

"STRUKTUR-WIRKUNGSUNTERSUCHUNGEN VON  
SUBSTRATEN DER H<sup>+</sup>/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

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN .....</b>	<b>4</b>
2.1	<b>Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR) .....</b>	<b>4</b>
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	<b>Peptidtransport.....</b>	<b>15</b>
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 <sup>+</sup> /Peptidsymporter .....	19
2.3	<b>Struktur-Wirkungsuntersuchungen von Liganden der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2.....</b>	<b>21</b>
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 $\beta$ -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
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
3.1	<b>Material .....</b>	<b>31</b>
3.2	<b>Methoden.....</b>	<b>32</b>
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

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>41</b>
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	$\beta$ -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 $\beta$ -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
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>ANLAGEN</b>	<b>118</b>
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> <sub>50</sub>	Konzentration eines Inhibitors, die nötig ist, um 50 % der spezifischen Aufnahme eines Standardsubstrates zu hemmen.
<i>K</i> <sub>i</sub>	Inhibierungskonstante
<i>K</i> <sub>t</sub>	Affinitätskonstante des Transportes (Michaelis-Menten-Konstante)
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
n.b.	nicht bestimmt
LLC-PK <sub>1</sub>	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 Tripeptidsympporter 1
PEPT2	protonengekoppelter Di- und Tripeptidsympporter 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 <sub>2</sub> )]-	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			