257, G489-G495.
- 82 McKay, D. M. & Baird, A. W., **1999**. *Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport*. *Gut*, 44, 283-289.
- 83 Mackenzie, B., Fei, Y. J., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1996**. *The human intestinal H⁺/peptide cotransporter hPEPT1 transports differentially-charged dipeptides with identical electrogenic properties*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1284, 125-128.
- 84 Thwaites, D. T., Hirst, B. H. & Simmons, N. L., **1993**. *Direct assessment of dipeptide/H⁺ symport in intact human intestinal (Caco-2) epithelium: a novel method utilizing continuous intracellular pH measurement*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, 432-438.
- 85 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.
- 86 Irie, M., Terada, T., Katsura, T., Matsuoka, S. & Inui, K., **2005**. *Computational modelling of H⁺-coupled peptide transport via human PEPT1*. *J. Physiol. (Lond.)*, 565, 429-439.
- 87 Leibach, F. H. & Ganapathy, V., **1996**. *Peptide transport in the intestine and the kidney*. *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 99-119.
- 88 Meredith, D. & Boyd, C. A. R., **2000**. *Structure and function of eucaryotic peptide transporters*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, 754-778.
- 89 Herrera-Ruiz, D. & Knipp, G. T., **2003**. *Current perspectives on established and putative mammalian oligopeptide transporters*. *J. Pharm. Sci.*, 92, 691-714.
- 90 Daniel, H. & Kottra, G., **2004**. *The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology*. *Pflugers Arch.*, 447, 610-618.
- 91 Terada, T. & Inui, K., **2004**. *Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery*. *Curr. Drug Metab.*, 5, 85-94.

- 92 Boll, M., Markovich, D., Weber, W. M., Korte, H., Daniel, H. & Murer, H., **1994**. *Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, β -lactam antibiotics and ACE-inhibitors*. Pflugers Arch., 429, 146-149.
- 93 Boll, M., Herget, M., Wagener, M., Weber, W. M., Markovich, D., Biber, J., Clauss, W., Murer, H. & Daniel, H., **1996**. *Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 284-289.
- 94 Liang, R., Fei, Y. J., Prasad, P. D., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Feng, T. L., Hediger, M. A., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1995**. *Human intestinal H^+ /peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization*. J. Biol. Chem., 270, 6456-6463.
- 95 Liu, W., Liang, R., Ramamoorthy, S., Fei, Y.-J., Ganapathy, M. E., Hediger, M. A., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1995**. *Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H^+ /peptide cotransporter family, from human kidney*. Biochim. Biophys. Acta, 1235, 461-466.
- 96 Verri, T., Kottra, G., Romano, A., Tiso, N., Peric, M., Maffia, M., Boll, M., Argenton, F., Daniel, H. & Storelli, C., **2003**. *Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PEPT1-type peptide transporter1*. FEBS Letters, 549, 115-122.
- 97 Romano, A., Kottra, G., Barca, A., Tiso, N., Maffia, M., Argenton, F., Daniel, H., Storelli, C. & Verri, T., **2006**. *High-affinity peptide transporter PEPT2 (SLC15A2) of the zebrafish *Danio rerio*: functional properties, genomic organization, and expression analysis*. Physiol. Genomics, 24, 207-217.
- 98 Terada, T., Saito, H., Mukai, M. & Inui, K., **1997**. *Characterization of stably transfected kidney epithelial cell line expressing rat H^+ /peptide cotransporter PEPT1: localization of PEPT1 and transport of β -lactam antibiotics*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 281, 1415-1421.
- 99 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.
- 100 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.
- 101 Fei, Y.-J., Sugawara, M., Liu, J.-C., Li, H. W., Ganapathy, V., Ganapathy, M. E. & Leibach, F. H., **2000**. *cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1*. Biochim. Biophys. Acta 1492, 145-154.
- 102 Klang, J. E., Burnworth, L. A., Pan, Y. X., Webb, K. E., Jr. & Wong, E. A., **2005**. *Functional characterization of a cloned pig intestinal peptide transporter (pPepT1)*. J. Anim. Sci., 83, 172-181.
- 103 Zhang, E. Y., Emerick, R. M., Pak, Y. A., Wrighton, S. A. & Hillgren, K. M., **2004**. *Comparison of human and monkey peptide transporters: PEPT1 and PEPT2*. Mol. Pharm., 1, 210-210.

- 104 Van, L., Pan, Y. X., Bloomquist, J. R., Webb, K. E., Jr. & Wong, E. A., **2005**. *Developmental regulation of a turkey intestinal peptide transporter (PepT1)*. *Poult. Sci.*, 84, 75-82.
- 105 Fei, Y. J., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1998**. *Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 58, 239-261.
- 106 Tame, J. R., Dodson, E. J., Murshudov, G., Higgins, C. F. & Wilkinson, A. J., **1995**. *The crystal structures of the oligopeptide-binding protein OppA complexed with tripeptide and tetrapeptide ligands*. *Structure*, 15, 1395-1406.
- 107 Dunten, P. & Mowbray, S. L., **1995**. *Crystal structures of the dipeptide binding protein from Escherichia coli involved in active transport and chemotaxis*. *Protein Sci.*, 4, 2327-2334.
- 108 Payne, J. W., Grail, B. M. & Marshall, N. J., **2000**. *Molecular recognition templates of peptides: driving force for molecular evolution of peptide transporters*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 283-289.
- 109 Payne, J. W., Grail, B. M., Gupta, S., Ladbury, J. E., Marshall, N. J., O'Brien, R. & Payne, G. M., **2000**. *Structural basis for recognition of dipeptides by peptide transporters*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 384, 9-23.
- 110 Fei, Y. J., Liu, W., Prasad, P. D., Kekuda, R., Oblak, T. G., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1997**. *Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H⁺/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2*. *Biochemistry*, 36, 452-460.
- 111 Terada, T., Saito, H., Mukai, M. & Inui, K., **1996**. *Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H⁺/peptide cotransporter, PEPT1*. *FEBS Lett.*, 394, 196-200.
- 112 Bolger, M. B., Haworth, I. S., Yeung, A. K., Ann, D., von Grafenstein, H., Hamm-Alvarez, S., Okamoto, C. T., Kim, K.-J., Basu, S. K., Wu, S. & Lee, V. H., **1998**. *Structure, function, and molecular modeling approaches to the study of the intestinal dipeptide transporter PepT1*. *J. Pharm. Sci.*, 87, 1286-1291.
- 113 Yeung, A. K., Basu, S. K., Wu, S. K., Chu, C., Okamoto, C. T., Hamm-Alvarez, S. F., von Grafenstein, H., Shen, W.-C., Kim, K.-J., Bolger, M. B., Haworth, I. S., Ann, D. K. & Lee, V. H. L., **1998**. *Molecular identification of a role for tyrosine 167 in the function of the human intestinal proton-coupled dipeptide transporter (hPepT1)*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250, 103-107.
- 114 Döring, F., Martini, C., Walter, J. & Daniel, H., **2002**. *Importance of a small N-terminal region in mammalian peptide transporters for substrate affinity and function*. *J. Membr. Biol.*, 186, 55-62.
- 115 Meredith, D., **2004**. *Site-directed mutation of arginine 282 to glutamate uncouples the movement of peptides and protons by the rabbit proton-peptide cotransporter PepT1*. *J. Biol. Chem.*, 279, 15795-15798.
- 116 Kulkarni, A. A., Davies, D. L., Links, J. S., Patel, L. N., Lee, V. H. L. & Haworth, I. S., **2007**. *A charge pair interaction between Arg282 in transmembrane segment 7 and Asp341 in transmembrane segment 8 of hPepT1*. *Pharm. Res.*, 24, 66-72.

