

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie
der Technischen Universität München

**Heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung intestinaler
und renaler Peptidtransporter in der methylotrophen Hefe**
Pichia pastoris

Stephan Theis

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johann Bauer

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.-Prof. Dr. Hannelore Daniel**
- 2. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer**
- 3. Univ.-Prof. Dr. Dieter Langosch**
(mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 25.10.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.01.2002 angenommen.

Inhaltsübersicht	1
<hr/>	
ZUSAMMENFASSUNG.....	4
<u>1</u> <u>EINLEITUNG.....</u>	<u>6</u>
<u>2</u> <u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>20</u>
<u>3</u> <u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	<u>31</u>
<u>4</u> <u>SYNOPSIS UND ENTWICKLUNGSPERSPEKTIVEN</u>	<u>109</u>
<u>ANHANG.....</u>	<u>113</u>

ZUSAMMENFASSUNG	4
<u>1</u> <u>EINLEITUNG.....</u>	6
1.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN DES TRANSPORTES VON PEPTIDEN	6
1.2 DIE PHYSIOLOGISCHE ROLLE DER PEPTIDTRANSPORTER AN EPITHELIIEN DES DÜNNDARMS UND DER NIERE	6
1.3 BEZIEHUNGEN ZWISCHEN STRUKTUR UND FUNKTION DER PEPTIDTRANSPORTER PEPT1 UND PEPT2	9
1.4 DIE SUBSTRATSPEZIFIÄT DER PEPTIDTRANSPORTER.....	12
1.5 DIE METHYLOTROPHE HEFE <i>PICHA PASTORIS</i> ALS HETEROLOGES EXPRESSIONSSYSTEM.....	16
1.6 ZIELE DER ARBEIT	19
<u>2</u> <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	20
2.2 MATERIALIEN	20
2.2.1 DAS OOZYTENSYSTEM.....	20
2.2.2 HEFE- UND BAKTERIENSTÄMME.....	20
2.2.3 RADIOAKTIV-MARKIERTE VERBINDUNGEN	20
2.2.4 PEPTIDE, PEPTIDMIMETIKA, PEPTID- UND AMINOSÄURENDERIVATE	20
2.2.5 CHEMIKALIEN, REAGENTIEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE, VERBRAUCHSMATERIAL	20
2.2.6 GERÄTE	21
2.3 METHODEN	21
2.3.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION	21
2.3.2 KONSTRUKTION DER EXPRESSIONSVEKTOREN.....	22
2.3.3 DNA-SEQUENZIERUNG.....	23
2.3.4 HEFETRANSFORMATION.....	24
2.3.5 TRANSPORTSTUDIEN AN HEFEZELLEN.....	25
2.3.6 MEMBRANPRÄPARATION	27
2.3.7 WESTERN-BLOT-ANALYSE	27
2.3.8 ZUFALLSMUTAGENESE.....	28
2.3.9 PRÄPARATION GENOMISCHER DNA AUS <i>P. PASTORIS</i>	28
2.3.10 EXPRESSION DER PEPTIDTRANSPORTER IN <i>XENOPUS LAEVIS</i> OOZYTEN	29
2.3.11 ANALYSE DER TRANSPORTPARAMETER	30

3	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</u>	<u>31</u>
3.1	ETABLIERUNG DER HEFE <i>PICHIA PASTORIS</i> ALS EXPRESSIONSSYSTEM FÜR PEPTIDTRANSPORTPROTEINE DER SÄUGER	32
3.1.1	EXPRESSION DES HUMANEN PEPTIDTRANSPORTERS PEPT1 IN <i>P. PASTORIS</i>	32
3.1.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG	35
3.1.3	ZUFALLSMUTAGENESE ZUR CHARAKTERISIERUNG DER BEZIEHUNG ZWISCHEN STRUKTUR UND FUNKTION	45
3.1.4	DISKUSSION DER BEFUNDE ZUR NUTZUNG VON <i>PICHIA PASTORIS</i> ALS EXPRESSIONSSYSTEM DER PEPTIDTRANSPORTER AUS SÄUGERN (3.1)	52
3.2	STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNGEN DER PEPTIDTRANSPORTER PEPT1 UND PEPT2	63
3.2.1	VERGLEICH DER STRUKTURELLEN ANFORDERUNGEN VON SUBSTRATEN FÜR IHRE INTERAKTION MIT DEM INTESTINALEN UND DEM RENALEN PEPTIDTRANSPORTER PEPT1 UND PEPT2	64
3.2.2	DETERMINANTEN FÜR DIE STEREOSPEZIFISCHE ERKENNUNG UND DEN TRANSPORT VON PEPTIDEN DURCH DIE PEPTIDTRANSPORTER PEPT1 UND PEPT2	73
3.2.3	BESTIMMUNG DER MINIMALEN STRUKTURELLEN MERKMALE IN SUBSTRATEN VON PEPT2	79
3.2.4	IDENTIFIZIERUNG EINES NEUARTIGEN INHIBITORS FÜR DEN INTESTINALEN PEPTIDTRANSPORTER PEPT1	89
3.2.5	CHARAKTERISIERUNG HOCHAFFINER INHIBITOREN FÜR PEPT2	93
3.2.6	DISKUSSION DER BEFUNDE ZU DEN STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNGEN (3.2)	98
4	<u>SYNOPSIS UND ENTWICKLUNGSPERSPEKTIVEN.....</u>	<u>109</u>
	<u>ANHANG.....</u>	<u>113</u>

Zusammenfassung

Die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 in Säugetieren besitzen eine wesentliche Rolle in der Aufnahme und Konservierung von Aminosäuren in verschiedenen Geweben und verfügen damit über eine nutritive Funktion. Da sie neben ihren physiologischen Substraten, Di- und Tripeptiden, auch verschiedene pharmakologisch wirksame Peptidmimetika als Substrate akzeptieren, besitzen sie darüber hinaus auch eine pharmakologische Bedeutung.

Als Testsystem zur funktionellen und strukturellen Charakterisierung tierischer und menschlicher Peptidtransporter konnte in dieser Arbeit die methylo-trophe Hefe *Pichia pastoris* etabliert werden. Für den humanen intestinalen Peptidtransporter (hPEPT1) wurde gezeigt, dass eine hohe funktionelle Expressionsrate u.a. abhängig ist vom 5'-nichtranslatierten Bereich der cDNA, der Anzahl der ins Genom integrierten cDNA-Kopien und der Art des Promotors. Für das heterolog exprimierte hPEPT1-Protein mit einem Anteil von ca. 0,6% der Membranproteine in *P. pastoris* waren die entscheidenden funktionellen Eigenschaften wie die pH-Abhängigkeit des Transportes, die Substratspezifität und die Substrataffinität vollständig erhalten. Mittels einer Zufallsmutagenese mit nachfolgender Phänotypisierung wurden mit Ile-382 und Gly-476 zwei Aminosäurereste im hPEPT1-Protein identifiziert, deren Austausch zu einer veränderten pH-Abhängigkeit der Transportfunktion führt.

Die heterologe Expression in *P. pastoris* erlaubte die Etablierung eines Screeningsystems für umfassende Untersuchungen zu Struktur-Affinitätsbeziehungen von Substraten für ihre Wechselwirkung mit PEPT1 und PEPT2. In Kombination mit elektrophysiologischen Untersuchungen an *X. laevis* Oozyten, die PEPT1 oder PEPT2 exprimieren, wurden dabei neue Einblicke in die Funktion der Carrierproteine erhalten. Unter Verwendung einer Vielzahl von Dipeptiden und Derivaten gelang es, wesentliche strukturelle Eigenschaften der Substrate festzulegen, die ihre Affinität zu den Transportern und ihre Transportfähigkeit bestimmen, wie Hydrophobizität, Ladung oder Stereoisomerie von Dipeptiden. Insbesondere konnten erstmals die minimalen strukturellen Anforderungen für die Substraterkennung und den Transport von Substraten durch PEPT2 identifiziert werden. Mit Lys[Z(NO₂)]-enthaltenden Dipeptidabkömmlingen wurden die ersten spezifischen Inhibitoren der Peptidtransporter erhalten, die mit hoher Affinität (10 µM bei PEPT1 bzw. 40 nM bei PEPT2) und reversibel sowohl mit der äußeren als auch der inneren Substratbindungsstelle der Proteine interagieren. Die Hefe *P. pastoris* erwies sich somit hervorragend zur Expression und Charakterisierung der Peptidtransporter aus Säugern geeignet. Mit diesem System wurden wesentliche neue Erkenntnisse zur Struktur und Funktionsweise dieser sowohl nutritiv als auch pharmakologisch relevanten Transportproteine gewonnen.

Summary

The mammalian peptide transporters PEPT1 and PEPT2 play an important role in the absorption and conservation of amino acids in different tissues and therefore possess a nutritive role. As the peptide carriers accept besides di- and tripeptides as their physiological substrates also a variety of pharmacologically active peptidomimetics as substrates they are relevant for drug delivery and metabolism.

In this work, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* was established as a new heterologous expression system for mammalian peptide transporters and their functional and structural characterisation. As shown for the human intestinal peptide transporter (hPEPT1), a high functional expression level depends mainly on the 5'-untranslated region of the cDNA, the copy number of the integrated cDNA's in the yeast genome and the promoter used. For the heterologously expressed hPEPT1-protein comprising about 0.6% of the yeast membrane proteins, all the decisive functional characteristics such as pH-dependency of transport, substrate affinity and specificity were fully preserved. By a random-mutagenesis approach to study the structure-function relationships Ile-382 and Gly-476 were identified as two amino acid residues in the hPEPT1-protein, that, when exchanged for other residues, lead to an altered pH-dependence of transport function.

Moreover, the yeast system was established as a screening platform allowing extended studies on the structure-affinity relationships of substrates binding to the peptide transporters PEPT1 and PEPT2. In combination with electrophysiological measurements in *X. laevis* oocytes expressing PEPT1 or PEPT2 new insights into the function and operational mode of the carriers were obtained. By using a variety of dipeptides and derivatives it was shown that different factors as hydrophobicity, charge or stereoisomerism of amino acids in dipeptides affect affinity and transport. In addition, by applying novel amino acid and dipeptide derivatives, important functional groups within the substrates and their spatial position were identified that represent the minimal structural determinants for substrate binding and transport by PEPT2. With the Lys[Z(NO₂)]-dipeptide derivatives the first specific inhibitors of the peptide transporters were obtained, that interact with high affinity (10 μM in case of PEPT1 and 40 nM in case of PEPT2) and reversible mode of action at the external as well as internal substrate binding domain.

In summary, the yeast *P. pastoris* was shown to be suitable for expression and characterisation of mammalian peptide transporters. By using this new yeast system valuable information on structure and function of these nutritionally as well as pharmacologically important transport proteins were obtained.

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen des Transportes von Peptiden

Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen sind durch eine biologische Membran gegenüber ihrer Umgebung abgegrenzt. Die Plasmamembran übernimmt dabei eine Barrierefunktion und gewährleistet darüber hinaus durch eine selektive Permeabilität die Homöostase des inneren Milieus der Zellen. Für die selektive Aufnahme von hydrophilen Substanzen in die Zellen, z. B. zur Versorgung mit notwendigen Nährstoffen, bedarf es daher spezifischer Membranproteine.

Einer dieser Transportprozesse stellt die Aufnahme von kurzkettigen Peptiden in die Zellen dar. Als Vermittler dienen Peptidtransportproteine, die mittlerweile für eine Vielzahl von Spezies, u.a. Bakterien (Hagting, A. et al., 1994; Gibson, M. M. et al., 1984), Hefen (Basrai, M. A. et al., 1995; Perry, J. R. et al., 1994), Pflanzen (Steiner, H. Y. et al., 1994) und Säuger (Boll, M. et al., 1994; Liang, R. et al., 1995; Liu, W. et al., 1995; Saito, H. et al., 1996; Boll, M. et al., 1996; Liu, W. et al., 1995) nachgewiesen und durch molekularbiologische Methoden auf genetischer Ebene identifiziert werden konnten.

Aufgrund der Ähnlichkeit in Funktion und Struktur werden die Transporter der Familie der Protonen gekoppelten Oligopeptid-Transporter (POT-Familie) (Paulsen, I. T. & Skurray, R. A., 1994) bzw. der Peptidtransporter (PTR-Familie) (Steiner, H. Y. et al., 1995) zugeordnet.

1.2 Die physiologische Rolle der Peptidtransporter an Epithelien des Dünndarms und der Niere

Dass Dipeptide in großem Umfang im Dünndarm aktiv resorbiert werden und dieser Transportprozess unabhängig ist von dem des Transportes freier Aminosäuren, war lange Zeit umstritten und konnte erstmals zu Beginn der 70er Jahre eindeutig belegt werden (Leibach, F. H. & Ganapathy, V., 1996; Adibi, S. A., 1971; Adibi, S. A. et al., 1974; Adibi, S. A. et al., 1975; Matthews, D. M. et al., 1974). Dazu dienten zum einen Transportuntersuchungen mit hydrolyseresistenten Dipeptiden (Addison, J. M. et al., 1972; Matthews, D. M. et al., 1972), zum anderen aber die Befunde von Hartnup- und Cystinurie-Patienten (Matthews, D. M., 1971; Tarlow, M. J. et al., 1970). Bei diesen Patienten kommt es trotz eines angeborenen Defektes in der Resorption bestimmter Aminosäuren nur selten zu einer Protein-Mangelernährung, da die entsprechenden Aminosäuren auch in Form von Di- und Tripeptiden resorbiert werden können.

Noch immer kontrovers diskutiert wird die Frage in wieweit die Resorption von kurzkettigen Peptiden für die Versorgung des Organismus mit α -Aminostickstoff quantitativ bedeutender ist als die der Aufnahme von freien Aminosäuren (Übersichtsartikel bei Matthews, D. M., 1975; Matthews, D. M. & Adibi, S. A., 1976; Leibach, F. H. & Ganapathy, V., 1996).

Die aktive Aufnahme von Di- und Tripeptiden gegen einen Konzentrationsgradienten ist nicht nur auf Epithelzellen des Dünndarms beschränkt, sie konnte auch für resorptive Zellen des proximalen Tubulus der Niere gezeigt werden (Ganapathy, V. et al., 1981; Ganapathy, V. et al., 1980; Ganapathy, V. et al., 1981). Der renalen Reabsorption von kurzkettigen Peptiden, die entweder glomerulär filtriert wurden oder im Tubuluslumen aus der Hydrolyse von größeren Polypeptiden durch Peptidasen entstehen, wird eine bedeutende Rolle in der Konservierung von Peptid-gebundenem Aminostickstoff zugeschrieben (Ganapathy, V. & Leibach, F. H., 1986; Daniel, H. & Herget, M., 1997).

Neue Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass der als renale Isoform beschriebene Peptidtransporter neben der Niere auch in anderen Geweben und Organen, u.a. in Gehirn, Lunge und Brustdrüse, nachgewiesen werden kann (Döring, F. et al., 1998; Groneberg, D. A. et al., 2001), was auf noch weitere, bisher unbekannte Aufgaben und Funktionen der Peptidtransporter schließen lässt.

Ausgehend von dieser physiologischen Funktion der Peptidtransporter kommt ihnen auch unter **klinischen Aspekten** im Rahmen der künstlichen Ernährung eine wichtige Rolle zu. Aufgrund der Existenz der Peptidtransporter kann über Dipeptid-haltige enterale und parenterale Ernährungslösungen eine ausreichende Versorgung auch mit Aminosäuren wie Glutamin, Tyrosin oder Cystein, die in ihrer freien Form entweder instabil oder nur schwer löslich sind, erreicht werden. So wurde z.B. für die Zufuhr von Glutamin-Dipeptid-haltigen parenteralen Lösungen gezeigt, dass sie dem postoperativen Verlust von Stickstoff und der Reduktion des Glutamin-Gehaltes im Muskel entgegen wirken, sowie Effekte auf den Immunstatus und die Darmintegrität besitzen (Stehle, P. et al., 1989; Fürst, P. et al., 1997; Fürst, P., 1998).

Die Suche nach der **treibenden Kraft** des Peptidtransportprozesses in Dünndarm und Niere führte 1983 zu einem bis dato für Säuger einmaligen Befund. Im Gegensatz zu dem für andere Transportprozesse in Säugetieren bedeutenden transmembranären Na^+ -Gradienten, wurde hier neben dem Membranpotential erstmals ein zelleinwärts gerichteter Protonen-Gradient als treibende Kraft für den Transport von Dipeptiden in intestinale und renale Bürstensaum-

Membranvesikel (BSMV) des Kaninchens gezeigt (Ganapathy, V. & Leibach, F. H., 1983; Ganapathy, V. et al., 1984; Daniel, H. et al., 1991). Dass die Aufnahme von Di- und Tripeptiden tatsächlich im Cotransport mit Protonen erfolgt und zu einer intrazellulären Ansäuerung führt, wurde für den Peptidtransport an der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 gezeigt (Thwaites, D. T. et al., 1993; Thwaites, D. T. et al., 1993). Der zelleinwärts gerichtete Protonengradient wird hierbei durch das Zusammenspiel des Na^+/H^+ -Austauschers an der apikalen Membran von Epithelzellen der Niere und des Darms sowie durch die basolateral lokalisierte Na^+-K^+ -ATPase generiert und aufrechterhalten (Abb. 1-1). Bei dem Transport von Di- und Tripeptiden handelt es sich daher um einen tertiär aktiven Transportprozess (Leibach, F. H. & Ganapathy, V., 1996).

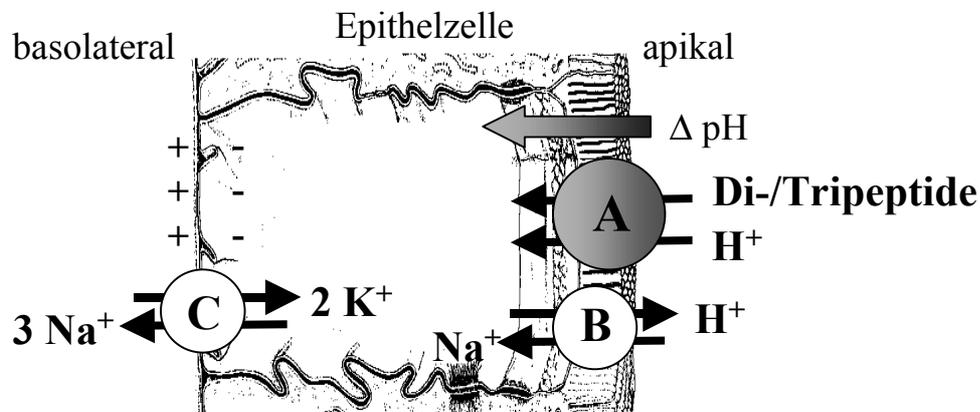


Abbildung 1-1. Modell des Peptidtransporters an einer intestinalen oder renalen Epithelzelle
A. Peptidtransporter, B. Na^+/H^+ -Austauscher, C. Na^+-K^+ -ATPase

Durch **Expressionsklonierung** in *Xenopus laevis* Oozyten ist es 1994 erstmals gelungen, mit der cDNA die genetische Information zunächst für den intestinalen Peptidtransporter (als PEPT1 bezeichnet) (Boll, M. et al., 1994; Fei, Y. J. et al., 1994) und kurz darauf auch für das renale Paralog (PEPT2) (Boll, M. et al., 1996) des Kaninchens zu identifizieren und zu isolieren. Nachfolgend wurden die cDNAs der orthologen Transporter von Mensch (Liang, R. et al., 1995; Liu, W. et al., 1995), Ratte (Saito, H. et al., 1995; Saito, H. et al., 1996) und Maus (Fei, Y. et al., 2000; Rubio-Aliaga, I. et al., 2000) kloniert.

Ausgehend von der genetischen Information war es jetzt möglich, mittels molekularbiologischer und biochemischer Techniken die Peptidtransporter sowohl unter strukturellen als auch funktionellen Aspekten mit neuen methodischen Ansätzen zu charakterisieren.

1.3 Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2

Anhand des offenen Leserahmens der cDNA's wurden für die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 aus dem Kaninchen die entsprechenden Proteine mit 707 bzw. 729 Aminosäuren abgeleitet (Boll, M. et al., 1996; Boll, M. et al., 1994). Durch vergleichende Analyse wurde eine Identität der beiden Paraloge von etwa 50% zueinander auf Aminosäureebene ermittelt. Die entsprechenden humanen Orthologe waren mehr als 80% zu denen aus dem Kaninchen identisch. Aufgrund von Hydrophobizitätsanalysen der Aminosäureabfolge wird für alle bisher identifizierten Peptidtransporterproteine von Säugern die Existenz von zwölf Transmembrandomänen (TMD) vorhergesagt (Abbildung 1-2).

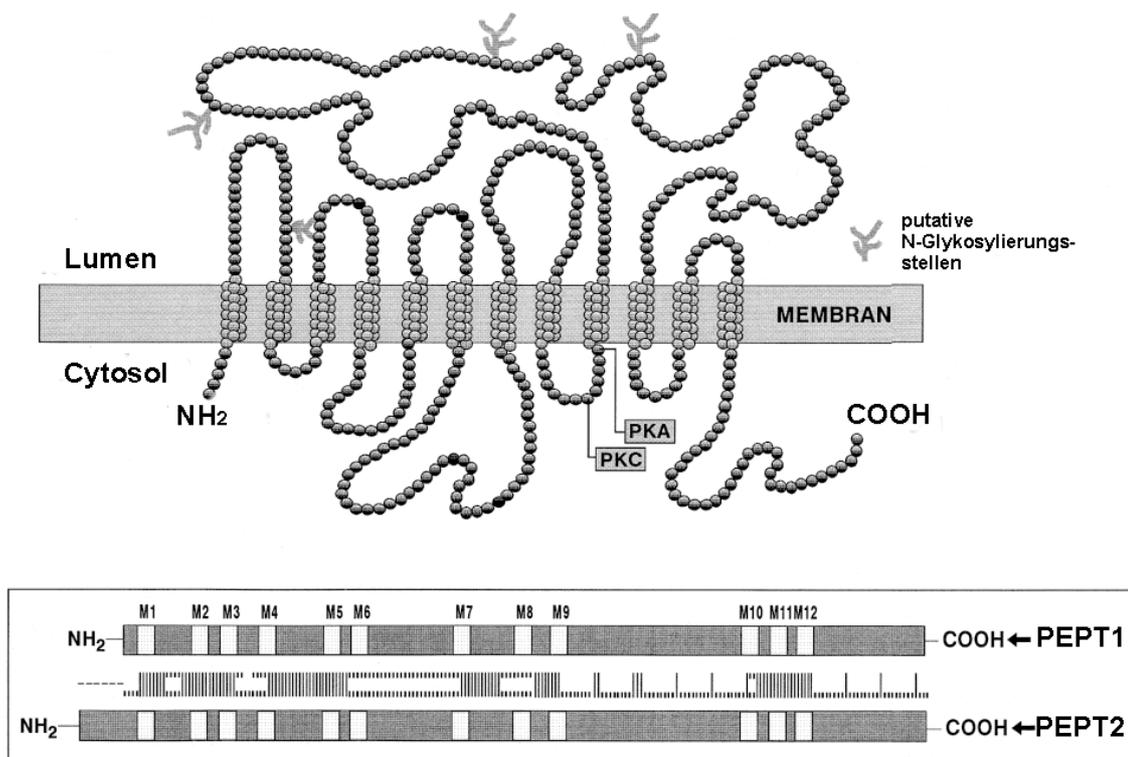


Abbildung 1-2. Struktur-Modell von PEPT1 und schematischer Homologievergleich mit PEPT2.
 PKA, Erkennungsstelle für cAMP abhängige Proteinkinase, PKC, für Proteinkinase C
 M, Transmembrandomänen

Allen Transportern gemeinsam ist nach diesem Modell die intrazelluläre Position von N- und C-Terminus des Proteins sowie eine große hydrophile, extrazellulär lokalisierte Schleife zwischen den TMD 9 und 10 (Daniel, H., 1996; Rubio-Aliaga, I. et al., 2000). Die Identität bzw. Ähnlichkeit ist im Bereich der Transmembrandomänen größer als in den extra- oder intrazellulären Schleifen. Weiterhin finden sich konservierte Aminosäuren vermehrt in den ersten 6 TMD und die größten Unterschiede am N- und C-Terminus der Proteine (Fei, Y. J. et

al., 1998). Alle Peptidtransporterproteine weisen mögliche N-Glykosylierungsstellen sowie Erkennungsstellen für Proteinkinasen auf, was auf eine mögliche Regulation durch reversible Phosphorylierung hindeutet (Daniel, H., 1996; Wenzel, U. et al., 1999). Experimentell konnte durch Epitop-Insertion in unterschiedliche Proteinbereiche bisher die intrazelluläre Lokalisation des Carboxy-Terminus, sowie die extrazelluläre Lokalisation der Schleifen zwischen den Transmembrandomänen 9 und 10 sowie zwischen der 3. und 4. TMD gezeigt werden (Covitz, K. M. Y. et al., 1998). Diese Befunde scheinen somit das aus der Hydrophobizitätsanalyse abgeleitete Modell für die Topologie des hPEPT1-Proteins in der Plasmamembran zu bestätigen.

Für PEPT1 wurde nach *in vitro*-Translation in Anwesenheit von Mikrosomen ein apparentes Molekulargewicht von 71 kDa (Fei, Y. J. et al., 1994), für PEPT2 von 107 kDa bestimmt (Boll, M. et al., 1996). Die Ergebnisse für das PEPT2-Protein bestätigen Befunde an renalen BSMV, in denen durch Photoaffinitätsmarkierung eine oligomere Anordnung des Transporters sowie 105 kD für die kleinste monomere Masse des renalen Peptidtransporters ermittelt wurde (Boll, M. & Daniel, H., 1995).

Bisher gibt es sowohl für den intestinalen als auch den renalen Peptidtransporter nur sehr wenige Daten, die eine Auskunft darüber geben, welche Domänen im Protein für die Substraterkennung oder Protonentranslokation, aber auch für die Unterschiede in den Eigenschaften zwischen PEPT1 und PEPT2 verantwortlich sind. Als ein erster Ansatz diente die Konstruktion von chimären Transportproteinen (Döring, F. et al., 1996). Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein rekombinantes chimäres Protein, das bis zur 9. Transmembrandomäne PEPT2 entspricht und im weiteren bis zum C-terminalen Ende PEPT1, die Transporteigenschaften von PEPT2 beibehält. Daraus wurde abgeleitet, dass die N-terminale Region im Protein die phänotypischen Charakteristika der Peptidtransporter bestimmt. Der Ansatz, aus chimären Transportproteinen Daten zu Struktur und Funktion der Peptidtransporter zu erlangen, wurde später auch von Fei et al. aufgegriffen (Fei, Y. J. et al., 1998). Sie vermuteten anhand ihrer Befunde und den Ergebnissen von Döring et al., dass die Substratbindungsstelle innerhalb der TMD 7, 8 und 9 lokalisiert ist.

Aus Studien an BSMV der Niere sowie intestinalen und renalen Zelllinien gab es bereits Hinweise auf die Bedeutung von Histidinresten für die Transportfunktion der Peptidtransporter, vermutlich bei der Bindung und Translokation von Protonen (Miyamoto, Y. et al., 1986; Brandsch, M. et al., 1997). Die Vorbehandlung von BSMV mit dem Histidin modifizierenden

Agens Diethylpyrocarbonat (DEPC) führte zu einer nahezu vollständigen Inhibition des Peptidtransportes (Miyamoto, Y. et al., 1986). Dieser Effekt konnte später auch an den klonierten Peptidtransportern PEPT1 und PEPT2 nach Expression in *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden (Terada, T. et al., 1996; Fei, Y. J. et al., 1997). In den intestinalen und renalen Peptidtransportern PEPT1 und PEPT2 der unterschiedlichen Spezies lassen sich verschiedene Histidinreste als konserviert identifizieren. Im Falle von PEPT1 finden sich Histidinreste an den Aminosäurepositionen 57, 121 und 260 im Proteinverband. Für PEPT2 konserviert sind die Histidine His-87, His-142 sowie His-278. Über gerichtete Mutagenese dieser Histidinreste konnte gezeigt werden, dass im Fall von PEPT1 His-57 und bei PEPT2 das entsprechende His-87 essentiell für die Transportfunktion sind (Fei, Y. J. et al., 1997). Dieses Histidin ist sowohl bei PEPT1 als auch bei PEPT2 an nahezu identischer Position im Protein, d.h. in der 2. Transmembrandomäne in der Nähe der extrazellulären Oberfläche des Transportproteins lokalisiert. Eine Mutation von His-260 bei PEPT1 bzw. His-278 bei PEPT2 beeinflusst dagegen nicht die Transporteigenschaften der Peptidtransporter. Im Gegensatz zu Ergebnissen, die eine signifikante Rolle des His-142 im PEPT2-Protein aufzeigen, ist die Rolle des entsprechenden Histidins an Position 121 bei PEPT1 umstritten (Fei, Y. J. et al., 1997; Terada, T. et al., 1996; Chen XZ et al., 2000).

Neben der Bedeutung von Histidinresten für die Transportfunktion konnte über Computersimulation und gerichtete Mutagenese auch das Tyrosin an Position 167 in TMD 5 des humanen PEPT1-Proteins nach Expression in HEK-Zellen als essentiell für die Transportfunktion identifiziert werden (Yeung, A. K. et al., 1998). Ebenfalls über Computer-gestütztes Modeling in Kombination mit gerichteter Mutagenese wurde für den humanen PEPT1 ein möglicher Transportkanal aus den Transmembrandomänen 1, 3, 5 sowie 7, 8, 9 und 10 sowie eine funktionelle Rolle der Aminosäuren Tyr-12, Glu-26, Tyr-91, Arg-282, Trp-294, Asp-341 und Glu-595 postuliert (Bolger, M. B. et al., 1998).

Beim Vergleich der Ergebnisse aus dem Computer-Modeling und der gerichteten Mutagenese mit denen des Chimärenansatzes fällt allerdings auch auf, dass nicht alle als essentiell identifizierten Aminosäuren auch in den als entscheidend für die Transportfunktion vermuteten Transmembrandomänen lokalisiert sind (Meredith, D. & Boyd, C. A., 2000). Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Erkennungsstelle für Peptide aus Bereichen gebildet wird, die sich über das ganze Protein erstrecken. Für die Suche nach weiteren Bereichen und einzelnen Aminosäuren im Protein, die bei der Substratbindung und dem Transport eine Rolle spielen,

ist daher die Etablierung und der Einsatz von alternativen Methoden zur Strukturaufklärung von Bedeutung. Eine umfassende und detaillierte Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehungen wird aber letztendlich nur durch die Kristallisation des Transportproteins und der dreidimensionalen Röntgen-Strukturanalyse, wie z.B. im Fall des periplasmatischen Oligopeptid-Bindungsproteins OppA aus gram-negativen Bakterien, möglich sein (Sleigh, S. H. et al., 1997).

1.4 Die Substratspezifität der Peptidtransporter

Die Substratspezifität der Peptidtransporter ist seit der Entdeckung des Transportes von Peptiden Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Überwiegend durch Verdrängungsstudien an BSMV aus dem Dünndarm und der Niere sowie an Zelllinien und Perfusionsstudien an Darm und Niere wurde die Interaktion von Substraten mit dem intestinalen und renalen Peptidtransporter untersucht (Daniel, H. et al., 1992; Daniel, H. et al., 1991; Ganapathy, V. et al., 1981; Brandsch, M. et al., 1995; Thwaites, D. T. et al., 1994; Lister, N. et al., 1995; Silbernagl, S. et al., 1987; Daniel, H., 1996; Leibach, F. H. & Ganapathy, V., 1996).

Hierbei konnte gezeigt werden, dass der intestinale und der renale Peptidtransporter eine ähnliche Substratspezifität aufweisen. Allerdings unterscheiden sich die beiden Peptidtransporter signifikant in ihrer **Substrataffinität**. In kinetischen Untersuchungen mit Di- und Tripeptiden wurden für den renalen, später als PEPT2 bezeichneten, hochaffinen Peptidtransporter apparente Affinitäten (K_m - bzw. K_i -Werte) in der Größenordnung von 10 bis 250 μM bestimmt. Für den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 dagegen wurden für die gleichen Substrate Affinitäten >1 mM ermittelt (Daniel, H. et al., 1991; Skopicki, H. A. et al., 1991; Daniel, H. & Herget, M., 1997).

Als Substrate der Peptidtransporter dienen Di- und Tripeptide. Freie Aminosäuren oder Peptide mit mehr als drei Aminosäuren hingegen interagieren nicht mit den Transportern (Daniel, H. et al., 1992; Ganapathy, V. et al., 1991). Daher umfasst allein die Zahl ihrer physiologischen Substrate, also Di- und Tripeptide ausgehend von den 20 proteinogenen Aminosäuren mehr als 8400 mögliche Verbindungen (Meredith, D. & Boyd, C. A., 1995). Die Größe der möglichen Substrate variiert dabei von 132 Da für das kleinste Dipeptid Gly-Gly bis hin zu 576 Da für das größte Tripeptid Trp-Trp-Trp.

Diese breite Substratspezifität bzw. Multispezifität der Peptidtransporter ist auch unter **pharmakologischen Aspekten** sehr interessant. Denn neben den physiologischen Substraten werden auch verschiedene pharmakologisch aktive Peptidmimetika, also Verbindungen, die in ihrer Struktur Di- und Tripeptiden gleichen, als Substrate erkannt. Dazu gehören z.B. aus der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika Aminocephalosporine und Aminopenicilline, Peptidase-Inhibitoren, und, zumindest für PEPT1 eindeutig gezeigt, ACE-Inhibitoren (Daniel, H. & Adibi, S. A., 1993; Dantzig, A. H., 1997; Bretschneider, B. et al., 1999; Inui, K. et al., 1992; Swaan, P. W. et al., 1995; Kramer, W. et al., 1990).

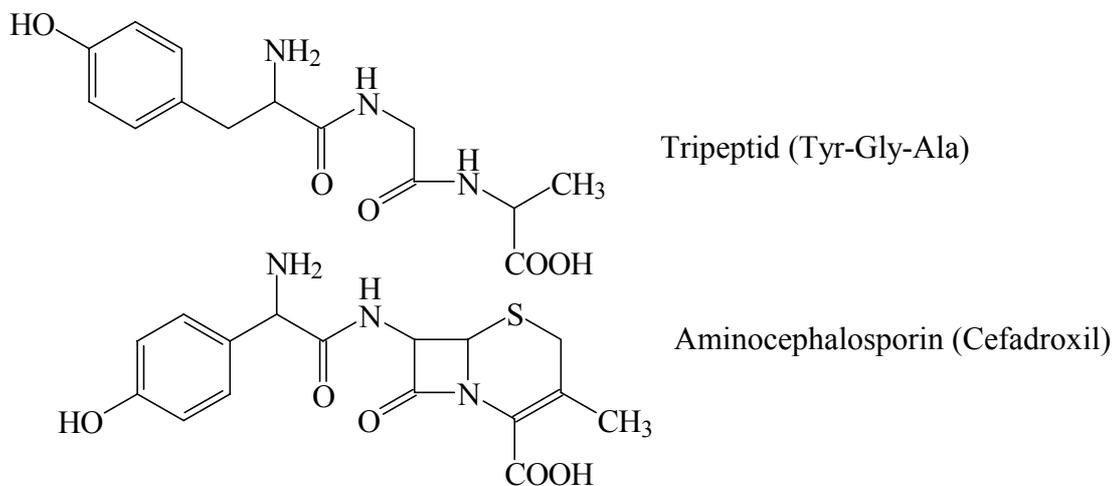


Abbildung 1-3. Strukturvergleich zwischen dem Tripeptid Tyr-Gly-Ala und Cefadroxil

Daher stellen die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 ein interessantes Target für die Entwicklung von Pharmaka dar, die aufgrund ihrer Interaktion mit den Peptidtransportern eine sehr gute Bioverfügbarkeit besitzen (Tsuji, A., 1999). Dieser Ansatz wurde bereits im Falle von L-Dopa, einem Therapeutikum für die Parkinson-Krankheit, mit der Entwicklung des Dipeptidmimetikums L-Dopa-L-Phe aufgegriffen (Tamai, I. et al., 1998). Auch die hohe orale Bioverfügbarkeit von Valacyclovir, der Prodrug-Form des antiviral wirkenden Acyclovir, ist auf die Resorption über PEPT1 zurückzuführen (Ganapathy, M. E. et al., 1998; Han, H. K. et al., 1998).

