

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 Cyclophylin 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).

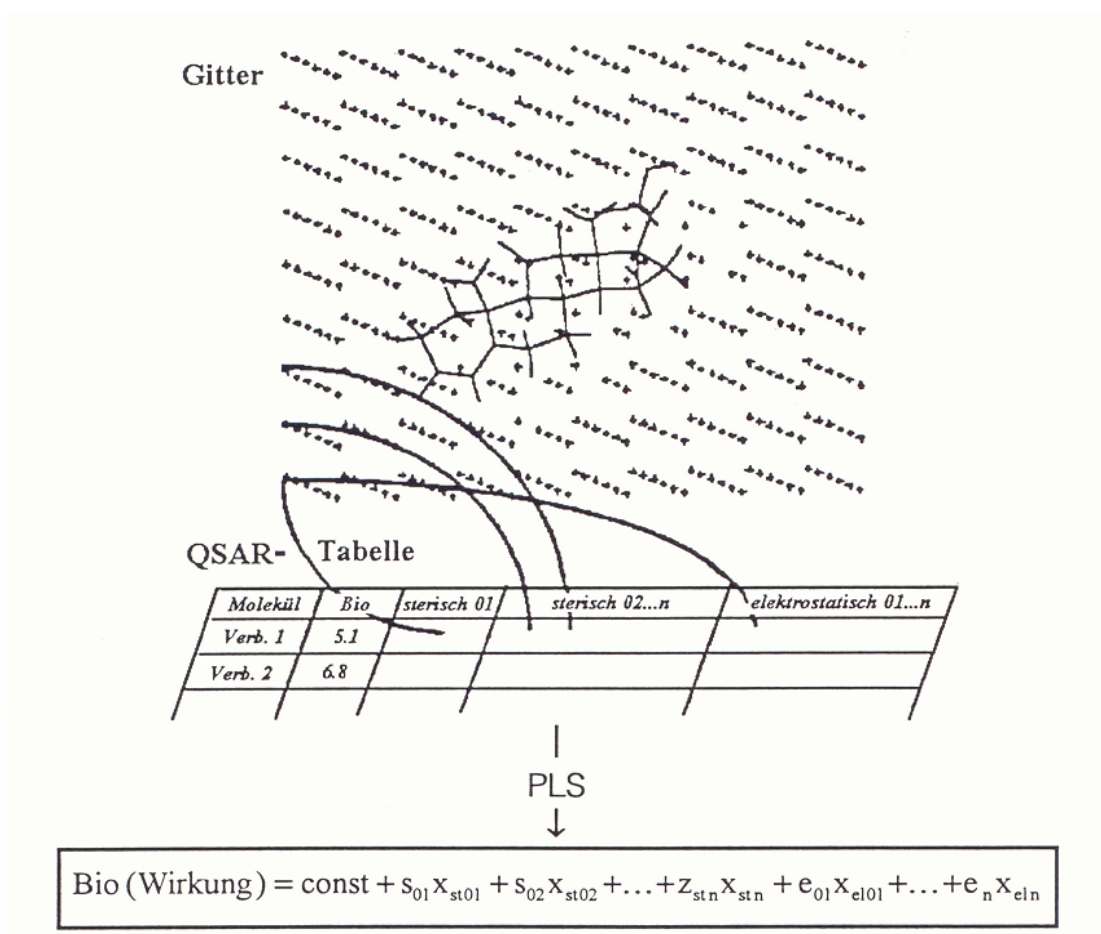


Abbildung 1: Darstellung eines Gitternetzes zur Berechnung der molekularen Felder eines Datensatzes. Für jeden Gitterpunkt werden die Feldbeiträge in eine Tabelle eingetragen. Durch die PLS-Analyse werden die biologischen Daten (z. B. als $\lg 1/K_i$) mit den Feldbeiträgen in Bezug gesetzt. Das Modell 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 Partiaalladung 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