- 117 Vig, B. S., Stouch, T. R., Timoszyk, J. K., Quan, Y., Wall, D. A., Smith, R. L. & Faria, T. N., **2006**. *Human PEPT1 pharmacophore distinguishes between dipeptide transport and binding*. *J. Med. Chem.*, 49, 3636-3644.
- 118 Kararli, T. T., **1989**. *Gastrointestinal absorption of drugs*. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6, 39-86.
- 119 Chesney, R. W., Jones, D. & Zelikovic, I., **1993**. *Renal amino acid transport: cellular and molecular events from clearance studies to frog eggs*. *Pediatr. Nephrol.*, 7, 574-584.
- 120 Hidalgo, I. J., Raub, T. J. & Borchard, R. T., **1989**. *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. *Gastroenterology*, 96, 736-749.
- 121 Delie, F. & Rubas, W., **1997**. *A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model*. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 14, 221-286.
- 122 Kimmich, G. A., **1990**. *Isolation of intestinal epithelial cells and evaluation of transport functions*. *Methods Enzymol.*, 192, 324-340.
- 123 Ganapathy, V., Mendicino, J. F. & Leibach, F. H., **1981**. *Transport of glycyl-L-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit*. *J. Biol. Chem.*, 256, 118-124.
- 124 Kramer, W., Leipe, I., Petzoldt, E. & Girbig, F., **1988**. *Characterization of the transport system for β -lactam antibiotics and dipeptides in rat renal brush-border membrane vesicles by photoaffinity labeling*. *Biochim. Biophys. Acta*, 939, 167-172.
- 125 Fogh, J., Fogh, J. M. & 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.
- 126 Brandsch, M., Brandsch, C., Prasad, P. D., Ganapathy, V., Hopper, U. & Leibach, F. H., **1995**. *Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H^+ /peptide cotransporter*. *FASEB J.*, 9, 1489-1496.
- 127 Döring, F., Michel, T., Rosel, A., Nickolaus, M. & Daniel, H., **1998**. *Expression of the mammalian renal peptide transporter PEPT2 in the yeast *Pichia pastoris* and applications of the yeast system for functional analysis*. *Mol. Membr. Biol.*, 15, 79-88.
- 128 Liu, W., Liang, R., Ramamoorthy, S., Fei, Y.-J., Ganapathy, M. E., Hediger, M. A., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1995**. *Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H^+ /peptide cotransporter family, from human kidney*. *Biochim Biophys Acta*, 1235, 461-466.
- 129 Swaan, P. W. & Tukker, J. J., **1997**. *Molecular determinants of recognition for the intestinal peptide carrier*. *J. Pharm. Sci.*, 86, 596-602.
- 130 Bailey, P. D., Boyd, C. A. R., Collier, I. D., George, J. P., Kellett, G. L., Meredith, D., Morgan, K. M., Pettecrew, R. & Price, R. A., **2006**. *Affinity prediction for substrates of the peptide transporter PepT1*. *Chem. Commun. (Camb.)*, 21, 323-325.
- 131 Vabeno, J., Nielsen, C. U., Steffansen, B., Lejon, T., Sylte, I., Jorgensen, F. S. & Luthman, K., **2005**. *Conformational restrictions in ligand binding to the human intesti-*

- nal di-/tripeptide transporter: implications for design of hPEPT1 targeted prodrugs. Bioorg. Med. Chem.*, 13, 1977-1988.
- 132 Bailey, P. D., Boyd, C. A. R., Bronk, J. R., Collier, I. D., Meredith, D., Morgan, K. M. & Temple, C. S., **2000**. *How to make drugs orally active: a substrate template for peptide transporter PEPT1. Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 39, 505-508.
- 133 Andersen, R., Jorgensen, F. S., Olsen, L., Vabeno, J., Thorn, K., Nielsen, C. U. & Steffansen, B., **2006**. *Development of a QSAR model for binding of tripeptides and tripeptidomimetics to the human intestinal di-/tripeptide transporter hPEPT1. Pharm. Res.*, 23, 483-492.
- 134 Tukker, J. J. & Swaan, P. W., **1992**. *Molecular features essential for active peptide transport. Pharm. Res.*, 9, 180.
- 135 Marshall, N. J., Grail, B. M. & Payne, J. W., **2001**. *Predominant torsional forms adopted by oligopeptide conformers in solution: Parameters for molecular recognition. J. Pept. Sci.*, 7, 175-189.
- 136 Gupta, S. & Payne, J. W., **2001**. *Evaluation of the conformational propensities of peptide isosteres as a basis for selecting bioactive pseudopeptides. J. Peptide Res.*, 58, 546-561.
- 137 Li, J. & Hidalgo, I. J., **1996**. *Molecular modeling study of structural requirements for the oligopeptide transporter. J. Drug Target.*, 4, 9-17.
- 138 Swaan, P. W., Stehouwer, M. C. & Tukker, J. J., **1995**. *Molecular mechanism for the relative binding affinity to the intestinal peptide carrier. Comparison of three ACE-inhibitors: enalapril, enalaprilat, and lisinopril. Biochim. Biophys. Acta*, 1236, 31-38.
- 139 Li, J., Tamura, K., Lee, C. P., Smith, P. L., Borchardt, R. T. & Hidalgo, I. J., **1998**. *Structure-affinity relationships of Val-Val and Val-Val-Val stereoisomers with the apical oligopeptide transporter in human intestinal Caco-2 cells. J. Drug Target.*, 5, 317-327.
- 140 Ekins, S., Johnston, J. S., Bahadduri, P. M., D'Souza, V. M., Ray, A., Chang, C. & Swaan, P. W., **2005**. *In vitro and pharmacophore-based discovery of novel hPEPT1 inhibitors. Pharm. Res.*, 22, 512-517.
- 141 Swaan, P. W., Koops, B. C., Moret, E. E. & Tukker, J. J., **1998**. *Mapping the binding site of the small intestinal peptide carrier (PepT1) using comparative molecular field analysis. Recept. Channels*, 6, 189-200.
- 142 Wanchana, S., Yamashita, F., Hara, H., Fujiwara, S.-I., Akamatsu, M. & Hashida, M., **2004**. *Two- and three-dimensional QSAR of carrier-mediated transport of β -lactam antibiotics in Caco-2 cells. J. Pharm. Sci.*, 93, 3057-3065.
- 143 Cruciani, G., Pastor, M. & Guba, W., **2000**. *VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. Eur. J. Pharm. Sci.*, 11, S29-39.
- 144 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.
- 145 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.

- 146 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.
- 147 Brandsch, M., Thunecke, F., Küllertz, G., Schutkowski, M., Fischer, G. & Neubert, K., **1998**. *Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide Symporter, PEPT1*. J. Biol. Chem., 273, 3861-3864.
- 148 Hartrodt, B., Theis, S., Knütter, I., Börner, V., Born, I., Brandsch, M., Daniel, H. & Neubert, K. *New insights into the stereospecificity of the intestinal H⁺/peptide symporter*. in *Peptides 2000*. **2001** Montpellier, France: EDK.
- 149 Daniel, H., Morse, E. L. & Adibi, S. A., **1992**. *Determination of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane*. J. Biol. Chem., 267, 9565-9573.
- 150 Terada, T., Sawada, K., Irie, M., Saito, H., Hashimoto, Y. & Inui, K., **2000**. *Structural requirements for determining the substrate affinity of peptide transporters PEPT1 and PEPT2*. Pflugers Arch., 440, 679-684.
- 151 Meredith, D., Temple, C. S., Guha, N., Sword, C. J., Boyd, C. A. R., Collier, I. D., Morgan, K. M. & Bailey, P. D., **2000**. *Modified amino acids and peptides as substrates for the intestinal peptide transporter PepT1*. Eur. J. Biochem., 267, 3723-3728.
- 152 Snyder, N. J., Tabas, L. B., Berry, D. M., Duckworth, D. C., Spry, D. O. & Dantzig, A. H., **1997**. *Structure-activity relationship of carbacephalosporins and cephalosporins: antibacterial activity and interaction with the intestinal proton-dependent dipeptide transport carrier of Caco-2 cells*. Antimicrob. Agents Chemother., 41, 1649-1657.
- 153 Okano, T., Inui, K., Takano, M. & Hori, R., **1986**. *H⁺ gradient-dependent transport of aminocephalosporins in rat intestinal brush-border membrane vesicles. Role of dipeptide transport system*. Biochem. Pharmacol., 35, 1781-1786.
- 154 Wenzel, U., Gebert, I., Weintraut, H., Weber, W. M., Clauss, W. & Daniel, H., **1996**. *Transport characteristics of differently charged cephalosporin antibiotics in oocytes expressing the cloned intestinal peptide transporter PepT1 and in human intestinal Caco-2 cells*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 277, 831-839.
- 155 Daniel, H. & Adibi, S. A., **1993**. *Transport of β -lactam antibiotics in kidney brush border membrane. Determinants of their affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter*. J. Clin. Invest., 92, 2215-2223.
- 156 Tamai, I. & Tsuji, A., **1987**. *Transport mechanism of cephalixin in isolated hepatocytes*. J. Pharmacobiodyn., 10, 632-638.
- 157 Muranushi, N., Horie, K., Masuda, K. & Hirano, K., **1994**. *Characteristics of ceftibuten uptake into Caco-2 cells*. Pharm. Res., 11, 1761-1765.
- 158 Hidalgo, I. J., Bhatnagar, P., Lee, C. P., Miller, J., Cucullino, G. & Smith, P. L., **1995**. *Structural requirements for interaction with the oligopeptide transporter in Caco-2 cells*. Pharm. Res., 12, 317-319.
- 159 Terada, T., Saito, H., Mukai, M. & Inui, K., **1997**. *Recognition of β -lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, in LLC-PK₁ cells*. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 273, F706-F711.