Das Ziel verschiedener Studien war es daher, die strukturellen Erfordernisse für die Erkennung von Substraten durch die Peptidtransporter zu identifizieren. So konnte durch Untersuchungen am renalen und intestinalen Peptidtransporter ihre Stereoselektivität gezeigt werden (Daniel, H. et al., 1992; Lister, N. et al., 1995; Tamai, I. et al., 1988). Die bevorzugte Bindung der L-Isomere von Aminosäuren in Peptiden gegenüber D-Isomeren trifft dabei auch

für die Stereoselektivität der Aufnahme von β -Lactam-Antibiotika zu (Wenzel, U. et al., 1995; Tamai, I. et al., 1988).

Im weiteren konnte für den Peptidtransporter der Niere gezeigt werden, dass auch Eigenschaften der Seitenketten von Aminosäuren wie ihre Hydrophobizität oder Ladung, die Affinität von Dipeptiden zum Transporter beeinflussen (Daniel, H. et al., 1992). Als weitere strukturelle Erfordernisse für Substrate mit einer hohen Affinität zum Transporter wurden außerdem a) eine freie terminale α -Aminogruppe und Carboxylgruppe, b) die Position der Aminogruppe und des Stickstoffs der Peptidbindung in α -Position, sowie c) die Trans-Konfiguration der Peptidbindung diskutiert (Daniel, H. et al., 1992). Für die Peptidbindung als ein weiteres strukturelles Merkmal, das allen Peptiden gemeinsam ist, wurde von Daniel und Adibi gezeigt, dass sie auch durch eine Säure-Amid-Bindung bzw. eine Keto-Methylenbindung ersetzt werden kann, ohne dass es zu einem Verlust der Affinität kommt (Daniel, H. et al., 1992; Daniel, H. & Adibi, S. A., 1994).

Ein weiterer Ansatz, die Erfordernisse von Substraten für die Interaktion mit den Peptidtransportern zu beschreiben und damit die Substratvielfalt der Transporter zu erklären, sind die Arbeiten von Döring et al. an den isolierten und heterolog exprimierten Peptidtransportern PEPT1 und PEPT2 (Döring, F. et al., 1998). Durch systematische Analysen der Interaktion von ω -Aminofettsäuren mit dem intestinalen Carrier PEPT1 konnte erstmals dessen minimale Anforderung an ein Substrat definiert werden. Danach ist für den elektrogenen Transport durch PEPT1 eine Minimalstruktur des Substrates erforderlich, die einen intramolekularen Abstand zwischen den geladenen Zentren, also dem Stickstoff der Aminogruppe und dem Kohlenstoff der Carboxylgruppe, von 500 bis 630 pm aufweist. Entfernt man die Amino- oder die Carboxylgruppe von ω -Aminofettsäuren, führt dies dazu, dass die Substanz nicht mehr elektrogen transportiert wird (Döring, F. et al., 1998). Diese Ergebnisse erklären darüber hinaus auch den Befund, dass der Präkursor der Porphyrinsynthese, die δ -Aminolävulinsäure, von den Peptidtransportern elektrogen transportiert wird (Döring, F. et al., 1998).

Für den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass verschiedene Aminosäuren-Derivate wie Alanin-Arylamide spezifisch mit dem humanen PEPT1 nach Expression in *Xenopus* Oozyten oder in Caco-2 Zellen interagieren (Borner, V. et al., 1998). Der elektrogene Transport dieser Moleküle durch PEPT1 zeigt, dass weder eine klassische Peptidbindung noch eine C-terminale Carboxylgruppe ein absolutes Erfordernis für eine Interaktion mit PEPT1 darstellen. Andere Studien zeigten außerdem, dass auch Verbindungen, die keine Peptidbindung aufweisen, wie 4-Aminophenyllessigsäure (4-APAA)

(Temple, C. S. et al., 1998) und 4-Aminomethylbenzoesäure (4-AMBA) (Meredith, D. et al., 1998), mit PEPT1 interagieren, wenngleich mit sehr niedrigen Affinitäten.

Entsprechende Untersuchungen zu minimalen Anforderungen von Substraten des renalen Peptidtransporters PEPT2 wurden allerdings noch nicht durchgeführt. Daher kann die Frage nach der Allgemeingültigkeit dieser Befunde für alle Transporter der Säuger bisher nicht beantwortet werden.

Um letztendlich auf molekularer Ebene die Substraterkennung durch die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 beschreiben zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen. Zum einen müssen auch die minimalen strukturellen Anforderungen an Substrate des hochaffinen Peptidtransporters PEPT2 entschlüsselt werden. Zum anderen gibt es bisher nur wenige Daten, die einen direkten und umfassenden Vergleich der klonierten Transporter PEPT1 und PEPT2 hinsichtlich ihrer Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Substraterkennung ermöglichen. Die vorliegenden Befunde zu PEPT1 und PEPT2 sind bisher überwiegend an unterschiedlichen Zell- und Expressionssystemen erhoben worden, was ihre Vergleichbarkeit erschwert. Erkenntnisse zu gemeinsamen strukturellen Anforderungen von PEPT1 und PEPT2 an ihre Substrate aber auch die Identifizierung ihrer Unterschiede kann darüber hinaus auch bei der Entwicklung neuer Pharmaka, ausgehend von spezifischen Leitstrukturen, von Bedeutung sein. Weiterhin ist es bisher nicht gelungen, spezifische Inhibitoren von PEPT1 und PEPT2 zu identifizieren. Durch derartige Inhibitoren wäre es möglich, wie für andere Membranproteine, z.B. den Na⁺/Glucose-Cotransporter SGLT1, bereits gezeigt, wesentliche Einblicke in die Struktur und Funktionsweise der Transportproteine zu erhalten (Mackenzie, B. et al., 1996; Falk, S. et al., 1999).

Aus dieser Zusammenfassung des Kenntnisstandes wird ersichtlich, dass es für das Verständnis der Struktur und Funktion der Transportproteine auf molekularer Ebene neuer methodischer Ansätze bedarf.

1.5 Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* als heterologes Expressionssystem

Für die Peptidtransporter gilt wie für Membranproteine generell, dass die Expression und Überexpression in homologen und heterologen Expressionssystemen vielfach schwieriger ist, als die Produktion löslicher Proteine (Schertler, G. F. X, 1992; Eckart, M. R. & Bussineau, C. M., 1996). Für die Peptidtransporter sind bereits Expressionssysteme wie das *Xenopus laevis* Oozyten System oder Zelllinien beschrieben, in denen diese Transporter in funktioneller Form exprimiert werden können (Boll, M. et al., 1996; Boll, M. et al., 1994; Liang, R. et al., 1995; Ramamoorthy, S. et al., 1995). Für bestimmte Fragestellungen scheiden diese Systeme allerdings aus, z.B. infolge der geringen Expressionshöhe oder der aufwendigen und teuren Handhabung. Aufgrund erster Ergebnisse zur funktionellen Expression von Peptidtransportern aus Säugern in der Hefe *Pichia pastoris* (Döring, F. et al., 1997; Döring, F. et al., 1998), schien das System geeignet für neue Anwendungen ausgebaut zu werden.

Pichia pastoris zählt zu einer Gruppe von Hefespezies vier unterschiedlicher Genera, die die Fähigkeit besitzen, mit Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (Gellissen, G., 2000; Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000; Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000; Cregg, J. M. et al., 1993). Die anderen Genera umfassen *Hansenula*, *Candida* und *Torulopsis*. Zunächst für die Produktion von sogenanntem single-cell-protein eingesetzt, also primär zur Erzeugung von Proteinen für die Tierernährung, erfolgte ab 1980 die Entwicklung von *Pichia pastoris* zu einem Expressionssystem für die Charakterisierung und Herstellung heterologer Proteine (Gellissen, G., 2000).

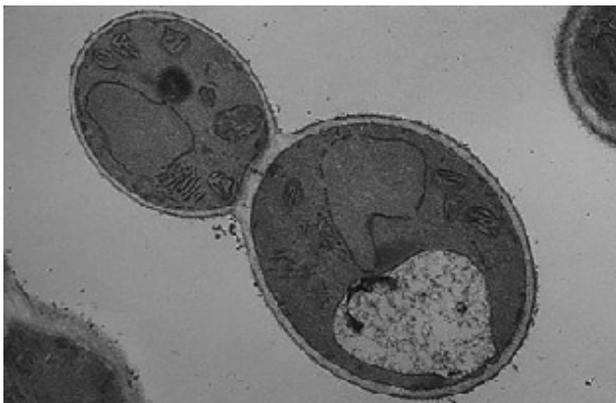


Abbildung 1-4. Mikroskopische Aufnahme einer knospenden *Pichia pastoris* Zelle. (Quelle: www.invitrogen.com)

Die Fähigkeit, Methanol zu verwerten, beruht bei *P. pastoris* wie auch bei den anderen fakultativ methylotrophen Hefen auf einem gemeinsamen Abbauweg (Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000; Cregg, J. M. et al., 1989; Ellis, S. B. et al., 1985). Die initiale Reaktion ist hierbei die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid in bestimmten Zellkompartimenten, den Peroxisomen. Für diesen ersten Abbauschritt verantwortlich sind Alkoholoxidasen (AOX). Die Gene, die für die Alkoholoxidasen 1 und 2 codieren (*AOX1* und

AOX2) konnten identifiziert und isoliert werden (Cregg, J. M. et al., 1989; de Hoop, M. J. et al., 1991; Ellis, S. B. et al., 1985). Die Expression der Alkoholoxidase 1, die hauptsächlich für den Abbau von Methanol verantwortlich ist, wird auf der Ebene der Transkription sehr genau reguliert (Cregg, J. M. et al., 1989; Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000). Die Regulation des *AOX1*-Gens erfolgt durch zwei Mechanismen: einem Repressions-/Derepressions-Mechanismus und einem Induktions-Mechanismus. Die *AOX1*-Expression kann durch Methanol im Medium in hohem Maße stimuliert werden. Bei Abwesenheit von Methanol im Medium ist dagegen keine *AOX1*-mRNA nachweisbar (Cregg, J. M. et al., 1989). Bei *Pichia pastoris* Kulturen, die auf Methanol-haltigem Medium aufgezogen werden, kann das AOX1-Enzym bis zu 30 % des gesamten löslichen Proteins der Zelle betragen (Gellissen, G., 2000; Cregg, J. M. et al., 1993).

Aufgrund der großen Effizienz der Transkription der AOX1 sowie der genauen Kontrolle ihrer Expression durch die Induktion mit Methanol wurde daher der Promotor des *AOX1*-Gens als erster Promotor zur Expression von Fremdgenen in *Pichia pastoris* etabliert.

Da molekulargenetische Techniken, die bereits für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* seit langem etabliert waren, sich auch in der Arbeit mit *Pichia pastoris* einsetzen ließen, erfolgte in den letzten Jahren eine Verbreitung und Weiterentwicklung des Pichia-Systems. Dies findet auch darin Ausdruck, dass seit 1993 die Zahl der Publikationen in der Medline-Datenbank zu *Pichia pastoris* von 8 Arbeiten auf über 600 angestiegen ist (Stand: Februar 2001). Die Entwicklung des *Pichia*-Systems betraf vor allem die Genese neuer Expressionsvektoren mit neuen Promotoren und Selektionsmarkern, aber auch die Einführung neuer *Pichia pastoris* Stämme.

Tabelle 1-1. Relevante Komponenten der Vektoren zur Protein-Expression in *P. pastoris*.
(nach Cereghino, J.L. & Cregg, J.M., 2000).

Sekretionssignale	ohne, PHO1, α -MF, SUC2, PHA-E
Marker-Gene	HIS4, ADE1, ARG4, G418, URA3, Zeo
Promotoren	AOX1, GAP, FLD1, PEX8, YPT1

Sekretionssignale: PHO1, *P. pastoris* saure Phosphatase; α -MF, *S. cerevisiae* α - Mating Faktor; SUC2, Invertase; PHA-E, *Phaseolus vulgaris* Agglutinin; Marker-Gene: HIS4, Histidinol-Dehydrogenase; ADE1, Amidoimidazolsuccinocarboxamid-Synthase; ARG4, Argininosuccinat-Lyase; URA3, Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase; Promotoren. AOX1, Alkoholoxidase 1; GAP, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; FLD1, Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase; PEX8, Peroxisomales Matrixprotein; YPT1, YPT1-GTPase.

Für verschiedene Aspekte dieser Arbeit, wie z.B. der Entwicklung eines Wachstumsassays war die Expression unter der Kontrolle des durch Methanol induzierbaren AOX1-Promotors aufgrund des retardierten Wachstums der transgenen Hefezellen auf Methanol-haltigen Nährmedien ungeeignet. Daher war vor allem die Entwicklung eines Expressionsvektors entscheidend, mit dem eine kontinuierliche und hohe funktionelle Expression der Peptidtransporter möglich war. Hierfür wurde der Promotor der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAP) isoliert und in Expressionsvektoren integriert (Waterham, H. R. et al., 1997). Für den GAP-Promotor konnte gezeigt werden, dass er auf Glucose-haltigen Medien eine konstitutive Expression ermöglicht, die in ihrer Höhe vergleichbar ist mit der des AOX-Promotors. Die Aktivität des GAP-Promotors ist abhängig von der Kohlenstoffquelle im Medium, wobei die höchste Aktivität auf Glucose-haltigen Medien gemessen wurde. Mit Glycerin oder Methanol als Kohlenstoffquelle betrug die Aktivität noch 2/3 bzw. 1/3 der bei Glucoseangebot (Waterham, H. R. et al., 1997). Der Vorteil des GAP-Promotors liegt darin begründet, dass Methanol nicht zur Induktion der Expression gebraucht wird und die Hefestämme daher auf einer einzigen Kohlenstoffquelle kultiviert werden können.

Eine weitere entscheidende Verbesserung war die Entwicklung neuer und weiterer Marker zur Selektion positiver rekombinanter *Pichia pastoris* Zellen. Als einziger Selektionsmarker war zunächst nur der HIS4-Marker erhältlich, bei dem die Selektion über die funktionelle Komplementierung eines im Wildtyp-Hefestamm defekten Gens in der Biosynthese von Histidin, der Histidinol-Dehydrogenase erfolgt (Crane, D. I. & Gould, S. J., 1994). Ein weiterer Marker, der auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde, war der Zeo-Marker. Der Zeo-Marker besteht aus dem 375 bp langen *Sh ble* Gen von *Streptoalloteichus hindustanus*, dessen Genprodukt eine Resistenz gegenüber dem Bleomycin-artigen Antibiotikum Zeocin verleiht (Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000).

Wie alle erhältlichen *Pichia pastoris* Stämme stammt auch der in dieser Arbeit verwendete Histidin-auxotrophe Stamm GS115 vom Stamm NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL, USA) ab. Aufgrund der Mutation in der Synthese von Histidin kann der Stamm GS115 zwar auf komplexen Medien kultiviert werden, für das Wachstum auf Minimalmedien ist allerdings, bis zu einer eventuellen Komplementierung des mutierten HIS4-Gens durch Transformation, die Supplementierung des Mediums mit Histidin erforderlich (Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000).

Ein Vorteil des *Pichia pastoris* Hefesystems liegt darin, dass es durch homologe Rekombination zwischen Sequenzen des Expressionsvektors und des *P. pastoris* Genoms zu einer Integration des zu exprimierenden Fremdgens in das Genom der Hefe kommt, wodurch die Stabilität des transgenen Hefestammes auch in Abwesenheit eines Selektionsdrucks gewährleistet bleibt.

Ein weiterer Punkt, der das Hefesystem gegenüber anderen Systemen – wie z.B. bakteriellen Expressionssystemen - überlegen macht, betrifft die posttranslationale Modifizierung der Proteine. *P. pastoris* ist als eukaryotische Zelle in der Lage, viele der posttranslationalen Modifikationen an Proteinen durchzuführen, die bei höheren Eukaryoten vorkommen, wie z.B. die Prozessierung von Signalsequenzen, die Proteinfaltung und Bildung von Disulfidbrücken oder O- und N-glykosidische Modifizierungen (Busser, K. et al., 1993; Gemmill, T. R. & Trimble, R. B., 1999; Higgins, D. R. & Cregg, J. M., 1998).

1.6 Ziele der Arbeit

Ausgehend von der entscheidenden Bedeutung der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 für die Homöostase von Aminosäurenstickstoff sowie ihrer Rolle in pharmakologischen Prozessen besteht ein großes Interesse an den molekularen und strukturellen Grundlagen des Transportprozesses.

Als wesentliche Voraussetzung zu ihrer Analyse bedarf es eines Expressionssystems, das es ermöglicht, entsprechende Daten in großem Umfang zu generieren.

Daher sollte in dieser Arbeit zunächst das *Pichia pastoris* Hefesystem als Expressionssystem für den humanen Peptidtransporter mit hoher Rate funktioneller Expression etabliert werden.

Darüber hinaus sollte ein neues Verfahren zur ungerichteten Mutagenese entwickelt werden, mit dessen Hilfe Informationen zur Struktur-Aktivitätsbeziehung des Peptidtransporters erlangt werden können.

Im Vorhaben sollte das Hefesystem auch als Screeningplattform etabliert werden, um mit hohem Durchsatz a) Informationen zu Anforderungen an Substrate von PEPT1 und PEPT2 sowie b) vergleichende Analysen der Transporter-Isoformen vorzunehmen, c) die minimalen strukturellen Anforderungen von Substraten für PEPT2 zu identifizieren, sowie d) spezifische Inhibitoren für PEPT1 und PEPT2 zu identifizieren und zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.2 Materialien

2.2.1 Das Oozytensystem

Für die Entnahme von Oozyten zur Expression der Peptidtransporter dienten *Xenopus laevis* (Südafrikanische Krallenfrösche) der Fa. Nasco (Fort Atkinson, USA).

2.2.2 Hefe- und Bakterienstämme

Für die Transformation und Expression der Peptidtransporter wurde der Histidin-auxotrophe *Pichia pastoris* Stamm GS115 verwendet (Invitrogen, San Diego, USA). Für die Propagation und Transformation der verschiedenen Expressionsplasmide wurde der Stamm TOP 10F' (Invitrogen, San Diego, USA) eingesetzt. Für die Zufallsmutagenese kamen Epicurian® Coli XL1-Red kompetente Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) zum Einsatz.

2.2.3 Radioaktiv-markierte Verbindungen

Das radioaktiv-markierte Dipeptid [Alanin-2,3-³H]D-Phe-L-Ala ([³H]-D-Phe-Ala) mit einer spezifischen Aktivität von 40 Ci/mmol und einer Volumenaktivität von 1,1 mCi/ml wurde von Biotrend (Köln) bezogen.

2.2.4 Peptide, Peptidmimetika, Peptid- und Aminosäurenderivate

Peptide, Peptidmimetika, Peptid- und Aminosäurenderivate wurden entweder von Sigma, Deisenhofen oder Bachem, Heidelberg bezogen oder speziell durch Dr. B. Hartrodt aus der Arbeitsgruppe von Prof. K. Neubert (Institut für Biochemie, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle) nach Standardmethoden der Peptidchemie (Barth, A. et al., 1980; Wunsch, E, 1974) synthetisiert.

2.2.5 Chemikalien, Reagenzien für die Molekularbiologie, Verbrauchsmaterial

Laborchemikalien (pro analysis Qualität) sowie die Komponenten für Bakterien- und Hefemedien wurden überwiegend von Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) bezogen. Weiterhin wurden in dieser Arbeit folgende Materialien verwendet: Enzyme, dNTP's und DNA-Größenmarker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Frankfurt; Roche, Mannheim und Life Technologies, Karlsruhe); Oligonukleotide (Eurogentech, Seraing, Belgien sowie MWG, Ebersberg); Clean-a-gene DNA Isolations–Kit, sowie Petrischalen und Zentrifugationsröhrchen (Renner, Dannstadt); High-Molecular-Weight-Range Proteinmarker, Protease-Inhibitor-Cocktail, Anti-mouse-IgG (Peroxidase-Konjugat), 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (Sigma, Deisenhofen); Positope™-Protein, Anti-myc Antikörper, TA cloning Kit, Topo™-TA Cloning Kit und Zeocin (Invitrogen, San Diego, USA);

Zymolyase (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan). ELONGASE Amplifikations-System (Life Technologies, Karlsruhe); mMessage-machine™ *in-vitro*-Transkriptions-Kit (Ambion, Austin, USA); FlexiPrep Kit zur Isolierung von Plasmid-DNA, Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Sequenzierungs-Kit sowie ReproGel (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg); Hefestickstoff-Basis (DIFCO, Becton-Dickinson, Heidelberg); ME-25 Membranfilter (Schleicher & Schuell, Dassel); 96-well Filterplatten (MAHA und MHVB) sowie Stanzstempel (Millipore, Eschborn). Glasperlen (Säure-gewaschen, 0,5 mm Durchmesser), Roti-Quant zur Proteinbestimmung, Szintillationscocktail (Rotiszint Eco), PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe); Szintillationsvials (Zinsser Analytic, Frankfurt).

2.2.6 Geräte

Neben den laborüblichen Geräten kamen folgende spezielle Geräte zum Einsatz: Thermocycler Personal Cycler (Biometra, Göttingen) sowie PCR-Sprinter und PCR-Express (Hybaid, Heidelberg); Automatischer Sequenzierer ALFexpress (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg); Mini-Protean II Vertikal-Elektrophorese System; Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer-Zelle, Gene Pulser II Electroporation System (Biorad, München); Vakuum-Filtrationssystem (Sonderanfertigung A. Kratz, Institut für Ernährungswissenschaft, Gießen); β -Szintillations-Zähler LS6500 (Beckmann, Fullerton, USA) und MicroBetaTriLux (Wallac, Turku, Finland); Oozyten Mikroinjektor Nanoject (Drummond, Birmingham, USA); Membranfilterhalter sowie die Multiscreen-Stanze von Millipore (Eschborn); TEC-05 amplifier (npi electronic, Tamm); Kühlzentrifuge Sorvall RC2-B und RC5-B (Du Pont Instruments, Bad Nauheim) sowie BR4i (Jouan, Saint-Herblain, Frankreich).

2.3 Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation eines ausgewählten DNA-Fragmentes mittels spezifischer Oligonukleotide (Mullis, K. B. & Faloona, F. A., 1987). Die PCR wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um durch gerichtete Mutagenese neue Schnittstellen für Restriktions-Enzyme in cDNA's einzufügen. Ausgehend von genomischer DNA der Hefeklonen im Rahmen der Zufallsmutagenese (s. 2.2.9) wurden mittels PCR entsprechende, in das Hefe-Genom zu integrierende cDNA-Stränge der Peptidtransporter amplifiziert und isoliert. Es wurde hierbei das ELONGASE System eingesetzt, bei dem eine *Taq/Pyrococcus* DNA-Polymerase-Mischung Verwendung findet, die eine Korrektur-Lese-Aktivität besitzt.

Die Reaktion erfolgte ausgehend von 10 ng Plasmid-DNA bzw. 1 μ g isolierter genomischer DNA. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 25 μ l 0,5 μ l Elongase-Enzym

(1U/ μ l), sowie 0,5 μ l Sense- und Antisense-Primer (Endkonzentration 200 nM) sowie 1,6 mM MgCl₂. Das Amplifikations-Protokoll bestand, soweit bei den Ergebnissen nicht anders erwähnt, aus einer initialen Denaturierung bei 94°C (30 s), gefolgt von 35 Zyklen zur Amplifikation der DNA (Denaturierung für 30 s bei 94°C, Anlagern der Primer für 30 s bei 57°C, Synthese für 120 s bei 68°C). Zur Kontrolle der Amplifikation wurden die PCR-Produkte in einem 0,8 bis 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Sambrook, J. et al., 1989). Anschließend erfolgte die Insertierung der PCR-Produkte mittels TA-Cloning Kit oder TOPO-TA Cloning Kit in den Vektor pCRII (Invitrogen, San Diego, USA). Hierbei macht man sich zu Nutze, dass die meisten Taq-Polymerasen an den 3'-Enden der PCR-Produkte überhängende dATP's anfügen. Daher können diese Fragmente in Plasmide ligiert werden, die in der Klonierungsstelle dazu komplementäre überhängende dTTP's aufweisen.

2.3.2 Konstruktion der Expressionsvektoren

Zur Konstruktion der Expressionsvektoren, der Transformation, Propagation und Isolierung der Plasmide sowie zur Restriktionsanalyse wurden klassische molekularbiologische Labormethoden nach Sambrook und Maniatis eingesetzt (Sambrook, J. et al., 1989). Zur Expression von hPEPT1 in *Pichia pastoris* wurden 4 Expressionsvektoren erzeugt. Für die Konstruktion des Expressionsvektors pPIC3L-hPEPT1 wurde ein 2,2 kb großes cDNA-Fragment, das für hPEPT1 kodiert, durch *Sall* und *NotI* Verdau aus dem Vektor pBS-SK'-PEPT1 (Liang, R. et al., 1995) geschnitten. Das Plasmid pPIC3L (Döring, F. et al., 1997) wurde mit *XhoI/NotI* verdaut. Da *Sall* und *XhoI* kompatible kohäsive Enden erzeugen, konnte die hPEPT1-cDNA in die *XhoI/NotI*-Stellen von pPIC3L insertiert werden. Das daraus resultierende Plasmid wurde als pPIC3L-hPEPT1 bezeichnet. Zur Insertion der hPEPT1-cDNA in den Expressionsvektor pPIC9 (Invitrogen, San Diego, USA) wurden zunächst über PCR (s.2.2.1) am 5'-Ende eine *AvrII*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle in die hPEPT1-cDNA eingefügt. Die hPEPT1-cDNA wurde dabei ausgehend vom Plasmid pBS-SK'-hPEPT1 mit den Primern hPINTAV: 5'-CGGCAGTCGCAGGACCTAGGGGAGCCGCCCATGGGAATG T CC-3' und hPICTX 5'-CTTGCCTCCTTCTAGACACATCTGTTTCTGTGAATTGGCCC-C-3' mit den gewünschten Schnittstellen (*kursiv* hervorgehoben) als 5'-Extensionen amplifiziert. Das erhaltene 2,2 kb große PCR-Fragment mit den *AvrII/XbaI*-Schnittstellen wurde mit dem TA-Cloning Kit in das Plasmid pCRII kloniert. Anschließend wurde das *AvrII/XbaI*-Fragment aus dem Vektor pCRII-hPEPT1 in die *AvrII*-Schnittstelle (*XbaI* und *AvrII* besitzen kompatible kohäsive Enden) des Plasmids pPIC9 insertiert. Diese Klonierungsschritte führten zu einer Fusion im korrekten offenen Leserahmen mit der α -

Faktor Signalsequenz von *S. cerevisiae*, die auf dem Plasmid pPIC9 integriert ist. Der entstandene Vektor wurde pPIC9-hPEPT1 benannt. Zur Generierung der Expressionsvektoren pPICZB-hPEPT1 und pGAPZB-hPEPT1 ausgehend von den Plasmiden pPICZB und pGAPZB (Invitrogen, San Diego, USA) wurden ebenfalls zunächst über PCR zwei Schnittstellen am 5' und 3'-Bereich der hPEPT1-cDNA eingefügt. Hierbei wurde das Oligonukleotid hPINTBSP (5'-GTCGCAGGAGCCCTTCGAACCGCCGCAT-3') zur Generierung einer *Bsp119I*-Schnittstelle eingesetzt und hPICTX (Sequenz siehe oben) zur Generierung einer *XbaI*-Stelle. Das PCR-Produkt wurde mittels TA-Cloning Kit in den pCRII Vektor ligiert und anschließend das *Bsp119I/XbaI*-Fragment in die mit *Bsp119I/XbaI* geschnittenen Plasmide pPICZB und pGAPZB inseriert. Durch das Einfügen der *XbaI*-Schnittstelle wurde das native Stop-Codon der hPEPT1-cDNA mutagenisiert. Somit kommt es zu einer C-terminalen Fusion der hPEPT1-cDNA im korrekten offenen Leserahmen mit Sequenzen, die für das myc-Epitop und einen Polyhistidin-Tag kodieren und in den Plasmiden pPICZB und pGAPZB integriert sind. Zur Kontrolle der Mutation des Stop-Codons und der korrekten Fusion an das myc/His-Epitop wurden die erhaltenen Konstrukte sequenziert.

2.3.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger, F. et al., 1977) unter der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Cy5 (5'-Cyanin) zur Markierung der DNA und deren anschließender Detektion durch den automatischen DNA-Sequenzierer ALF-Express. Eine Methode, die zur Sequenzierung eingesetzt wurde, war die T7-Sequenzierung mit dem AutoReadSequencing Kit, bei der ein Cy5-markierter Primer, nicht-markierte Didesoxynukleotide (ddNTP's) und Desoxynukleotide (dNTP's) sowie eine T7-Polymerase zur Generierung von fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotid terminierten DNA-Strängen verwendet wird. Ein weiteres Verfahren, das zur Sequenzierung angewendet wurde, war das sogenannte Cycle-Sequencing. Der Ansatz bestand hierbei aus einem DNA-Template, einem nicht-markierten Primer, einer hitzestabilen Polymerase und Cy5-markierten ddNTP's und dNTP's. Die Zyklen bestehen hierbei aus thermischer Denaturierung und Polymerisierung, bei der es zu einem Kettenabbruch nach Einbau von Cy5 markierten ddNTP's kommt. Durch die Temperaturzyklen kommt es in jedem Durchlauf zu einer linearen Zunahme der Menge von terminierten DNA-Strängen.

Vergleiche der Sequenzen auf DNA- und Protein-Ebene mit den in der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) abgelegten Sequenzen der Peptidtransporter wurde das Programm DNASIS (Hitachi Software Engineering) verwendet.

2.3.4 Hefetransformation

Lineare DNA kann in *Pichia pastoris* stabile Transformanden über homologe Rekombination zwischen Sequenzen der einzubringenden Plasmid-DNA und den dazu homologen Regionen im Genom erzeugen. Zur Identifikation von positiven rekombinanten *P. pastoris*-Klonen dient die Selektion über sogenannte Marker-Gene. Diese führen entweder wie im Falle von HIS4 zu einer Komplementierung des Histidin-auxotrophen Phänotyps des Wildtyp-Hefestamms GS115 oder verleihen wie beim Zeo-Marker eine Resistenz gegenüber einem Antibiotikum. Des Weiteren kann durch eine Linearisierung an verschiedenen Stellen des zu transformierenden Plasmids ein unterschiedlicher Integrationsort bevorzugt werden. Hierbei kommt die Integration ins Genom entweder über ein einzelnes Crossing-Over zu Stande oder es kann bei Integration im AOX1-Locus zu einem doppelten Crossing-Over und dabei zu einem Verlust des AOX1-Gens kommen. Durch den Verlust der AOX1 zeigen diese Transformanden daher ein langsames Wachstumsverhalten (MutS) auf Methanol-haltigen Medien als der Wildtyp (Mut+).

Transformation durch die Lithium-Chlorid Methode

Die Vorbehandlung von Hefen mit Alkalimetallkationen erlaubt es die Zellen ohne vorherige Lyse der Zellwand für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen. Zur Transformation wurden jeweils 15-20 µg der Plasmide pPIC3L, pPIC3L-hPEPT1 mit *Sall* zur Generierung von Mut⁺-Transformanden und mit *BglII* für MutS-Transformanden, pPIC9 und pPIC9-hPEPT1 mit *Sall*, pPICZB, pPICZB-hPEPT1, pGAPZB und pGAPZB-hPEPT1 mit *AvrII* linearisiert. Eine 50 ml Kultur des Stammes GS115 wurde bis zu einer OD von 0,8–1 in YPD-Medium (1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glucose) kultiviert und durch 10 min Zentrifugation bei 3.000 g und RT geerntet. Nach Waschen der Zellen mit 25 ml H₂O wurde das Pellet in 1 ml 100 mM LiCl resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation in 400 µl 100 mM LiCl aufgenommen. Pro Ansatz wurden 50 µl der Zell-Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zentrifugation die LiCl-Lösung vom Pellet abgenommen. In der angegebenen Reihenfolge wurden dann zum Pellet jeweils 240 µl 50% PEG, 36 µl 1M LiCl, 25 µl 2 mg/ml einzelsträngige Lachs-Sperma-DNA sowie die linearisierte Plasmid-DNA in 50 µl H₂O gegeben, für 1 min gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock bei 42°C für 25 min im Wasserbad wurden die Ansätze bei 3.000 g abzentrifugiert (5 min, RT). Zur Selektion über den HIS4-Marker wurden die Zellen direkt auf MD-Agarplatten (1% Glucose, 1,34% Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren, 4×10⁻⁵% Biotin, 2% Agar) ausplattiert. Zur Selektion auf Zeocin-Resistenz wurden die Zellen zunächst für 1h mit 1 ml YPD-Medium unter Schütteln bei 30°C inkubiert und anschließend auf YPD-Agar-

platten mit 100 µg/ml Zeocin ausplattiert. Die Agarplatten wurden dann für 2-3 Tage bei 30 °C bis zum Erscheinen positiver rekombinanter Hefe-Kolonien inkubiert.

Die Selektion auf Mut⁺ oder MutS-Phänotyp erfolgte durch gleichzeitiges Aufbringen von positiven rekombinanten *P. pastoris* Klonen der Transformations-Ansätze pPIC3L und pPIC3L-hPEPT1 auf Methanol-haltige MM-Agarplatten (0,5% Methanol, 1,34% Hefestoffbasis ohne Aminosäuren, 4×10⁻⁵% Biotin, 2% Agar) und MD-Agarplatten und Selektion nach Kolonien, die ein normales Wachstum auf MD-Platten zeigten, aber langsamer auf MM-Platten wuchsen (MutS-Phänotyp).

Die Selektion auf multiple Integrationsereignisse der positiven rekombinanten Hefekolonien nach Transformation mit den Plasmiden pPICZB, pPICZB-hPEPT1, pGAPZB sowie pGAPZB-hPEPT1 beruht auf der erhöhten Zeocin-Resistenz bei Vorhandensein von mehreren Kopien der Fremd-DNA im *P. pastoris*-Genom und erfolgte durch Ausplattieren auf YPD-Agarplatten mit steigenden Konzentrationen an Zeocin (bis zu 1,2 mg/ml).

Transformation durch Elektroporation

Eine weitere Möglichkeit zur Transformation von Hefezellen mit linearisierter Plasmid-DNA stellt die Elektroporation dar. Aufgrund der besseren Transformationseffizienz wurde diese Methode im Rahmen der Zufallsmutagenese eingesetzt, um eine möglichst hohe Ausbeute an Transformanten mit mutierter hPEPT1-cDNA zu erhalten. Zur Elektroporation wurde eine 50 ml Kultur der *P. pastoris* GS115 Zellen bis zu einer OD von 1,3 – 1,5 in YPD Medium kultiviert. Nach 5 min Zentrifugation (3.000 g, 4°C) wurden die Zellen zweimal mit 50 ml eiskaltem H₂O und einmal mit eiskaltem 1M Sorbitol gewaschen und anschließend in 150 µl 1 M Sorbitol resuspendiert. Pro Ansatz wurden 80 µl Zellsuspension in einem 2ml-Reaktionsgefäß mit 5 - 10 µg linearisierter Plasmid-DNA gemischt, in eine eiskalte Elektroporations-Küvette (0,2 cm) überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 1500 V, 25 µF und 200 Ω gepulst, so dass eine Pulslänge von etwa 5 ms und eine Feldstärke von ca. 7500 V/cm erreicht wurde. Nach der Elektroporation wurde 1 ml 1M Sorbitol zu den Zellen gegeben, die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 1 h bei 30°C inkubiert. Danach wurde 1 ml YPD-Medium zugeführt, die Zellen für 2 h bei 30°C geschüttelt und anschließend auf YPD-Platten mit 100 µg/ml Zeocin ausplattiert.