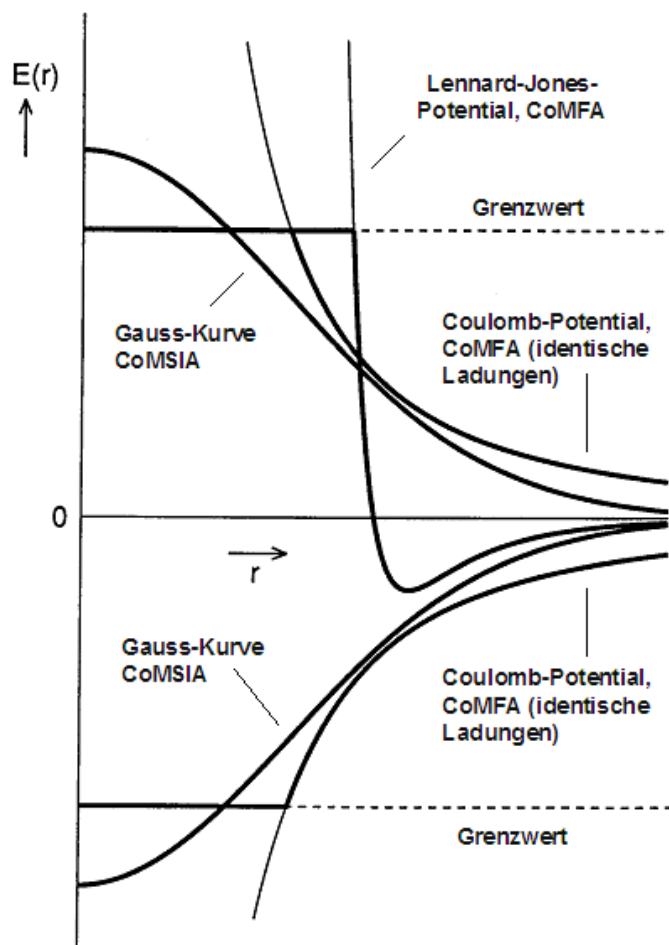


Abbildung 2: Lennard-Jones und Coulomb-Potential (CoMFA) im Vergleich zur Gauss-Funktion (CoMSIA).¹⁹

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 Proteinverdaus 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).

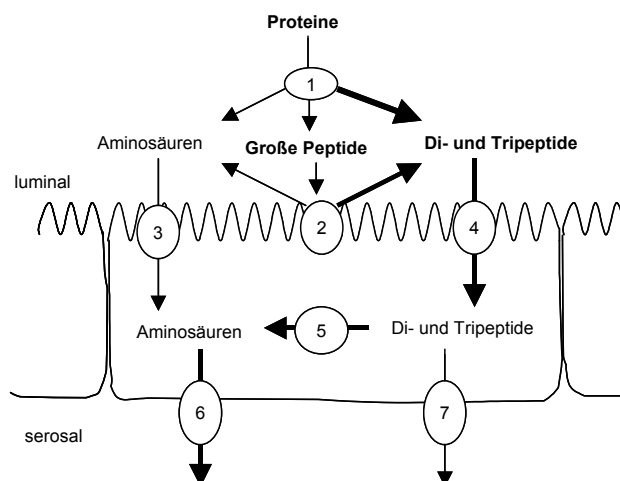


Abbildung 3: Verdauung und Resorption von Proteinen im Dünndarm. 1) Peptidasen im Darmlumen; Peptidasen (2), Aminosäuretransporter (3) und Peptidtransporter (4) in der Luminalmembran; 5) Peptidasen im Cytosol; 6 und 7) Aminosäure und Peptidtransporter in der Serosalmembran.⁴

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.

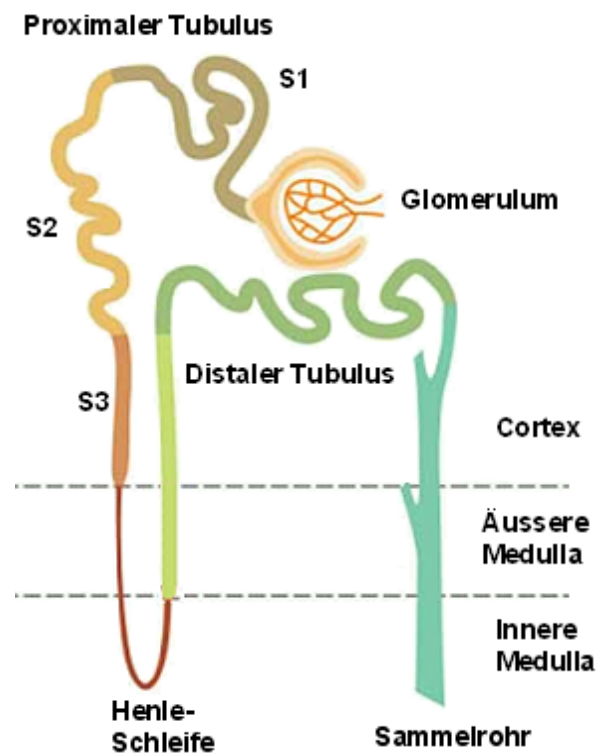


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Nephrons. Das zu reinigende Blut in den Kapillaren des Glomerulums wird durch die Kapillarwände filtriert, so dass größere Bestandteile (z. B. Blutzellen und Proteine) zurückgehalten werden. Das so genannte Ultrafiltrat (Primärharn) wird von der Bowmanschen Kapsel 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