-
- 160 Eddy, E. P., Wood, C., Miller, J., Wilson, G. & Hidalgo, I. J., **1995**. *A comparison of the affinities of dipeptides and antibiotics for the di-/tripeptide transporter in Caco-2 cells*. *Int. J. Pharm.*, 115, 79-86.
- 161 Bai, J. P. F. & Amidon, G. L., **1992**. *Structural specificity of mucosal-cell transport and metabolism of peptide drugs: implication for oral peptide drug delivery*. *Pharm. Res.*, 9, 969-978.
- 162 Shu, C., Shen, H., Hopfer, U. & Smith, D. E., **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.
- 163 Ganapathy, M. E., Huang, W., Wang, H., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1998**. *Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246, 470-475.
- 164 Sugawara, M., Huang, W., Fei, Y.-J., Leibach, F. H., Ganapathy, V. & Ganapathy, M. E., **2000**. *Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2*. *J. Pharm. Sci.*, 89, 781-789.
- 165 Döring, F., Walter, J., Will, J., Föcking, M., Boll, M., Amasheh, S., Clauss, W. & Daniel, H., **1998**. *Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications*. *J. Clin. Invest.*, 101, 2761-2767.
- 166 Bravo, S. A., Nielsen, C. U., Frokjaer, S. & Brodin, B., **2005**. *Characterization of rPEPT2-mediated Gly-Sar transport parameters in the rat kidney proximal tubule cell line SKPT-0193 cl.2 cultured in basic growth media*. *Mol. Pharm.*, 2, 98-108.
- 167 Neumann, J., Bruch, M., Gebauer, S. & Brandsch, M., **2004**. *Transport of the phosphonodipeptide alafosfalin by the H⁺/peptide cotransporter PEPT1 and PEPT2 in intestinal and renal epithelial cells*. *Eur. J. Biochem.*, 271, 2012-2017.
- 168 Theis, S., Hartrodt, B., Kottra, G., Neubert, K. & Daniel, H., **2002**. *Defining minimal structural features in substrates of the H⁺/peptide cotransporter PEPT2 using novel amino acid and dipeptide derivatives*. *Mol. Pharm.*, 61, 214-221.
- 169 Döring, F., Will, J., Amasheh, S., Clauss, W., Ahlbrecht, H. & Daniel, H., **1998**. *Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter*. *J. Biol. Chem.*, 273, 23211-23218.
- 170 Bill, R. M., **2001**. *Yeast - a panacea for the structure-function analysis of membrane proteins?* *Curr. Genet.*, 40, 157-171.
- 171 Cheng, Y. & Prusoff, W. H., **1973**. *Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction*. *Biochem. Pharmacol.*, 22, 3099-3108.
- 172 SYBYL 6.9 and 7.0, Tripos Associates, Inc.: St. Louis, USA.
- 173 Cohen, N. C., **1983**. *β-Lactam antibiotics: geometrical requirements for antibacterial activities*. *J. Med. Chem.*, 26, 259-264.
- 174 Allen, F. H., Davies, J. E., Galloy, J. J., Jonson, O., Kennard, O., Macrae, C. F., Mitchell, E. M., Mitchell, G. F., Smith, J. M. & Watson, D. G., **1991**. *The development*

- of versions 3 and 4 of the Cambridge Structural Database System.* J. Chem. Inf. Comput. Sci., 31, 187-204.
- 175 Muranushi, N., Yoshikawa, T., Yoshida, M., Oguma, T., Hirano, K. & Yamada, H., **1989.** *Transport characteristics of ceftibuten, a new oral cephem, in rat intestinal brush-border membrane vesicles: relationship to oligopeptide and amino β -lactam transport.* Pharm. Res., 6, 308-312.
- 176 Gasteiger, J. & Marsili, M., **1980.** *Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges.* Tetrahedron, 36, 3219-3222.
- 177 Clark, M., Cramer III, R. D. & Van Opdenbosch, N., **1989.** *Validation of the general purpose tripos 5.2 force field.* J. Comput. Chem., 10, 982-1012.
- 178 Marshall, N. J. & Payne, J. W., **2001.** *The importance of electrostatic charge and dielectric constant in conformational analysis of biologically active dipeptides.* J. Mol. Model., 7, 112-119.
- 179 Schinke, H., **1995.** Dissertation, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg.
- 180 Böhm, M., Stürzebecher, J. & Klebe, G., **1999.** *Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses using comparative molecular field analysis and comparative molecular similarity indices analysis to elucidate selectivity differences of inhibitors binding to trypsin, thrombin and factor Xa.* J. Med. Chem., 42, 458-477.
- 181 Brandsch, M., Brandsch, C., Ganapathy, M. E., Chew, C. S., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1997.** *Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H^+ /peptide cotransport systems in intestine (PEPT1) and in kidney (PEPT2).* Biochim. Biophys. Acta, 1324, 251-262.
- 182 Ganapathy, M. E., Prasad, P. D., Mackenzie, B., Ganapathy, V. & Leibach, F. H., **1997.** *Interaction of anionic cephalosporines with the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2.* Biochim. Biophys. Acta, 1324, 296-308.
- 183 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, 61-47.
- 184 Biegel, A., **2002.** *Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Substraten des intestinalen Peptidtransporters PEPT1.* Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 185 Friedmann, D. I. & Amidon, G. L., **1989.** *Passive and carrier-mediated intestinal absorption components of two angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor prodrugs in rats: enalapril and fosinopril.* Pharm. Res., 12, 1043-1047.
- 186 Lin, C. J., Akarawut, W. & Smith, D. E., **1999.** *Competitive inhibition of glycylsarcosine transport by enalapril in rabbit renal brush border membrane vesicles: interaction of ACE inhibitors with high-affinity H^+ /peptide symporter.* Pharm. Res., 16, 609-615.
- 187 Thwaites, D. T., Cavet, M., Hirst, B. H. & Simmons, N. L., **1995.** *Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.* Br. J. Pharmacol., 114, 981-986.
- 188 Belpoggi, F., Soffritti, M., Padovani, M., Esposti, D. D., Lauriola, M. & Minardi, F., **2006.** *Results of long-term carcinogenicity bioassay on sprague-dawley rats exposed to aspartame administered in feed.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1076, 559-577.