2.3.5 Transportstudien an Hefezellen

Die Aufnahmeexperimente mit Hefezellen wurden unter Verwendung einer Schnellfiltrationstechnik mit dem radioaktiv markierten Dipeptid [³H]-D-Phe-Ala entweder auf Einzelfiltern oder auf 96-well Filterplatten durchgeführt. Zellen der Klone GAPZB, GAPZB-hPEPT1

sowie GAP-PEPT2 (Döring, F. et al., 1998) wurden in YPD-Medium bis zu einer OD von 3-6 kultiviert und direkt für die Aufnahmemessung eingesetzt. Bei den Stämmen mit AOX1-Promotor kontrollierter Expression (PIC3L, PIC3L-hPEPT1, PIC9, PIC9-hPEPT1 sowie GS-PEPT1S (Döring, F. et al., 1997)) wurden die Zellen zunächst in MGY-Medium (1% Glycerin, 1,34% Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren, 4×10^{-5} % Biotin) bzw. MGY-Medium mit 0,004 % Histidin (MGYH) bis zu einer OD von 3-6 herangezogen und dann zur Induktion der Expression auf Methanol-haltiges Medium (MM bzw. MMH) für weitere 24 h überführt.

Einzelfilter-Assay

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3.000 g, 5 min, RT) geerntet, dreimal mit Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM, pH6,5) (KPP) gewaschen und auf eine Zelldichte von 1 OD in 10 μ l KPP resuspendiert. Die Aufnahme wurde durch schnelles Mischen der Hefesuspension mit 40 μ l KPP, 0,1 μ Ci [3 H]-D-Phe-Ala enthaltend sowie mit oder ohne Kompetitoren (0,001 bis 10 mM), gestartet. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Aufnahme in die Zellen durch Zugabe von 3 ml eiskaltem KPP gestoppt, der Ansatz über einen Filter (ME25, 0,45 μ m Porengröße) abgesaugt und der Filter nach dreimaligem Waschen mit KPP in ein Szintillationsvial überführt. Nach Zugabe von 4 ml Szintillator wurde die mit dem Filter assoziierte Radioaktivität im β -Szintillationszähler bestimmt.

96-well Filterplatten-Assay

Die Zellen wurden vorbehandelt wie für den Einzelfilter-Assay und auf eine Zelldichte von 1 OD in 20 μ l KPP resuspendiert. Die Filterplatten (MAHA bzw. MHVB, 96-well, 0,45 μ m Porengröße) wurden mit 30 μ l KPP für 5 min prä-äquilibriert und anschließend abgesaugt. Zu 30 μ l Inkubationslösung (0,1 μ Ci [3 H]-D-Phe-Ala mit oder ohne Kompetitoren in den entsprechenden Endkonzentrationen von 1 nM bis 20 mM in KPP) wurden in jedes Well 20 μ l Hefesuspension hinzugegeben und für 15 min auf einem Mikrotiterplatten-Vortexer unter leichtem Rütteln inkubiert. Anschließend wurde der Unterboden der Mikrotiterplatte entfernt, die Inkubation durch Zugabe von 200 μ l eiskaltem KPP und Absaugen des Ansatzes mittels Vakuum-Filtrationssystem gestoppt und die Filter 3 \times mit 200 μ l KPP gewaschen. Zur Bestimmung der mit den Filtern assoziierten Radioaktivität wurden A) die Filter mittels Stanze von der Platte entfernt und in Szintillationsröhrchen überführt, mit 4 ml Szintillationscocktail versehen und die Radioaktivität im β -Counter bestimmt oder B) nach dem Waschen der Filterplatten in jedes Well 35 μ l Szintillationscocktail gegeben, die Platte mit Klebefolie versiegelt und direkt im MicroBetaTriLux gemessen.

2.3.6 Membranpräparation

Zellen der entsprechenden Hefestämme GAP-hPEPT1 oder GAP-K (Kontrolle) wurden in YPD-Medium bis zu einer OD von 4-6 kultiviert und durch 10 min Zentrifugation (3.000 g, 4°C) pelletiert. Das Zellpellet wurde einmal mit eiskaltem Breaking-Puffer (50 mM Na-Phosphat (pH 7,4), 1mM EDTA, 5% Glycerin) gewaschen und anschließend zu 100 OD/ml Breaking-Puffer mit 1mM PMSF und 2 µl/ml Protease-Inhibitor (PI) Cocktail resuspendiert. Zur Suspension wurde ein gleiches Volumen Glasperlen (Säure-gewaschen, 0,5 mm Durchmesser) hinzugegeben und die Zellen durch kräftiges Vortexen (8× für 30 s, jeweils unterbrochen durch 30 s Inkubation auf Eis) aufgebrochen. Die Zellwand sowie nicht zerstörte Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation abgetrennt (2.000 g, 4°C, 10 min) und die Zellmembran durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g (4°C, 30 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl Membran-Suspensions-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit 1 mM PMSF und 1 µl PI-Cocktail aufgenommen. Aliquote wurden schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über die Roti-Quant Methode mit BSA als Standard.

2.3.7 Western-Blot-Analyse

Membranproteine der entsprechenden Hefestämme oder das positopeTM-Protein wurden auf einem 10%-igen SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (Mini-Protean II, 0,06 A, 200 mV, 45 min). Durch Elektrotransfer wurden die Proteine dann über eine Semi-Dry Transfer-Zelle auf PVDF-Membran transferiert (20 mV, 260 mA, 45 min). Zur Kontrolle der Transfereffizienz und zur Markierung der Markerproteine wurden die auf der Membran immobilisierten Proteine zunächst durch Ponceau S (0,2% w/v Ponceau S in 3% w/v Sulfosalicylsäure und 0,1% Essigsäure) reversibel gefärbt. Nach Entfärben durch Waschen mit Wasser wurde die Membran für 1 h bei RT mit 4% Magermilchpulver in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) blockiert. Nach 3× 5 min Waschen mit PBS wurde die Membran zur Immuno-Detektion der myc-getaggten Proteine mit dem monoklonalen Anti-myc Antikörper (Endkonzentration von 0,9 µg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS gewaschen (3× 10 min) und 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper Anti-mouse IgG (Peroxidase-Konjugat, 1:2000 Verdünnung) inkubiert. Durch 3-maliges Waschen (10 min) mit PBS wurden ungebundene Antikörper entfernt. Zur Visualisierung der myc-getaggten Proteine wurde der Blot in 10 ml 50 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5,0) mit 4 mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol und 5 µl 30% H₂O₂ entwickelt. Die Farbentwicklung wurde nach 2-5 min Inkubation im Dunkeln durch Waschen mit Wasser

gestoppt. Nach Trocknen der Membran wurde der Blot zur Quantifizierung des myc-getaggtten Proteins eingescannt und densitometrisch über Sigma-Gel™ Software (SPSS Science, Chicago, USA) ausgewertet.

2.3.8 Zufallsmutagenese

Die Generierung von Mutationen in die pGAPZB-hPEPT1-cDNA erfolgte unter Verwendung des *E. coli* Stammes XL1-red. Diesem Stamm fehlen durch Defekte in den Genen mutS, mutD und mutT drei Hauptreparatur-Mechanismen zur Beseitigung von spontan auftretenden Mutationen in der DNA. Durch den Verlust zur Fehlpaarungsreparatur, Fehlen der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase III sowie dem Verlust der Hydrolyse von 8-oxo-dGTP kommt es zu einem 5000-fach häufigeren Auftreten von zufälligen Mutationen (Greener, A. et al., 1997).

Zur Mutagenisierung wurden die XL1-red Zellen mit der pGAPZB-hPEPT1 cDNA sowie dem pGAPZB-Plasmid als Negativkontrolle transformiert, die erhaltenen Transformanten zu einem Ansatz vereinigt, über Nacht in 50 ml LB-Medium (1% NaCl, 1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, pH 7,0) kultiviert und mittels Flexi-Prep Kit die mutagenisierte Plasmid-DNA präpariert. Zur Amplifikation der mutagenisierten Plasmide wurde die aus XL1-red präparierte DNA in XL1-blue *E. coli* transformiert, die Transformanten zu einer 100 ml Kultur vereinigt und aus dieser Kultur durch Midi-Präp und Flexi-Prep die Plasmid-DNA isoliert.

2.3.9 Präparation genomischer DNA aus *P. pastoris*

Die Präparation genomischer DNA aus *Pichia pastoris* beruht auf der Lyse von Hefe-Sphäroplasten und der Isolierung der genomischen DNA durch Ethanolpräzipitation.

Hierzu wurde eine Hefe-Kultur in 20 ml YPD-Medium bis zu einer OD von 4-6 herangezogen, geerntet (2.500 g, 10 min bei RT), 2× in 20 ml H₂O gewaschen und in 2 ml SCED-Lösung (1 M Sorbitol, 10 mM Na-Citrat (pH 7,5), 10 mM EDTA, 10 mM DTT) resuspendiert. Zur Lyse der Zellwand wurden 100 µl Zymolyase (3 mg/ml) hinzugegeben, 50 min bei 37°C inkubiert und die zu ca. 80% sphäroplastierten Zellen durch Zugabe von 2 ml 1% SDS lysiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden 1,5 ml 5M K-Acetat (pH 8,9) zugefügt, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (10 min, 4°C, 10.000 g). Der Überstand wurde überführt und die DNA durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol und Inkubation für 15 min bei RT präzipitiert. Nach Zentrifugation (10.000 g, 20 min, 4°C) wurde das Pellet in 700 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) gelöst. Zur Entfernung von Proteinen wurde die

Lösung mittels Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen und die Reinheit und Menge der präparierten DNA photometrisch bestimmt.

2.3.10 Expression der Peptidtransporter in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Peptidtransporter können nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten sowohl durch elektrophysiologische Messungen als auch durch Transportuntersuchungen mit radioaktiv markierten Dipeptiden funktionell untersucht werden (Boll, M. et al., 1996; Boll, M. et al., 1994). Aus dem Bauchraum eines mit 0,22% Tricain narkotisierten Frosches wurden Oozyten entnommen, nach Waschen mit ORII-Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES/Tris, pH 7,4) für 90 min mit Kollagenase A (2 mg/ml) behandelt und manuell sortiert (Bertran, J. et al., 1992). Die vereinzelt Oozyten wurden über Nacht in einer modifizierten Barth-Lösung (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,82 mM MgSO₄, 0,41 mM CaCl₂, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 2,4 mM NaHCO₃, 220 mg/l Gentamycin, 10 mM HEPES/Tris, pH 7,4) bei 18°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden in Oozyten der Wachstumsstadien V/VI 32,6 nl H₂O (Kontrolle), oder 32,6 nl der cRNA der Peptidtransporter PEPT1, PEPT2, oder hPEPT1 (1 ng/nl) über einen Mikroinjektor injiziert. Die cRNA wurde durch *in vitro*-Transkription mit T7-RNA-Polymerase (mMessage-machine) synthetisiert. Nach 3-5 Tagen Inkubation in modifizierter Barth-Lösung bei 18°C wurden die Oozyten dann für elektrophysiologische Untersuchungen oder Aufnahmeexperimente verwendet.

Elektrophysiologische Untersuchungen

Die Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemm-Technik (TEVC, Two-electrode-voltage-clamp) wurde angewendet, um an Oozyten, die die Peptidtransporter exprimieren, die Ladungsver-schiebung durch den Cotransport von Substraten mit Protonen zu charakterisieren. Gemessen wurde die Veränderung des Stroms (I) bei unterschiedlichen Transmembran-Potentialen (V), der durch die Substratzugabe zu Oozyten induziert wurde. Hierzu wurde die Oozyte in eine offene Kammer in einem Volumen von etwa 0,5 ml plaziert und kontinuierlich mit modifizierter Barth-Lösung (pH 6,5) oder mit den entsprechenden Substratlösungen (in der Regel 5 mM Substrat in modifizierter Barth-Lösung, pH 6,5) perfundiert. Das Membranpotential der Oozyten wurde auf -60 mV kurzgeschlossen. Strom-Spannungs-Beziehungen (current-voltage-relationship, I-V) wurden im Potential-Bereich von -160 bis +80 mV durch 100 ms kurze Pulse an den entsprechenden Membranpotentialen gefolgt von 200 ms langen Pausen gemessen. Die I-V Messungen wurden dabei unmittelbar vor und 30 s nach Substrat-Zugabe gemessen, nachdem ein konstanter Haltestrom erreicht wurde. Der Strom, der durch die

Peptidtransporter bei einem gegebenen Membranpotential erzeugt wurde, wurde als Differenz der Halteströme in An- und Abwesenheit des Substrates bestimmt.

Aufnahmeexperimente

Zur Bestimmung der Aufnahme des radioaktiv markierten Dipeptids [³H]-D-Phe-Ala in Oozyten, die die Peptidtransporter exprimieren, wurden pro Ansatz 8-10 Oozyten zunächst in Aufnahmebuffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM Hepes/Tris bei Ansätzen mit pH ≥6,5 bzw. 5 mM Mes/Tris bei Ansätzen mit pH <6,5 vorinkubiert. Anschließend wurden die Oozyten in 100 µl Aufnahmebuffer mit 1 µCi [³H]-D-Phe-Ala für 30 min bei RT inkubiert. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von 3 ml eiskaltem Aufnahmebuffer gestoppt. Nach 3× Waschen mit jeweils 3 ml Puffer wurden die Oozyten in ein Szintillationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 100 µl 10% SDS etwa 1-2 h solubilisiert. Anschließend wurden 3 ml Szintillationscocktail zugegeben und die mit den Oozyten assoziierte Radioaktivität in einem β-Szintillationszähler bestimmt.

2.3.11 Analyse der Transportparameter

Alle Berechnungen, sowohl lineare wie nicht-lineare Regressionsanalyse, die Kalkulation der Inhibitionskonstanten (K_i) aus den IC_{50} -Werten und die statistische Analyse, wurden mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad, Los Angeles, USA, Version 3.01) durchgeführt. Die IC_{50} -Werte als die Konzentration eines nicht-markierten Kompetitors, die benötigt wird, um die Transporter vermittelte Aufnahme des radioaktiv markierten Dipeptids [³H]-D-Phe-Ala zu 50% zu inhibieren, wurden über nicht-lineare Regression mit einer Bindungsstelle ermittelt. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean) von mindestens 2 unabhängigen Experimenten angegeben. Im Falle der Aufnahmemessungen im Hefesystem wurden für jeden Messpunkt in der Regel drei Parallelbestimmungen durchgeführt, bei Aufnahmemessungen im Oozyten-System wurden 8-10 Oozyten pro Messpunkt eingesetzt. Die Daten aus den elektrophysiologischen Untersuchungen sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente an unterschiedlichen Oozyten-Präparationen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Für die Charakterisierung von Membranproteinen wie Peptidtransportern ist der Einsatz von Zellsystemen, in denen die Proteine in funktioneller Form exprimiert werden können, eine wesentliche Voraussetzung. Für Fragestellungen, die sich mit molekularen und strukturellen Aspekten der Transportproteine befassen, bedarf es Systemen, die zum einen das Transportprotein in großen Quantitäten in funktioneller Form zur Verfügung stellen und zum anderen eine einfache Handhabung und umfassende genetische Manipulierbarkeit gewährleisten. Durch eigene Vorarbeiten sowie weitere Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Daniel konnte bereits gezeigt werden, dass die Hefe *Pichia pastoris* ein vielversprechendes System für die Untersuchung der Peptidtransporter darstellt. Diese Studien dienten daher als Ausgangspunkt für die Weiterentwicklung des *P. pastoris*-Systems als Expressionssystem.

Für das vorliegende Vorhaben ergaben sich zwei thematische Schwerpunkte, die zunächst getrennt voneinander dargestellt und im Anschluss an die jeweiligen Ergebnisse in ihrer Bedeutung diskutiert werden.

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Etablierung der Hefe *Pichia pastoris* als generelles Expressionssystem für die Peptidtransporter und die Optimierung der Produktion der rekombinanten Proteine. Zu diesem Zweck wurde der humane intestinale Peptidtransporter hPEPT1 – der bisher nicht in Hefen exprimiert wurde – in *P. pastoris* eingebracht und die Bedingungen und Voraussetzungen für eine hohe funktionelle Expressionsrate des Proteins erarbeitet. Darüber hinaus wurden neue Methoden entwickelt, mit denen eine funktionelle Charakterisierung der Transporter, ihrer Struktur und bedeutenden Proteinregionen unternommen werden kann.

Auf der Grundlage dieser Techniken wurden im zweiten Teil dieser Arbeit umfassende Untersuchungen zu Struktur-Affinitäts-Beziehungen der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 vorgenommen.

3.1 Etablierung der Hefe *Pichia pastoris* als Expressionssystem für Peptidtransportproteine der Säuger

Der generelle Vorteil einer Expression von Säugerproteinen in Hefe beruht auf der schnellen Generationszeit sowie der einfachen und kostengünstigen Handhabung. Am Beispiel des humanen intestinalen Peptidtransporters hPEPT1 wurden daher zunächst die experimentellen Voraussetzungen und Kulturbedingungen für eine hohe funktionelle Expressionsrate der Peptidtransporter in *Pichia pastoris* erarbeitet (3.1.1). Daran anschließend wurde ein Screeningsystem entwickelt, mit dem in großem Umfang Substanzen hinsichtlich ihrer Interaktion mit den Peptidtransportern untersucht werden konnten (3.1.2). Ausgehend von einem Wachstumsassay, der zur Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften der Peptidtransporter entwickelt wurde, konnte dann – wie unter 3.1.3 beschrieben – die Methode der Zufallsmutagenese eingesetzt werden, um Informationen zur Struktur-Funktionsbeziehung der Transporter zu erhalten.

3.1.1 Expression des humanen Peptidtransporters PEPT1 in *P. pastoris*

Konstruktion der hPEPT1-Expressionsvektoren und *P. pastoris*-Stämme

Zur Expression des humanen Peptidtransporters PEPT1 in *P. pastoris* wurden unterschiedliche Expressionsvektoren konstruiert (Abbildung 3-1).

Diese Vektoren unterscheiden sich im verwendeten Promotor, der Länge des 5'-nicht-translatierten Bereiches der hPEPT1-cDNA oder dem Einsatz von Signalsequenzen. Diese Konstrukte wurden dann eingesetzt, um durch homologe Rekombination die hPEPT1-cDNA so in das Hefegenom stabil zu integrieren, dass deren Expression unter der Kontrolle des durch Methanol induzierbaren AOX1-Promotors oder des Promotors der GAP-DH stand. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Hefestämme erzeugt, um den Einfluss weiterer Faktoren wie den Integrationsort der hPEPT1-cDNA im Hefegenom, die Anzahl der Kopien der Fremd-cDNA sowie der Kulturbedingungen auf die Expressionshöhe zu untersuchen. Als Maß für die Expressionshöhe diente dabei stets die Aufnahme des radioaktiv-markierten Dipeptids [³H]-D-Phe-Ala in die transgenen Hefezellen.

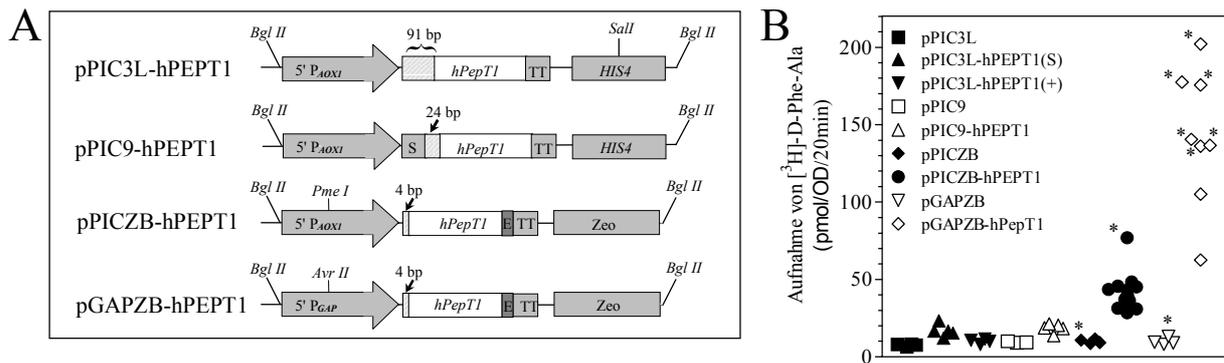


Abbildung 3-1. Expression von hPEPT1 in *P. pastoris* nach Transformation unterschiedlicher Konstrukte

A) Darstellung der Plasmide, die zur Expression in *P. pastoris* konstruiert wurden. P_{AOX1} , Promotor des *P. pastoris* AOX1-Gens; P_{GAP} , Promotor des *P. pastoris* GAP-DH-Gens; S, Signalsequenz des α -Faktors (α -MF) von *S. cerevisiae*; bp, Basenpaare zwischen Transkriptionsstart und des Translationsinitiations-Codons von hPEPT1; TT, AOX1-Transkriptions-Terminations-Region; E, Epitop-Tag (myc-Epitop und His6-Tag); HIS4, Histidinol-Dehydrogenasegen; Zeo, Zeocin-Resistenzgen; *BglIII*, *AvrII*, *PmeI*, *Sall*, Positionen der relevanten Restriktionsenzyme;

B) Aufnahme von [3 H]-D-Phe-Ala in *P. pastoris*-Zellen, die mit den unterschiedlichen Konstrukten transformiert wurden. Die Aufnahme von [3 H]-D-Phe-Ala (2 μ Ci/ml; 20 min, pH 6,5) wurde unter Verwendung eines Einzelfilterassays bestimmt. Die Symbole repräsentieren die Transportrate von jedem getesteten Transformanten. Transformanten mit mehreren Integrationen des Konstruktes in das Genom sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. (S) langsamer Methanol-Verwertungs-Phänotyp (MutS); (+) gleicher Phänotyp der Methanol-Verwertung wie der Wildtypstamm. Die Daten stellen den Mittelwert von drei Wiederholungsmessungen dar.

Wie Abbildung 3-1 zeigt, besitzt der 5'-nicht-translatierte Bereich der Fremd-cDNA und damit der Bereich zwischen den Promotorsequenzen und dem ATG des Fremdgens einen Einfluss auf die Expressionshöhe. Die Verkürzung des 5'-nicht-translatierten Bereichs der hPEPT1-cDNA von 91 bp im pPIC3L-hPEPT1 Konstrukt auf 4 bp im pPICZB-hPEPT1 Konstrukt führt hierbei zu einer 4-fachen Steigerung der Aufnahme von [3 H]-D-Phe-Ala.

Weiterhin wurde untersucht, ob das Anfügen einer Signalsequenz an den Aminoterminus des hPEPT1-Proteins seine Expression erhöht. Im Gegensatz zu der für einen Serotoninrezeptor beschriebenen Steigerung der Expression (Weiss, H. M. et al., 1995), vermutlich über eine verbesserte Insertion des Rezeptorproteins in die Membran, führt das Anfügen der Signalsequenz des α -Faktors (α -MF) zu einer Reduktion der Expressionshöhe von hPEPT1.

Zur Untersuchung der Bedeutung des Integrationsortes der hPEPT1-cDNA auf die Expressionshöhe wurde zum einen das pPIC3L-hPEPT1 Konstrukt vor der Transformation in *P. pastoris* entweder im HIS4-Gen linearisiert, wodurch eine Integration durch homologe Rekombination im mutierten HIS4-Locus des *Pichia*-Genoms favorisiert wird. Zum anderen wurde der Vektor durch *BglIII*-Verdau so präpariert, dass am 5'-flankierenden Bereich der einzubringenden cDNA Sequenzen des AOX1-Promoters und am 3'-Ende Sequenzen der Alkoholoxidase vorlagen, wodurch es zur Insertion der hPEPT1-cDNA durch homologe Rekombination in den AOX1-Locus und der Zerstörung des AOX1-Gens kommt. Wie in

Abbildung 3-1 zeigt, wurde eine 3- bis 5-fach höhere Expression erhalten, wenn die hPEPT1-cDNA so in den AOX1-Locus integriert wurde, dass es zu einem Verlust des AOX1-Gens kam. Das Fehlen der Alkoholoxidase 1 und das daraus resultierende verlangsamte Wachstum der rekombinanten Hefestämme auf Methanol-haltigen Medien (MutS-Phänotyp) führte somit zu einer höheren Expressionsrate des Peptidtransporters.

Als Alternative zur Expression unter der Kontrolle des Methanol-induzierbaren AOX1-Promotors wurde die Expression des humanen Peptidtransporters unter der Kontrolle des Promotors der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAP) geprüft. Wie in Abbildung 3-1 demonstriert, kann mittels GAP-Promotor eine bis zu 5-fach höhere Expressionsrate von hPEPT1 im Vergleich zu derjenigen mit AOX1-Promotor erzielt werden.

Ob auch die Anzahl der Kopien der hPEPT1-cDNA im *P. pastoris*-Genom einen Einfluss auf die Höhe der Expression besitzt, wurde durch Selektion von Transformanten ermittelt, die eine vermehrte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Zeocin aufwiesen. Eine Integration mehrerer Kopien des Zeo-Resistenzgens führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Zeocin. Da bei der Integration der hPEPT1-cDNA immer auch eine Kopie des auf dem Expressionsvektor codierten Zeo-Resistenzgens mit in das Hefegenom integriert wird, weist eine erhöhte Resistenz auch auf eine erhöhte Zahl an Kopien der hPEPT1-cDNA im Genom hin. Die mehrfache Integration der hPEPT1-cDNA in das Hefegenom führte zu einer bis zu 5-fach höheren Expression des Peptidtransporters im Vergleich zu nicht-selektierten Transformanten.

Ein Stamm, der das pGAPZB-hPEPT1 Konstrukt enthielt, zeigte mit 202 ± 11 pmol/OD/20min eine bis zu 25-fach höhere Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala als der isogene Kontrollstamm, der mit dem Plasmid pGABZB transformiert wurde. Aufgrund dieser hohen funktionellen Expression wurde dieser Stamm daher für die weitere Charakterisierung eingesetzt. Die scheinbare Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala in den Kontrollstamm von $8 \pm 0,4$ pmol resultierte dabei, wie in Voruntersuchungen ermittelt wurde, vor allem aus einer unspezifischen Bindung des Peptides an die Zellen und das Filtermaterial und war daher für die weiteren Untersuchungen vernachlässigbar.

3.1.2 Funktionelle Charakterisierung

Transportcharakteristika von hPEPT1 nach konstitutiver Expression in *P. pastoris*

Wie Abbildung 3-2 zeigt, war die Höhe der funktionellen Expression von hPEPT1 unter der Kontrolle des GAP-Promotors im Stamm GAP-hPEPT1 über eine Inkubationsdauer von 30 min weitgehend linear und abhängig von der optischen Dichte der Hefekultur. Die höchsten Aufnahmezeiten wurden bei Zelldichten von 4-6 OD erzielt, weshalb für alle weiteren Experimente die Kultivierungs- und Erntebedingungen entsprechend standardisiert wurden.

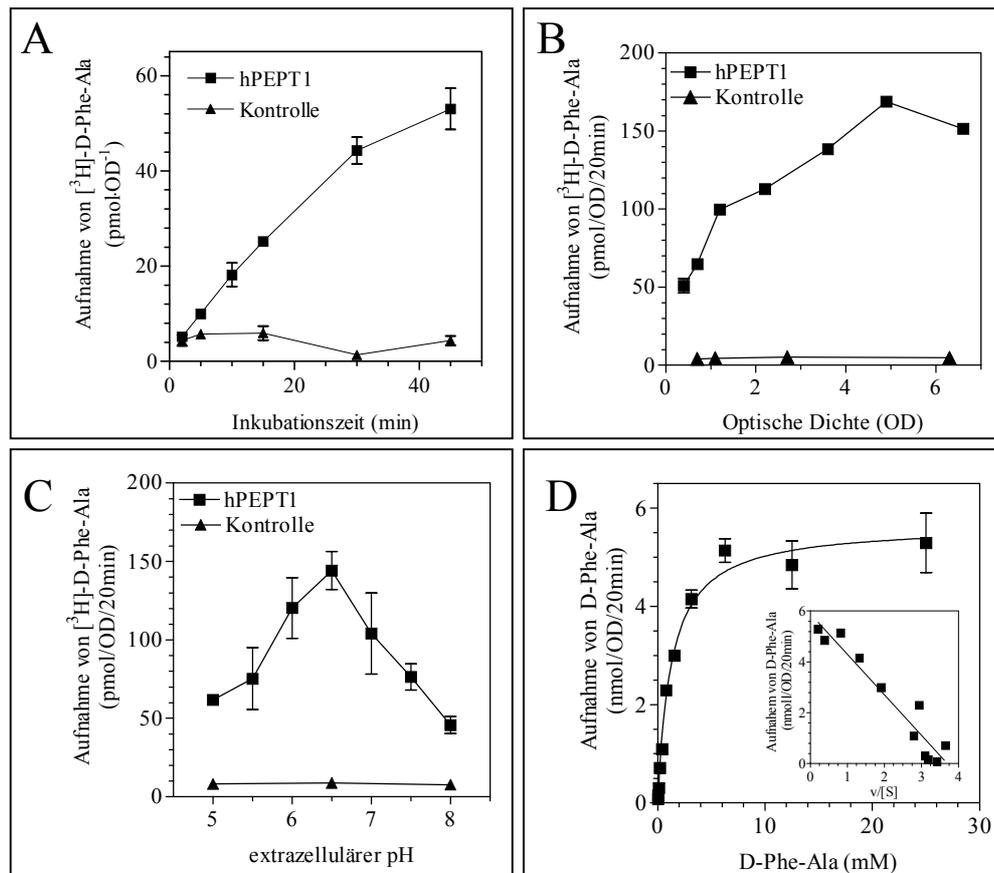


Abbildung 3-2. Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{-D-Phe-Ala}$ in hPEPT1 exprimierende *P. pastoris*-Zellen als Funktion der Inkubationszeit, der optischen Dichte, des pH-Wertes im Medium und der Substratkonzentration.

Die Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{-D-Phe-Ala}$ in hPEPT1 exprimierende oder Kontrollzellen in Abhängigkeit von der (A) Inkubationsdauer (2 $\mu\text{Ci/ml}$; pH 6,5), (B) Zelldichte der Hefekultur (2 $\mu\text{Ci/ml}$; pH 6,5, 20 min), (C) des extrazellulären pH-Wertes im Medium (Kaliumphosphatpuffer pH 5-8; 2 $\mu\text{Ci/ml}$; 20 min) sowie (D) der Substratkonzentration (0,0001-25 mM, 2 $\mu\text{Ci/ml}$; pH 6,5, 20 min; Inset: Eadie-Hofstee-Plot) wurde unter Verwendung eines Einzelfilterassays bestimmt.

Als charakteristisch für den Peptidtransporter hPEPT1 gilt die Abhängigkeit des Peptidtransportes vom extrazellulären pH. Aus diesem Grund wurde die Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{-D-Phe-Ala}$ in hPEPT1 exprimierende Hefezellen über einen pH-Bereich von pH 5 bis 8 bestimmt. Abbildung 3-2C zeigt, dass die Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{-D-Phe-Ala}$ in den Stamm GAP-hPEPT1 ausgeprägt pH-abhängig ist mit einem Optimum bei pH 6,5. Eine vergleichbare

pH-Abhängigkeit wurde auch nach Expression von hPEPT1 in Oozyten oder HeLa-Zellen erhalten (Liang, R. et al., 1995). Studien zur Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala in transgene Hefezellen als Funktion steigender D-Phe-Ala Konzentrationen ergaben darüber hinaus eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einem apparenten K_m -Wert von $1,26 \pm 0,16$ mM (Abbildung 3-2D), was in Übereinstimmung mit Werten aus anderen Expressionssystemen steht. Daher sind alle wesentlichen Eigenschaften des Peptidtransporters nach Expression in *Pichia pastoris* konserviert.

Höhe der funktionellen Expression von hPEPT1

Im weiteren wurde geprüft, ob die maximale Transportrate (V_{max}) von hPEPT1 im Stamm GAP-hPEPT1 abhängig ist von der Kohlenstoffquelle des Mediums, das zur Hefekultivierung verwendet wurde.

Kinetische Konstanten	komplexes Medium YPD (Glucose)	Minimal-Medium		
		Glucose	Glycerin	Methanol
K_m (mM)	$1,26 \pm 0,16$	$1,49 \pm 0,18$	$1,12 \pm 0,25$	$1,41 \pm 0,45$
V_{max} (nmol/OD/20min)	$5,65 \pm 0,19$	$3,16 \pm 0,18$	$2,56 \pm 0,16$	$0,21 \pm 0,02$

Tabelle 3-1. Kinetische Charakteristika von hPEPT1 nach Expression in verschiedenen Medien.

Zellen des Stammes GAP-hPEPT1 wurden entweder in komplexem Glucose-haltigem Medium (YPD) oder in Minimal-Medien, die Glucose, Glycerin oder Methanol als Kohlenstoffquelle enthielten. Die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala in hPEPT1 exprimierende Hefezellen (2 μ Ci/ml, pH 6,5, 20 min) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (0,0001-25 mM) wurde unter Verwendung eines Einzelfilterassays bestimmt.

Wie Tabelle 3-1 in der Zusammenfassung zeigt, verändert sich im Gegensatz zur maximalen Transportaktivität die Affinität bei der Verwendung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen nicht signifikant. Bei GAP-hPEPT1 Hefezellen in komplexen Medien mit Glucose (YPD) wurde eine V_{max} von $5,65 \pm 0,19$ nmol \times OD⁻¹ \times 30min⁻¹ bestimmt. Wenn Minimalmedien mit Glucose als Kohlenstoffquelle zur Kultivierung verwendet wurden, lag die V_{max} bei $3,16 \pm 0,18$ nmol \times OD⁻¹ \times 30min⁻¹, und war daher um 23% größer als bei Medien mit Glycerin und etwa 15-fach höher als in Medien mit Methanol als C-Quelle. Daher ist die Höhe der funktionellen Expression unter der Kontrolle des GAP-Promotors stark durch die eingesetzte Kohlenstoffquelle reguliert. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher stets Glucose als Kohlenstoffquelle im Medium eingesetzt.

Immunologischer Nachweis des hPEPT1-Proteins

Zur Detektion und Quantifizierung des im GAP-hPEPT1 Stamm exprimierten humanen Peptidtransporters wurde der immunologische Nachweis des hPEPT1-Proteins über Western-Blot eingesetzt. Für den Nachweis und die Bestimmung der Menge des produzierten Proteins bedarf es allerdings eines spezifischen Antikörpers, der das hPEPT1-Protein immunologisch erkennt. Da bisher kein Antikörper mit hinreichender Spezifität für hPEPT1 vorliegt, wurde das sogenannte Epitop-Tagging eingesetzt. Hierfür wurde die cDNA des hPEPT1 so modifiziert, dass das entsprechende hPEPT1-Protein am Carboxy-Terminus ein Myc-Epitop und einen aus 6 Histidinresten bestehenden His6-Tag enthielt. Für das Myc-Epitop sind monoklonale Antikörper kommerziell erhältlich. Dadurch wurde erstmals eine Detektion und Quantifizierung der Menge des heterolog exprimierten Peptidtransporters in *P. pastoris* möglich.

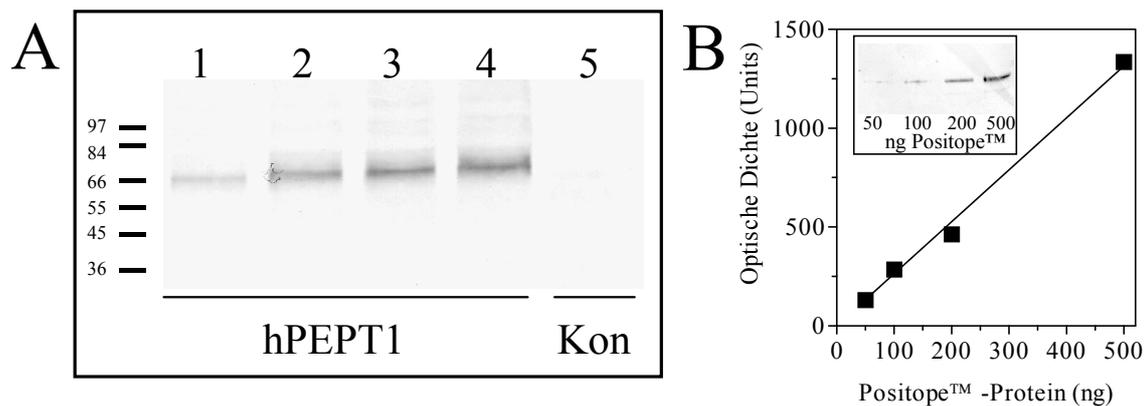


Abbildung 3-3. Immunoblot-Analyse des in *Pichia pastoris* exprimierten hPEPT1-Proteins.