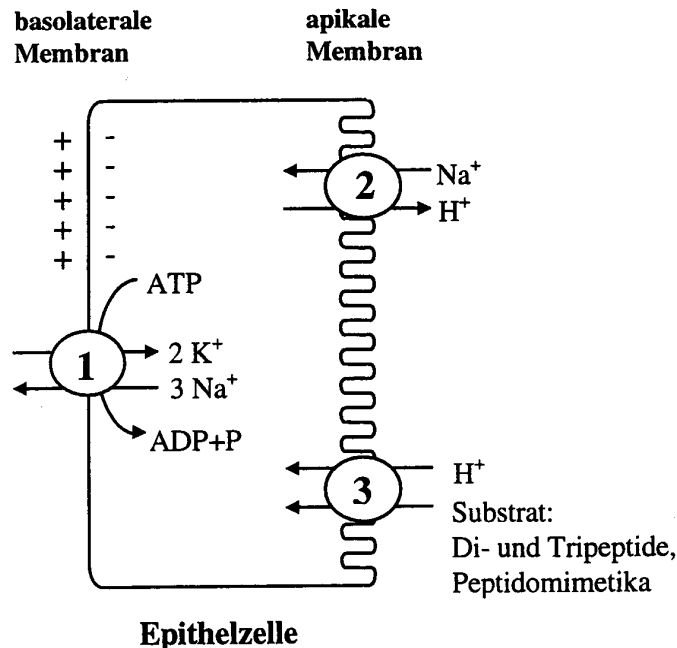


Abbildung 5: Schematische Darstellung an der Peptidaufnahme beteiligter Transportprozesse der Enterocyte. 1) Na^+/K^+ -ATPase; 2) Na^+/H^+ -Austauscher, 3) H^+ /Peptid-symporter.⁴

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).

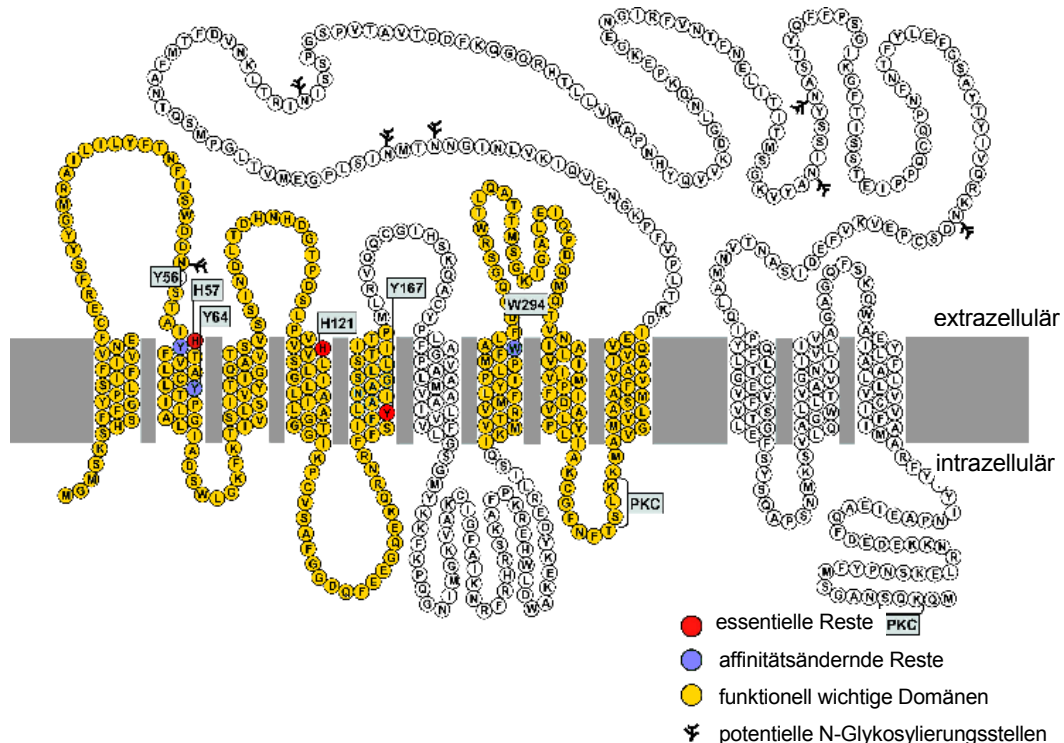


Abbildung 6: Modell der hypothetischen Membrantopologie von PEPT1. Das Protein besteht aus 12 Transmembrandomänen, dessen N- und C-Termini im Cytosol liegen. Die funktionell wichtigen Domänen sind gelb dargestellt. Farbige Aminosäurereste sind für die Funktion essentiell.¹¹

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 Säugerzellen, 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.