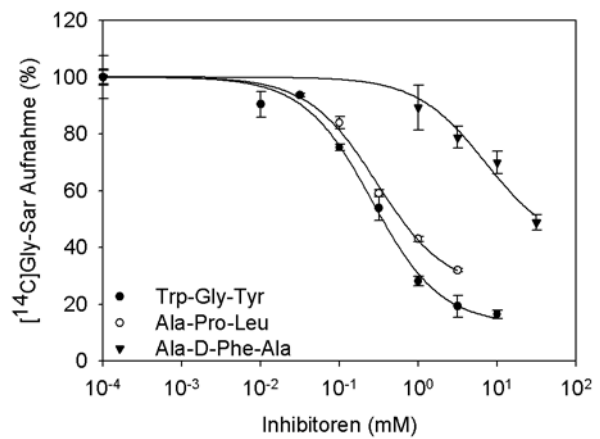
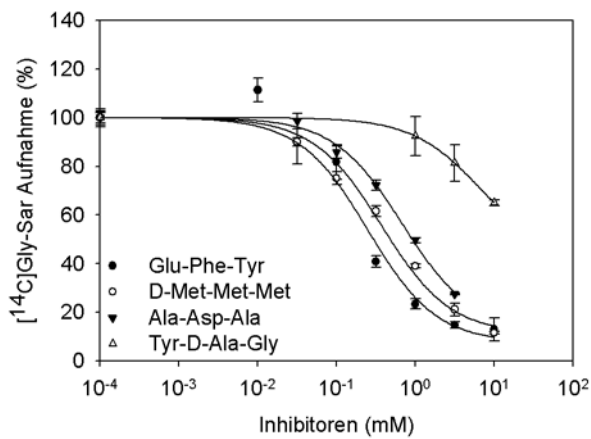
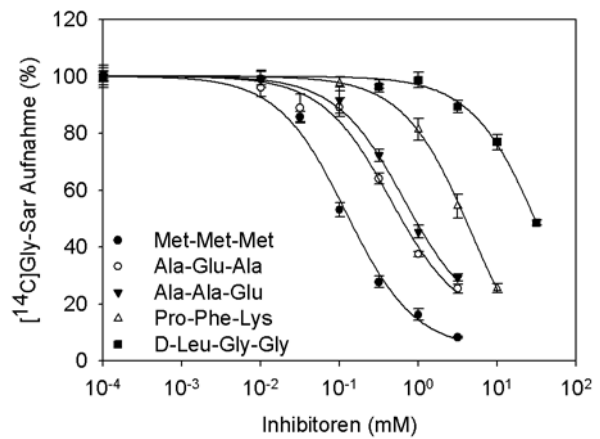
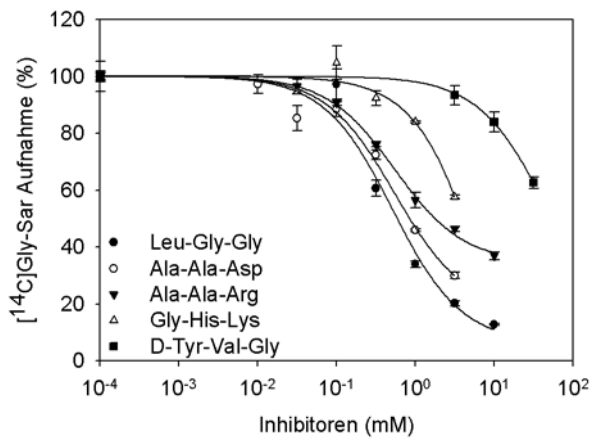
-
- 189 Boudes, P. F., **2006**. *The challenges of new drugs benefits and risks analysis: lessons from the ximelagatran FDA Cardiovascular Advisory Committee*. *Contemp. Clin. Trials*, 5, 432-440.
- 190 Gustafsson, D., Nystrom, J., Carlsson, S., Bredberg, U., Eriksson, U., Gyzander, E., Elg, M., Antonsson, T., Hoffmann, K., Ungell, A., Sorensen, H., Nagard, S., Abrahamsson, A. & Bylund, R., **2001**. *The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects*. *Thromb. Res.*, 101, 171-181.
- 191 Börner, V., Fei, Y.-J., Hartrodt, B., Ganapathy, V., Leibach, F. H., Neubert, K. & Brandsch, M., **1998**. *Transport of amino acid aryl amides by the intestinal H⁺/peptide cotransporter system, PEPT1*. *Eur. J. Biochem.*, 255, 698-702.
- 192 Martin, Y. C., Bures, M. G., Danaher, E. A., DeLazzer, J., Lico, I. & Pavlik, P. A., **1993**. *A fast new approach to pharmacophore mapping and its application to dopaminergic and benzodiazepine agonists*. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 7, 83-102.
- 193 Meredith, D., Boyd, C. A. R., Bronk, J. R., Bailey, P. D., Morgan, K. M., Collier, I. D. & Temple, C. S., **1998**. *4-Aminomethylbenzoic acid is a non-translocated competitive inhibitor of the epithelial peptide transporter PepT1*. *J. Physiol.*, 512, 629-634.
- 194 Temple, C. S., Stewart, A. K., Meredith, D., Lister, N. A., Morgan, K. M., Collier, I. D., Vaughan-Jones, R. D., Boyd, C. A. R., Bailey, P. D. & Bronk, J. R., **1998**. *Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter*. *J. Biol. Chem.*, 273, 20-22.
- 195 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.
- 196 Tamura, K., Lee, C.-P., Smith, P. L. & Borchardt, R. T., **1996**. *Metabolism, uptake, and transepithelial transport of the stereoisomers of Val-Val-Val in the human intestinal cell line, Caco-2*. *Pharm. Res.*, 13, 1663-1667.
- 197 Li, F., Hong, L., Mau, C.-I., Chan, R., Hendricks, T., Dvorak, C., Yee, C., Harris, J. & Alfredson, T., **2006**. *Transport of levovirin prodrugs in the human intestinal Caco-2 cell line*. *J. Pharm. Sci.*, 95, 1318-1325.

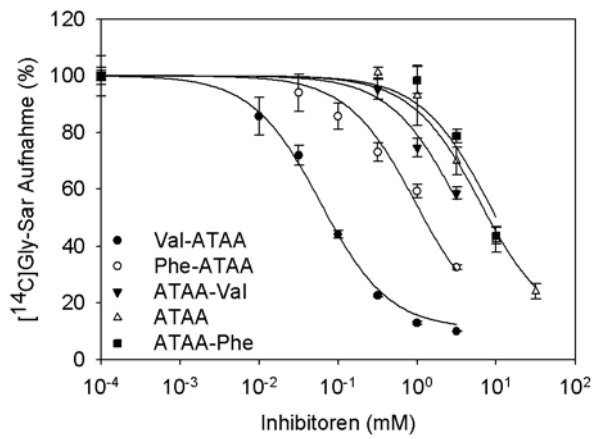
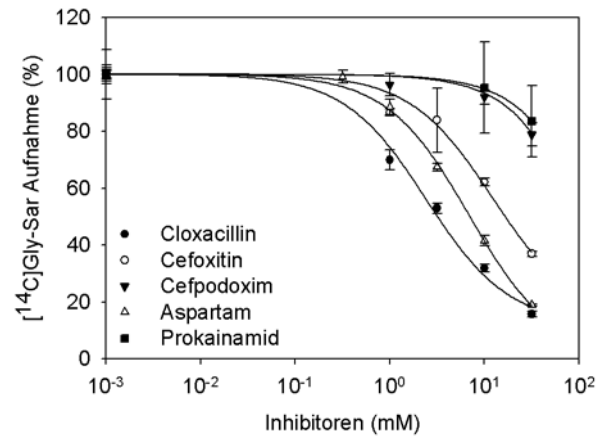
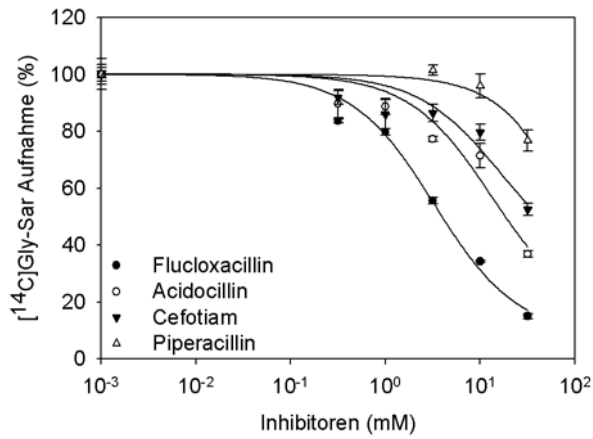
7 Anlagen