Hefemembranproteine und Positope-Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert und mit monoklonalem Anti-myc Antikörper inkubiert. Der Antikörper erkennt das myc-Epitop, das C-terminal an das hPEPT1-Protein fusioniert wurde oder im Positope-Protein enthalten war.

A. Spur 1-4: Membranprotein von hPEPT1 exprimierenden Hefezellen; 1: 25 µg, 2: 50 µg, 3: 75 µg, 4: 100 µg. Spur 5: 100 µg Membranprotein des Kontrollstammes (Kon).

B. Lineare Regressionsanalyse der optischen Dichte für die durch Immunoblotting erhaltenen Signale von steigenden Mengen des Positope-Proteins.

Zum immunologischen Nachweis wurden die Membranproteine des transgenen Hefestamms, der den 'getaggen' Peptidtransporter exprimiert (GAP-hPEPT1), isoliert und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im anschließenden Western-Blot konnte über den monoklonalen Anti-myc Antikörper eine intensive Bande detektiert werden (Abbildung 3-3A).

Demgegenüber wurde mit den Membranproteinen des isogenen Kontrollstammes GAPZB kein Signal erhalten (Spur 5). Das apparente Molekulargewicht, das durch Vergleich mit den entsprechenden Markerproteinen ermittelt wurde, lag bei 66 kDa. Wenn man die molekulare

Masse des C-terminalen Tag's mit 2,5 kDa abzieht, besitzt hPEPT1 eine Masse von etwa 62,5 kDa. Daher wandert das in *P. pastoris* exprimierte hPEPT1-Protein etwas schneller als anhand des aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Molekulargewichts von 78,8 kDa erwartet wurde. Allerdings wurde auch durch *in vitro*-Translation der PEPT1-cRNA des Kaninchens bei einem nahezu identischen vorhergesagten Molekulargewicht ein 60 kDa-Signal im SDS-PAGE für die unglykosylierte Form erhalten (Liang, R. et al., 1995).

Quantifizierung des in Hefe produzierten hPEPT1-Proteins

Um die Menge an produziertem hPEPT1-Protein in den transgenen Hefen zu bestimmen, wurde das rekombinante Positope-Protein als Standard eingesetzt. Dieses 53 kDa große Protein enthält neben mehreren anderen Tag's auch das Myc-Epitop. Dazu wurden unterschiedliche Mengen des Positope-Proteins über SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein durch Anti-myc Antikörper detektiert. Über eine lineare Regressionsanalyse der Signalstärken, die densitometrisch für die unterschiedlichen Mengen des Kontrollproteins ermittelt wurden, konnte die in Abbildung 3-3B gezeigte Standardkurve erhalten werden. Durch Vergleich mit Signalstärken für gleichzeitig aufgetragene Membranpräparationen des GAP-hPEPT1 Stammes konnte daher die Menge des heterolog exprimierten Proteins bestimmt werden (Abbildung 3-3). Die optischen Dichten, die für die resultierenden Signale ermittelt wurden, entsprachen 142, 403, 599 und 705 ng des 'getaggen' hPEPT1-Proteins. Das entspricht umgerechnet 6 ± 1 ng hPEPT1-Protein pro μg Gesamtmembranprotein und somit einem Anteil von ca. 0,6% der gesamten isolierten Membranproteinfraktion. Ausgehend von dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von 78,8 kDa wurden insgesamt 64 pmol hPEPT1-Protein pro mg Membranprotein gefunden. D.h. 1 OD Hefezellen liefert etwa 10 μg Membranprotein und ein Liter Hefekultur, die zu einer Dichte von 4 OD/ml herangezogen wird, ergibt etwa 0,2 mg hPEPT1-Protein. Diese Menge an Protein könnte ausreichend für weitere Schritte zur Proteinreinigung sein.

Substratspezifität des humanen PEPT1 nach Expression in *P. pastoris*

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung des heterolog exprimierten Peptidtransporters hPEPT1 wurde seine Substratspezifität bestimmt. Die selektive Interaktion von Peptiden mit der Substratbindungsstelle von hPEPT1 wurde durch Verdrängungsexperimente mit dem radioaktiv markierten Dipeptid [^3H]-D-Phe-Ala und steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen bestimmt. Für diese Untersuchungen wurde eine neue Schnellfiltrationstechnik entwickelt, bei der hPEPT1 exprimierende Hefezellen, im Gegensatz zu der bislang eingesetzten Technik mit Einzelfiltern, auf 96-well Filterplatten mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert werden können. Durch diesen neuen Transportassay ist es möglich, Substanzen in großem Umfang und schnell hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem Peptidtransporter zu untersuchen.

Wie Abbildung 3-4 und Tabelle 3-2 zeigen, konnte die Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala sowohl durch neutrale als auch durch geladene Di- und Tripeptide konzentrationsabhängig gehemmt werden. Dagegen waren weder Peptide mit mehr als 3 Aminosäuren noch freie Aminosäuren in der Lage, mit hPEPT1 zu interagieren.

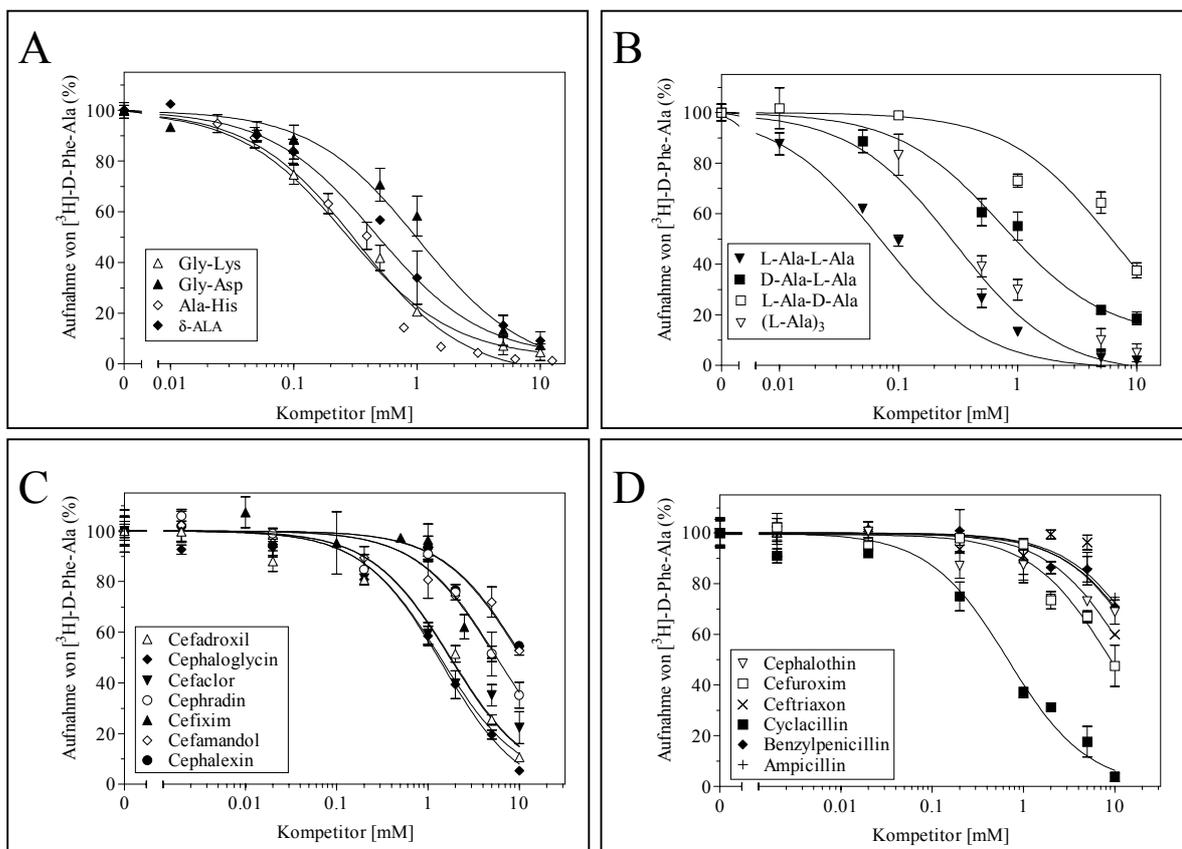


Abbildung 3-4. Hemmung der Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala durch unterschiedliche Testverbindungen in hPEPT1 exprimierenden *P. pastoris*-Zellen.

Die Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala ($2\ \mu\text{Ci/ml}$, pH6,5, 20 min) in hPEPT1 exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde auf 96-well-Filterplatten in Anwesenheit steigender Konzentrationen der Kompetitoren (0,001-10 mM) bestimmt. Die Befunde sind als Mittelwerte \pm SEM für die verbleibende Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala in Gegenwart von Kompetitoren (%) dargestellt.

Die Inkorporierung eines D-Isomers in N- und/oder C-terminaler Position des Dipeptids Ala-Ala reduziert dabei seine Affinität gegenüber hPEPT1 in folgender Reihenfolge: L-Ala-L-Ala > D-Ala-L-Ala > L-Ala-D-Ala > D-Ala-D-Ala, was die ausgeprägte Enantioselektivität der Substraterkennung von hPEPT1 erkennen lässt. Auch Substanzen ohne Peptidbindung wie z.B. das Ausgangssubstrat der Synthese von Porphyrinen, δ -Aminolävulinsäure, sowie ausgewählte Aminocephalosporine interagieren mit dem humanen PEPT1. Dies wurde bereits für den Peptidtransporter aus dem Kaninchen gezeigt (Döring, F. et al., 1998).

Insgesamt dokumentieren die in Tabelle 3-2 zusammengefassten app. K_i -Werte für die unterschiedlichen Substrate, dass die charakteristische Substratspezifität von hPEPT1 nach Expression im Hefesystem erhalten geblieben ist. Somit ist dieses System auch als Screeningsystem zur Untersuchung der Interaktion neuer Substanzen mit den Peptidtransportern geeignet.

Testverbindung	K_i -Werte (mM)	Testverbindung	K_i -Werte (mM)
L-Ala	> 25	<i>Cephalosporine</i>	
L-Ala-L-Ala	0,1 ± 0,01	Cefadroxil	1,4 ± 0,1
L-Ala-L-Ala-L-Ala	0,2 ± 0,03	Cephaloglycin	1,5 ± 0,3
L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	> 10	Cefaclor	1,6 ± 0,2
		Cephradin	6,0 ± 1,4
D-Ala-L-Ala	0,8 ± 0,1	Cefixim	6,3 ± 1,2
L-Ala-D-Ala	6,1 ± 0,2	Cefamandol	8,0 ± 2,6
D-Ala-D-Ala	> 10	Cephalexin	8,2 ± 1,8
		Cephalothin	11,2 ± 3,4
Gly-Lys	0,3 ± 0,03	Cefuroxim	11,2 ± 0,2
Gly-Asp	1,0 ± 0,3	Ceftriaxon	25,3 ± 2,0
Ala-His	0,3 ± 0,04	<i>Penicilline</i>	
		Cyclacillin	0,6 ± 0,1
δ -Aminolävulinsäure	0,5 ± 0,1	Benzylpenicillin	21,2 ± 3,4
		Ampicillin	25,6 ± 1,3

Tabelle 3-2. App. Affinitäten ausgewählter Verbindungen für die Hemmung der Aufnahme von [3 H]-D-Phe-Ala in hPEPT1 exprimierende Hefezellen.

K_i -Werte wurden aus den IC_{50} -Werten für die verbleibende Aufnahme von [3 H]-D-Phe-Ala (2 μ Ci/ml, pH6,5, 20 min) in hPEPT1 exprimierende *P. pastoris*-Zellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen der Kompetitoren (0,001-10 mM) (vgl. Abbildung 3-4) errechnet.

Interaktion von β -Lactam-Antibiotika mit hPEPT1

Da der intestinale Peptidtransporter PEPT1 die Hauptroute darstellt, über die oral verfügbare und daher oral aktive β -Lactam-Antibiotika in die intestinalen Epithelzellen aufgenommen

werden, kann dieser Hefeassay als nützliches Werkzeug dienen, um Pharmaka zu identifizieren, die mit dem Peptidtransporter interagieren. Daher wurden 13 verschiedene β -Lactam-Antibiotika mit unterschiedlichen Strukturelementen ausgewählt, die sich hinsichtlich ihrer Resorptionsrate beim Menschen sehr unterscheiden. Abbildung 3-4C und D zeigt die entsprechenden Verdrängungskurven für diese Pharmaka und Tabelle 3-2 fasst die resultierenden K_i -Werte zusammen. Substanzen wie Cefadroxil, Cefaclor, Cephradine, Cephalexin, Cefixim oder Cyclacillin, die alle eine gute bis sehr gute Verfügbarkeit aufweisen, zeigen Inhibitionskonstanten, die vergleichbar sind zu denen von Di- und Tripeptiden und im Bereich von 0,6 bis 8 mM liegen. Im Gegensatz dazu wiesen die Cephalosporine Ceftriaxon, Cephalothin, Cefuroxim, sowie Benzylpenicillin, die aufgrund ihrer schlechten intestinalen Resorption gewöhnlich parenteral verabreicht werden, Inhibitionskonstanten auf, die über 10 mM lagen. Ein Vergleich mit den kürzlich publizierten Affinitäten für die gleichen Substrate an Caco-2 Zellen, die ebenfalls den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 exprimieren (Bretschneider, B. et al., 1999), zeigt, dass hPEPT1 exprimierende Hefezellen dafür geeignet sind, um die Interaktion von solchen Substanzen mit dem intestinalen Carrier zu erfassen und eine Vorhersage ihrer oralen Verfügbarkeit beim Menschen erlaubt.

Entwicklung eines Hefe-Wachstums-Assays zur funktionellen Charakterisierung der Peptidtransporter hPEPT1 und PEPT2

Die Charakterisierung der Peptidtransporter nach Expression in *Pichia pastoris* durch Transportuntersuchungen mit dem radioaktiv markierten Dipeptid [^3H]-D-Phe-Ala zeigte, dass deren wesentlichen Eigenschaften wie ihre pH-Abhängigkeit und die Substratspezifität auch im Hefesystem konserviert sind. Als eine neue Methode, die Transportereigenschaften zu charakterisieren, wurde ein neuartiger Wachstumstest entwickelt. Hierbei wurde das veränderte Wachstumsverhalten der transgenen Hefestämme aufgrund der von ihnen exprimierten Peptidtransporter auf Dipeptid-haltigen Nährmedien verglichen zum Ausgangsstamm genutzt.

Zur Ermittlung der Substrataffinitäten der Peptidtransporter wurde dazu ein Test entwickelt, bei dem Nährmedien zusätzlich die Dipeptide Alanin-Ethionin (Ala-Eth) oder Leucin-Ethionin (Leu-Eth) (Synthese durch Dr. B. Hartrodt, Institut für Biochemie, Universität Halle) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurden. Ethionin ist als ein für die Zelle toxisches Analog des Methionins beschrieben (Alix, J. H., 1982; Island, M. D. et al., 1987), das anstelle der terminalen S-ständigen Methylgruppe einen Ethylrest trägt (Abbildung 3-5).

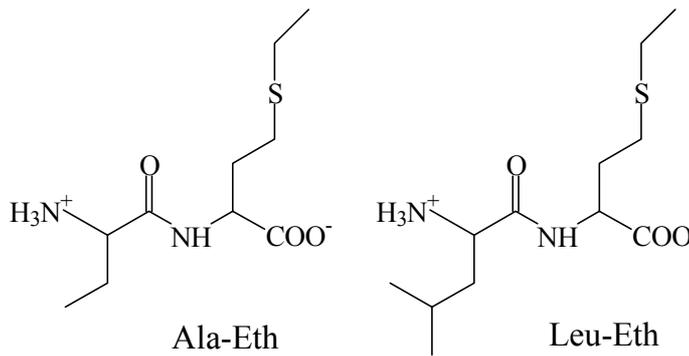


Abbildung 3-5. Strukturformeln der Dipeptide Alanin-Ethionin (Ala-Eth) und Leucin-Ethionin (Leu-Eth).

In Form des Dipeptids kann Ethionin nur von solchen Hefezellen aktiv aufgenommen werden, die einen Peptidtransporter exprimieren. Nach Aufnahme der Ethionin-Peptide in die Hefezellen kommt es durch deren intrazelluläre Hydrolyse zur Freisetzung des Ethionins, das dann eine Störung des Wachstums und der Zellteilung bedingt.

Durch Verdrängungsexperimente mit Leu-Eth und Ala-Eth konnte gezeigt werden, dass beide Peptide spezifisch mit der Aufnahme des radioaktiv-markierten Dipeptids [^3H]-D-Phe-Ala in hPEPT1 und PEPT2 exprimierende Hefezellen konkurrieren (Abbildung 3-6). Sowohl für diese Wachstumstests als auch für die weiteren Untersuchungen zu PEPT2 wurde der Hefestamm GAP-PEPT2 eingesetzt (Döring, F. et al., 1998).

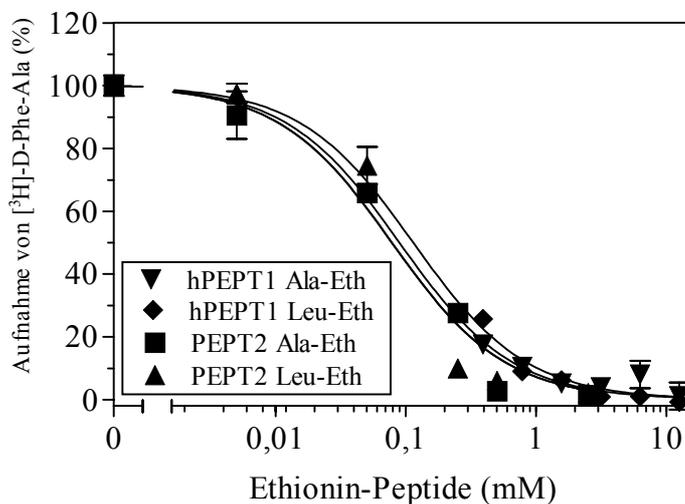


Abbildung 3-6. Hemmung der Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala durch Ala-Eth und Leu-Eth in hPEPT1 und PEPT2 exprimierenden *P. pastoris*-Zellen.

Die Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala ($2 \mu\text{Ci/ml}$, 20 min, pH 6,5) in hPEPT1 und PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde auf 96-well-Filterplatten in Anwesenheit steigender Konzentrationen der Ethionin-Peptide (0,001-10 mM) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM für die verbleibende Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala in Gegenwart von Kompetitoren (%) dargestellt.

Für die Interaktion mit dem humanen PEPT1 wurde für Leu-Eth ein K_i -Wert von $70 \pm 16 \mu\text{M}$ und für Ala-Eth von $126 \pm 23 \mu\text{M}$ erhalten. Für PEPT2 wurden die K_i -Werte von 54 ± 2 und $84 \pm 4 \mu\text{M}$ ermittelt.

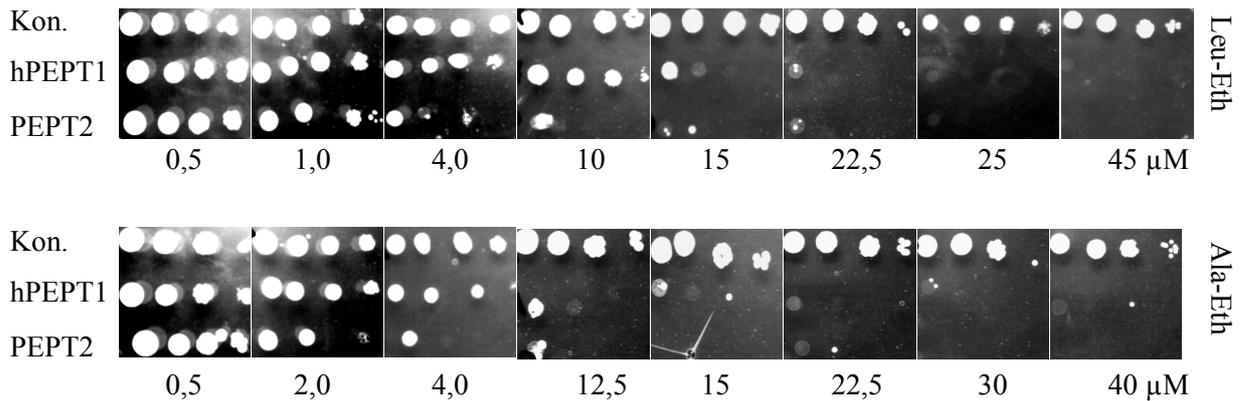


Abbildung 3-7. Wachstumstest auf Leu-Eth und Ala-Eth-haltigen Nährböden.

Jeweils 5 μl Zellsuspension mit 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 Hefezellen der Stämme GAP-K (Kon.), GAP-hPEPT1 (hPEPT1) sowie GAP-PEPT2 (PEPT2) wurden auf MDH-Agarplatten (1% Glucose, 1,34% Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren, $4 \times 10^{-5}\%$ Biotin, 2% Agar, 100 μM Histidin, 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5)) mit den angegebenen Konzentrationen Leu-Eth oder Ala-Eth aufgetropft und für 3-4 Tage bei 28°C inkubiert.

Im Wachstumstest spiegeln sich die unterschiedlichen Affinitäten von Leu-Eth und Ala-Eth zu den Transportern hPEPT1 und PEPT2 wider. Wie Abbildung 3-7 zeigt, waren Hefezellen des Kontrollstammes GAP-K (Kon.), die keine Peptidtransporter exprimieren und daher diese toxischen Peptide nicht aktiv in die Zelle aufnehmen können, in der Lage, unabhängig von der Konzentration von Leu-Eth und Ala-Eth in den Nährmedien zu wachsen und sich zu vermehren. Der Stamm GAP-hPEPT1 war ebenfalls noch bei sehr niedrigen Konzentrationen des toxischen Dipeptids befähigt zu wachsen. Wurde jedoch die Konzentration auf über 3 μM Ala-Eth oder 5 μM Leu-Eth erhöht, kam es zu einer Beeinträchtigung der Teilungsfähigkeit und daher zu weniger dichten Plaques. Bei Konzentrationen über 22,5 μM Ala-Eth und Leu-Eth war eine vollständige Wachstumsunterdrückung zu beobachten. Im Falle von PEPT2 kam es bereits bei Konzentrationen von 2 μM Ala-Eth und 1,5 μM Leu-Eth zu vermindertem Wachstum der Hefezellen und ab 20 μM Leu-Eth und Ala-Eth war das Wachstum vollständig unterdrückt. Für den oben gezeigten Wachstumstest wurden jeweils 5 μl Zell-Suspension pro Plaque in absteigenden Zelldichten (10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 Zellen pro 5 μl) auf die Platten aufgetropft. Da die Wachstumsretardierung bei allen Plaques der entsprechenden, für hPEPT1- bzw. PEPT2-spezifischen Konzentration erhalten wurde, zeigt dieser Test offenbar spezifisch die Affinität an und ist unabhängig von der eingesetzten Hefezellzahl.

So wie die Affinität der Peptidtransporter durch einen Wachstumstest erfasst werden kann, lässt sich auch die Abhängigkeit des Transportes vom extrazellulären pH-Wert über das Zellwachstum darstellen. Voraussetzung für die Etablierung dieses Tests war ein *Pichia pastoris*-Stamm, der aufgrund des Defektes im HIS4-Gen, und somit der Histidin-Synthese, eine Histidin-Auxotrophie aufweist und deshalb auf eine ausreichende Zufuhr von Histidin über das

Medium angewiesen ist. Nach der Expression der Peptidtransporter hPEPT1 und PEPT2 können diesen transgenen Hefestämme nicht nur mit freiem Histidin sondern auch mit Histidin-haltigen Peptiden wachsen.

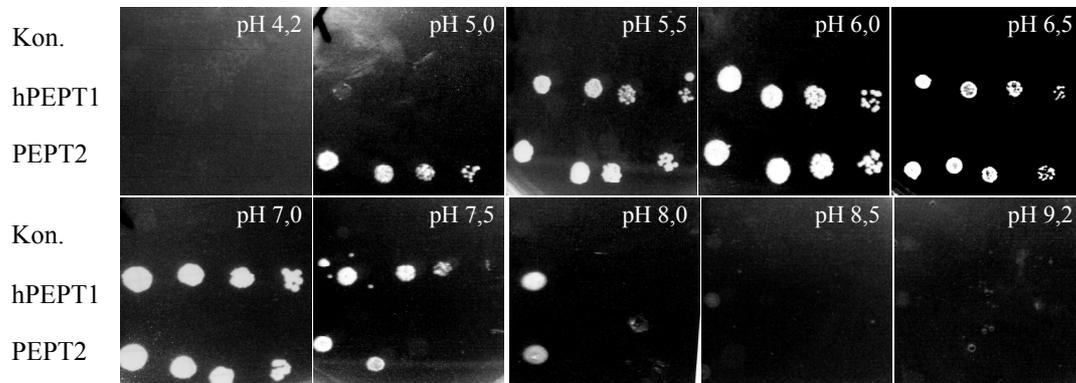


Abbildung 3-8. Wachstumstest auf Ala-His-haltigen Nährböden mit unterschiedlichen pH-Werten

Jeweils 5 μ l Zellsuspension mit 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 Hefezellen der Stämme GAP-K (Kontrolle, Kon.), GAP-hPEPT1 (hPEPT1) sowie GAP-PEPT2 (PEPT2) wurden auf MDAH-Agarplatten (1% Glucose, 1,34% Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren, 4×10^{-5} % Biotin, 2% Agar, 100 μ M Alanin-Histidin), die mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer auf die angezeigten pH-Werte von 4,2 bis 9,2 eingestellt waren, aufgetropft und für 3-4 Tage bei 28°C inkubiert.

Wie Abbildung 3-8 zeigt, waren hPEPT1 und PEPT2 exprimierende Zellen, nicht aber der isogene Kontrollstamm, befähigt auf Nährmedien zu wachsen, die als Histidinquelle 100 μ M Ala-His-Peptid enthielten. Die Abhängigkeit der Dipeptidaufnahme vom extrazellulären pH-Wert blieb auch in diesem Wachstumstest für hPEPT1 und PEPT2 spezifisch erhalten. Sowohl hPEPT1- als auch PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen waren in der Lage, auf Ala-His-haltigen Agarplatten in einem pH-Bereich von pH 5,5 bis 7,0 zu wachsen. Entsprechend dem etwas niedrigeren pH-Optimum von PEPT2 können PEPT2-exprimierende Hefezellen allerdings noch bei pH 5,0 wachsen und hPEPT1-Zellen aufgrund des Transportoptimums bei einem etwas höheren pH-Wert noch bei pH 7,5. Sowohl hPEPT1 als auch PEPT2-Zellen zeigten dagegen kein Wachstum mehr auf Ala-His-Medien, die auf einen pH-Werte <5,0 oder >8,0 gepuffert waren. Dies ist vermutlich in der begrenzten Fähigkeit zur Ala-His-Aufnahme bei den hohen oder niedrigen pH-Werten begründet und nicht in ihrer generellen Unfähigkeit auf diesen extremen pH-Werten zu wachsen. Sowohl hPEPT1 als auch PEPT2-transfizierte Zellen und der Kontrollstamm waren in der Lage, bei diesen pH-Werten zu wachsen, wenn anstelle von 100 μ M Ala-His je 100 μ M freies Histidin angeboten wurde (Befunde sind nicht dargestellt).

Durch die beschriebenen Wachstumstests erschien es daher möglich, die Peptidtransporter hPEPT1 und PEPT2 hinsichtlich ihrer funktionellen Transportcharakteristika wie Substrat-affinität und pH-Abhängigkeit des Peptidtransportes durch Zufallsmutagenese zu untersuchen.

3.1.3 Zufallsmutagenese zur Charakterisierung der Beziehung zwischen Struktur und Funktion

Um neue Informationen über die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der Peptidtransporter zu erhalten, wurde die Zufalls- oder ungerichtete Mutagenese eingesetzt. Einen schematischen Überblick zur Vorgehensweise zeigt Abbildung 3-9.

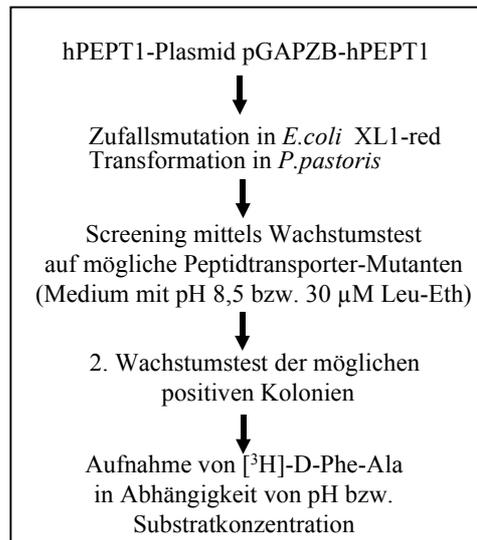


Abbildung 3-9. Vorgehensweise bei der Erzeugung und Selektion von Mutanten des Peptidtransporters hPEPT1.

Die angewandte Methode beruht darauf, dass es durch Transformation und Propagation des Plasmids pGAPZB-hPEPT1 im *E. coli*-Stamm XL1-red aufgrund von Defekten in drei wesentlichen DNA-Reparaturmechanismen der Bakterien zu ungerichteten Mutationen in der für hPEPT1 codierenden cDNA kommt. Werden diese Plasmide in *Pichia pastoris* transformiert, kann die Expression von mutierten Peptidtransporterproteinen erreicht werden. Wenn die Mutationen z.B. zu einer Substitution einer Aminosäure im hPEPT1-Protein führt, die entscheidend für dessen Eigenschaften ist, sollte es zu entsprechend phänotypisch auffälligen Veränderungen im Wachstumstest kommen.

Durch Isolation der cDNA einer solchen Peptidtransportmutante und deren Sequenzierung kann dann auf die Bedeutung bestimmter Aminosäurereste im Peptidtransporterprotein geschlossen werden, die entscheidend für die entsprechende Transporteigenschaft ist.

Zur Generierung von Hefeklonen, die mutierte hPEPT1-Proteine exprimieren, wurde die durch Propagation im XL1-red-Stamm mutagenisierte pGAPZB-hPEPT1 Plasmid-DNA (vgl. 2.2.8) in *Pichia pastoris* transformiert (vgl. 2.2.4). Die erhaltenen ca. 1000 Transformanden wurden dann zur Selektion von Peptidtransportermutanten mit einer erniedrigten Substrataffinität auf Platten mit 25 µM Ala-Eth (AE25) und 30 µM Leu-Eth (LE30) sowie zur Selektion nach einer veränderten pH-Abhängigkeit, auf Ala-His enthaltende Nährmedien, die auf pH 8,5 (MDAH, pH8,5) gepuffert waren, aufgebracht (vgl. Tabelle 3-3). Als Positivkontrolle

dienten Agarplatten, die 100 μM und 500 μM Ala-His (AH100 bzw. AH500) enthielten und auf pH 6,5 gepuffert waren oder 100 μM Histidin enthielten (MDH-Platten (pH8,5)). Nach 3-5 Tagen Inkubation erfolgte die Auswertung des Wachstumsverhaltens der aufgebrauchten Kolonien.

Platten	hPEPT1 Wildtyp (WT)	zu selektierende Mutante
		<i>Mutante mit verminderter Affinität</i>
Ala-His 100 μM	+	+
Ala-His 500 μM	+	+
Ala-Eth 35 μM	-	+
Ala-Eth 3 μM	+	+
Leu-Eth 30 μM	-	+
Leu-Eth 5 μM	+	+
		<i>Mutante mit veränderter pH-Abhängigkeit</i>
Ala-His (pH 6,5)	+	+
Ala-His (pH 8,5)	-	+
His (pH 8,5)	+	+

Tabelle 3-3. Schema zur Identifikation von hPEPT1-Mutanten durch selektive Wachstumstests.

Verwendet wurden folgende Agarplatten: MD, Minimal-Dextrose-Agarplatten (1% Glucose, 1,34% Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren, $4 \times 10^{-5}\%$ Biotin, 2% Agar) entweder mit 100 μM Histidin, 100 μM Ala-His oder 500 μM Ala-His; MDH-Platten mit 35 μM bzw. 3 μM Ala-Eth oder 30 bzw. 3 μM Leu-Eth; MDAH (pH 6,5) oder (pH 8,5), mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer des angegebenen pH-Wertes gepufferte MDAH-Platten. +, Wachstum der Hefekolonien auf den entsprechenden Nährböden; -, kein Wachstum.

In dieser ersten Selektionsrunde wurden insgesamt 62 Kolonien identifiziert, die entweder im sog. pH-Screen oder im sog. Affinitäts-Screen positiv waren. Um das Ergebnis des ersten Wachstumstests zu überprüfen, wurde ein 2. Screening mit diesen Kolonien durchgeführt.

Es wurden für 31 der 62 Kolonien die veränderten Wachstumseigenschaften bestätigt. Hierbei wiesen 5 Kolonien auf einen Affinitäts-Phänotyp hin, da diese Kolonien auf AE25- und LE30-Nährmedien wuchsen und 26 Kolonien zeigten einen pH-Phänotyp mit Wachstum auf Ala-His-Platten bei pH 8,5 an.

Um den veränderten Phänotyp der selektierten hPEPT1-Transportmutanten weiter zu überprüfen und zu verifizieren, wurden Aufnahmestudien mit dem radioaktiv markierten Dipeptid [^3H]-D-Phe-Ala durchgeführt (vgl 2.2.5). Für die im Wachstumstest selektierten pH-Mutanten wurde eine Bestimmung der Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationsmediums und für die selektierten Affinitätsmutanten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration durchgeführt.

Bei allen getesteten Affinitätsmutanten wurde eine nur sehr geringe Aufnahme an [³H]-D-Phe-Ala gemessen, weshalb die erhaltenen Kinetiken nicht auswertbar waren (Befunde sind nicht dargestellt). Daher muss bei den Affinitätsmutanten darauf geschlossen werden, dass das erhöhte Wachstum auf Nährmedien mit den toxischen Dipeptiden Leu-Eth und Ala-Eth in erster Linie auf eine verminderte Expression der Peptidtransporter und einer damit verbundenen niedrigen V_{\max} zurückzuführen ist und nicht auf eine veränderte Affinität der Peptidtransporter dieser Kolonien.

	[³H]-D-Phe-Ala-Aufnahme			
	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5 (= 100%)	pH 8,0
Wildtyp-hPEPT1	21 ± 5	53 ± 1	100	44 ± 11
Mutante R3	33 ± 5	66 ± 10	100	86 ± 3
Mutante R14	20 ± 5	52 ± 10	100	86 ± 8
Mutante Q34	14 ± 2	61 ± 10	100	77 ± 6

Tabelle 3-4. pH-Abhängigkeit der [³H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in Wildtyp- oder mutierte hPEPT1-Protein exprimierende Hefezellen.

Die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala (2 µCi/ml, 20 min) in Wildtyp- oder mutierte-hPEPT1-Protein exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde bei unterschiedlichen pH-Werten des Inkubationspuffers (pH 4,5-8,0) auf 96-well-Filterplatten bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten für die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala bei den entsprechenden pH-Werten im Vergleich zur Aufnahme bei pH 6,5 dargestellt.

Von den geprüften pH-Mutanten zeigten 3 der 22 Kolonien auch im Aufnahmeexperiment mit [³H]-D-Phe-Ala einen veränderten Phänotyp. Wie Tabelle 3-4 dokumentiert, sind die selektierten Klone R3, R14 und Q34 im Gegensatz zum Wildtyp-hPEPT1 auch bei einem pH-Wert von 8,0 zur Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala befähigt, die 77 bis 86 % der Aufnahmerate bei pH 6,5 betrug.

Alle anderen Kolonien zeigten sowohl im ersten als auch im zweiten Transportexperiment Aufnahmeraten, die entweder vergleichbar zu denen von Wildtyp-hPEPT1 waren, d.h. mit einer deutlich niedrigeren [³H]-D-Phe-Ala-Aufnahme bei pH 8,5 oder sie hatten so geringe Aufnahmeraten, dass eine Auswertung der Kinetik nicht möglich war.

Die drei selektierten Kolonien R3, R14 und Q34, die einen veränderten Phänotyp für die pH-Abhängigkeit der Dipeptidaufnahme zeigten, wurden daher für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Zur Identifikation der mutierten Sequenz der hPEPT1-cDNA wurde die in Abbildung 3-10 dargestellte Vorgehensweise gewählt.