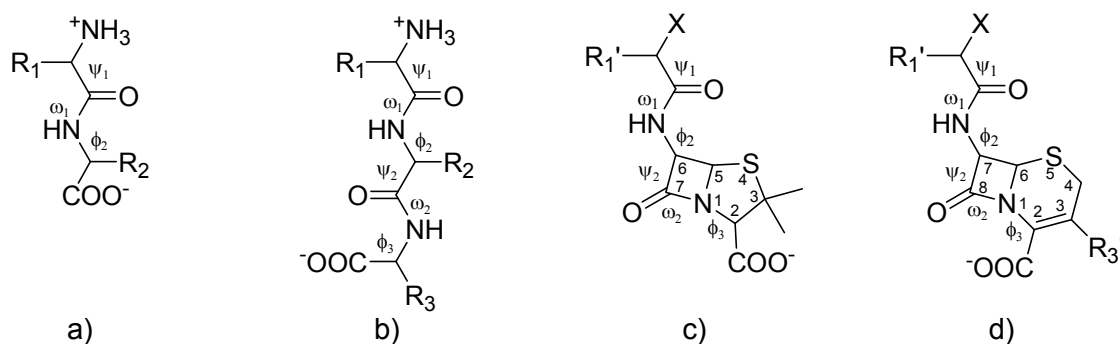


Abbildung 7: Grundgerüste von a) Dipeptiden, b) Tripeptiden, c) Penicillinen und d) Cephalosporinen (nach Anlage 7.4 Biegel et al., 2006a).

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).

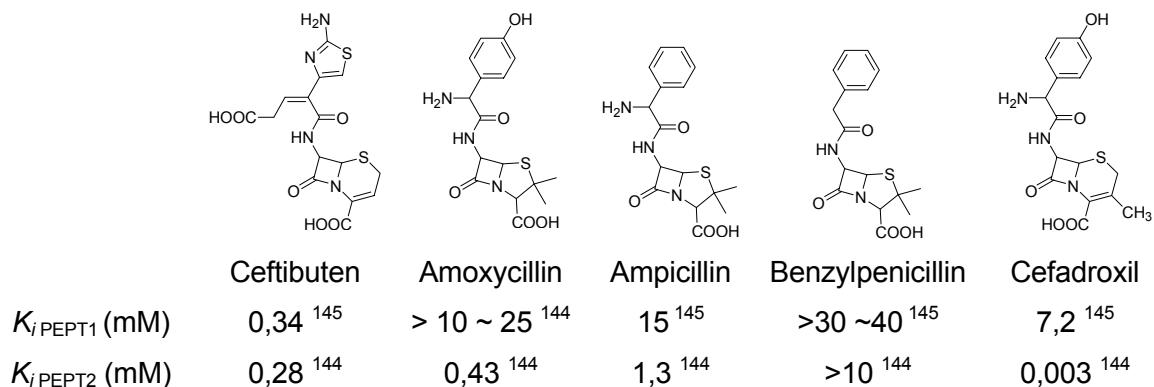


Abbildung 8: Chemische Strukturen ausgewählter β -Lactam-Antibiotika und ihre jeweiligen K_i -Werte an PEPT1 und PEPT2.

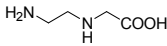
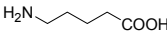
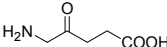
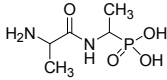
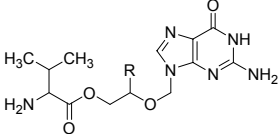
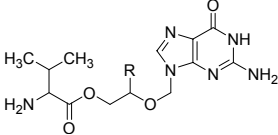
Mittels Konformationsanalysen konnte gezeigt werden, dass β -Lactam-Antibiotika zwei verschiedene bioaktive Rückgratkonformation einnehmen können. Je größer die für die Einstellung der bioaktiven Konformationen erforderlichen Energieänderungen sind, desto geringer ist die Erkennung von PEPT1.^{131,137} 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.

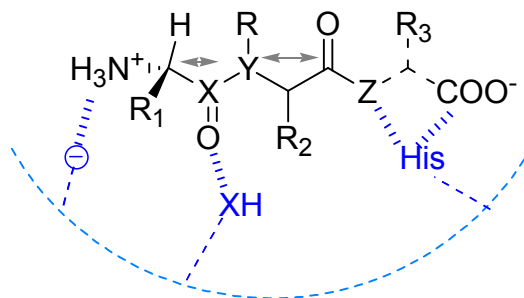


Abbildung 9: Modell der Erkennungsmerkmale von PEPT1 und PEPT2 sowie mögliche Wechselwirkungen in der hypothetischen Bindetasche (blau gekennzeichnet). Das Peptidrückgrat der Dipeptide ($X = C$; $Y-R = N-H$; $Z = O$) kann modifiziert sein. Die Pfeile zeigen an, dass der Abstand zwischen C_α -Atom und 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.