7.1 Hemmkurven

PEPT1

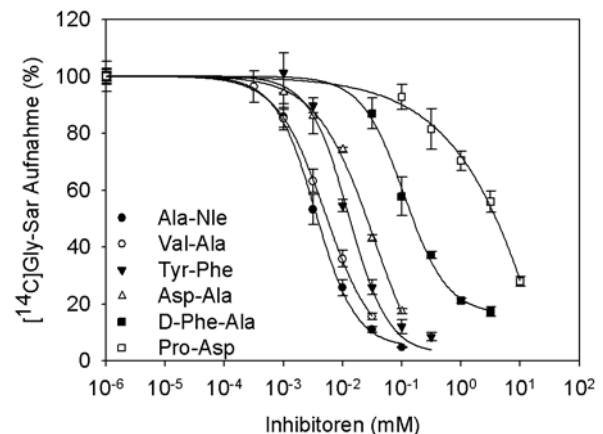
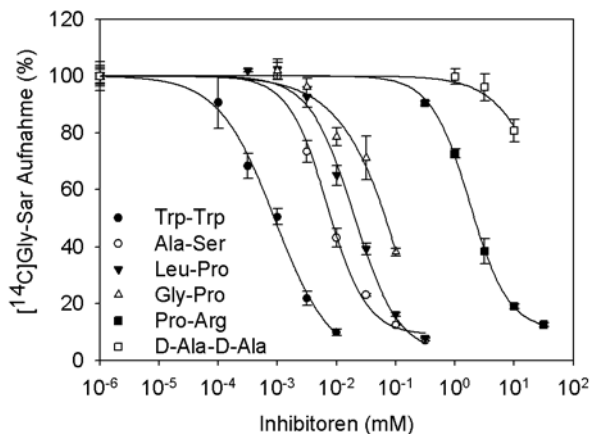
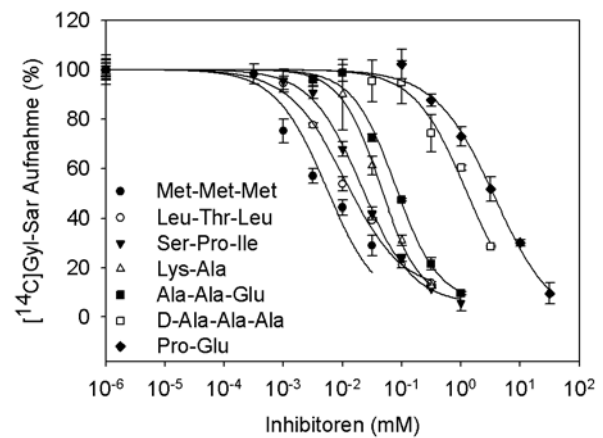
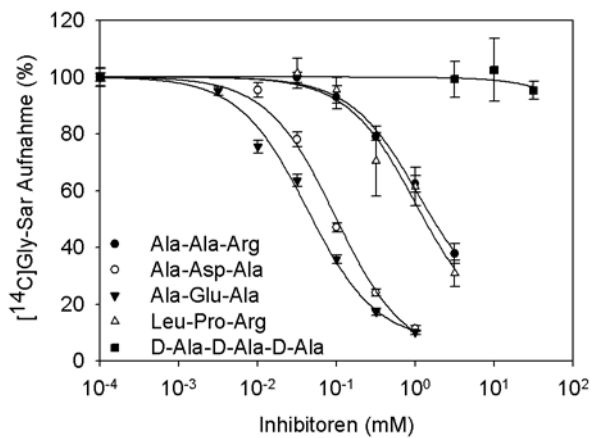
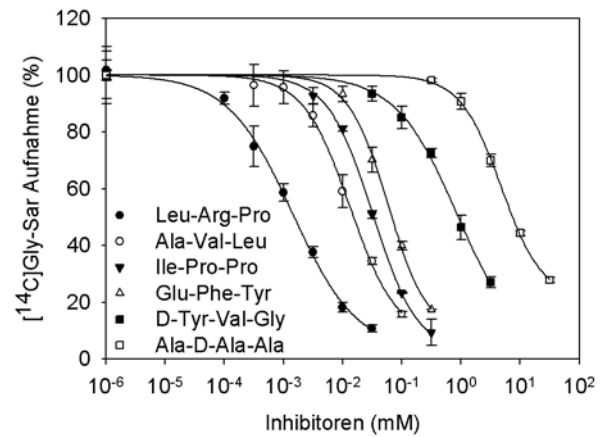
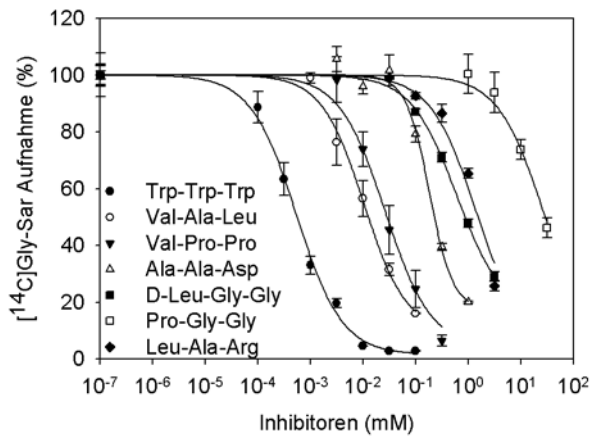
Substratspezifität der [^{14}C]Gly-Sar Aufnahme in Caco-2 Zellen. Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar (10 μM) wurde unter Koinkubation mit verschiedenen Dipeptiden in ansteigenden Konzentrationen bei 37°C und pH 6,0 nach 10 min gemessen (n = 4 bis 6).

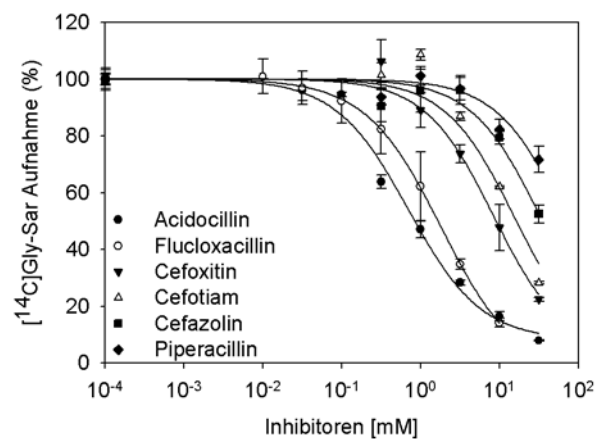
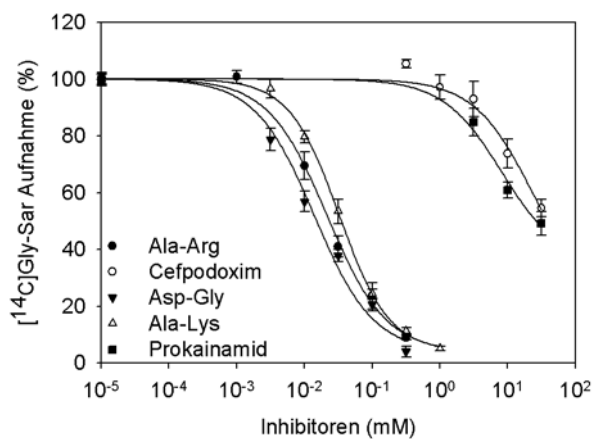
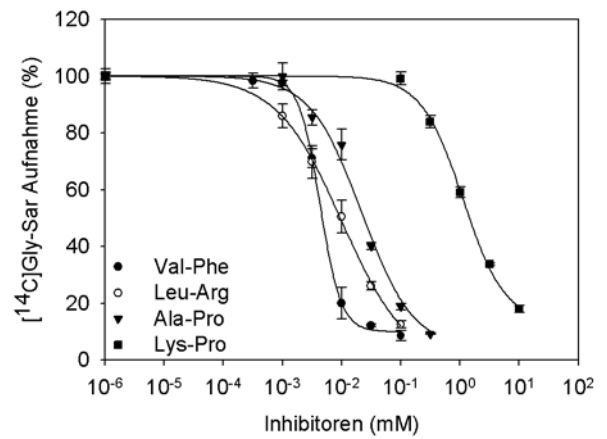
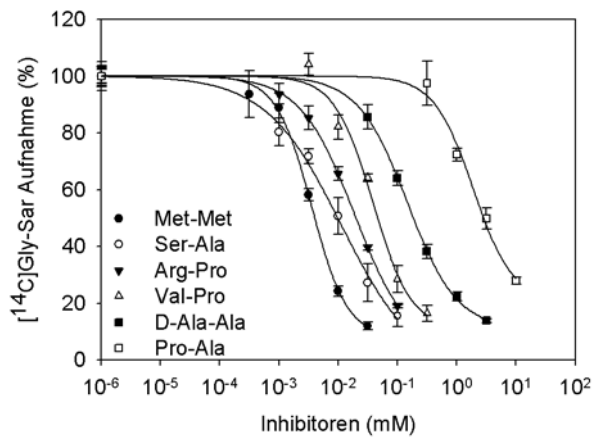
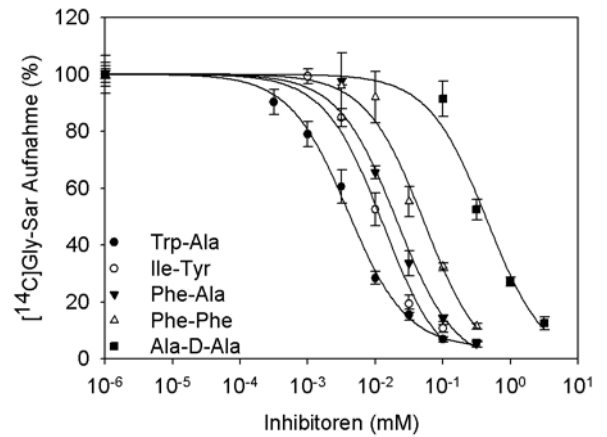
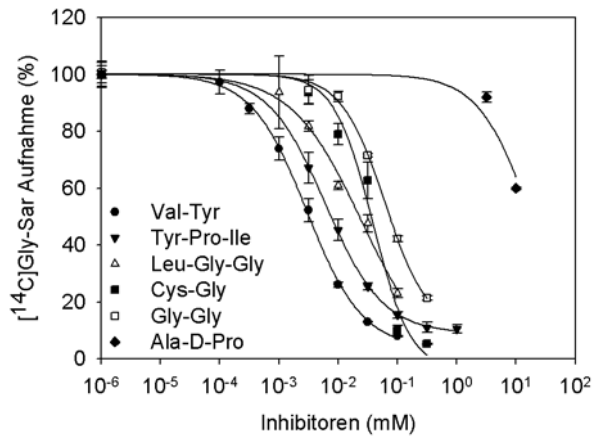