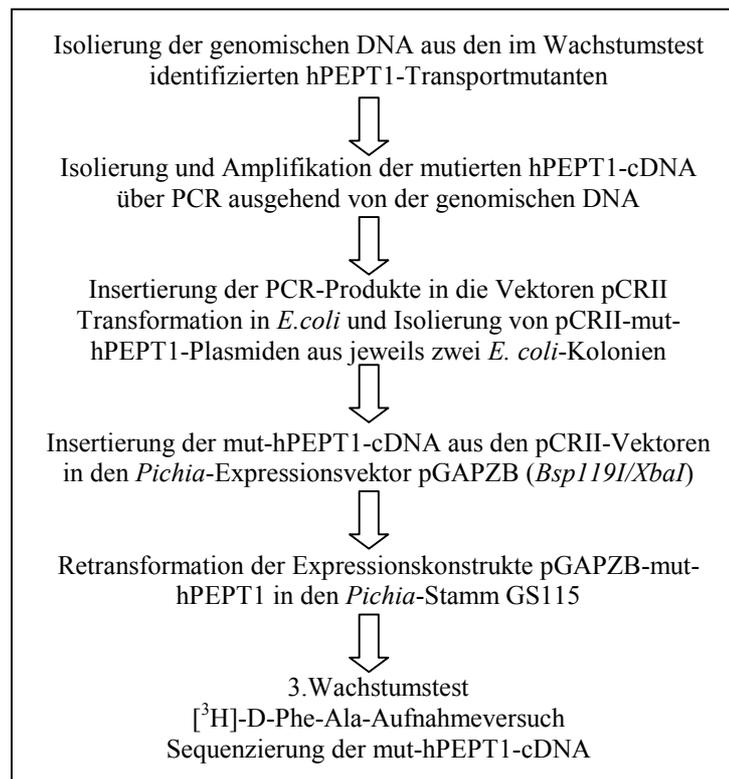


Abbildung 3-10. Vorgehensweise zur Identifizierung und Charakterisierung von Mutationen in der cDNA von hPEPT1-Transportmutanten

Aus diesen 3 Klonen wurde die genomische DNA isoliert (vgl. 2.2.9). Ausgehend davon wurde mittels PCR die für die mutierten hPEPT1-Proteine codierende cDNA (mut-hPEPT1-cDNA) amplifiziert (vgl. 2.2.1). Hierfür wurden die Primer pGAPfw und 3AOX1 (Sequenzen siehe Anhang) eingesetzt, da sie spezifisch für 5'- und 3'-flankierende Sequenzen des im Genom integrierten Expressionsvektors waren, aber nicht Teil der hPEPT1-cDNA. Wie in Abbildung 3-11 dargestellt, wurde in der PCR ein deutliches Signal in der erwarteten Höhe von 2,2 kb für alle Ansätze erhalten.

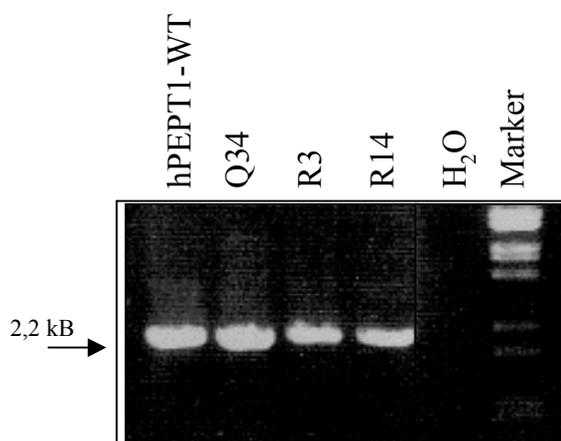


Abbildung 3-11. PCR zur Isolierung der mut-hPEPT1-cDNA's ausgehend von genomischer DNA der hPEPT1-Mutanten.

Die PCR wurde durchgeführt mit 1 µg genomischer DNA der identifizierten hPEPT1-Mutanten bzw. des hPEPT1-Wildtyp (WT) oder mit H₂O als Negativkontrolle. Zur Amplifikation verwendet wurden die Primer pGAPfw und 3AOX1 und das Elongase-system. Bedingungen: 94°C 30s; 35 Zyklen (94°C 30s, 57°C 30s, 68°C 120s). Jeweils 10 µl Reaktionsansatz wurden in einem 1%-igen Agarosegel bei 90mV aufgetrennt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden dann in das Plasmid pCRII ligiert und in *E. coli* transformiert. Von den Transformanden wurden jeweils 2 Kolonien ausgewählt und deren Plasmid-DNA präpariert. Hierdurch und durch das weitere Arbeiten mit zwei parallelen Ansätzen sollten mögliche Veränderungen bei der PCR-Amplifizierung oder der *E. coli*-Transformanden erkannt bzw. ausgeschlossen werden. Aus den pCRII-Plasmiden wurde nun über *Bsp119I/XbaI*-Verdau die mut-hPEPT1-cDNA isoliert und in den Expressionsvektor pGAPZB ligiert. Nach Transformation dieser Konstrukte in *E. coli* wurde aus jeweils einer Kolonie die Plasmid-DNA isoliert, mit *AvrII* linearisiert und dann in den *Pichia pastoris*-Hefestamm GS115 transformiert (vgl. 2.2.4).

Von den erhaltenen Hefetransformanden wurden je Ansatz 8 Kolonien ausgewählt und einem weiteren Wachstumstest unterzogen. Durch diesen dritten Test sollte gezeigt werden, dass der veränderte Phänotyp für die pH-Abhängigkeit des Peptidtransporters hPEPT1 auch tatsächlich durch Mutationen in der hPEPT1-cDNA hervorgerufen wird. Die jeweils 8 untersuchten Transformanden der beiden Ansätze der R2-Mutante sowie für einen Ansatz der Q34-Mutante und der R14-Mutante zeigten dabei auf Dipeptid-haltigen Nährmedien kein oder ein zum Wildtyp-hPEPT1-Stamm vergleichbares Wachstum. Dieses legte den Schluss nahe, dass die nach Retransformation erhaltenen Kolonien entweder keine Peptidtransporter mehr exprimierten oder der in der ersten Selektion erhaltene veränderte Phänotyp nicht auf eine Mutation in der hPEPT1-cDNA, sondern vermutlich auf andere Spontanmutationen des Hefestammes zurückzuführen war.

Für einen Ansatz der Q34- und der R14-Mutante wurde auch im 3. Test bei 5 bzw. 6 der 8 untersuchten Kolonien ein Wachstum auf Ala-His-haltigen Medien bei pH 8,5 erhalten. Von diesen positiven Kolonien wurden je zwei ausgewählt und im Aufnahmeversuch mit [³H]-D-Phe-Ala ebenfalls die pH-Abhängigkeit des Peptidtransportes geprüft (Abbildung 3-12).

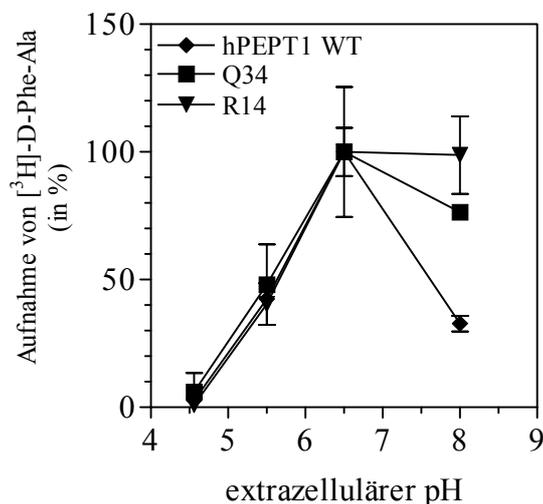


Abbildung 3-12. pH-Abhängigkeit der Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala in den hPEPT1-Wildtypstamm und in die mutierten Q34- und R14-Stämme.

Die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala (2 μ Ci/ml, 20 min) in den hPEPT1-Wildtyp (WT)-Stamm oder die mutierten Q34 und R14-Stämme wurde bei unterschiedlichen pH-Werten des Inkubationspuffers (pH 4,5-8,0) auf 96-well-Filterplatten bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM für die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala bei den entsprechenden pH-Werten im Vergleich zur Aufnahme bei pH 6,5 dargestellt.

Da der pH-Phänotyp auch hier bestätigt werden konnte, wurde zur Identifizierung der Mutation die entsprechende Q34 bzw. R14-hPEPT1-cDNA, die zur Retransformation in *Pichia pastoris* eingesetzt wurde, sequenziert (vgl. 2.2.3). Wie in Abbildung 3-13 dargestellt, wurden die Primer so gewählt, dass das gesamte Konstrukt in beide Richtungen vollständig sequenziert werden konnte.

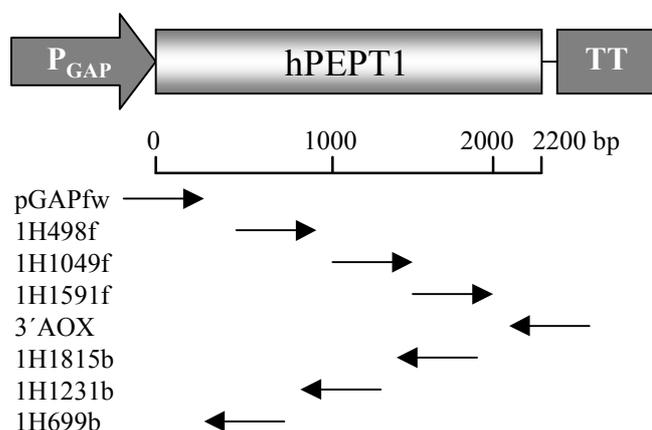


Abbildung 3-13. Darstellung der zur Sequenzierung verwendeten Primer.

Aufgelistet sind die Primer, die zur Sequenzierung der hPEPT1-cDNA aus den Transportmutanten eingesetzt wurden, sowie der jeweilige Startpunkt der Sequenzierung. Die Pfeile geben die Leserichtung in der Sequenzierungsreaktion an. (s. Anhang für Primersequenzen)

Durch Vergleich der mutierten Q34 bzw. R14-hPEPT1-Sequenz mit der Sequenz des Wildtyp-hPEPT1 wurde jeweils eine Punktmutation identifiziert (Tabelle 3-5). Diese Mutation war im Falle der Q34-Mutante ein Nukleotidaustausch $\text{GGT} \rightarrow \text{GAT}$, was zu einem Austausch auf Aminosäureebene in Position 476 im hPEPT1-Protein von Glycin zu Aspartat führte (G476D). Aus den Daten der Hydrophobizitätsanalyse ist diese Aminosäure 476 in der extrazellulären Schleife des Proteins zwischen Transmembrandomäne 9 und 10 lokalisiert. Für die R14-Mutante wurde ebenfalls ein Nukleotidaustausch ($\text{ATC} \rightarrow \text{CTC}$) identifiziert, der auf Aminosäureebene zu einem Austausch eines Isoleucin-Restes gegen einen Leucin-Rest in Aminosäureposition 382 im hPEPT1-Protein führte (I382L). Diese Aminosäure ist nach dem hPEPT1-Proteinmodell die letzte Aminosäure in der 9. TMD und damit in benachbarter Region zu der mutierten Aminosäure der Q34-Transportmutante.

hPEPT1-Mutation			
Selektierte Transportmutanten	Nukleotid-Austausch	Aminosäure-Austausch	Position im Protein
Q34	GGT \rightarrow GAT	G476D	in Schleife zwischen TMD 9 und 10
R14	ATC \rightarrow CTC	I382L	letzte AS TMD9

Tabelle 3-5. Identifikation der Mutationen auf der cDNA der hPEPT1-Transportmutanten Q34 und R14. AS, Aminosäure; TMD, Transmembrandomäne.

Der gemeinsame Bereich in dem sich die beiden Mutationen der Q34 und der R14-Mutante befinden, weist auf eine mögliche spezifische Bedeutung dieser Region für die Bindung und Translokation von Protonen im Prozess des Cotransportes mit Peptiden hin.

Um darüber hinaus zu zeigen, dass der veränderte Phänotyp der Transportmutanten Q34 und R14 auch in anderen Expressionssystemen erhalten bleibt, sollten die Transportermutanten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden. Ausgehend von den pCRII-mut-hPEPT1-Konstrukten wurde über *in-vitro*-Transkription die cRNA der beiden Mutanten erzeugt und in *X. laevis* Oozyten injiziert (vgl. 2.2.10). Zur Charakterisierung der Transporter wurden dann sowohl Fluxstudien mit markierten Dipeptiden als auch elektrophysiologische Techniken eingesetzt. Als nachteilig erwies sich in diesen Untersuchungen – vergleichbar zu Ergebnissen für die Expression anderer Transportproteine bzw. für chimäre Transportproteine – die niedrige Expressionsrate der mutanten hPEPT1-Proteine im Oozyten-System. Die erhaltenen Daten waren aufgrund der niedrigen Expressionsrate nicht auswertbar. Der Phänotyp der Transportmutanten Q34 und R14 konnte daher im Oozyten-System nicht charakterisiert werden und wurde funktionell nur durch Transportuntersuchungen am *P. pastoris*-System bestätigt.

Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass die Methode der Zufallsmutagenese in Kombination mit der heterologen Expression in *Pichia pastoris* und dem Hefe-Wachstums-Assay dazu geeignet ist, um Informationen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Peptidtransporter zu erhalten. Für den humanen PEPT1 konnten bisher unbekannte Aminosäurenpositionen im Protein identifiziert werden, die offenbar eine Rolle bei der pH-Abhängigkeit des Dipeptidtransportes spielen. Durch weitere Zyklen einer ungerichteten Mutagenese oder durch gerichtete Mutagenese in dem Proteinbereich, in dem sich die beiden hier identifizierten Mutationen befinden, lassen sich die Aminosäurenreste identifizieren, die für die Transportfunktion entscheidend sind.

3.1.4 Diskussion der Befunde zur Nutzung von *Pichia pastoris* als Expressionssystem der Peptidtransporter aus Säugern (3.1)

Peptidtransporter konnten in einer Vielzahl verschiedener Säugetierspezies identifiziert und aus ihnen isoliert werden, u.a. aus Kaninchen, Ratte, Maus und Mensch. Aufgrund der Verfügbarkeit der genetischen Information durch die Klonierung der cDNA's war es möglich, diese polytopischen Membranproteine isoliert zu untersuchen. Gerade für Fragestellungen, die sich mit strukturellen und molekularen Aspekten der Peptidtransporter befassen, war dies ein entscheidender Vorteil. Eine wesentliche Voraussetzung zu einer umfassenden Charakterisierung ist allerdings die Verfügbarkeit eines geeigneten Zellsystems zur Expression der Transporter.

Für die Produktion von Membranproteinen sowohl in homologen als auch in heterologen Expressionssystemen gilt, dass sie sehr viel schwieriger zu erreichen ist, als die Produktion löslicher Proteine (Schertler, G. F. X., 1992). Für die Peptidtransporter konnte bisher eine funktionelle Expression in verschiedenen Zellsystemen wie z.B. *X. laevis*-Oozyten oder Säugerzelllinien wie HeLa-Zellen demonstriert werden (Liang, R. et al., 1995; Fei, Y. J. et al., 1994; Boll, M. et al., 1994), die allerdings für bestimmte Fragestellungen nur eingeschränkt verwendbar sind.

Als alternatives System für die Expression der Peptidtransporter aus Säugern konnte in dieser Arbeit die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* etabliert werden. Weiterhin wurden neue Methoden zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der Peptidtransporter entwickelt.

Das *P. pastoris*-Hefesystem vereint sowohl die Vorteile bakterieller Systeme wie z.B. einfache Kultivierungsbedingungen und schneller Zellvermehrung als auch die Fähigkeit eukaryotischer Zellen zu komplexen posttranslationalen Modifizierungen der Proteine (Eckart, M. R. & Bussineau, C. M., 1996; Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000). Bis zum Beginn dieser Arbeit gab es noch keine Befunde zur Expression eines humanen Transportproteins in *P. pastoris*. Des Weiteren gab es erst zwei Beispiele der erfolgreichen Expression humaner Membranproteine. In beiden Fällen handelte es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Weiss, H. M. et al., 1998; Talmont, F. et al., 1996). Auch für besser charakterisierte Hefen wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* gibt es nur wenige Beispiele einer erfolgreichen Expression eines Transportproteins aus Säugern (Groves, J. D. et al., 1996; Ruetz, S. et al., 1993; Horowitz, B. et al., 1990). Erste Ergebnisse für die Expression von Peptidtransportern aus dem Kaninchen ließen jedoch vermuten, dass sich das *Pichia pastoris*-System auch für den

humanen PEPT1 und darüber hinaus generell für die Expression von Peptidtransportern eignet.

Die Expression in *P. pastoris* bringt entscheidende Vorteile für die Charakterisierung der Peptidtransporter:

- Die heterolog exprimierten Peptidtransporter werden in funktioneller Form exprimiert.
- Die Expression ist höher als in anderen Expressionssystemen wie z.B. dem für die Peptidtransporter bereits etablierten *Xenopus laevis* Oozyten-System.
So wurde für hPEPT1 exprimierende Oozyten lediglich eine ca. 8-fache Stimulation der Dipeptidaufnahme im Vergleich zu Kontroll-Oozyten gemessen. In *P. pastoris* war die Dipeptidaufnahme in hPEPT1 exprimierenden *P. pastoris*-Zellen bis zu 25-fach gegenüber Kontrollzellen erhöht.
- Die genetische Information für die Peptidtransporter wird stabil in das Genom integriert. Dadurch ist die Stabilität des Hefestammes und damit der Expressionshöhe des Carrierproteins gewährleistet.
- Die Hefe *Pichia pastoris* stellt einen einzelligen Organismus dar, der unter einfachen Bedingungen zu kultivieren ist und darüber hinaus auch die Möglichkeit bietet, aufgrund der schnellen Zellvermehrung große Mengen an Peptidtransporterprotein zu produzieren.
- Für die genetische Manipulation von Hefen sind eine Vielzahl von Methoden verfügbar bzw. können entwickelt werden, die sich zur Charakterisierung der Peptidtransporter einsetzen lassen.

Am Beispiel des intestinalen Peptidtransporters aus dem Menschen konnte gezeigt werden, dass die Carrier in dieser Hefe funktionell exprimierbar sind und die Expressionshöhe optimiert werden kann.

Für die Expressionsqualität in *Pichia pastoris* sind zahlreiche Faktoren bekannt geworden, die die Proteinproduktion in diesem System beeinflussen können. Dazu zählen u.a. die Anzahl der Kopien der Expressionskassette, die Stelle und Art der chromosomalen Integration der Expressionskassette, die 5'- und 3'-nichttranslatierten Bereiche der mRNA, die Anwesenheit eines Sekretionssignals sowie die Medien und Wachstumsbedingungen (Srekrishna, K. et al., 1997).

Diese Faktoren wurden daher zur Optimierung des Produktionssystems für die Peptidtransporter herangezogen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Expressionskonstrukte sowie unterschiedliche transgene *Pichia pastoris*-Stämme erzeugt, in denen die für den humanen

PEPT1 codierende cDNA über homologe Rekombination stabil in das Genom integriert wurde.

Als entscheidend für eine **hohe funktionelle Expressionsrate** der Peptidtransporter konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden:

- Die Verkürzung des 5'-nichttranslatierten Bereiches der hPEPT1-cDNA und damit der Bereich zwischen Promotor-Sequenzen und dem ATG von hPEPT1 von 91 bp auf 4 bp führte zu einer 4-fachen Steigerung der Expressionsrate. Auch in Studien zur Expression eines löslichen Proteins in *Pichia pastoris* konnte dies als Einflussfaktor der Expressionshöhe identifiziert werden (Sreekrishna, K. et al., 1997).
- Das Anfügen einer Signalsequenz für sekretorische Proteine an den Aminoterminus des hPEPT1-Proteins zeigte dagegen keinen Effekt auf die Expressionshöhe. Dieser Befund unterscheidet sich damit von Ergebnissen zur Expression eines Serotoninrezeptors in *P. pastoris* und der Steigerung der Expression durch die N-terminale Fusion eines Sekretionssignals (Weiss, H. M. et al., 1995). Eine Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Membrantopologie der beiden Proteine sein. Während der Aminoterminus des G-Protein gekoppelten Rezeptors extrazellulär lokalisiert ist, liegt der Aminoterminus im hPEPT1-Protein nach dem Proteinmodell intrazellulär (Mackenzie, B. et al., 1996).
- Die Art und Position der Integration der hPEPT1-cDNA ins Hefegenom beeinflusst dagegen stark die Expressionshöhe. Eine Zerstörung des Gens für die AOX1 bei der Integration der hPEPT1-cDNA und das damit verbundene langsamere Wachstum auf Methanol-haltigen Medien ist offenbar vorteilhaft für eine hohe funktionelle Expression des hPEPT1-Proteins. Auch für die Expression von intrazellulären Proteinen, nicht aber für die Produktion von sekretorischen Proteinen konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden (Sreekrishna, K. et al., 1997). Da bei *P. pastoris*-Zellen, die auf Methanol wachsen, die Alkoholoxidase 1 bis zu 35 % des Gesamtproteins betragen kann, liegt der Grund vermutlich in der fehlenden Konkurrenz um die Synthesekapazität des 'Fremdproteins' hPEPT1 und dem AOX1-Protein unter der Kontrolle des Methanol-induzierbaren Promotors der AOX1.
- In Analogie zu anderen *P. pastoris* exprimierten Proteinen (Clare, J. J. et al., 1991; Clare, J. J. et al., 1991; Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000), führte auch bei der Expression von hPEPT1 eine mehrfache Integration der cDNA in das Hefegenom zu einer Erhöhung der funktionellen Expression. Die Expression, die auf Mehrfachintegration des Expressi-

onstruktetes selektierten Transformanden, lag dabei 5- bis 20-fach über der nicht-selektierter Klone.

Die Expression des Peptidtransporters hPEPT1 unter der Kontrolle des GAP-Promotors zeigte erstmals für Membranproteine, dass dies eine vielversprechende Alternative zu der bisher als Standard geltenden Methanol-induzierbaren Expression darstellt. Unter Berücksichtigung der ermittelten Einflussgrößen für die Erzeugung der Expressionskonstrukte und rekombinanten Hefestämme wurde für den hPEPT1, vergleichbar zur Expression des Enzyms β -Lactamase (Waterham, H. R. et al., 1997), eine bis zu 5-fach höhere funktionelle Expression erzielt als unter dem induzierbaren AOX1-Promotor. Auch für die hPEPT1-Expression wurde ein wesentlicher Einfluss der Art der Kohlenstoffquelle auf die hPEPT1-Produktion unter Kontrolle des GAP-Promotors mit einem Maximum bei Verwendung Glucose-haltiger Nährmedien beobachtet.

Aufgrund nicht verfügbarer Antikörper sowie geeigneter Analyseverfahren zur Quantifizierung der heterolog exprimierten Peptidtransporterproteine war bislang ein Nachweis des hPEPT1-Proteins sowie der Vergleich der Effizienz verschiedener Expressionssysteme nur durch funktionelle Daten, also die Bestimmung der Aufnahme von Dipeptiden möglich.

In dieser Arbeit wurde daher das sogenannte **Epitop-Tagging** genutzt, bei dem die hPEPT1-cDNA so verändert wurde, dass das exprimierte Protein an seinem Carboxyterminus ein myc-Epitop und einen 6His-Tag besitzt.

Das Anfügen solcher Proteindomänen an den C-Terminus des hPEPT1-Proteins führte zu keinem Funktionsverlust des Carriers, da alle charakteristischen Parameter, wie seine pH-Abhängigkeit sowie Substratspezifität vollständig konserviert blieben.

Da für das myc-Epitop monoklonale Antikörper erhältlich sind, war es nun möglich, das hPEPT1-Protein immunologisch nachzuweisen und darüber hinaus durch vergleichende Analysen mit einem kommerziell erhältlichen rekombinanten Protein erstmals eine Quantifizierung der heterolog exprimierten Transportproteine vorzunehmen.

Hierbei konnten in 1 μ g Membranprotein des hPEPT1-Hefestammes 6 ± 1 ng des 'getaggen' hPEPT1-Proteins nachgewiesen werden. Das entspricht einem Anteil von ca. 0,6% der gesamten isolierten Membranproteinfraktion. Ausgehend vom Molekulargewicht von 78,8 kDa für hPEPT1 ergab dies ca. 64 pmol hPEPT1-Protein pro mg Membranprotein. Damit liegt die Menge, die an hPEPT1-Protein nachgewiesen wurde, in einem Bereich, der auch für andere in *P. pastoris* exprimierte Membranproteine, wie das Opsin (Abdulaev, N. G. et al.,

1997), das 0,6 - 0,75% des Membranproteins ausmachte, oder die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (40 pmol/mg bzw. 25 pmol/mg) (Weiss, H. M. et al., 1998) erreicht wurde.

Dies lässt vermuten, dass durch die gezielte Optimierung des hPEPT1-exprimierenden Hefestammes anscheinend die maximal mögliche Menge an heterolog exprimierbarem hPEPT1-Protein erreicht wurde.

Aus einer OD-Einheit rekombinanter *Pichia pastoris*-Zellen können etwa 10 µg Membranprotein präpariert werden. Daher kann aus einem Liter einer Kultur, die bis zu einer Dichte von 4OD/ml herangezogen wird, etwa 0,2 mg rekombinantes hPEPT1-Protein erhalten werden. Aufgrund der bereits für *P. pastoris*-Hefezellen etablierten Fermentationstechnologien (Cereghino, J. L. & Cregg, J. M., 2000) und der damit verbundenen Möglichkeit, große Zellmengen zu erhalten, besteht somit ein vielversprechender Ausgangspunkt für eine erfolgreiche Reinigung des hPEPT1-Proteins.

Vorteilhaft hierfür ist darüber hinaus der am hPEPT1-Protein angefügte C-terminale Bereich, der neben dem Myc-Epitop auch einen His6-Tag enthält. Eine Sequenz aus 6 Histidinen, wie im His6-Tag, ist in der Lage, eine Interaktion mit Metallionen wie Ni²⁺ oder Zn²⁺ einzugehen und stellt damit die Voraussetzung für die Aufreinigung von Proteinen über eine Metall-Affinitäts-Chromatographie dar. Diese Technik wurde bereits für die Reinigung verschiedener Membranproteine nach Expression in Hefen oder anderen Expressionssystemen erfolgreich eingesetzt (Urbatsch, I. L. et al., 1998; Fucentese, M. et al., 1997; Sauer, N. & Stolz, J., 1994).

Anhand der maximalen Transportrate in Kombination und der Quantifizierung des exprimierten hPEPT1-Proteins lassen sich erste Anhaltspunkte für die Transportkapazität und die Turnover-Rate der Peptidtransporter in Hefen erhalten. Aus der V_{\max} von $5,65 \pm 0,19$ nmol/OD/30min, die für die D-Phe-Ala-Aufnahme in hPEPT1 exprimierende *P. pastoris*-Zellen ermittelt wurde, ergibt sich eine Rate von 183 pmol D-Phe-Ala pro OD und min. Unter Berücksichtigung der Avogadroschen Konstante von $6,022 \times 10^{23}$ entspricht dies $1,11 \times 10^{14}$ Moleküle D-Phe-Ala, die von einer OD Zellen, also von 5×10^7 Hefezellen, pro Minute aufgenommen werden. Eine einzelne Hefezelle nimmt somit 37794 Moleküle D-Phe-Ala pro Sekunde auf. Über die Quantifizierung des exprimierten hPEPT1-Proteins konnte gezeigt werden, dass 64 pmol hPEPT1-Protein pro mg Membranprotein nachgewiesen werden können. Da aus einer OD Hefezellen ca. 10 µg Membranprotein isoliert werden können, ergeben sich somit ca. 7648 hPEPT1-Moleküle pro Zelle. Wenn eine Hefezelle mit 7648 hPEPT1-Transportern 37794 Moleküle D-Phe-Ala pro Sekunde transportiert, dann entspricht dies einer Transportrate von 5 Molekülen D-Phe-Ala pro Sekunde und hPEPT1-Molekül.

Diese Zahl bietet jedoch nur einen Anhaltspunkt, da ein vollständiger Aufschluss der Zellen und vollständige Extraktion des Membranproteins angenommen wurde. Da dies sicherlich nicht in vollem Umfang erreicht wurde, bleibt zu vermuten, dass die tatsächliche Transportrate deutlich höher ist als der hier ermittelte Wert.

Für zukünftige Fragestellungen zu **Struktur-Funktionsbeziehungen** der Peptidtransporter wäre der Einsatz von Techniken von Vorteil, mit denen in atomarer Auflösung Strukturen des Proteins bestimmt werden können. Solche Techniken wie z.B. massenspektrometrische Analysen (le Coutre, J. et al., 2000; Whitelegge, J. P. et al., 1999) oder Positions-spezifisches Spin-Labeling (Sun, J. et al., 1999), die bereits initial für verschiedene membranständige Transportproteine eingesetzt wurden, benötigen große Mengen an gereinigtem, homogenem Protein. Aus diesem Grund stellt das *Pichia pastoris*-Hefesystem zur Zeit das vielversprechendste System dar, das die benötigten Mengen an rekombinantem Peptidtransporterprotein in funktioneller Form zur Verfügung stellen kann.

Die Funktionalität der Peptidtransporter nach ihrer Expression in *P. pastoris* stellt außerdem eine wesentliche Voraussetzung dar, um in diesem System umfassende und vergleichende **Struktur-Affinitäts-Untersuchungen** durchzuführen.

Für diese Untersuchungen wurde ein Transportassay entwickelt, über den für eine Vielzahl von Liganden die Interaktion mit dem Transporter bestimmt werden kann. Dieser Transportassay beruht auf einer Schnellfiltrationstechnik mit 96-well Filterplatten und der konzentrationsabhängigen Verdrängung des radioaktiv markierten Dipeptids D-Phe-Ala von der Substratbindungsstelle der Peptidtransporter. Aus diesen Verdrängungsexperimenten lassen sich als Konstanten die IC_{50} - oder K_i -Werte ermitteln, die einen Aufschluss über die Affinität der Liganden zum Transporter geben. Dieser Assay ermöglicht sowohl eine schnellere als auch kostengünstigere Untersuchung der Substratspezifität der Transporter im Vergleich zum bislang verwendeten Einzelfilter-Assay. Darüber hinaus ist aufgrund der Robustheit und Stabilität des Hefeexpressionssystems, sowie der nahezu unbegrenzt zur Verfügung stehenden Zellmenge, eine teilweise Automatisierung dieses Systems zum Hochdurchsatz-Screeningsystem (High-throughput-screening, HTS) denkbar, wie es bereits für Bindungsstudien an Rezeptoren eingesetzt wird (Landro, J. A. et al., 2001; Hawthorne, S. J. et al., 2001).

Ein solches Screeningsystem ist gerade auch aufgrund der pharmakologischen Bedeutung der Peptidtransporter besonders dazu geeignet, bei der Entwicklung neuer Pharmaka eingesetzt zu werden. Für verschiedene β -Lactamantibiotika wurde gezeigt, dass ihre exzellente orale Bio-

verfügbarkeit vor allem durch ihre Affinität zum intestinalen Peptidtransporter PEPT1 bestimmt wird (Bretschneider, B. et al., 1999).

Ein Ansatz für die Entwicklung neuer oral verfügbarer Pharmaka ist die Identifikation von Leitstrukturen in Verbindungen, die diese zu Substraten der Peptidtransporter machen (Yang, C. Y. et al., 1999). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Daten, die aus den Verdrängungsexperimenten mit unterschiedlichen Peptidmimetika in sehr guter Übereinstimmung zu Daten aus anderen Zellsystemen stehen (Bretschneider, B. et al., 1999; Han, H. K. et al., 1999), erscheint das Hefesystem in Verbindung mit dem Assay auf Mikrofilterplatten sowohl für ein Screening von Substanzbibliotheken nach möglichen Substraten der Peptidtransporter als auch für eine rationale Entwicklung neuer Pharmaka besonders geeignet.

Das hPEPT1-Hefesystem kann somit dazu eingesetzt werden, Pharmaka hinsichtlich ihrer oralen Bioverfügbarkeit einzuschätzen und um sie hinsichtlich ihrer PEPT1 vermittelten Resorption strukturell zu optimieren.

Ausgehend von der funktionellen Expression der Peptidtransporter wurde mit der **Zufallsmutagenese** eine neue Methode zur Untersuchung und Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen der Peptidtransporter entwickelt.

Sowohl innerhalb der Substratbindungsstelle als auch dem Translokationsweg des Substrates kommt es zu direkten Wechselwirkungen bestimmter Aminosäurenreste des Peptidtransporterproteins mit dem Substrat. Diese Reste können in der Regel nicht durch andere Aminosäurenreste ersetzt werden, ohne dass es zu einer Veränderung der Funktion kommt. So wird z.B. für verschiedene Histidinreste des PEPT1-Proteins eine Beteiligung an der Bindung und Translokation von Protonen während des Cotransportes mit Peptiden diskutiert (Fei, Y. J. et al., 1997). Ebenso vermutet man auch für einen Tyrosin-Rest des Peptidtransporterproteins eine Bedeutung in der Substraterkennung (Yeung, A. K. et al., 1998). Für die Identifikation dieser für die Transportfunktion essentiellen Aminosäurenreste wurde bisher der Ansatz der gerichteten Mutagenese gewählt. Durch einen solchen Ansatz können allerdings nur wenige ausgesuchte Aminosäuren, für die bereits Hinweise auf ihre Funktion im Protein vorliegen, untersucht werden. Da sich aus dem Sequenzvergleich der Peptidtransporter jedoch nur begrenzt weitere Hinweise auf essentielle Aminosäuren finden lassen, wurde hier der Ansatz der Zufallsmutagenese gewählt.

Grundlage für die Identifizierung von Peptidtransportermutanten, die durch ungerichtete Mutagenese der cDNA in dem *E. coli*-Mutatorstamm XL1-red erzeugt wurden, war ein

Wachstumstest. Über diesen Wachstumstest konnten die funktionellen Charakteristika der Peptidtransporter wie die pH-Abhängigkeit und Substrataffinität durch spezifisches Wachstum PEPT1- oder PEPT2-exprimierender Hefezellen auf dipeptidhaltigen Nährmedien gemessen werden.

Zur Identifizierung von Mutanten mit veränderter Substrataffinität wurde dabei eine Selektion über toxische Dipeptide gewählt, wobei der Verlust der Sensitivität gegenüber hohen Konzentrationen der Ethionindipeptide in den Nährmedien als Maß für eine Verschlechterung der Substrataffinität diene. Vergleichbar zu diesem Wachstumsassay konnte auch für einen Hexosetransporter aus Pflanzen nach Expression in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* gezeigt werden, dass über das toxische Glucose-Analog 2-Desoxyglucose Transportmutanten mit einer veränderten Substrataffinität selektiert werden können (Will, A. et al., 1994; Will, A. et al., 1998).

Die Grundlage zur Selektion von Mutanten mit veränderter pH-Abhängigkeit der Dipeptidaufnahme liegt in der Histidin-Auxotrophie des verwendeten *P. pastoris*-Stammes und der Möglichkeit aufgrund der Expression der Peptidtransporter die essentielle Aminosäure Histidin in Form des Dipeptids Ala-His anbieten zu können. Entsprechend der pH-Abhängigkeit der Dipeptidaufnahme wird auf Nährmedien mit Ala-His bei pH-Werten $>8,0$ kein Wachstum der Hefezellen, die hPEPT1 exprimieren, erhalten.

Für die Identifizierung von Aminosäuren im Protein, die für die Funktionalität des Peptidtransporters hPEPT1 essentiell sind, besitzt dieser Ansatz aus Zufallsmutagenese, Expression in Hefezellen, Selektion der Peptidtransportmutanten und Identifizierung der Mutation entscheidende Vorteile:

- Alle Nukleotide der hPEPT1-cDNA werden mit gleicher Wahrscheinlichkeit mutiert. Durch eine ungerichtete Mutagenese können somit auch Aminosäurenreste im hPEPT1-Protein als funktionell wichtig identifiziert werden, die sich nicht aus einer Sequenzanalyse ableiten lassen.
- Generell führt die Mehrzahl der Mutationen zu einem nicht-funktionellen Transportprotein. Durch den Wachstumstest auf Dipeptid-haltigen Nährmedien werden nur solche Mutanten selektiert, die ein funktionsfähiges Transportprotein exprimieren. Somit lassen sich Mutationen identifizieren, die spezifisch Transporteigenschaften wie die pH-Abhängigkeit oder Substrataffinität betreffen.

