

5 Zusammenfassung und Ausblick

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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