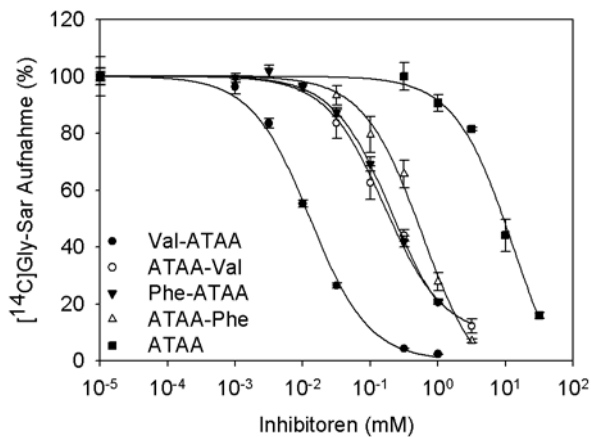


PEPT2

Substratspezifität der [^{14}C]Gly-Sar Aufnahme in SKPT Zellen. Die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar ($10\ \mu\text{M}$) wurde unter Koinkubation mit verschiedenen PEPT2-Liganden in ansteigenden Konzentrationen bei 37°C und pH 6,0 nach 10 min gemessen ($n = 4$ bis 6).







7.2 Datensatz des PEPT1-Modells (nach Anlage 7.4 Biegel et al., 2005).

7.2.1 Trainingsdatensatz

Tabelle 22: Biologische Daten der Di- und Tripeptide im Trainingsdatensatz.

Nr.	Aminosäure 1	Aminosäure 2	Aminosäure 3	K_i (mM)	Ref.
1	Bpa ^a	Ala		0,01	14
2	Bip ^b	Ala		0,02	14
3	Val	Phe		0,05	14
4	Ala	Pip ^c		0,06	146
5	Ala	Nle		0,09	14
6	Tyr	Ala		0,09	14
7	Ser(OBzl)	Ala		0,09	183
8	Tyr(OBzl)	Ala		0,09	183
9	Leu	Pro	Arg	0,10	
10	Met	Met	Met	0,10	
11	Val	Pro	Pro	0,10	
12	Val	Tyr		0,10	14
13	Ala	Phe	Pro	0,11	
14	Leu	Ala	Arg	0,11	
15	Leu	Thr	Leu	0,11	
16	Phe	Ala		0,11	14
17	Phe	Phe		0,11	14
18	Ala	Ser		0,14	183
19	Tyr	Phe		0,14	14
20	Val	Ala	Leu	0,14	

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 22

Nr.	Aminosäure 1	Aminosäure 2	Aminosäure 3	K_i (mM)	Ref.
21	Ser	Pro	Ile	0,17	
22	Trp	Trp	Trp	0,17	
23	Ala	Ala	Ala	0,18	
24	Leu	Pro		0,18	146
25	Cys	Gly		0,20	14
26	Glu	Phe	Tyr	0,20	
27	Ile	Val	Tyr	0,20	
28	Trp	Gly	Tyr	0,24	
29	Glu	Ala		0,25	14
30	Ile	Pro	Pro	0,28	
31	Gly	Pro		0,30	146
32	Leu	Arg	Pro	0,30	
33	Lys	Asp		0,33	
34	Tyr	Gly	Gly	0,35	
35	Leu	Gly	Gly	0,39	
36	Asp	Asp		0,41	14
37	Glu	Lys		0,51	
38	Asp	Lys		0,86	
39	Ala	Orn		0,97	10
40	Gly	Gly		1,0	14
41	Gly	His		1,0	14
42	Thr	Lys	Tyr	1,1	
43	Pro	Pro		1,2	146
44	Lys	Glu		1,3	
45	D-Tyr(OBzl)	Ala		1,4	14
46	Ala	Chx ^d		1,5	14
47	D-Ala	Ala		2,1	10
48	Pro	Arg		2,5	146
49	Ala	β -Ala		2,7	14
50	Ala	Anilid		2,9	191
51	Ala	5-Fla ^e		3,1	191
52	Gly	His	Lys	4,1	
53	Ala	D-Ala		4,2	10
54	Val	Pro	D-Pro	4,3	
55	β -Ala	Ala		4,8	14
56	D-Ala	Pro		5,0	10
57	Asp	Ala-NH ₂		5,4	14
58	Lys	Ala-NH ₂		6,4	

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 22

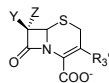
Nr.	Aminosäure 1	Aminosäure 2	Aminosäure 3	K_i (mM)	Ref.
59	D-Ala	Lys		7,0	10
60	D-Phe	Ala		7,0	14
61	β -Ala	Gly		7,3	14
62	D-Ala	Ala	Ala	7,9	
63	Ala	Ala	D-Ala	8,3	
64	Pro	Asp		9,8	146
65	D-Tyr	Val	Gly	14	
66	Tyr	D-Ala	Gly	14	
67	Pro	Gly	Gly	16	
68	Ala	D-Ala	Ala	17	
69	Ala	D-Phe	Ala	19	
70	Pro	Glu		20	146
71	D-Leu	Gly	Gly	25	
72	Ala	D-Lys		> 30 (~49) ^f	10
73	D-Ala	D-Pro		> 30 (~65) ^f	10
74	D-Ala	D-Lys		> 30 (~72) ^f	10
75	D-Ala	D-Ala		> 30 (~100) ^f	10

^a Biphenylalanin. ^b Benzylphenylalanin. ^c Pipecolinsäure. ^d Cyclohexylamid. ^e 5-Fluoroanilid. ^f Die K_i -Werte liegen außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden.

Tabelle 23: Strukturen und biologische Daten von β -Lactam-Antibiotika des Trainingsdatensatzes. Das Grundgerüst der Moleküle ist jeweils mit P für Penicillin und C für Cephalosporin bezeichnet.



P



C

Nr.	Name der Verbindung	Grundgerüst	Y	Z	R ₃ '	K_i (mM)	Ref.
Typ I							
76	Ceftibuten	C		—H	—H	0,34	145
77	Cefixim	C		—H	—CH CH ₂	12	145
78	Cefodizim	C		—H		22	145
79	Ceftriaxon	C		—H		> 30 (~40) ^a	145

Fortsetzung nächste Seite









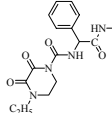

Fortsetzung Tabelle 23

Nr.	Name der Verbindung	Grundgerüst	Y	Z	R ₃ '	K _i (mM)	Ref.
80	Cefpirom	C		-H		> 30 (~45) ^a	145
81	Cefotaxim	C		-H		> 30 (~50) ^a	145
82	Cefepim	C		-H		> 30 (~70) ^a	145
Typ II							
83	Cyclacillin	P		-H		0,50	145
84	Cloxacillin	P		-H		2,5	144
85	Cefadroxil	C		-H	-H	7,2	145
86	Dicloxacillin	P		-H		7,2	144
87	Cefamandol	C		-H		8,1	145
88	Cephradin	C		-H	-CH ₃	9,8	145
89	Cefoxitin ^c	C		-OCH ₃		10	
90	Cefaclor	C		-H	-Cl	> 10 (~11) ^a	145
91	Moxalactam ^b	C		-OCH ₃		12	144
92	Oxacillin	P		-H		12	144
93	Metampicillin	P		-H		13	144
94	Ampicillin	P		-H		15	145
95	Cephalothin	C		-H		> 10 (~14) ^a	145
96	Cefapirin	C		-H		> 10 (~14) ^a	145
97	Penicillin V	P		-H		21	145
98	Cefuroxim	C		-H		26	145

^a Die K_i-Werte liegen außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden. ^b Moxalactam enthält ein Sauerstoffatom anstelle des Schwefelatoms im Penamring. ^c Cefoxitin wurde in 7S Konfiguration dargestellt

7.2.2 Testdatensatz

Tabelle 24: Strukturen und biologische Daten von β -Lactam-Antibiotika des Testdatensatzes.