Ausgehend von ca. 1000 Hefeklonen, die aus der Transformation mit mutierter hPEPT1-cDNA erhalten wurden, konnten in mehreren Selektionszyklen drei Transportmutanten identifiziert werden. Aus diesen drei Mutanten wurde die mutierte cDNA isoliert und dann zur

Bestätigung des Phänotyps wieder in den Wildtyp-Hefestamm retransformiert. Für eine Mutante konnte der Phänotyp der veränderten pH-Abhängigkeit nicht bestätigt werden. Es muss daher vermutet werden, dass der veränderte Phänotyp nicht auf einer Mutation der hPEPT1-cDNA beruht, sondern eventuell auf spontan auftretenden Mutationen im verwendeten Hefestamm zurückzuführen ist. Weiterhin wäre als Ursache denkbar, dass es bei der Retransformation nicht zu einer Integration des kompletten Expressionskonstruktes in das Hefegenom kam und daher auch nur ein funktionell eingeschränkt oder komplett inaktives hPEPT1-Protein exprimiert wurde.

Die aus dem ersten Screening auf veränderte Substrataffinität als mögliche Mutanten identifizierten hPEPT1-Klone zeigten in weiteren Versuchen eine zu geringe Aufnahme von Dipeptiden, um sie einer eingehenden Analyse unterziehen zu können. Die Selektion dieser falsch-positiven Kolonien erfolgte daher nicht aufgrund ihrer veränderten Affinität sondern wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Expressionsrate und der damit verbundenen verminderten Transportrate. Ob über den Wachstumstest auf Nährmedien mit toxischen Dipeptiden neben diesen falsch-positiven Kolonien auch 'echte' Affinitätsmutanten erhalten werden können, bleibt daher unklar. Auch für eine Mutationsanalyse mit einem Monosaccharid-Transporter wurde gezeigt, dass die Selektion mittels eines toxischen Substrats immer auch zur Isolierung von Klonen mit geringer Expressionsrate führt (Will, A. et al., 1994).

Als limitierend für die Identifikation von Affinitätsmutanten und die geringe Anzahl identifizierter pH-Mutanten muss allerdings auch die zu geringe Anzahl anfänglich selektierter Mutanten gelten. Der wesentliche Unterschied zur Mutationsanalyse mit einem Monosaccharid-Transporter, bei der aus lediglich 800 untersuchten Transformanten mehr als 30 Affinitätsmutanten isoliert werden konnten, besteht in der Generierung der mutierten cDNA's. Somit scheint die Mutation der hPEPT1-cDNA durch Propagation in dem XL1-red Mutatorstamm und damit die im Vergleich zu einer PCR-vermittelten Zufallsmutagenese zu geringe Mutationsrate, der limitierende Schritt gewesen zu sein.

Die nach Retransformation und erneuter funktioneller Charakterisierung erhaltenen zwei hPEPT1-Mutanten Q34 und R14 zeigten eine veränderte pH-Abhängigkeit. Aus der Sequenzierung der mutierten cDNA's und Sequenzvergleich mit dem Wildtyp-hPEPT1 wurden die mutierten Nukleotide identifiziert. Im Fall der Q34-Mutante wurde ein Basenaustausch identifiziert, der auf Aminosäureebene zu einem Austausch des Glycins an Position 476 des hPEPT1-Proteins gegen einen Aspartat-Rest führte. Bei der R14-Mutante kommt es in Folge eines einzelnen Basenaustausches an Position 382 anstelle eines Isoleucins zum Einbau eines

Leucins. Die beiden Mutationen betreffen benachbarte Bereiche des hPEPT1-Proteins, da G476D nach dem hPEPT1-Membranmodell in der großen extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 9 und 10 lokalisiert ist und der Aminosäureaustausch I382L die letzte Aminosäure der putativen 9. Transmembrandomäne betrifft.

Wie aus dem Homologievergleich der bisher aus Säugern identifizierten Peptidtransporter ermittelt werden konnte, ist Ile-382 sowohl bei allen bisher identifizierten PEPT1-Proteinen als auch bei allen PEPT2-Proteinen hoch konserviert. Weiterhin ist allen PEPT1-Proteinen gemeinsam, dass jeweils vor und hinter diesem Isoleucin-Rest Aminosäuren mit geladenen Seitenketten liegen, wobei an Position 381 ein Glutamat voran gestellt ist und direkt nach dem Ile-382 mit Aspartat und Lysin weitere Aminosäuren mit geladenen Seitenketten folgen. Für ein mutiertes Hexose-Transportprotein konnte bereits gezeigt werden, dass, vergleichbar zu der veränderten pH-Abhängigkeit der identifizierten hPEPT1-Mutanten, die Veränderung der hydrophoben Umgebung von geladenen Gruppen im Protein durch einen Aminosäureaustausch zu einer Verschiebung des pH-Optimum führt (Will, A. et al., 1998). Auch in der R14-Mutante kommt es durch den I382L Austausch zu einer Veränderung in einer hydrophoben Aminosäure. Obwohl die Veränderung der Hydrophobizität aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Aminosäuren vermutlich nur sehr gering ist, scheint sie ausreichend dafür zu sein, dass die Umgebung der geladenen Aminosäuren-Seitenketten verändert wird. Da der Leucin- bzw. Isoleucin-Rest nicht direkt mit Protonen interagieren kann, kommt vermutlich den umgebenden geladenen Gruppen eine Bedeutung für die Bindung, Dissoziation und Translokation der Protonen zu.

Auch die in der Q34-Mutante identifizierte Position Gly-476 ist bei allen PEPT1 konserviert und ebenso wie Ile-382 von geladenen Aminosäuren umgeben, mit einem vorangestellten Aspartat-Rest sowie einem Lysin und Glutamat danach. Im Unterschied zum I382L Aminosäureaustausch kommt es hier beim Austausch eines Glycins gegen einen Glutamat-Rest zu einer deutlichen Veränderung der Seitenketten-Eigenschaften der substituierten Aminosäure. Durch die Carboxylgruppe der Glutamat-Seitenkette wird eine zusätzliche Ladung in der Umgebung konservierter geladener Aminosäuren-Seitenketten in das hPEPT1-Protein eingebracht. Da es bei der selektierten Transportmutante Q34 auch bei höheren pH-Werten nicht zu einem Abfall des Transportes von Dipeptiden kommt, wäre ein indirekter Einfluss des Glu-Restes auf die Protonenbindung und Dissoziation denkbar. Für andere Transportproteine wie einen Myo-Inositol/H⁺-Symporter (Seyfang, A. et al., 1997) oder die Lactose-Permease (Frillingos, S. et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass die Carboxylgruppe eines Aspartats oder eines Glutamats an der Translokation von Protonen beteiligt ist.

Um die Funktion dieser im Rahmen der Zufallsmutagenese identifizierten Aminosäuren im hPEPT1-Protein weiter zu klären, wäre nun über eine gerichtete Mutagenese ein gezielter Austausch dieser Aminosäuren durch andere Aminosäuren denkbar. Auch könnte durch den Austausch zusätzlicher Aminosäuren in diesem Proteinbereich gezielt deren Bedeutung für die Transportfunktion untersucht werden. Andererseits könnten durch weitere Zyklen einer ungerichteten Mutagenese auch in anderen Bereichen des hPEPT1-Proteins Aminosäuren gefunden werden, die in räumlicher Nähe zu den hier identifizierten Resten stehen und daher zusammen mit diesen Domänen den Translokationsweg für Substrat und/oder Protonen bilden.

Durch die Zufallsmutagenese konnte gezeigt werden, dass neben den für die Transportfunktion vermutlich essentiellen Aminosäuren His-57, His-121, Tyr-167, Trp-294 oder Glu-595 (Fei, Y. J. et al., 1997; Bolger, M. B. et al., 1998; Yeung, A. K. et al., 1998) und neben den bisher überwiegend untersuchten ersten 6 Transmembrandomänen auch weiteren bisher unbekannt Positionen im Protein eine wesentliche Bedeutung für den Cotransport von Peptiden und Protonen zukommt. Da die Bestimmung der 3D-Struktur der Peptidtransporter über Röntgen-Struktur-Analysen eines Proteinkristalls oder weiterer biophysikalischer Methoden in naher Zukunft nicht möglich sein wird, kann somit die Zufallsmutagenese als wichtige Alternative für die Identifikation von Bereichen im Transporterprotein angesehen werden, die entscheidend für die Erkennung und Translokation von Substraten sind.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass sich die Hefe *Pichia pastoris* als System zur Expression der Peptidtransporter aufgrund der Höhe der Expression und der erhaltenen Funktion der Transporterproteine sehr gut eignet. Durch den Einsatz der entwickelten Methoden und Techniken können diese sowohl nutritiv wie auch pharmakologisch bedeutenden Transportsysteme funktionell und strukturell auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Eine der Anwendungen der transgenen Hefen stellt die als Screeningsystem zur Bestimmung von Struktur-Affinitäts-Beziehungen der Peptidtransporter eingesetzte Technik dar.

3.2 Struktur-Affinitäts-Beziehungen der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war, umfassende vergleichende Daten zu Struktur-Affinitäts-Beziehungen der beiden Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 zu erhalten.

Eine wesentliche Voraussetzung für diese Untersuchungen war der Einsatz des *Pichia*-Systems als Expressionssystem für die beiden Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 sowie das in 3.1 entwickelte Screeningsystem. Über dieses Screeningsystem war es möglich, in großem Umfang und sehr effizient die Interaktion von unterschiedlichen Verbindungen mit den Peptidtransportern zu bestimmen. Um darüber hinaus differenzieren zu können, ob die untersuchten Substanzen mit den Peptidtransportern PEPT1 und PEPT2 lediglich interagieren oder auch transportiert werden, wurden ergänzende elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Das *Xenopus laevis* Oozyten-System war zur Untersuchung der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 bereits etabliert (Boll, M. et al., 1996; Boll, M. et al., 1994). Die elektrophysiologischen Untersuchungen an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden Oozyten dienten über die Messung des substratinduzierten Einwärtsstroms einer Substanz, sie als transportierbares Substrat oder als Inhibitor zu identifizieren. Um eine möglichst große Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den beiden Peptidtransporter-Paralogen PEPT1 und PEPT2 zu erhalten, wurden sowohl für die Untersuchungen in Hefen als auch für die Untersuchungen in Oozyten die Peptidtransporter der selben Spezies eingesetzt. Da die cDNA der humanen Peptidtransporterisoform PEPT2 bisher nicht verfügbar ist, wurden die in der Arbeitsgruppe von Prof. Daniel isolierten cDNA's der Transporter PEPT1 und PEPT2 aus dem Kaninchen zur Expression in Oozyten und Hefen eingesetzt (Boll, M. et al., 1996; Boll, M. et al., 1994). Als PEPT1 exprimierender Hefestamm diente der Stamm GS-PEPT1s (Döring, F. et al., 1997) sowie der Stamm GAP-PEPT2 (Döring, F. et al., 1998) zur Charakterisierung des Peptidtransporters PEPT2.

Durch die Kombination dieser beiden Expressionssysteme war es daher möglich, zum einen erstmals an den klonierten Transportern PEPT1 und PEPT2 einen umfassenden Vergleich der strukturellen Anforderungen der Substrate für ihre Interaktion mit den Transportern zu erlangen (3.2.1), Determinanten für die stereospezifische Erkennung und den Transport von Peptiden aufzuzeigen (3.2.2), die minimalen strukturellen Merkmale von Substraten des PEPT2 zu bestimmen (3.2.3) sowie erstmals hochaffine kompetitive Inhibitoren der Transporter PEPT1 und PEPT2 zu identifizieren und zu charakterisieren (3.2.4 und 3.2.5).

3.2.1 Vergleich der strukturellen Anforderungen von Substraten für ihre Interaktion mit dem intestinalen und dem renalen Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2

Bisher gab es nur wenige Informationen zu Ähnlichkeiten und Unterschieden der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 bezüglich der strukturellen Anforderungen in der Substraterkennung. Weiterhin wurden bislang noch keine umfassenden Studien durchgeführt, die die zwei Peptidtransporter-Isoformen direkt unter identischen Versuchsbedingungen charakterisierten. Daher wurden mehr als 60 Dipeptide ausgewählt, die einen möglichst weiten Bereich an strukturellen Unterschieden der Aminosäuren in den Seitenketten der Dipeptide wie Hydrophobizität, Größe oder geladene Gruppen abdeckten.

Interaktion von Ala-Xaa und Xaa-Ala Dipeptiden mit PEPT1 und PEPT2

In einer ersten Serie von Experimenten wurden Dipeptide untersucht, die aus einem Alaninrest in N- oder C-terminaler Position und unterschiedlichen Aminosäuren an der jeweils entgegengesetzten Position im Dipeptid bestanden, so dass hierdurch der Einfluss der Seitenkette in der jeweils variablen Position untersucht werden konnte. Zur Bestimmung der Affinitäten wurden Verdrängungsexperimente mit PEPT1 und PEPT2 exprimierenden Hefezellen und dem radioaktiv markierten Dipeptid [^3H]-D-Phe-Ala angewandt, die in Abbildung 3-14 exemplarisch für das Dipeptid Ala-Ala dargestellt sind. Aus den erhaltenen IC_{50} -Werten wurden dann als Maß für die Affinität zum Transporter die entsprechenden K_i -Werte ermittelt, die in den Tabellen zusammengefasst sind.

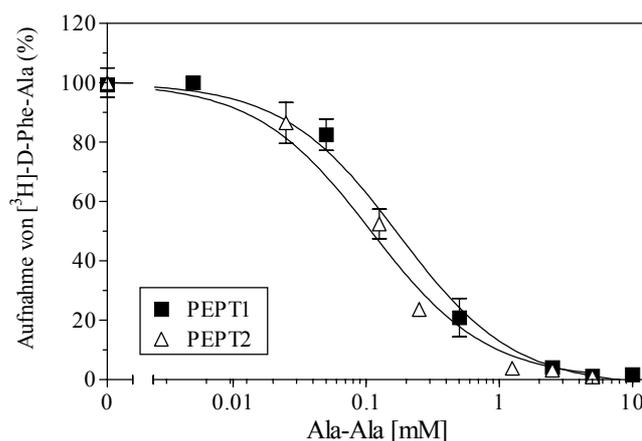


Abbildung 3-14. Hemmung der [^3H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende Hefezellen durch Ala-Ala.

Die Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala ($2 \mu\text{Ci/ml}$, 20 min, pH 6,5) in PEPT1 oder PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde auf 96-well-Filterplatten in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Ala-Ala (0,001-10 mM) bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM für die verbleibende Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala (%).

Generell wiesen die verschiedenen Xaa-Ala- und Ala-Xaa-Dipeptide einen sehr engen Bereich ihrer Affinitäten mit etwa 0,1 bis 0,3 mM für PEPT1 und 0,03 bis 0,18 mM für PEPT2 auf (Tabelle 3-6).

Zunächst wurde der Einfluss der Länge oder der Hydrophobizität der unterschiedlichen Seitenkettenstrukturen auf die Affinität zu beiden Transportern untersucht. Daher wurden

Ala-Xaa- und Xaa-Ala-Dipeptide eingesetzt, bei denen die Xaa-Seitenketten aus –H oder Alkylresten von steigender Kettenlänge bestanden, woraus die Dipeptide Ala-Gly, Ala-Ala, Ala- α -Abu und Ala-Nle sowie Gly-Ala, Nle-Ala und Leu-Ala resultierten. Die Anwesenheit einer Methyl-, Propyl- oder Butylgruppe als Seitenkettenrest beeinflusste nur in geringem Maße die Affinitäten verglichen mit denen von Ala-Gly oder Gly-Ala (Abbildung 3-15 und Tabelle 3-6).

	K_i (mM)			K_i (mM)	
	PEPT1	PEPT2		PEPT1	PEPT2
Ala-Gly	0,21 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	Gly-Ala	0,24 \pm 0,05	0,11 \pm 0,01
Ala-Ala	0,16 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	Ala-Ala	0,16 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
Ala-αAbu	0,11 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01	Leu-Ala	0,20 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02
Ala-Nle	0,17 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	Nle-Ala	0,17 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01
Ala-Aib	0,33 \pm 0,03	0,18 \pm 0,04			
Ala-Pro	0,16 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	Pro-Ala	4,29 \pm 0,01	0,46 \pm 0,03
Ala-Sar	0,20 \pm 0,03	0,04 \pm 0,001	Phe-Ala	0,19 \pm 0,01	0,03 \pm 0,001
Ala-Pip	0,11 \pm 0,02	0,15 \pm 0,09	Trp-Ala	0,16 \pm 0,07	0,03 \pm 0,01
Ala-Tyr	0,21 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	Tyr-Ala	0,22 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01
Ala-Ser	0,32 \pm 0,12	0,09 \pm 0,001	Ser-Ala	0,32 \pm 0,02	0,10 \pm 0,002
Ala-Orn	0,37 \pm 0,17	0,16 \pm 0,06	Orn-Ala	0,32 \pm 0,15	0,15 \pm 0,02
Ala-Lys	0,22 \pm 0,01	0,06 \pm 0,001	Lys-Ala	0,21 \pm 0,001	0,06 \pm 0,01
Ala-His	0,16 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	His-Ala	0,21 \pm 0,06	0,06 \pm 0,02
			Arg-Ala	0,24 \pm 0,04	0,18 \pm 0,06
Ala-Asp	0,21 \pm 0,01	0,20 \pm 0,07	Asp-Ala	0,35 \pm 0,01	0,37 \pm 0,09
Ala-Glu	0,20 \pm 0,01	0,20 \pm 0,02	Glu-Ala	0,62 \pm 0,01	0,52 \pm 0,15

Tabelle 3-6. Inhibitionskonstanten von Ala-Xaa- und Xaa-Ala-Dipeptiden für die [3 H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen.

Die K_i -Werte \pm SEM wurden aus den durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelten IC_{50} -Werten berechnet.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Zunahme der Länge und Hydrophobizität der Seitenkette an der C- und der N-terminalen Aminosäure nur einen geringen Einfluss besitzt. Die Alkylierung eines Glycin-Restes in Dipeptiden führt generell zu einem Anstieg der Affinität, allerdings unabhängig von der Größe der Alkylgruppe. Andererseits führte eine zusätz-

liche CH_3 -Gruppe am C_α -Atom der C-terminalen Aminosäure wie in Ala-Aib zu einem deutlichen Verlust in der Affinität zu beiden Transportern (Abbildung 3-15A und Tabelle 3-6).

Der Einfluss der Hydrophobizität und der Größe der Seitenkette von Aminosäuren in Dipeptiden wurde weiterhin anhand von Dipeptiden untersucht, die als aminoterminaler Aminosäure einen Phe, Trp, His oder Tyr-Rest besaßen. Wie aus Abbildung 3-15B ersichtlich, führt eine aromatische Seitenkette zu einem Anstieg der Affinität bei PEPT1 und PEPT2 im Vergleich zu Gly-Ala, wobei der Effekt bei PEPT2 mit einem bis zu 4-fach niedrigeren K_i -Wert stärker ausgeprägt war als bei PEPT1 (Tabelle 3-6). Andererseits zeigen die Daten von Dipeptiden, die an ihrem C-Terminus entweder aromatische (Tyr, His), ungeladene (Ser, Pro) oder modifizierte Aminosäuren wie Sarkosin (Sar) oder das Prolinanalogue Pipicolinsäure (Pip) enthielten, dass die Größe oder die Hydrophobizität der C-terminalen Aminosäure von geringerer Bedeutung für die Affinität zu den Peptidtransportern ist.

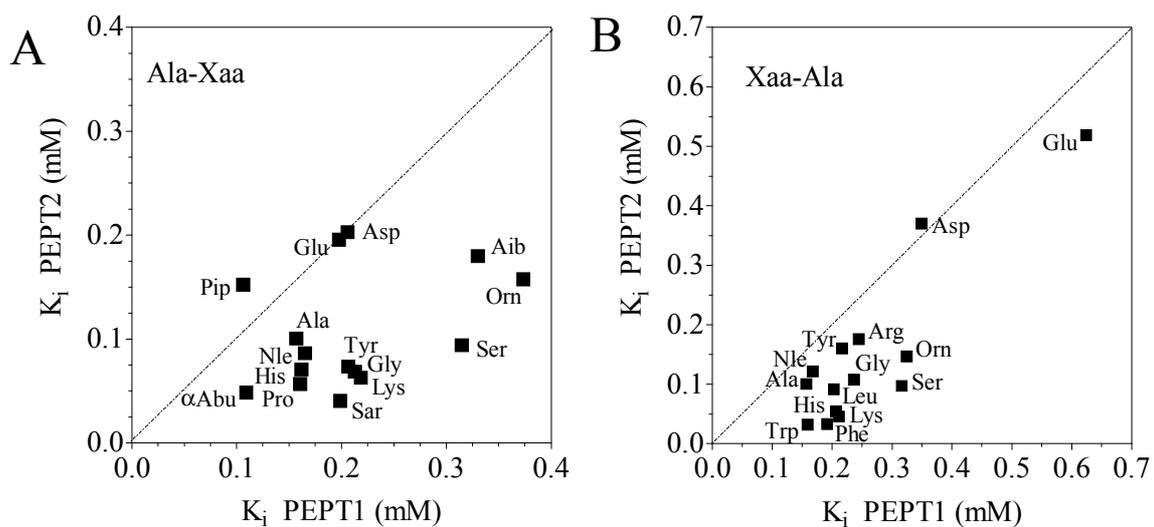


Abbildung 3-15. Vergleich der K_i -Werte für die Interaktion verschiedener Ala-Xaa (A) und Xaa-Ala (B) Dipeptide mit PEPT1 und PEPT2.

Die K_i -Werte wurden aus den IC_{50} -Werten der Verdrängungsanalysen mit den korrespondierenden Dipeptide für ihre Interaktion mit PEPT1 und PEPT2 ermittelt. Die K_i -Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt gleiche K_i -Werte für PEPT1 und PEPT2 an. α -Abu, α -Aminobuttersäure; Aib, Aminoisobuttersäure; Nle, Norleucin; Orn, Ornithin; Pip, Pipicolinsäure.

Für Dipeptide mit geladenen Aminosäurenresten an C-terminaler Position zeigte nur Ala-Orn mit K_i -Werten von $0,37 \pm 0,17$ mM für PEPT1 und $0,16 \pm 0,06$ mM für PEPT2 einen geringen Affinitätsverlust zu den Transportern. Interessanterweise wiesen die beiden Dipeptide mit negativ geladenen Aminosäuren am C-Terminus (Ala-Asp und Ala-Glu) mit 0,20 und 0,21 mM annähernd die gleichen Affinitäten zu PEPT1 und PEPT2 auf. Vergleichbar zu diesen Daten waren auch die Ergebnisse für die Xaa-Ala Dipeptide, bei denen ebenfalls, im

Unterschied zu einer gut tolerierten positiv geladenen Aminosäure im N-Terminus (Orn, Lys, Arg), ein negativ geladener Aminosäurenrest wie bei Glu-Ala und Asp-Ala zu einem Affinitätsverlust und nahezu gleichen K_i -Werten bei PEPT1 und PEPT2 führt.

Interaktion von Prolin-enthaltenden Dipeptiden mit PEPT1 und PEPT2

In Peptiden und Proteinen lassen sich aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung sowohl *cis*- als auch *trans*-Konformere finden. Innerhalb der proteinogenen Aminosäuren ließen sich die energetisch unvorteilhaften *cis*-Konformere in nennenswertem Umfang bisher jedoch nur bei Xaa-Pro-Peptidbindungen nachweisen. Für Xaa-Pro-Peptide konnte gezeigt werden konnte, dass nur der Anteil der Peptide, deren Peptidbindung in Transkonfiguration vorliegt, mit der Substratbindungsstelle des Peptidtransporters in Caco2-Zellen interagiert (Brandsch, M. et al., 1999).

Um einen direkten Vergleich ihrer Interaktion mit PEPT1 und PEPT2 zu erhalten, wurden hier 23 unterschiedliche Pro-Xaa und Xaa-Pro Dipeptide eingesetzt. Da nur der Trans-Anteil der Peptide mit der Substratbindungsstelle der Transporter interagiert, werden hier auch die um den Trans-Anteil korrigierten Affinitäten dargestellt.

Die Affinitäten der Pro-Xaa-Dipeptide variierten für PEPT1 zwischen $0,26 \pm 0,03$ mM für Pro-Leu bis zu $8,36 \pm 0,32$ mM für Pro-Glu (Tabelle 3-7). Die um die Trans-Anteile korrigierten Affinitäten ($K_{i(\text{corr})}$) für die Xaa-Pro Dipeptide lagen dagegen in einem engen Bereich von 0,07 bis 0,29 mM (Tabelle 3-7). Obwohl die Affinitäten zu PEPT2 generell höher waren als die für PEPT1, lagen auch hier die Affinitätskonstanten für die Pro-Xaa Dipeptide in einem größeren Bereich (0,08 bis 4,2 mM) als die für die Xaa-Pro-Peptide ($K_{i(\text{corr})}$ von 0,04 bis 0,18 mM).

Die Unterschiede der Affinitäten der Pro-Xaa-Peptide zu PEPT1 und PEPT2 können vorwiegend auf die Unterschiede in ihren physikochemischen Eigenschaften zurückgeführt werden. Eine Vergrößerung der Seitenkette und damit der Hydrophobizität der C-terminalen Aminosäure wie in der Serie Pro-Gly, Pro-Ala und Pro-Leu führte zu einem 25-fachen Anstieg der Affinität zu PEPT1 (6,38 auf 0,26 mM) und bis zu 40-fach zu PEPT2 (von 3,50 mM auf 0,08 mM).

	K_i (mM)			K_i (mM)	
	PEPT1	PEPT2		PEPT1	PEPT2
Pro-Gly	6,38 ± 1,04	3,50 ± 0,20	Gly-Pro	0,37 ± 0,06 (0,19 ± 0,03)	0,35 ± 0,03 (0,18 ± 0,02)
Pro-Ala	4,29 ± 0,10	0,46 ± 0,03	Ala-Pro	0,16 ± 0,01 (0,10 ± 0,01)	0,06 ± 0,01 (0,04 ± 0,01)
Pro-Leu	0,26 ± 0,03	0,08 ± 0,01	Leu-Pro	0,34 ± 0,01 (0,20 ± 0,01)	0,13 ± 0,01 (0,08 ± 0,01)
			Nle-Pro	0,29 ± 0,03 (0,19 ± 0,02)	0,07 ± 0,01 (0,04 ± 0,01)
Pro-Pro	0,33 ± 0,01 (0,17 ± 0,01)	0,18 ± 0,07 (0,09 ± 0,04)	Pro-Pro	0,33 ± 0,01 (0,17 ± 0,01)	0,18 ± 0,07 (0,09 ± 0,04)
Pro-Hpr	2,63 ± 0,02	1,72 ± 0,65	Sar-Pro	0,47 ± 0,03 (0,29 ± 0,02)	0,26 ± 0,01 (0,16 ± 0,01)
Pro-Phe	0,51 ± 0,01	0,11 ± 0,01	Phe-Pro	0,70 ± 0,06 (0,24 ± 0,02)	0,29 ± 0,02 (0,10 ± 0,01)
			Trp-Pro	0,28 ± 0,01 (0,07 ± 0,002)	0,16 ± 0,05 (0,04 ± 0,01)
Pro-Tyr	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,06	Tyr-Pro	0,51 ± 0,16 (0,15 ± 0,05)	0,42 ± 0,07 (0,13 ± 0,02)
Pro-Ser	3,21 ± 0,21	0,74 ± 0,07	Ser-Pro	0,16 ± 0,07 (0,11 ± 0,05)	0,07 ± 0,01 (0,05 ± 0,01)
Pro-Lys	3,62 ± 0,54	0,25 ± 0,01	Lys-Pro	0,28 ± 0,07 (0,18 ± 0,05)	0,13 ± 0,02 (0,08 ± 0,01)
Pro-Arg	1,96 ± 0,37	0,63 ± 0,14	Arg-Pro	0,20 ± 0,06 (0,14 ± 0,04)	0,16 ± 0,03 (0,11 ± 0,11)
Pro-Asp	6,18 ± 0,64	4,12 ± 0,32			
Pro-Glu	8,36 ± 0,32	4,20 ± 0,45			

Tabelle 3-7. Inhibitionskonstanten von Pro-Xaa- und Xaa-Pro-Dipeptiden für die [³H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen.

Die K_i-Werte ± SEM wurden aus den durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelten IC₅₀-Werten berechnet. K_{i(corr)}-Werte der Xaa-Pro-Peptide sind in Klammern dargestellt und wurden errechnet durch Multiplikation der ermittelten K_i-Werte mit (Trans-Anteil/100) (Brandsch, M. et al., 1999).

Diese Abhängigkeit findet ihr Bestätigung durch Daten der Peptide Pro-Phe und Pro-Tyr, die einen aromatischen Aminosäurenrest enthielten und ebenfalls einen 25-fach niedrigeren K_i-Wert als Pro-Gly zeigten. Vergleichbar zu den Werten der Ala-Xaa-Dipeptide zeigten auch hier die Peptide mit negativ geladenen Seitenketten eine niedrigere Affinität, die im Falle von Pro-Asp und Pro-Glu mit einem K_i von 6,18 ± 0,64 und 8,36 ± 0,32 mM für PEPT1 und mit 4,12 ± 0,32 und 4,20 ± 0,45 mM für PEPT2 ermittelt wurde.

Im Gegensatz dazu konnte im Falle der Xaa-Pro-Dipeptide nur begrenzt ein Zusammenhang zwischen ihren physikochemischen Eigenschaften und ihrer Affinität beobachtet werden (Abbildung 3-16 und Tabelle 3-7). Wie für Xaa-Ala-Peptide führt auch hier die Einführung eines Alkylrestes in der Seitenkette von Gly-Pro zu einem Anstieg der Affinität. Allerdings konnte im Gegensatz zu den Xaa-Ala-Peptiden kein eindeutiger Effekt auf die Veränderung der Affinität erhalten werden, wenn eine aromatische Aminosäure im Peptid enthalten war.

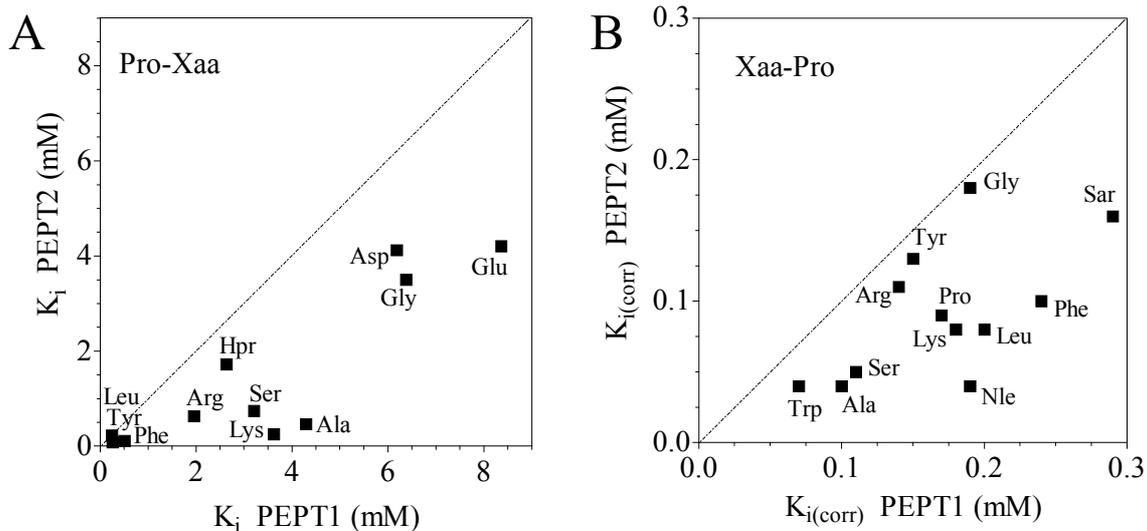


Abbildung 3-16. Vergleich der K_i - bzw. der $K_{i(corr)}$ -Werte für die Interaktion verschiedener Pro-Xaa (A) und Xaa-Pro (B) Dipeptide mit PEPT1 und PEPT2.

Die K_i -Werte wurden aus den Daten der Verdrängungsanalysen der korrespondierenden Dipeptide für ihre Interaktion mit PEPT1 und PEPT2 ermittelt. $K_{i(corr)}$ -Werte der Xaa-Pro-Peptide wurden errechnet durch Multiplikation der ermittelten K_i -Werte mit (Trans-Gehalt/100). Die K_i -Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt gleiche K_i -Werte für PEPT1 und PEPT2 an.

Interaktion von Glycin-Dipeptiden und Dipeptiden mit zwei geladenen Resten mit PEPT1 und PEPT2

Im Unterschied zu den K_i -Werten, die für Ala-Dipeptide erhalten wurden, wiesen die entsprechenden Glycin-Dipeptide eine tendenziell niedrigere Affinität zu den Transportern PEPT1 und PEPT2 auf (Tabelle 3-8 und Tabelle 3-6).

Auch hier zeigten Dipeptide mit geladenen Aminosäurenresten, dass eine Ladung am NH_2 -Terminus mit K_i -Werten von 0,18 für Lys-Gly an PEPT1 und 0,01 mM an PEPT2, sowie 0,26 und 0,04 mM für Asp-Gly an PEPT1 und PEPT2 gut toleriert wird. Dagegen wurde auch bei Glycin-Dipeptiden eine negativ-geladene Seitenkette schlechter toleriert, was im Falle von Gly-Asp zu einem deutlichen Abfall der Affinität im Vergleich zu Gly-Gly führte.

Für die Interaktion von Dipeptiden, die aus zwei geladenen Aminosäuren bestehen, scheint für die Affinität zu PEPT1 und PEPT2 die Ladung der zweiten Aminosäureseitenkette ausschlaggebend zu sein (Abbildung 3-17 und Tabelle 3-8). Einzige Ausnahme ist die Interaktion von Lys-Lys mit PEPT1, da hier mit einem K_i -Wert von $0,47 \pm 0,12$ mM eine schlechtere Affinität gemessen wurde als für die Dipeptide Ala-Lys oder Gly-Lys, bei denen Lysin ebenfalls die C-terminale Aminosäure bildet.

Dipeptide	K_i (mM)	
	PEPT1	PEPT2
Gly-Gly	$0,20 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,05$
Gly-Gln	$0,17 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,01$
Gly-Sar	$0,35 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,13$
Gly-Lys	$0,24 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$
Gly-His	$0,20 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,003$
Gly-Asp	$0,61 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,02$
Lys-Gly	$0,18 \pm 0,05$	$0,01 \pm 0,003$
Asp-Gly	$0,26 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,01$
Glu-Lys	$0,31 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$
Lys-Glu	$0,51 \pm 0,09$	$0,30 \pm 0,12$
Lys-Asp	$0,40 \pm 0,14$	$0,12 \pm 0,05$
Lys-Lys	$0,47 \pm 0,12$	$0,04 \pm 0,01$
Asp-Asp	$0,62 \pm 0,11$	$0,51 \pm 0,07$
Phe-Phe	$0,08 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$

Tabelle 3-8. Inhibitionskonstanten von verschiedenen Dipeptiden für die [3 H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen.

Die K_i -Werte \pm SEM wurden aus den durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelten IC_{50} -Werten errechnet.

Ebenso wie die Dipeptide mit zwei geladenen Seitenketten interagiert auch das Dipeptid Phe-Phe mit zwei aromatischen Seitenketten mit den Peptidtransportern, wobei Affinitäten von $0,08 \pm 0,01$ mM zu PEPT1 und $0,06 \pm 0,01$ mM zu PEPT2 erhalten wurden. Im Falle von PEPT1 ist dieses Dipeptid damit das Substrat, das von den mehr als 60 untersuchten Dipeptiden die höchste Affinität zu PEPT1 aufweist.

