

## 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-NH<sub>2</sub>, 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*

[<sup>14</sup>C]Gly-Sar (spezifische Radioaktivität, 53 mCi x mmol<sup>-1</sup>) 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 cm<sup>2</sup> Plastikflaschen (Greiner) in einem Inkubator in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub>-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"> <li>- 500 ml Minimum Essential Medium (MEM)</li> <li>- 10 % fötales Kälberserum</li> <li>- 1 % nicht-essentielle Aminosäurelösung</li> <li>- 0,5 % Gentamicin (45 µg/ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 ml PBS (calciumfrei)</li> <li>- 3 ml Trypsin 0,05 % mit 0,02 % EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tag 1 nach Aussäen, dann zweitägig und am Tag vor dem Versuch</li> </ul>
SKPT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 ml Dulbecco's modifiziertes EAGLE Medium Nutrient Mixtur F12 (HAM) 1:1, ohne Glutamin</li> <li>- 10 % fötales Kälberserum</li> <li>- 0,1 % epidermaler Wachstumsfaktor (10 ng/ml)</li> <li>- 0,1 % Insulin (4 µg/ml)</li> <li>- 0,1 % Dexamethason (5 µg/ml)</li> <li>- 0,1 % bovines Apo-Transferrin (5 µg/ml)</li> <li>- 0,5 % Gentamicin (45 µg/ml)</li> <li>- 2 mM Glutamin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 ml PBS (calciumfrei)/EDTA (1mM)</li> <li>- 3 ml Trypsin 0,1 % mit 0,04 % EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- täglich</li> </ul>

Die Aussaat erfolgte je nach den experimentellen Erfordernissen entweder in Polysterol-Petrischälchen mit 35 mm Durchmesser (Falcon<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Großbritannien) oder in Transwell<sup>®</sup>-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<sup>®</sup>-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 [<sup>14</sup>C]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 CaCl<sub>2</sub>, 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>, 5,0 mM Glukose) gewaschen. Danach erfolgte die 10-minütige Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  [<sup>14</sup>C]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<sup>®</sup> Ca 630 (0,5 % v/v) in Puffer (50 mM Tris, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 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  $\mu\text{l}$  gemes-

sen, der 10  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>-ERS Volttohmmeter, 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  $\mu\text{l}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Deutschland) und bis zur Gehaltsbestimmung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $\beta$ -Strahlers ( $^{14}\text{C}$ ) 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<sup>®</sup> eco-plus) versetzt und gründlich vermischt. Die Messungen erfolgten im Flüssigkeitsscintillationsspektrometer (Tri-Carb<sup>®</sup> 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  $\mu\text{l}$

(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 <sup>§</sup>	1	0,4
D-MMM	30	1,1	PLG-NH <sub>2</sub> <sup>*</sup>	15	1,3
D-YVG <sup>*</sup>	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

<sup>\*</sup> Die Messung erfolgte bei pH = 2,4; <sup>§</sup> 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 10 mM Tetramethylammoniumchlorid (98 %) (pH 4,5) zusammen. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit TFA. Jeweils 5  $\mu$ 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  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Eine Homogenisierung des Zell-Wasser-Gemisches erfolgte nach dem Auftauen durch mehrmaliges Aufziehen der Proben mit einer  $150\ \mu\text{m}$ -Kanüle (Omnican<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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.<sup>171</sup>

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

$K_t$  Michaelis-Menten-Konstante des Referenzsubstrates

### Berechnung des transepithelialen Fluxes

Die Fluxraten  $J$  ([% / Akzeptor \* h] bzw. [% / cm<sup>2</sup> \* 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  $\beta$ -Lactam-Antibiotika; siehe Anlage 7.2). 26 Verbindungen wurden bereits in einer vorhergehenden Studie zu PEPT1 verwendet.<sup>14</sup> 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  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, 27 Tripeptide und 32 Dipeptide- und -Derivate). Für eine gleichmäßige Verteilung der Bindungsaffinitäten im Bereich (0,3  $\mu$ 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  $\beta$ -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.<sup>172</sup> Die Startstrukturen wurden mit geladenen N- und C-Termini, ausgenommen die Aminogruppe der thiazolhaltigen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, sowie mit Peptidbindungen in *trans*-Konformation aufgebaut. Die  $\beta$ -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.<sup>173</sup> Das chirale Kohlenstoffatom, an dem die X und R<sub>1</sub>' Reste gebunden sind, wurde als *R* konfiguriert betrachtet.<sup>152</sup> Die jeweiligen Fragmente der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurden aus der Cambridge Strukturdatenbank (CSD) entnommen.<sup>174</sup> Die R<sub>1</sub>' Reste (Butenylcarboxyl- und Oximgruppen) der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die einen Aminothiazolring enthalten, wurden als *Z*-Isomere aufgebaut.<sup>175</sup> Die Partialladungen wurden entsprechend der Gasteiger-Marsili-Methode berechnet.<sup>176</sup> 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.<sup>177,178</sup>

#### 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<sup>-1</sup> 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.<sup>179</sup> 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).<sup>14</sup> 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  $\alpha$  wurde auf 0,3 gesetzt.<sup>180</sup> 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  $\sigma$ -Wert (Spaltenfilter) wurde so variiert, dass jeweils 10 % der Variablen in die PLS-Rechnung eingehen. Er lag zwischen 1,0 und 2,5.