Nr.	Name der Verbindung	Grundgerüst	Y	Z	R ₃ '	K _i (mM)	Ref.
99	Flucloxacillin §	P		-H		3,2	
100	Cephalexin §	C		-H	-CH ₃	14	145
101	Acidocillin §	C		-H		15	
102	Cefmetazol ^{a, §}	C		-O-CH ₃		28	145
103	Cefazolin §	C		-H		> 30 (~31)*	
104	Benzylpenicillin §	P		-H		> 30 (~40)*	145
105	Piperacillin §	P		-H		> 30 (~61)*	
106	Cefpodoxim §	C		-H	-O-CH ₃	> 30 (~110)*	

§ Typ II β -Lactam-Antibiotikum; § Typ I β -Lactam-Antibiotikum; ^a Cefmetazol wurde in 7S Konfiguration dargestellt. * Die K_i-Werte liegen außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden.

Tabelle 25: Biologische Daten der Di- und Tripeptide des Testdatensatzes.

Nr.	Aminosäure 1	Aminosäure 2	Aminosäure 3	K_i (mM)	Ref.
107	Asp(OBzl)	Ala		0,09	14
108	Ile	Tyr		0,12	14
109	Ala	Phe	Leu	0,10	
110	Ala	Ala		0,14	14
111	Ser	Ala		0,14	146
112	Phe	Leu	Leu	0,14	14
113	Ala	Pro	Leu	0,15	14
114	Trp	Ala		0,16	14
115	Ala	Lys		0,21	183
116	Tyr	Pro	Ile	0,25	
117	Asp	Ala		0,32	183
118	Lys	Ala		0,34	183
119	D-Met	Met	Met	0,52	
120	Pro	Phe	Lys	2,0	
121	Pro	Asp		9,8	14
122	Ala	D-Pro		15	146

7.3 Datensatz des PEPT2-Modells (nach Anlage 7.4 (Biegel et al., 2006b)).

7.3.1 Trainingsdatensatz

Tabelle 26: Biologische Daten der Di- und Tripeptide des Trainingsdatensatzes für PEPT2 (geordnet nach abfallender Bindungsaffinität and PEPT2). Die grau unterlegten Zeilen kennzeichnen $K_{i,PEPT1}/K_{i,PEPT2}$ -Quotienten < 100 und > 5 .

Nr.	Amino- säure 1	Amino- säure 2	Amino- säure 3	K_i PEPT2 (mM)	Ref.	K_i PEPT1 (mM)	Ref.	$\frac{K_{i,PEPT1}}{K_{i,PEPT2}}$
1	Trp	Trp	Trp	0,0003		0,17		567
2	Trp	Trp		0,0008		0,090		113
3	Leu	Arg	Pro	0,0012		0,30		250
4	Trp	Gly	Tyr	0,0017		0,24		141
5	Met	Met	Met	0,0020		0,10		50
6	Val	Tyr		0,0025		0,10	14	40
7	Ala	Nle		0,0031		0,090	14	29
8	Bpa ^a	Ala		0,0037		0,020	14	5
9	Val	Phe		0,0038		0,050	14	13
10	Val	Ala		0,0045		0,090	14	20
11	Ala	Ser		0,0062		0,14	183	23
12	Val	Ala	Leu	0,0090		0,14		16
13	Tyr	Phe		0,0090		0,14	14	16
14	Phe	Asp		0,011		0,17		15
15	Ala	Val	Leu	0,012		0,14		12
16	Lys	Lys		0,012	10	6,7	10	558
17	Ala	Asp		0,014	14	0,26	126	19
18	Ile	Val	Tyr	0,014		0,20	14	14
19	Leu	Pro		0,010*		0,11*	146	11
20	Phe	Ala		0,016		0,11	14	7
21	Ala	Ala	Ala	0,017		0,18		11
22	Leu	Gly	Gly	0,018		0,39		22
23	Ser	Pro	Ile	0,019		0,16		8
24	Asp	Lys		0,020	126	0,86		43
25	Phe	Glu		0,022		0,18		8
26	Asp	Ala		0,031		0,32		10
27	Val	Pro	Pro	0,023		0,060		3

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 26

Nr.	Amino- säure 1	Amino- säure 2	Amino- säure 3	K_i PEPT2 (mM)	Ref.	K_i PEPT1 (mM)	Ref.	$\frac{K_i \text{ PEPT1}}{K_i \text{ PEPT2}}$
28	Ile	Pro	Pro	0,027		0,28		10
29	Cys	Gly		0,029		0,20	14	7
30	Lys	Pro		0,034*		0,26*		10
31	Gly	Ala		0,035		0,38	14	11
32	Thr	Lys	Tyr	0,039		1,1		28
33	Val	Pro		0,039*		0,080*	14	2
34	Lys	Ala		0,041		0,34		8
35	Ala	Glu	Ala	0,046		0,48		10
36	Glu	Phe	Tyr	0,052		0,20		4
37	Gly	Gly		0,054		1,0	14	19
38	Ala	Ala	Glu	0,069		0,81		12
39	Ala	Asp	Ala	0,079		0,72		9
40	D-Phe	Ala		0,097		7,0	14	72
41	D-Ala	Ala		0,13		2,1	10	16
42	Ala	Ala	Asp	0,16		0,82		5
43	Ala	D-Ala		0,27		4,2	10	16
44	D-Leu	Gly	Gly	0,59		25		42
45	D-Tyr	Val	Gly	0,72		14		19
46	Pro	Phe	Lys	0,90		2,0		2
47	Ala	β -Ala		0,98		2,7	14	3
48	D-Ala	Ala	Ala	1,0		7,9		8
49	Leu	Ala	Arg	1,2		0,10		0,1
50	Pro	Arg		1,6		2,5	146	2
51	β -Ala	Ala		2,1		4,8	14	2
52	Pro	Asp		2,1		9,8		5
53	Pro	Ala		2,6		9,5	14	4
54	Pro	Glu		2,6		20	146	8
55	Gly	His	Lys	3,1		4,1		1
56	Ala	D-Ala	Ala	4,2		8,4		2
57	Tyr	D-Ala	Gly	>3 (~6,5) ^b		>10 (~14) ^b		2
58	Pro	Gly	Gly	11		16		2
59	D-Ala	D-Ala		>10 (~42) ^b		>30 (~100) ^b	10	2

^a Benzylphenylalanin. ^b Die K_i -Werte liegen außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden. * K_i -Werte wurden nach dem *trans*-Gehalt korrigiert.

Tabelle 27: Strukturen und biologische Daten von β -Lactam-Antibiotika des Trainingsdatensatzes. Das Grundgerüst der Moleküle ist jeweils mit P für Penicillin und C für Cephalosporin bezeichnet.



Nr.	Name der Verbindung	Grundgerüst	Y	Z	R ₃ '	K _i , PEPT2 (mM)	Ref.	K _i , PEPT1 (mM)	Ref.	$\frac{K_{i,PEPT1}}{K_{i,PEPT2}}$
Typ I										
60	Ceftibuten	C		-H	-H	0,28	144	0,34	145	1
61	Cefixim	C		-H	-CH ₂	2,6	144	12	145	5
62	Cefodizim	C		-H		9,0	144	22	145	2
63	Cefpirom	C		-H		10	144	>30 (~45) ^a	145	5
64	Cefepim	C		-H		11	144	>30 (~70) ^a	145	6
65	Cefotaxim	C		-H		20	144	>30 (~50) ^a	145	3
66	Ceftriaxon	C		-H		28	144	>30 (~40) ^a	145	1
Typ II										
67	Cefadroxil	C		-H	-H	0,003	144	7,2	145	2800
68	Cefaclor	C		-H	-Cl	0,029	144	>10 (~11)	145	380
69	Cyclacillin	P		-H	-H	0,044	144	0,50	145	11
70	Cephradin	C		-H	-CH ₃	0,065	144	9,8	145	150
71	Moxalactam ^b	C		-OCH ₃		0,087	144	12	144	140
72	Dicloxacillin	P		-H	-H	0,42	144	7,2	144	17

Fortsetzung nächste Seite








Fortsetzung Tabelle 27

Nr.	Name der Verbindung	Grundgerüst	Y	Z	R ₃ '	K _i PEPT2 (mM)	Ref.	K _i PEPT1 (mM)	Ref.	$\frac{K_{i,PEPT1}}{K_{i,PEPT2}}$
73	Ampicillin	P		-H		1,3	144	15	145	11
74	Metampicillin	P		-H		0,73	144	13	144	17
75	Cloxacillin	P		-H		0,95	144	3,0	144	3
76	Cefamandol	C		-H		2,8	144	8,1	145	3
77	Oxacillin	P		-H		3,6	144	12	144	4
78	Cephalothin	C		-H		8,3	144	>10 (14) ^a	145	2
79	Cefoxitin ^c	C		-O-CH ₃		8,6		10		1
80	Cefapirin	C		-H		11	144	>10 (20) ^a	145	2
81	Cefuroxim	C		-H		13	144	26	145	2
82	Cefazolin	C		-H		>30 (~31) ^a		>30 (~31) ^a		1
83	Cefpodoxim	C		-H		>30 (~31) ^a		>30 (~110) ^a		4

^a Die K_i -Werte liegen außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden. ^b Moxalactam enthält ein Sauerstoffatom anstelle des Schwefelatoms im Penamring. ^c Cefoxitin wurde in 7S Konfiguration dargestellt

7.3.2 Testdatensatz

Tabelle 28: Strukturen und biologische Daten der β -Lactam-Antibiotika des Testdatensatzes.