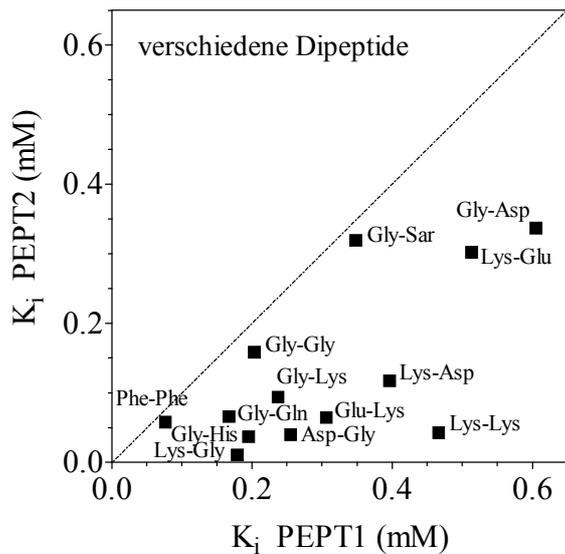


Abbildung 3-17. Vergleich der K_i -Werte für die Interaktion verschiedener Dipeptide mit PEPT1 und PEPT2.

Die K_i -Werte wurden aus den Daten der Verdrängungsanalysen der korrespondierenden Dipeptide für ihre Interaktion mit PEPT1 und PEPT2 ermittelt. Die K_i -Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt gleiche K_i -Werte für PEPT1 und PEPT2 an.

Elektrophysiologische Messung des Transportes der eingesetzten Dipeptide

Alle in den Verdrängungsexperimenten verwendeten Dipeptide wurden darüber hinaus auf ihren elektrogenen Transport durch die Peptidtransporter untersucht. Hierbei wurde für alle untersuchten Peptide in elektrophysiologischen Untersuchungen über die TEVC-Technik Substrat-induzierte Einwärtsströme und die für PEPT1 oder PEPT2 nach Expression in *X. laevis* Oozyten typischen I-V Kurven gemessen, wie sie am Beispiel von Gly-Gln und Ala-Ala in Abbildung 3-18 dargestellt sind. Wenngleich nicht für alle Peptide explizit gezeigt, kann doch davon ausgegangen werden, dass alle untersuchten Dipeptide von den Carriern nicht nur als Substrat erkannt sondern auch elektrogen transportiert werden.

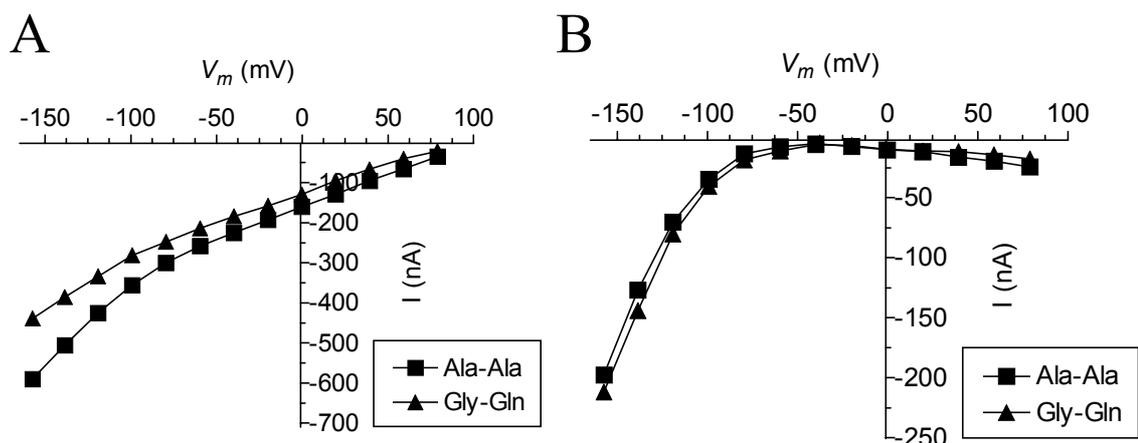


Abbildung 3-18. Strom-Spannungs-Beziehungen bei Perfusion von Ala-Ala und Gly-Gln an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden *X. laevis*-Oozyten

I-V-Beziehungen an PEPT1 (A) und PEPT2 (B) exprimierenden Oozyten wurden durch die TEVC-Technik erhalten. Oozyten wurden mit Barth-Lösung (pH 6,5) mit oder ohne 5 mM Gly-Gln oder Ala-Ala perfundiert. Das Membranpotential wurde schrittweise auf die gezeigten Testpotentiale kurzgeschlossen und der Substrat-induzierte Einwärtsstrom als Differenz bei An- und Abwesenheit des Substrates bestimmt.

Insgesamt konnte hier gezeigt werden, dass alle geprüften Dipeptide unabhängig von den physikochemischen Eigenschaften ihrer Seitenketten mit den Peptidtransportern PEPT1 und PEPT2 interagieren und elektrogen transportiert werden. Durch den Einsatz von mehr als 60 unterschiedlichen Dipeptiden konnte jedoch der spezifische Einfluss der Seitenketten in Dipeptiden auf deren Affinität zu PEPT1 und PEPT2 ermittelt werden. Mit Ausnahme der Dipeptide mit sauren Aminosäureresten, bei denen PEPT2 und PEPT1 annähernd die gleichen Affinitäten aufwiesen, ist PEPT2 der Transporter mit höherer Affinität. Die K_i -Werte umfassten für PEPT1 einen Bereich von 0,08 bis 8,4 mM und variierten für PEPT2 zwischen 0,01 bis 4,2 mM. Aufgrund des sehr engen Bereiches der Affinitäten besitzen andere strukturelle Elemente vermutlich einen stärkeren Einfluss auf die Erkennung von Substraten durch die Peptidtransporter als die Seitenketten in den Substraten.

3.2.2 Determinanten für die stereospezifische Erkennung und den Transport von Peptiden durch die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2

Die bisher durchgeführten Studien zur Stereoselektivität der Peptidtransporter wurden vorwiegend durch Aufnahmeexperimente an Membranvesikeln oder Caco-2-Zellen mit ausgesuchten Dipeptiden durchgeführt (Daniel, H. et al., 1992; Ganapathy, V. et al., 1985; Li, J. et al., 1998; Lister, N. et al., 1995). Daher sollte hier geprüft werden, ob die bisher allgemein akzeptierten Annahmen auch für die klonierten Peptidtransporter gültig sind. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit diese Ergebnisse auch auf Dipeptidderivate übertragbar sind und ob PEPT1 und PEPT2 hinsichtlich der stereoselektiven Substraterkennung Unterschiede aufweisen.

Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von LL-, DL-, LD- und DD-Stereoisomere verschiedener Dipeptide und Dipeptidderivate synthetisiert und in Verdrängungsexperimenten an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden Hefezellen und in elektrophysiologischen Untersuchungen an Oozyten eingesetzt.

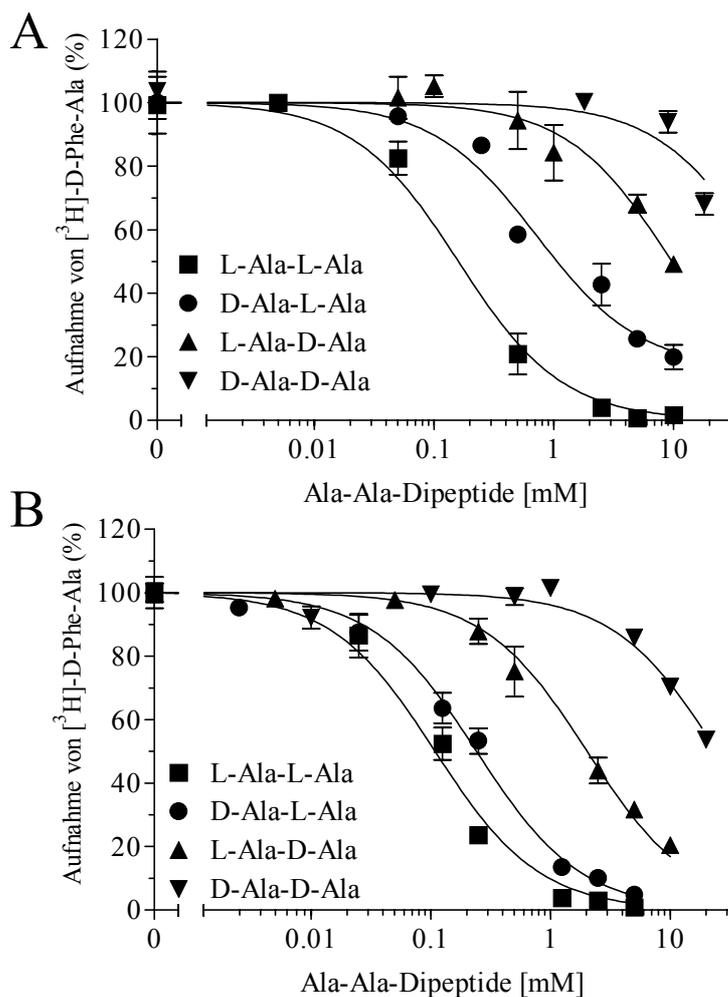


Abbildung 3-19. Hemmung der $[^3\text{H}]\text{-D-Phe-Ala}$ -Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierenden Hefezellen durch Stereoisomere von Alanylpeptiden

Die Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{-D-Phe-Ala}$ ($2\ \mu\text{Ci/ml}$, 20 min, pH 6,5) in PEPT1 (A) oder PEPT2 (B) exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde auf 96-well-Filterplatten in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Ala-Ala-Peptiden (0,001-25 mM) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM für die verbleibende Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{-D-Phe-Ala}$ (%) dargestellt.

Wie Abbildung 3-19 zeigt, interagieren unterschiedliche Stereoisomere des Dipeptids Ala-Ala selektiv mit der Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala in PEPT1 und PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen. Die höchste Affinität zu den beiden Transportern zeigt das aus zwei L-Alanin-Isomeren bestehende Dipeptid L-Ala-L-Ala mit einem K_i-Wert von 0,16 ± 0,03 mM für PEPT1 und 0,10 ± 0,01 mM für PEPT2. Die Einführung einer D-Aminosäure in das Dipeptid führt zu einem Affinitätsverlust, der größer ausfällt, wenn das D-Isomer in C-terminaler Position steht. Wenn beide Aminosäuren des Dipeptids aus D-Isomeren bestehen, zeigt sich ein vollständiger Affinitätsverlust zu beiden Peptidtransportern (Tabelle 3-9).

Dipeptide		K _i (mM)		Dipeptidderivate		K _i (mM)	
		PEPT1	PEPT2			PEPT1	PEPT2
Ala-Ala	LL	0,16 ± 0,03	0,10 ± 0,01	Tyr(Bzl)-Ala	LL	0,10 ± 0,01	0,004 ± 0,001
	DL	0,78 ± 0,06	0,24 ± 0,01		DL	1,59 ± 0,34	0,21 ± 0,04
	LD	6,12 ± 0,18	2,26 ± 0,23				
	DD	>20	>20 (~22,8)		DD	>1 (~4,13)	>1 (1,07)
Ala-Pro	LL	0,16 ± 0,01	0,06 ± 0,01	Lys(Z)-Ala	LL	0,09 ± 0,004	0,02 ± 0,01
	DL	1,54 ± 0,19	0,69 ± 0,20		DL	2,68 ± 0,33	0,12 ± 0,02
	LD	>20 (~31,4)	>20 (~44,4)		LD	17,9 ± 4,3	1,14 ± 0,30
	DD	>20 (~34,4)	>20		DD	4,96 ± 1,08	0,52 ± 0,03
Ala-Lys	LL	0,22 ± 0,01	0,06 ± 0,001	Ala-Lys(Z)	LL	0,19 ± 0,01	0,01 ± 0,002
	DL	0,88 ± 0,06	0,34 ± 0,002		DL	0,50 ± 0,01	0,16 ± 0,01
	LD	>20 (42,7)	16,1 ± 4,4		LD	1,66 ± 0,12	2,05 ± 0,10
	DD	10,4 ± 1,0	4,48 ± 0,80		DD	3,28 ± 0,02	3,43 ± 1,04
				Ala-Orn(Z)	LL	0,10 ± 0,04	0,02 ± 0,01
			DL		0,27 ± 0,002	0,09 ± 0,01	
			LD		0,78 ± 0,23	0,70 ± 0,24	
			DD		1,56 ± 0,38	2,43 ± 0,21	
				Asp(OBzl)-Ala	LL	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,03
			DL		0,42 ± 0,09	0,13 ± 0,02	
				Ala-Asp(OBzl)	LL	0,18 ± 0,02	0,05 ± 0,01
			DD		1,32 ± 0,57	0,69 ± 0,14	
				Ala-Lys(Ac)	LL	0,21 ± 0,02	0,04 ± 0,01
			DD		24,0 ± 6,2	15,4 ± 3,7	

Tabelle 3-9. Affinitäten verschiedener Stereoisomere von Dipeptiden und Dipeptidderivaten für ihre Interaktion mit PEPT1 und PEPT2.

K_i-Werte wurden ermittelt aus den Verdrängungsanalysen der korrespondierenden Dipeptide für die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala in PEPT1 und PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen.

Diese Stereoselektivität der Peptidtransporter war auch bei den Ala-Pro und Ala-Lys Dipeptiden zu sehen. Allerdings mit dem Unterschied, dass bei Ala-Pro bereits das LD-Isomer keine Interaktion mehr mit den Transportern zeigte und das DD-Isomer von Ala-Lys eine höhere Affinität zu PEPT1 und PEPT2 aufwies als das LD-Isomer.

Im Falle der getesteten Dipeptidderivate, bei denen die Original-Dipeptidstruktur durch Seitenketten-Modifizierungen verändert wurde, blieb die Stereoselektivität der Transporter ebenfalls erhalten. Wie aus Tabelle 3-9 hervorgeht, erscheint es allerdings noch schwieriger, den Einfluss der Konfiguration der Substrate auf die Interaktion mit den Transportern vorherzusagen. Sowohl PEPT1 als auch PEPT2 behielten ihre hohe Stereoselektivität gegenüber den LL-Formen der Dipeptidderivate mit geschützten Seitenketten. Allerdings zeigten auch die anderen Stereoisomere von Dipeptidderivaten mit großen hydrophoben Schutzgruppen in den Seitenketten wie bei der Ala-Lys(Z)- oder der Ala-Orn(Z)-Reihe weiterhin eine hohe Affinität zu PEPT1 und PEPT2 (Tabelle 3-9). Die LD-Isomere zeigten mit Ausnahme von L-Lys(Z)-D-Ala, Affinitäten, die bei PEPT1 ca. 3-fach und bei PEPT2 bis zu 12-fach niedriger waren als die der DL-Isomere. Auch die DD-Isomere zeigten mit K_i -Werten von 1,3 bis 5,0 für PEPT1 und 0,5 bis 3,4 für PEPT2 noch eine nennenswerte Affinität zu den Peptidtransportern. Dies gilt sowohl für die untersuchten Dipeptide mit geschützten sauren Aminosäureseitenketten, wie Ala-Asp(OBzl), als auch für die basischen, wie Ala-Orn(Z).

D-Lys(Z)-D-Ala, D-Ala-D-Lys(Z), D-Ala-D-Orn(Z), D-Asp(OBzl)-D-Ala und D-Ala-D-Asp(OBzl) stellen somit die ersten DD-konfigurierten Dipeptid-Strukturen dar, die gute Affinitäten zu PEPT1 und PEPT2 aufweisen.

Für die Beibehaltung einer guten Affinität scheint weiterhin die Hydrophobizität und Größe der Schutzgruppe eine Rolle zu spielen, da das DD-Dipeptidderivat D-Ala-D-Lys(Ac), das eine kleine hydrophile Schutzgruppe in der Seitenkette enthält, Affinitäten vergleichbar zu ungeschützten Dipeptiden aufwies. D-Ala-D-Lys(Ac) zeigte nur eine geringe Affinität zu den Transportern mit einem K_i -Wert von $24,0 \pm 6,2$ mM für PEPT1 und $15,4 \pm 3,7$ mM für PEPT2 (Tabelle 3-9).

Zum Nachweis, dass die unterschiedlichen Stereoisomere auch elektrogen transportiert werden und nicht nur mit der Substratbindungsstelle der Transporter PEPT1 und PEPT2 interagieren, wurden weitere elektrophysiologische Untersuchungen an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden Oozyten durchgeführt. Als Referenzsubstrat, um die Unterschiede in der Expressionshöhe der Peptidtransporter bei verschiedenen Oozyten auszugleichen, wurde das Dipeptid Gly-Gln eingesetzt. Die Ergebnisse aus den elektrophysiologischen Untersuchungen sind

als Einwärtsströme, die durch das Dipeptid oder -derivat an PEPT1 oder PEPT2 exprimierenden Oozyten im Vergleich zu Gly-Gln erhalten wurden, dargestellt.

Wie Abbildung 3-20 zeigt, wurde auch elektrophysiologisch ein charakteristisches Muster für die Interaktion der vier möglichen Stereoisomere von Ala-Ala mit den Peptidtransportern erhalten. Dabei zeigte das LL-Isomer von Ala-Ala in einer Konzentration von 10 mM mit $106\% I_{\text{Gly-Gln}}$ für PEPT1 und $100\% I_{\text{Gly-Gln}}$ für PEPT2 einen identischen Einwärtsstrom wie 10 mM des Standardpeptids Gly-Gln (Abbildung 3-20A und C). Bei PEPT1 zeigten das DL- und das LD-Isomer noch messbare Einwärtsströme, die allerdings mit 64 und 33 $\% I_{\text{Gly-Gln}}$ geringer waren als die des LL-Isomers. Das DD-Isomer induzierte keinen Einwärtsstrom, so dass davon auszugehen ist, dass es nicht in die Oozyten aufgenommen wird.

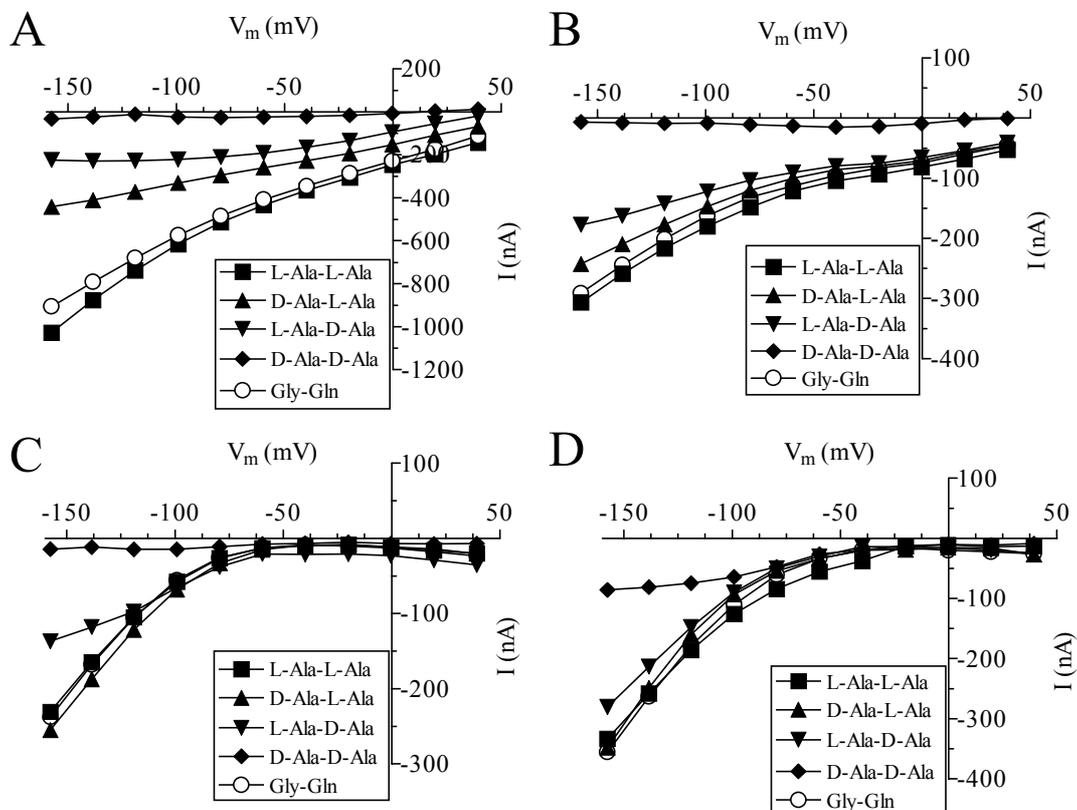


Abbildung 3-20. Strom-Spannungs-Beziehungen von Ala-Ala und seiner Stereoisomeren an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden *X. laevis*-Oozyten.

I-V-Beziehungen an PEPT1 (A, B) und PEPT2 (C, D) exprimierenden Oozyten wurden durch die TEVC-Technik erhalten. Oozyten wurden mit Barth-Lösung (pH 6,5) und 10 mM (A, C) oder 100 mM (B, D) Gly-Gln oder den angegebenen Isomeren von Ala-Ala perfundiert. Das Membranpotential wurde schrittweise auf die gezeigten Testpotentiale gebracht und der Substrat-induzierte Einwärtsstrom als Differenz bei An- und Abwesenheit des Substrates bestimmt.

Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Interaktion von 10 mM der Ala-Ala-Peptide mit PEPT2 erreicht, allerdings zeigten hier das DL-Isomer mit $102\% I_{\text{Gly-Gln}}$ und das LD-Isomer mit $92\% I_{\text{Gly-Gln}}$ einen vergleichsweise höheren Strom. Während bei PEPT1 durch 100 mM der Dipeptide noch Unterschiede in der Höhe der Substrat-induzierten Einwärtsströme zu

finden waren, wurden für PEPT2 auch für das DL- und LD-Isomer etwa 100 % $I_{\text{Gly-Gln}}$ erhalten. Auch für 100 mM D-Ala-D-Ala war ein Einwärtsstrom (57 % $I_{\text{Gly-Gln}}$) messbar, was trotz sehr niedriger Affinität von über 20 mM auf eine Interaktion mit PEPT2 hinweist.

Auch für weitere Dipeptide wie Ala-Pro, Ala-Lys und das Derivat Ala-Lys(Z) konnte gezeigt werden, dass sie enantioselektiv interagieren und die Höhe des Substrat-induzierten Einwärtsstroms dadurch unterschiedlich ist (Abbildung 3-21). Es zeigte sich hierbei jedoch ein wesentlicher Unterschied zwischen PEPT1 und PEPT2, da bei PEPT2 auch für das DL-Isomer von Ala-Ala und Ala-Lys (10 und 5 mM) sowie das LD-Isomer von Ala-Ala (10 mM) ein mit den LL-Isomeren vergleichbarer sehr hoher Einwärtsstrom erhalten wurde.

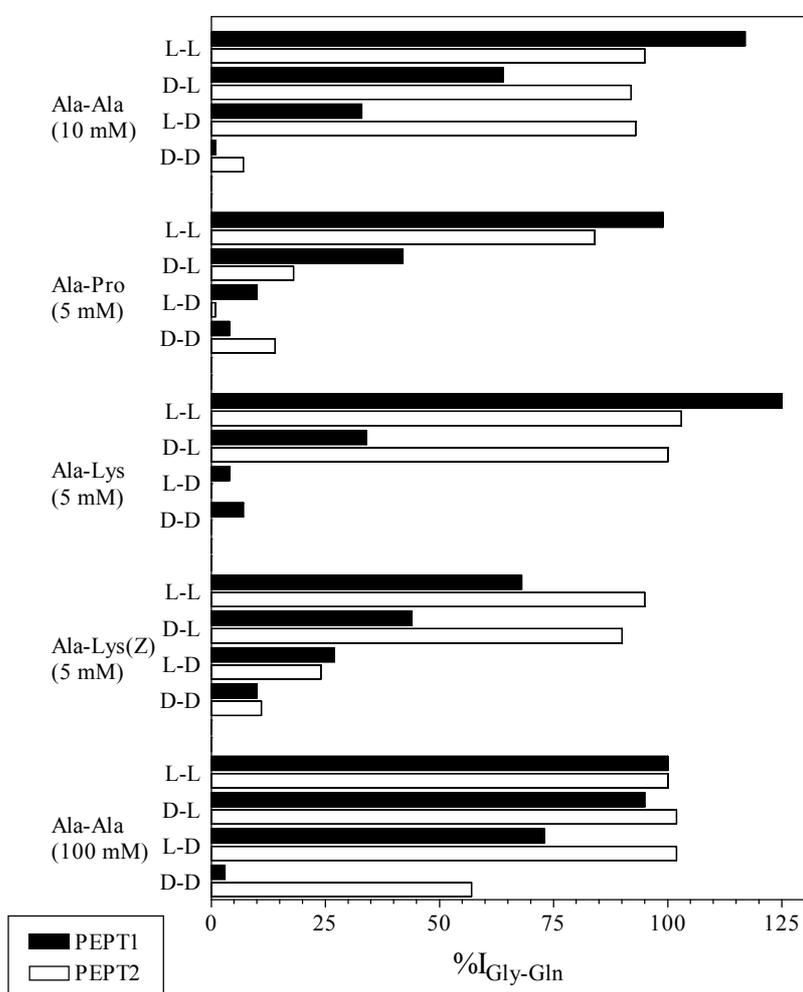


Abbildung 3-21. Elektrophysiologische Untersuchungen von Isomeren verschiedener Dipeptide an PEPT1 und PEPT2.

I-V-Beziehungen an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden Oozyten wurden durch die TEVC-Technik ermittelt. Oozyten wurden mit mod. Barth-Lösung (pH 6,5) und 5, 10 oder 100 mM Gly-Gln oder den angegebenen Dipeptid-Isomeren perfundiert. % $I_{\text{Gly-Gln}}$ wurde entnommen aus den Aufnahmen der I-V Beziehungen, wie in Abbildung 3-20 gezeigt und stellt den durch 5, 10 oder 100 mM der Testsubstanz im Verhältnis zu dem von der gleichen Konzentration Gly-Gln induzierten Stroms bei einem Membranpotential von -60 mV (PEPT1) und -100 mV (PEPT2) dar.

Insgesamt konnte hier gezeigt werden, dass die Stereoselektivität unabhängig von der Seitenkette der Dipeptide ist und die Unterschiede der Transportcharakteristika von DL-, LD und DD- zu LL-Isomeren hauptsächlich auf ihrer Bindungsfähigkeit an die Transporter und damit ihrer Affinität beruhen. Allerdings scheint die Stereoselektivität auch für den Transportprozess determinierend zu sein, da bei PEPT1 selbst bei 100 mM des LD-Isomers, also einer

Konzentration, die mehr als 16-mal über dem ermittelten K_i -Wert liegt, nicht die Ströme erreicht wurden, die für das LL-Isomer gemessen wurden.

Generell zeigten sowohl PEPT1 als auch PEPT2 eine ausgeprägte Enantioselektivität in der Substraterkennung, mit einer Bevorzugung der LL-Isomere. Für die weitere Reihenfolge der Affinitäten scheint es sowohl bei den Dipeptidderivaten, als auch im Falle von Ala-Lys weitere Faktoren zu geben, die die Affinität zu den Transportern bestimmen.

3.2.3 Bestimmung der minimalen strukturellen Merkmale in Substraten von PEPT2

Um systematisch die minimalen strukturellen Merkmale von Substraten des Peptidtransporters PEPT2 zu erarbeiten, wurden neuartige Aminosäuren- und Peptidderivate (Synthese durch Dr. B. Hartrodt, Institut für Biochemie, Halle) synthetisiert und durch Verdrängungsstudien an PEPT2 exprimierenden *P. pastoris*-Zellen und elektrophysiologische Messungen an PEPT2 exprimierenden *X. laevis*-Oozyten auf ihre Interaktion mit dem Transporter untersucht. Durch diesen Ansatz mit zwei unabhängigen Transport-Assays war es möglich, Substanzen zu unterscheiden, die lediglich mit der Substratbindungsstelle des Transporters interagieren und solchen, die nach Bindung auch transportiert werden.

Rolle der Carbonylgruppe für die Substrataffinität von PEPT2

Wie kürzlich gezeigt (Döring, F. et al., 1998), werden ω -Aminofettsäuren vom intestinalen Peptidtransporter PEPT1 transportiert. Der elektrogene Transport der ω -Aminofettsäuren benötigt lediglich zwei Kopfgruppen (Amino- und Carboxy-Terminus), die durch mindestens 4 CH₂-Gruppen als intramolekularen 'Spacer' voneinander getrennt sein müssen.

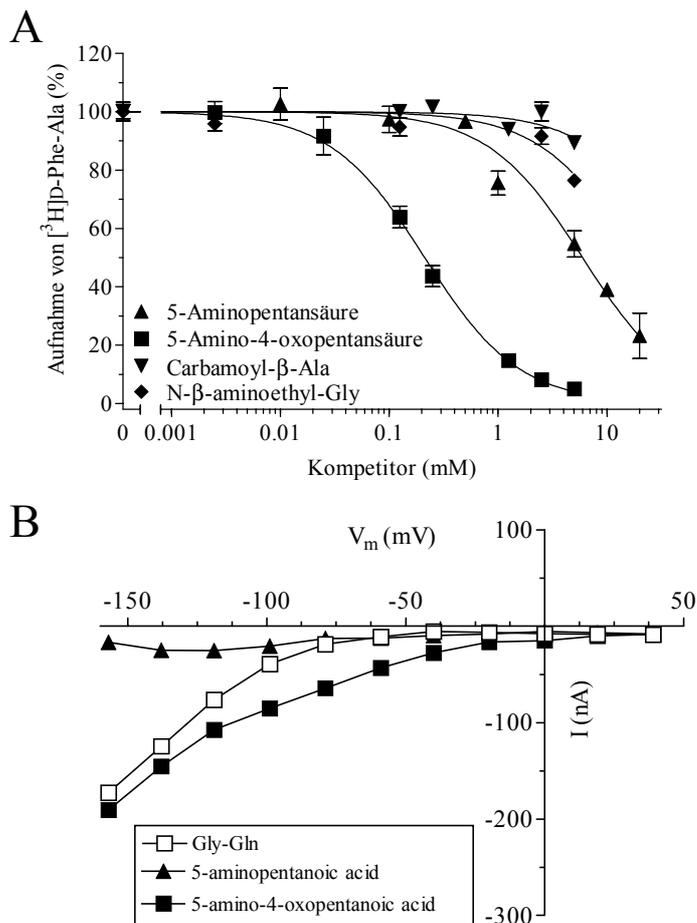


Abbildung 3-22. Charakteristika der Interaktion von ω -Aminofettsäuren mit PEPT2.

A. Die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala in PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde bestimmt in Anwesenheit steigender Konzentrationen (0,001-20 mM) von ω -Aminofettsäuren (pH 6,5, 15 min Inkubation). Die Aufnahme in Abwesenheit eines Kompetitors wurde auf 100% gesetzt.

B. Strom-Spannungs-Beziehungen (I-V) wurden durch die TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt, die mit Barth-Lösung (pH 6,5) und 5 mM Gly-Gln oder den entsprechenden ω -Aminofettsäuren perfundiert wurden.

Aus diesem Grund wurde 5-Aminopentansäure (5-APA) als kleinste Aminofettsäure, die von PEPT1 erkannt und transportiert wird, eingesetzt, um zu bestimmen, ob die gleichen minimalen Anforderungen für die Substrate von PEPT2 zutreffen. Im Gegensatz zur Affinität von 5-APA zu PEPT1, die mit 1,14 mM (Döring, F. et al., 1998) im Bereich normaler Peptid-Substrate lag, war die Affinität zu PEPT2 mit $7,28 \pm 1,32$ mM weit über den Werten, die charakteristisch für PEPT2-Substrate sind (Abbildung 3-22, Tabelle 3-10).

Substanz	Struktur	K_i (mM)	% $I_{\text{Gly-Gln}}$
5-Aminopentansäure		$7,28 \pm 1,32$	34
5-Amino-4-oxopentansäure		$0,22 \pm 0,01$	103
N-β-Aminoethyl-Gly		>10	0
Carbamoyl-β-Ala		>10	0
Gly-Ala		$0,11 \pm 0,01$	136
β-Ala-Ala		$0,93 \pm 0,01$	50
4-ABA-Ala		$5,61 \pm 0,22$	0
5-APA-Ala		$3,60 \pm 0,29$	12
6-AHA-Ala		$6,54 \pm 0,22$	24
7-AHA-Ala		$25,1 \pm 6,4$	21
Ala-Gly		$0,07 \pm 0,01$	95
Ala-β-Ala		$0,39 \pm 0,09$	26
Ala-4-ABA		$0,12 \pm 0,03$	50
Ala-5-APA		$0,06 \pm 0,02$	91
Ala-6-AHA		$0,76 \pm 0,07$	21
Ala-8-AOA		$0,37 \pm 0,03$	62

Tabelle 3-10. ω-Aminofettsäuren und ω-Aminoacyl-Alanin Derivate und ihre Interaktion mit PEPT2.

Apparente K_i -Werte wurden aus den IC_{50} -Werten der Daten errechnet, die in den Abb. 3-22A, 3-23A und 3-24A dargestellt sind. % $I_{\text{Gly-Gln}}$ wurde entnommen aus den Messungen der I-V Beziehungen, abgebildet in den Abb. 3-22B, 3-23B und 3-24B und stellt den durch 5 mM der Testsubstanz im Verhältnis zu dem durch 5 mM Gly-Gln induzierten Strom bei einem Membranpotential von -100 mV dar. 4-ABA, 4-Aminobuttersäure, 5-APA, 5-Aminopentansäure, 6-AHA, 6-Aminohexansäure, 7-AHA, 7-Aminoheptansäure, 8-AOA, 8-Aminooctansäure.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für verschiedene andere ω-Aminofettsäuren erhalten (Daten nicht dargestellt). Durch die Einführung einer Carbonylgruppe in das Rückgrat der 5-

APA zur 5-Amino-4-oxopentansäure erhöhte sich die Affinität um mehr als das 30-fache auf $0,22 \pm 0,01$ mM (Abbildung 3-22, Tabelle 3-10). Diese ist somit vergleichbar mit der üblicher PEPT2-Substrate und auch die elektrogenen Transportcharakteristika sind typisch für PEPT2 (Abbildung 3-22B). 5-Amino-4-oxopentansäure ist wahrscheinlich deshalb ein Substrat, da es dem Dipeptid Gly-Gly strukturell gleicht, wobei jedoch die Peptidbindung durch eine Keto-methylenfunktion ersetzt ist. Andererseits zeigt das Gly-Gly Derivat N- β -Aminoethyl-Gly mit einer reduzierten Peptidbindung ohne Carbonyl-Funktion mit einem K_i -Wert von >10 mM keine Interaktion mit PEPT2. Es ist daher offensichtlich, dass die Carbonylgruppe das entscheidende strukturelle Element für die hohe Bindungsaffinität ist.

Bedeutung der Stellung der Carbonylgruppe innerhalb des Rückgrats

Da ω -Aminofettsäuren sehr flexibel sind, ist es schwierig, Informationen über die genaue räumliche Anordnung der funktionell wichtigen Gruppen zu erlangen. Um die Bedeutung des molekularen Abstandes zwischen der terminalen Aminogruppe und der Carbonylgruppe im Rückgrat zu bestimmen, wurden eine Reihe modifizierter Dipeptide eingesetzt, die aus einer ω -Aminosäure mit unterschiedlicher Kettenlänge am N-Terminus und einem Alaninrest an C-terminaler Position bestanden (Abbildung 3-23 und Tabelle 3-10).