Nr.	Name der Verbindung	Grundgerüst	Y	Z	R ₃ '	K _i , PEPT2 (mM)	Ref.	K _i PEPT1 (mM)	Ref.	$\frac{K_{i,PEPT1}}{K_{i,PEPT2}}$
84	Cephalexin	C		-H	CH	0,075	144	14	145	190
85	Amoxicillin	P		-H		0,43	144	>10 (~25) ^a	144	60
86	Acidocillin	C		-H		0,72		15		21
87	Flucloxacillin	P		-H		1,6		7,0		17
88	Cefmetazol ^b	C		-O-CH ₃		4,3	144	28	145	7
89	Benzylpenicillin	P		-H		11	144	>30 (~40) ^a	145	4

^a Die K_i -Werte liegen außerhalb des Messbereiches. Die in Klammern angegebenen Werte sind Schätzwerte, die aus dem Verlauf der Hemmkurven abgeleitet wurden. ^b Cefmetazol wurde in 7S Konfiguration dargestellt.

Tabelle 29: Biologische Daten der Di- und Tripeptide des Testdatensatzes.

Nr.	Amino- säure 1	Amino- säure 2	Amino- säure 3	K_i PEPT2 (mM)	Ref.	K_i PEPT1 (mM)	Ref.	$\frac{K_i\text{PEPT1}}{K_i\text{PEPT2}}$
90	Met	Met		0,0032		0,08		25
91	Trp	Ala		0,0035		0,16	¹⁴	46
92	Tyr	Pro	Phe	0,0054		0,25		46
93	D-Met	Met	Met	0,0059		0,52		88
94	Ala	Ala		0,0060	¹²⁶	0,14	¹⁴	23
95	Ser	Ala		0,0072		0,14	¹⁴⁶	20
96	Ala	Gly		0,0071		0,14	¹⁴	20
97	Ile	Tyr		0,0083		0,12	¹⁴	15
98	Leu	Arg		0,0090		0,41		46
99	Leu	Thr	Leu	0,0097		0,11		11
100	Ala	Pro		0,012*		0,10*	¹⁴	8
101	Arg	Pro		0,012*		0,27*	¹⁴⁶	23
102	Ala	Asp		0,014	¹²⁶	0,26	¹⁴	19
103	Ala	Pro	Gly	0,017	¹²⁶	n.b.		
104	Tyr	Arg		0,017	¹²⁶	n.b.		
105	Asp	Gly		0,019		0,56		29
106	Ala	Lys		0,023		0,21	¹⁸³	9
107	Gly	Pro		0,027*		0,16*	¹⁴⁶	6
108	Ala	D-Pro		15		15	¹⁴⁶	1

* K_i -Werte wurden nach dem *trans*-Gehalt korrigiert

7.4 Veröffentlichte Originalarbeiten

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.

Biegel, A., Knütter, I., Hartrodt, B., Gebauer S., Theis, S., Luckner, P., Kottra, G., Rastetter, M., Zebisch, K., Thondorf, I., Daniel, H., Neubert, K. & Brandsch, M., **2006a**. The Renal Type H^+ /Peptide Symporter PEPT2: Structure-Affinity Relationships. *Amino Acids* 31, 137-156.

Biegel, A., Gebauer, B., Brandsch, M., Neubert, K. & Thondorf, I., **2006b**. Structural Requirements of the H^+ /Peptide Cotransporter PEPT2 Determined by Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis. *J. Med. Chem.* 49, 4286-4296.

Biegel, A., Gebauer S., Hartrodt, B., Knütter, I., Neubert, K., Brandsch, M. & Thondorf, I., **2007**. Recognition of 2-Aminothiazole-4-Acetic Acid Derivatives by the Peptide Transporters PEPT1 and PEPT2. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32, 69-76.

DANKSAGUNG

In dieser Stelle möchte ich denjenigen Personen danken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Klaus Neubert für seine Unterstützung zur Finanzierung meiner Promotion.

Bei PD Dr. Iris Thondorf bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung, für die zahlreichen inspirativen Fachgespräche, die wesentlich zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beitrugen und für ihr reges Interesse am Fortgang der Arbeit. Zudem war sie jederzeit Ansprechpartner für computertechnische Fragestellungen. Außerdem danke ich ihr für ihr Engagement beim Schreiben und Korrekturlesen der Veröffentlichungen.

Bei PD Dr. Matthias Brandsch bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe alle experimentellen Untersuchungen durchführen zu können. Außerdem danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen und sein ständiges Interesse an neuen Ergebnissen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Sabine Gebauer bedanken, die mich in die Molecular-Modelling-Methoden eingeführt hat. Ihr danke ich für ihre allumfassende Unterstützung während meiner Zeit in der Arbeitsgruppe „Molecular Modelling“. Ihre fortwährende Hilfsbereitschaft, Motivation und ihr Engagement haben möglicherweise den größten Anteil zur Fertigstellung dieser Arbeit und der Publikationen beigetragen. Außerdem danke ich ihr für die Hilfestellungen bei der HPLC-Analytik.

Frau Dr. Ilka Knütter arbeitete mich in alle Techniken der Zellkultur ein und hatte allzeit ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art. Bei ihr möchte ich mich besonders für die zahlreichen Stunden des Korrekturlesens der Publikationen aber auch der Dissertation bedanken.

Frau Dr. Bianka Hartrodt danke ich für die Durchführung der vielen Synthesen und Frank Broda für seine Hilfestellungen bei Softwareproblemen jeglicher Art.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie und besonders bei meinen Freunden für ihren Beistand während der Promotionszeit. Danke für eure Unterstützung, euer Verständnis und Danke für eure Geduld.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG „Molecular Modelling“ und der AG „Membrantransport“ für die schöne Zeit.

Dem Land Sachsen Anhalt sowie der Kommission für Graduiertenförderung der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

LEBENS LAUF

Name Biegel
Vorname Annegret
Geburtsdatum 09.04.1977
Geburtsort Freiberg, Deutschland
Familienstand ledig
Anschrift Beesener Str.23, 06110 Halle/Saale, Deutschland

Schulbildung

1983 - 1989 Polytechnische Oberschule „Adolf Hennecke“ in Senftenberg
 1990 - 1996 Gymnasium Senftenberg mit Abschluss Abitur

Studium

10/1996 –10/2002 Studium der Biochemie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie,
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 - 09/1999 –08/2000 Erasmus-Stipendiatin der Europäischen Union
 Studium der Biochemie und der Interkulturellen Kommunikation an
 der University of Turku und der Åbo Akademi in Turku, Finnland
 11/2001-07/2002 Diplomarbeit: „Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Substraten des
 intestinalen Peptidtransporters PEPT1“am Institut für Biochemie, Martin-
 Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Betreuer: Prof. Dr. K. Neubert und Dr. S. Gebauer
 09/2002 Hochschulabschluss Diplombiochemikerin

Tätigkeiten

12/2002-05/2006 Doktorandin am Institut für Biochemie, Fachbereich Bioche-
 mie/Biotechnologie
 12/02-03/03 wissenschaftliche Mitarbeiterin des CNRS-DFG Bilateral
 Projektes mit dem Titel: „Rational design of selective
 anion receptors“
 04/03-03/06 Stipendiatin der Graduiertenförderung des Landes
 Sachsen-Anhalt
 Betreuer: Prof. Dr. K. Neubert und PD Dr. I. Thondorf
 Seit 05/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl Altlasten der Branden-
 burgischen Technischen Universität Cottbus

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

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

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

Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Annegret Biegel

Halle (Saale), den 10.04.2007