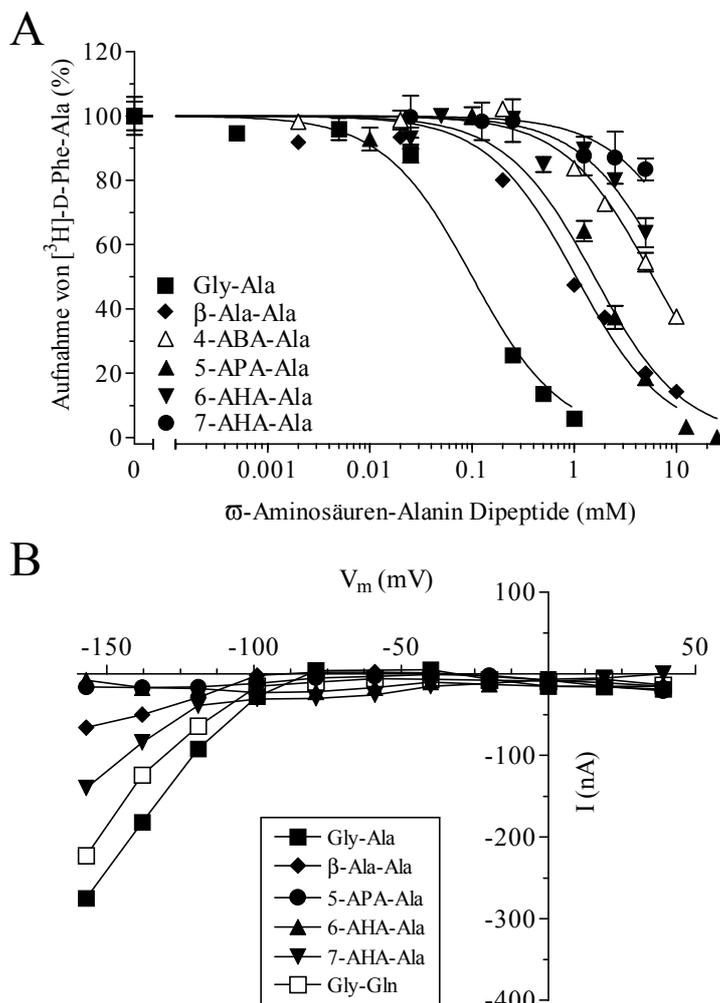


Abbildung 3-23. Charakteristika der Interaktion von ω -Aminosäuren-Alanyl-Dipeptiden mit PEPT2.

A. Die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala (2 μ Ci/ml) in PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen (0,001-20 mM) von ω -Aminosäuren-Alanyl-Dipeptiden (pH 6,5, 15 min) bestimmt. Die Aufnahme in Abwesenheit eines Kompetitors wurde auf 100 % gesetzt.

B. Strom-Spannungs-Beziehungen (I-V) wurden durch die TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt, die mit Barth-Lösung (pH 6,5) mit oder ohne 5 mM Gly-Gln oder entsprechenden ω -Aminosäuren - Alanin -Dipeptide perfundiert wurden.

Die kleinste dieser Substanzen, Glycyl-Alanin (Gly-Ala), zeigte eine Affinität von $0,11 \pm 0,01$ mM, wie für ein Standard-Dipeptid erwartet werden kann. Bereits eine Verlängerung durch eine weitere CH_2 -Gruppe, die zwischen der Aminogruppe und der Amid-Bindung eingefügt wurde (β -Ala-Ala), reduzierte die Affinität 8-fach auf $0,93 \pm 0,01$ mM. Parallel zum Abfall der Affinität betrug auch der Substrat induzierte Einwärtsstrom nur noch ca. $50 \% I_{\text{Gly-Gln}}$. Eine schrittweise Verlängerung der ω -Aminosäuren-Kette um weitere Methylen-einheiten führte zu einem weiteren Abfall der Affinität auf $5,61 \pm 0,22$ mM für 4-ABA-Ala und $25,1 \pm 6,4$ mM für 7-AHA-Ala. Carbamoyl- β -Ala, ein Gly-Gly-Derivat, in dem die Amidbindung zum Aminoterminus hin verschoben ist, so dass eine Methylen-einheit zwischen der N-terminalen Aminogruppe und der Amidbindung fehlt, zeigte keine Interaktion mit PEPT2.

Dadurch wurde gezeigt, dass sowohl die terminale Aminogruppe als auch die als essentiell identifizierte Carbonylgruppe durch nicht mehr als eine oder maximal zwei Methylen-gruppen voneinander getrennt sein dürfen, um eine hochaffine Interaktion und den Transport des Substrates zu gewährleisten.

Einfluss der Lokalisierung der C-terminalen Carboxylgruppe

Um Informationen über die Bedeutung der terminalen Carboxylgruppe von Substraten auf die Affinität zu PEPT2 zu erlangen, wurde eine Reihe von Dipeptiden untersucht, die N-terminal ein Alanin besaßen und ω -Aminosäuren unterschiedlicher Kettenlänge als C-Terminus aufwiesen (Abbildung 3-24 und Tabelle 3-10).

Bei Alanyl-Glycin (Ala-Gly) ist die Distanz von der Amid-Bindung zur terminalen Carboxylgruppe prototypisch für Dipeptide. Daher zeigte Ala-Gly mit einem K_i von $0,07 \pm 0,01$ mM auch eine hohe Affinität und einen erwarteten hohen Substrat-induzierten Einwärtsstrom von $95 \% I_{\text{Gly-Gln}}$.

Eine Verlängerung der ω -Aminosäuren-Kette um eine Methylen-gruppe (Ala- β -Ala) reduzierte die Affinität ca. 5-fach auf $0,39 \pm 0,09$ mM und den Einwärtsstrom auf $26 \% I_{\text{Gly-Gln}}$. Die Einführung einer weiteren CH_2 -Einheit (Ala-4-ABA) erhöhte jedoch sowohl die Affinität als auch den Strom auf $0,12 \pm 0,03$ mM bzw. $50 \% I_{\text{Gly-Gln}}$. Durch die Einführung einer weiteren CH_2 -Einheit im Falle von Ala-5-APA konnte die Affinität und der Einwärtsstrom noch weiter auf $0,06 \pm 0,02$ mM und $91 \% I_{\text{Gly-Gln}}$ erhöht werden.

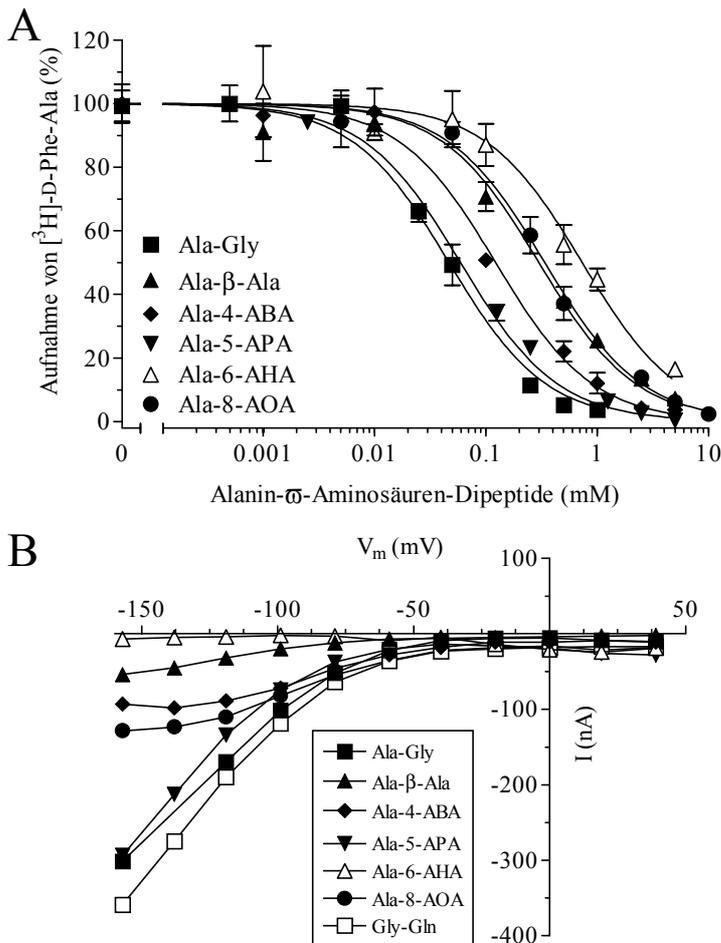


Abbildung 3-24. Charakteristika der Interaktion von Alanin- ω -Aminosäuren-Dipeptiden mit PEPT2.

A. Die Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{-D-Phe-Ala}$ ($2 \mu\text{Ci/ml}$) in PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen ($0,001\text{-}20 \text{ mM}$) von Kompetitoren bestimmt (pH 6,5). Die Aufnahme in Abwesenheit eines Kompetitors wurde auf 100% gesetzt.

B. Strom-Spannungs-Beziehungen (I-V) wurden durch die TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt, die mit Barth-Lösung (pH 6,5) mit oder ohne 5 mM Gly-Gln oder der entsprechenden Alanin- ω -Aminosäuren-Dipeptide perfundiert wurden.

Obwohl letztere Verbindung in ihrer Gesamtlänge nahezu vergleichbar zu einem Tripeptid ist, fehlt ihr die zweite Peptidbindung, was zu einer höheren Flexibilität in der Konformation führt. Tripeptide werden von PEPT2 wie Dipeptide als Substrate erkannt. Hier konnte gezeigt werden, dass die zweite Peptidbindung nicht für eine hohe Affinität und elektrogenen Transport von Tripeptiden benötigt wird. Eine weitere Kettenverlängerung wie bei Ala-6-AHA und Ala-8-AOA, Substanzen, deren Kettenlänge die eines Tripeptids überschreiten, resultierte wiederum in einer Abnahme der Affinität ($0,76 \pm 0,07 \text{ mM}$ bzw. $0,37 \pm 0,03 \text{ mM}$) und in verminderten Einwärtsströmen.

Interaktion von Aminosäure-Arylamiden mit PEPT2

Bisher wurde noch nicht geklärt, inwieweit eine C-terminale Carboxylgruppe zur Substraterkennung benötigt wird. Für PEPT1 wurde gezeigt (Borner, V. et al., 1998), dass auch Aminosäure-Arylamide, denen eine terminale Carboxylgruppe fehlt, als Substrat von PEPT1 erkannt werden. Daher wurden verschiedene para-substituierte Alanin-Anilide zur Untersuchung an PEPT2 eingesetzt (Abbildung 3-25A). Wie in Abbildung 3-25B gezeigt, waren Alanin-Aryla-

mide in der Lage, die [^3H]-D-Phe-Ala Aufnahme in PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen spezifisch zu inhibieren. Ala-anilid (X=H) zeigte einen K_i -Wert von $0,13 \pm 0,04$ mM (Tabelle 3-11), was vergleichbar zu Affinitäten von Standard-Dipeptiden ist. Die Affinitäten für die Interaktion von Alanin-Arylamiden mit PEPT2 konnten stufenweise durch Einführung einer Carboxymethylester-, Chloro- oder Nitro-Gruppe an para-Position des Phenylrings erhöht werden (Abbildung 3-25B). Ala-4-nitroanilid zeigte mit $0,008 \pm 0,001$ eine 16-fach höhere Affinität gegenüber PEPT2 im Vergleich zu Ala-anilid. Demgegenüber führte die Einführung einer Carboxylgruppe zu einem drastischen Abfall der Affinität auf $2,93 \pm 0,87$ mM.

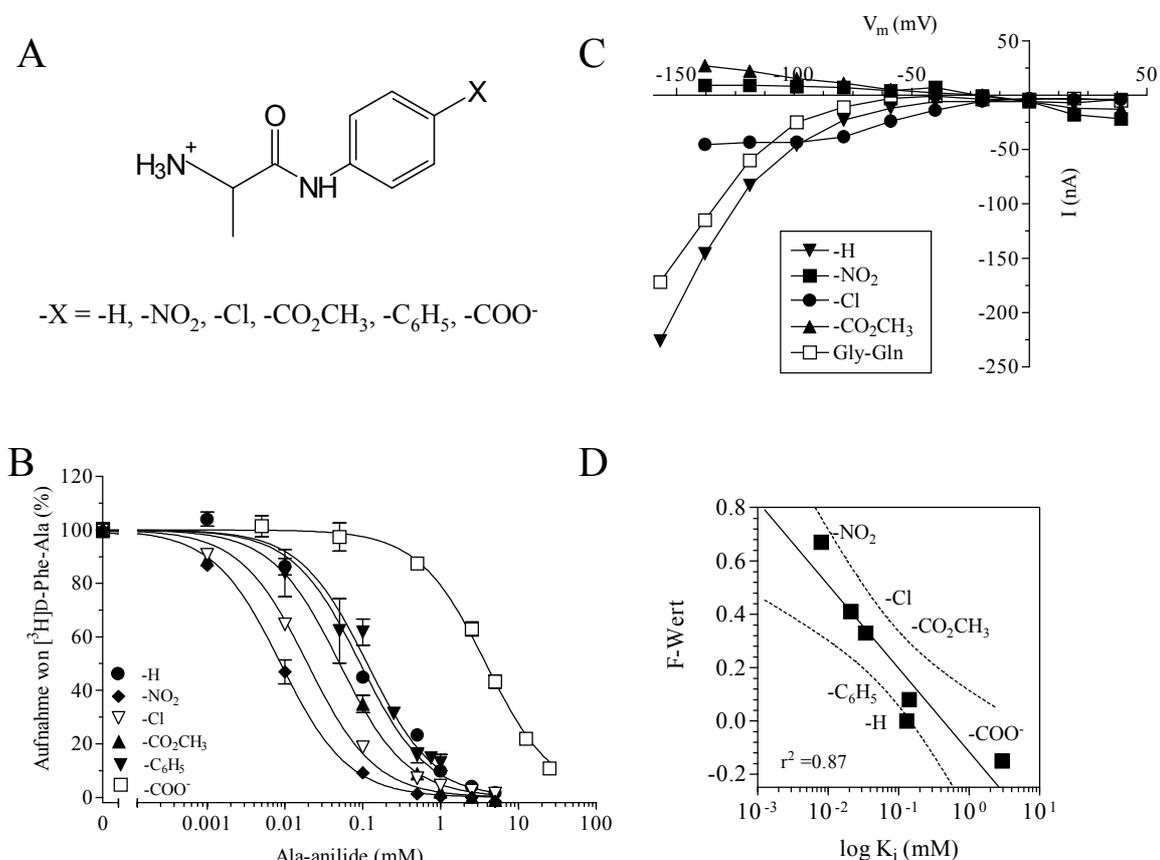


Abbildung 3-25. Interaktion von Alanin-Arylamiden mit PEPT2

A. Strukturen der Alanin-Arylamide

B. Die Aufnahme von [^3H]-D-Phe-Ala (2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) in PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen wurde bestimmt in Anwesenheit steigender Konzentrationen (0,001-25 mM) von Alanin-Aniliden (pH 6,5, 15 min Inkubation). Die Aufnahme in Abwesenheit von Ala-aniliden wurde auf 100 % gesetzt.

C. Strom-Spannungs-Beziehungen (I-V) wurden durch die TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt, die mit Barth-Lösung (pH 6,5) und 5 mM Gly-Gln oder der entsprechenden Alanin-Arylamiden perfundiert wurden.

D. Beziehung zwischen der Affinitätskonstanten (K_i) der Alanin-Arylamide für die Interaktion mit PEPT2 und den F-Werten als aromatische Substituenten-Konstanten. Die gestrichelte Linie zeigt das 95% Konfidenz-Intervall der linearen Regressionsgeraden an.

Da die para-Substituenten am Phenylring der Ala-anilid-Derivate sich in ihren physikochemischen Eigenschaften wie der Hydrophobizität, der Masse oder den elektronischen (induk-

tiven und mesomeren) Parametern unterscheiden (Tabelle 3-11), könnten diese Eigenschaften dazu dienen, die enormen Unterschiede in den Affinitäten zu erklären. Keine signifikante Korrelation konnte zwischen den Affinitäten und den aromatischen Konstanten, die sterische (M_R) oder hydrophobe (π) Parameter beschreiben, gefunden werden. Es gab aber eine deutliche Beziehung zwischen den Affinitäten der unterschiedlichen Alanin-Arylamide mit dem Swain-Lupton-Parameter F , als einem beschreibenden Parameter für das elektronische Feld von Substituenten am Phenylring (Abbildung 3-25D).

Substanz	-X	F	π	M_R	K_i (mM)	% $I_{\text{Gly-Gln}}$
Ala-anilid	-H	0	0	1,03	$0,13 \pm 0,04$	114
Ala-4-nitroanilid	-NO ₂	0,67	-0,28	7,36	$0,008 \pm 0,001$	0
Ala-4-chloroanilid	-Cl	0,41	0,71	6,03	$0,02 \pm 0,002$	58
Ala-4-aminobenzoesäure -methylester	-CO ₂ CH ₃	0,33	-0,01	12,87	$0,03 \pm 0,01$	0
Ala-4-phenylanilid	-C ₆ H ₅	0,08	1,96	25,36	$0,14 \pm 0,03$	0
Ala-4-aminobenzoesäure	-COO ⁻	-0,15	-4,36	6,05	$2,93 \pm 0,87$	0

Tabelle 3-11. Interaktion der Alanin-Arylamide mit PEPT2 und die Rolle der Konstanten der aromatischen Substituenten.

Apparente K_i -Werte (\pm SEM) wurden aus den IC_{50} -Werten errechnet, die über nicht-lineare Regressionsanalyse der Daten in Abbildung 3-25B ermittelt wurden. Die Ströme wurden aus den in Abbildung 3-25C dargestellten I-V Beziehungen entnommen und repräsentieren den durch 5 mM der Substanz im Verhältnis zu dem durch 5 mM Gly-Gln induzierten Strom bei einem Membranpotential von -100 mV. Die aromatischen Substituenten-Konstanten F (elektronisch), π (lipophil), und M_R (sterisch, molare Refraktion) wurden entnommen aus (Hansch, C. et al., 1973).

Da höhere F -Werte mit niedrigeren K_i -Werten und daher höheren Affinitäten für die Bindung an PEPT2 korrelieren, sind, zumindest zum Teil, die unterschiedlichen induktiven und mesomeren Eigenschaften der para-Substituenten, und damit die Elektronendichte am aromatischen Ringsystem, verantwortlich für die großen Unterschiede in den Affinitäten der verschiedenen Ala-anilide.

Aus den elektrophysiologischen Ergebnissen wird deutlich, dass die Substrataffinität und der Transport offenbar zwei unabhängige Größen für die Peptidtransporter darstellen. Unter den getesteten Alanin-Arylamiden waren somit nur Ala-anilid und Ala-4-chloroanilid in der Lage einen Einwärtsstrom an PEPT2 exprimierenden Oozyten zu induzieren (Abbildung 3-25C). In einer Konzentration von 5 mM generierte Ala-anilid Ströme, die 114% der Ströme von 5 mM des Dipeptids Gly-Gln ($\%I_{\text{Gly-Gln}}$) betragen und in der Aufzeichnung der Strom-Spannungs-

Beziehungen (I-V) keine Unterschiede zu normalen PEPT2-Substraten erkennen ließ. Obwohl das para-nitro-Derivat von Ala-anilid die höchsten Affinitäten ($0,008 \pm 0,001$ mM) zeigte, wurde es nicht elektrogen über PEPT2 transportiert (Abbildung 3-25). Darüber hinaus war Ala-4-nitroanilid in der Lage in einer Konzentration von 100 μ M den durch 5 mM Gly-Gln induzierten Strom vollständig zu inhibieren (Abbildung 3-26). Daher stellt Ala-4-nitroanilid einen hochaffinen Inhibitor von PEPT2 dar.

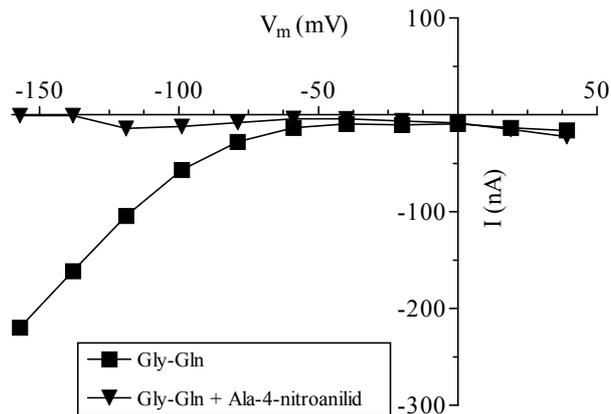


Abbildung 3-26. Hemmung des Gly-Gln-induzierten Einwärtsstroms durch Ala-4-nitroanilid.

Strom-Spannungs-Beziehungen (I-V) wurden durch die TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt, die mit Barth-Lösung (pH 6,5) mit oder ohne 5 mM Gly-Gln und 100 μ M Ala-4-nitroanilid perfundiert wurden.

Interaktion von Alanin-Aminobenzoesäure mit PEPT2

Im Gegensatz zu Ala-4-aminobenzoesäure wurden Alanin- ω -Aminosäuren-Dipeptide, die ebenfalls am N-Terminus einen Alaninrest besitzen und eine terminale Carboxylgruppe, von PEPT2 mit hohen Affinitäten transportiert. Der Unterschied zwischen diesen beiden Substanzen liegt dabei in der Flexibilität der Seitenkette der ω -Aminosäuren und damit der Möglichkeit, die COO⁻-Gruppe in der Substratbindungsdomäne richtig positionieren zu können. Im Falle von Ala-4-aminobenzoesäure dagegen ist die Struktur sehr rigide und verhindert somit eine mögliche Substratbindung in einer definierten Domäne des Transportproteins. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurden daher zwei weitere Alanin-Aminobenzoesäure-Derivate hinsichtlich ihrer Affinität und Transporteigenschaften untersucht, bei denen die Carboxylgruppe an ortho- und meta-Position des Phenylrings eingefügt ist (Abbildung 3-27).

Wenn sich die COO⁻-Gruppe anstelle der para- an meta-Position befand, stieg die Substrataffinität um das 50-fache auf $0,056 \pm 0,003$ mM und die Transportströme ergaben $54 \% I_{\text{Gly-Gln}}$ mit vergleichbaren Charakteristika zu denen von Di- und Tripeptiden (Abbildung 3-27). Befand sich die Carboxylgruppe am Phenylring in ortho-Position, stieg die Affinität nur um das 5-fache verglichen mit Ala-4-aminobenzoesäure, jedoch wurden keine Transportströme erhalten.

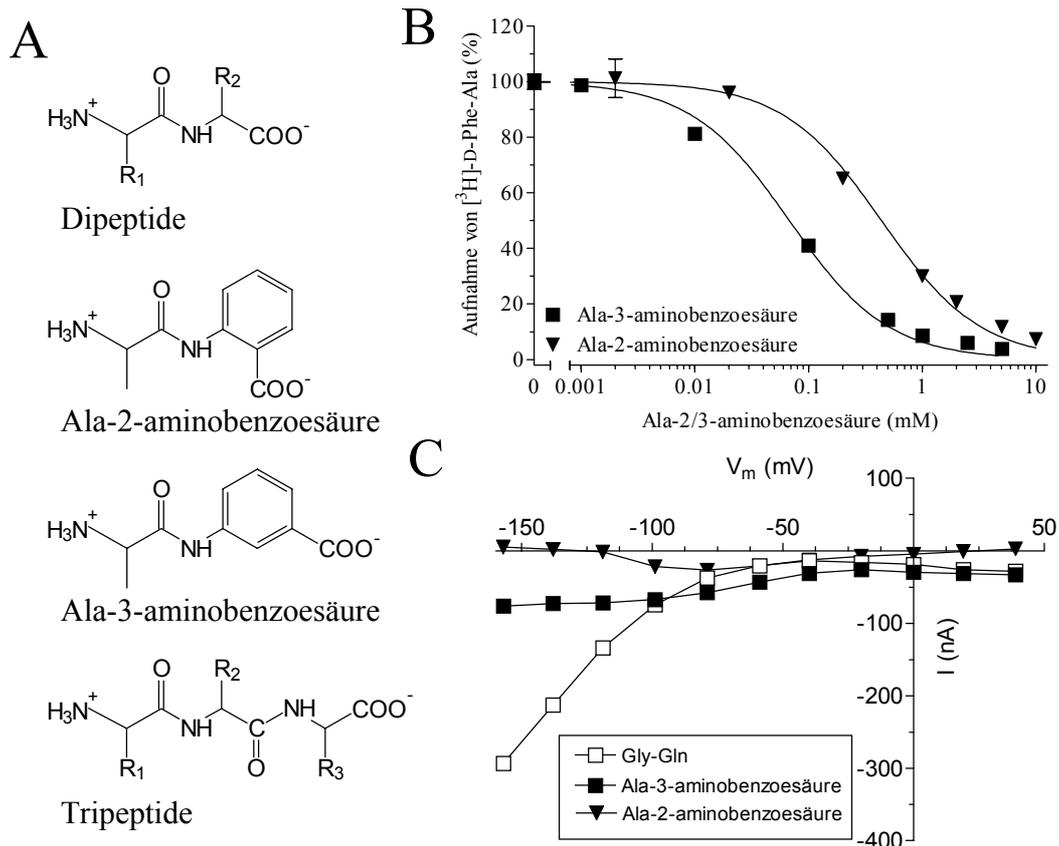


Abbildung 3-27. Charakterisierung der Interaktion von Ala-2- und Ala-3-aminobenzoesäure mit PEPT2.

A. Strukturen von Ala-2- und Ala-3-aminobenzoesäure im Vergleich zu Strukturen von Di- und Tripeptiden

B. Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala (2 μCi/ml) in PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen (0,001-10 mM) von Ala-3- und Ala-2-aminobenzoesäure (pH 6,5). Die Aufnahme in Abwesenheit eines Kompetitors wurde auf 100 % gesetzt.

C. Strom-Spannungs-Beziehungen (I-V) wurden durch die TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt, die mit Barth-Lösung (pH 6,5) mit oder ohne 5 mM Gly-Gln bzw. Ala-3- und Ala-2-aminobenzoesäure perfundiert wurden.

Vergleicht man die Struktur von Ala-3-aminobenzoesäure mit der von Tripeptiden, so wird deutlich, dass nur hier die essentielle Aminogruppe und die benötigte Carbonylfunktion der Amid-Bindung in vergleichbarer räumlicher Anordnung und mit einem entsprechenden Abstand zur Carboxylgruppe lokalisiert ist, wie dies bei der terminalen Carboxylgruppe von Tripeptiden der Fall ist. Daher kann die Ala-3-aminobenzoesäure aufgrund ihrer Struktur als perfektes Tripeptidmimetikum gelten, das eine vergleichbare Affinität und Transportrate wie z.B. Tri-Alanin ($K_i = 0,23 \pm 0,06$ mM, 76 % $I_{\text{Gly-Gln}}$, Daten sind nicht dargestellt) besitzt. Die Blockierung der COO⁻-Gruppe in meta-Position durch eine Veresterung (Ala-3-aminobenzoesäuremethylester) führte zu einer Beibehaltung der hohen Affinität, verhinderte jedoch den elektrogenen Transport ($K_i = 0,19 \pm 0,06$ mM, 5 % $I_{\text{Gly-Gln}}$, Daten sind nicht dargestellt). Dies

zeigt die Bedeutung der Carboxylgruppe und ihrer Position in Substraten für Bindung und Transport über PEPT2.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die wesentlichen Unterschiede zwischen PEPT2 und dem intestinalen Peptidtransporter PEPT1 nicht nur die Substrataffinität betreffen, sondern auch die Anforderungen für einen elektrogenen Transport. Über neuartige Aminosäure-Anilide sowie modifizierte Dipeptide, die aus einer N- oder C-terminalen α -Aminosäure und einer ω -Aminosäure an der gegenüberliegenden Position bestehen, konnten erstmals die minimalen strukturellen und chemischen Anforderungen für die Substraterkennung und den Transport durch PEPT2 aufgezeigt werden. Diese minimalen Anforderungen sind die essentielle Länge des Rückgrates, die terminalen geladenen Gruppen, die Carbonylgruppe im Rückgrat sowie ihre relative Position in der Substratbindungsdomäne von PEPT2.

3.2.4 Identifizierung eines neuartigen Inhibitors für den intestinalen Peptidtransporter PEPT1

Da bis zum Beginn dieser Arbeit noch kein hochaffiner Inhibitor für die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 identifiziert werden konnte, war die Entwicklung eines solchen, spezifisch mit den Peptidtransportern interagierenden Inhibitors, das Ziel der folgenden Untersuchung.

Dazu wurde zunächst die Interaktion des Dipeptids Lys-Pro und verschiedener, von Lys-Pro abgeleiteter Peptidderivate mit dem intestinalen Peptidtransporter PEPT1 nach Expression in *P. pastoris* bestimmt (Abbildung 3-28).

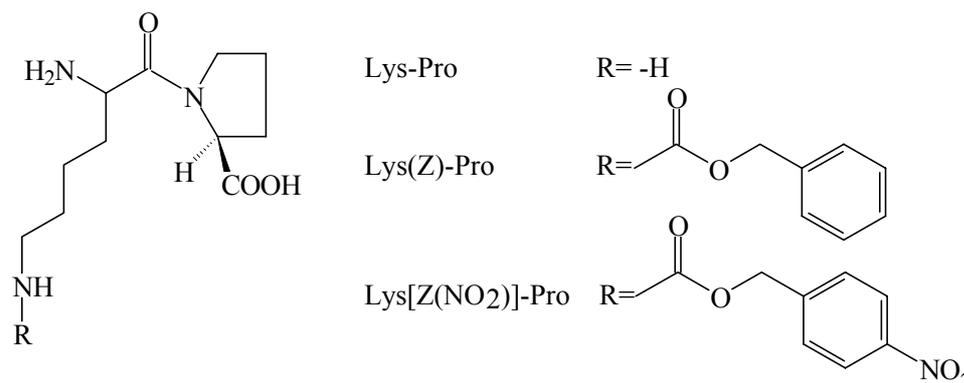


Abbildung 3-28. Strukturformel von Lys-Pro und der Derivate Lys(Z)-Pro und Lys[Z(NO₂)]-Pro

Wie in Abbildung 3-29 dargestellt, sind Lys-Pro und die Derivate Lys(Z)-Pro sowie Lys[Z(NO₂)]-Pro in der Lage, die Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala in PEPT1 exprimierende Hefezellen konzentrationsabhängig zu inhibieren. Beide Lys-Pro Derivate werden von PEPT1 mit apparenten K_i-Werten von 78 ± 18 μM bzw. 5,1 ± 0,4 μM erkannt.

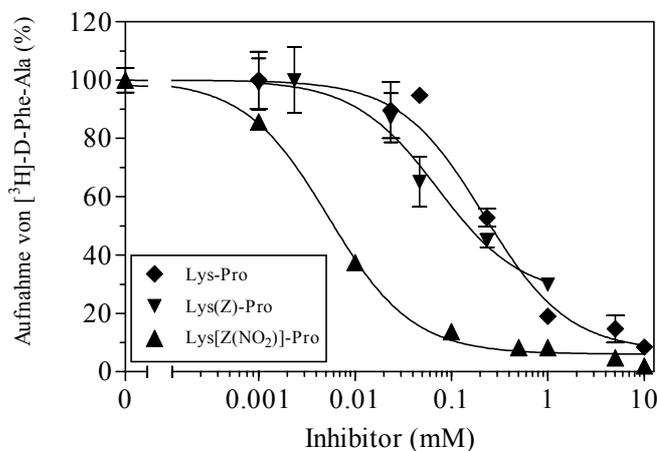


Abbildung 3-29. Inhibition der Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala durch Lys-Pro-Derivate

Hemmung der Aufnahme von [³H]-D-Phe-Ala (2 μCi/ml, pH 6,5, 20 min) in PEPT1 exprimierende *P. pastoris*-Zellen durch steigende Konzentrationen an Lys-Pro, Lys(Z)-Pro und Lys[Z(NO₂)]-Pro (0-10 mM). Die Aufnahme in Abwesenheit von Inhibitoren wurde auf 100% gesetzt.

Die Werte für die Derivate sind damit erheblich niedriger als der Wert, der mit 263 ± 60 μM für das Dipeptid Lys-Pro erhalten wurde. Diese spezifischen Modifizierungen der Seitenketten erhöhen die Affinität um einen Faktor von 4 im Fall von Lys(Z)-Pro und 52 im Fall von

Lys[Z(NO₂)]-Pro. Aufgrund seiner hohen Affinität wurde daher Lys[Z(NO₂)]-Pro für weitere Experimente eingesetzt.

Zur Untersuchung der Interaktion von Lys-Pro und den Derivaten in PEPT1 exprimierenden *Xenopus laevis*-Oozyten wurde die Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemm-Technik (TEVC) angewendet. Dadurch war es möglich, den elektrogenen Transport von Lys-Pro sowie die Inhibition des Transportes durch die Derivate mit den geschützten Seitenketten Lys(Z)-Pro und Lys[Z(NO₂)]-Pro zu erfassen.

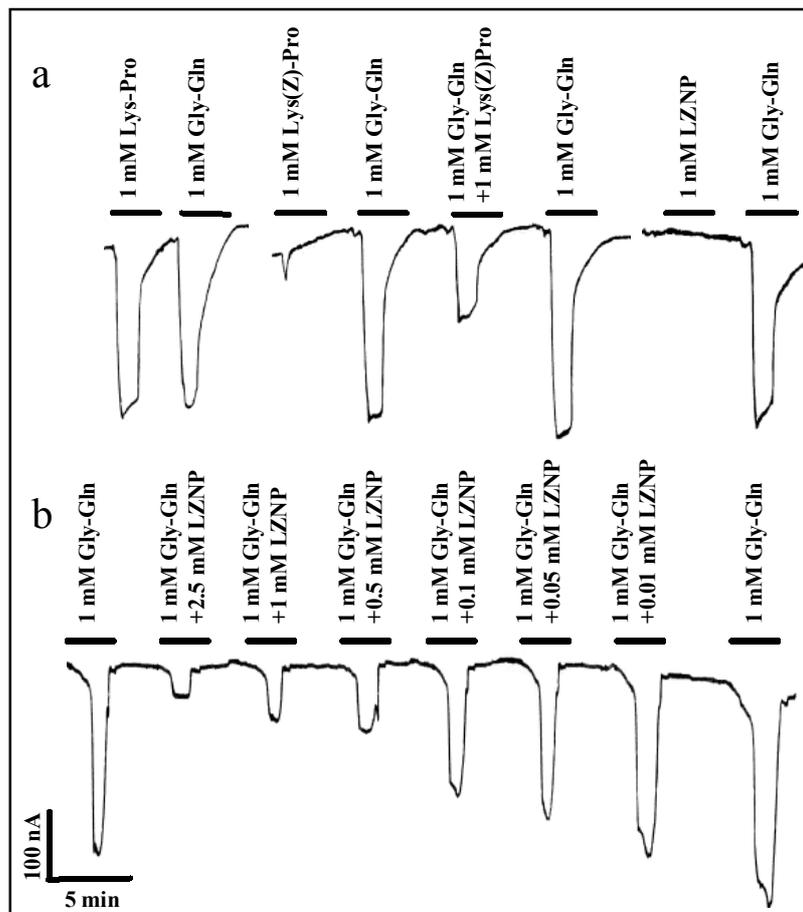


Abbildung 3-30. Registrierung der Substrat-induzierten Einwärtsströme in PEPT1 exprimierende *Xenopus laevis* Oozyten.

Typische Aufnahmen der Einwärtsströme in PEPT1 exprimierende *Xenopus laevis* Oozyten in Anwesenheit von 1 mM Lys-Pro, Lys(Z)-Pro, Lys[Z(NO₂)]-Pro (LZNP) oder 1 mM Gly-Gln allein oder mit den angezeigten Konzentrationen von LZNP (0,01-2,5 mM). Das Membranpotential wurden auf -60 mV kurzgeschlossen und die Oozyten in modifizierter Barth-Lösung (pH 6,5) perfundiert. Kontroll-Oozyten (mit H₂O injiziert) zeigten keine Antwort im Einwärtsstrom nach Zugabe von Gly-Gln oder LZNP.

Wie Abbildung 3-30 (a) zeigt, induziert Lys-Pro durch elektrogenen Transport über PEPT1 Einwärtsströme, die vergleichbar sind zu denen des Referenz-Dipeptids Gly-Gln mit 215 nA bei einem Haltepotential von -60 mV. Demgegenüber ruft Lys(Z)-Pro keinen Einwärtsstrom hervor, wenn es in einer Konzentration von 1 mM appliziert wird, ist aber in der Lage, den durch Gly-Gln hervorgerufenen Strom um 50% zu inhibieren. Auch im Falle von Lys[Z(NO₂)]-Pro wurde kein Einwärtsstrom gemessen. Die Perfusion der gleichen Oozyte mit steigenden Konzentrationen (0,01 bis 2,5 mM) von Lys[Z(NO₂)]-Pro reduzierte jedoch den Gly-Gln-Strom bis auf 10% des initialen Wertes (Abbildung 3-30, b).

Lys[Z(NO₂)]-Pro konkurriert daher effizient mit Dipeptiden an der Substratbindungsstelle von PEPT1, wird allerdings selbst nicht elektrogen transportiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Transportes von Peptiden durch Lys[Z(NO₂)]-Pro komplett reversibel ist, da die Gly-Gln induzierten Einwärtsströme zu ihrem Ausgangswert zurückkehrten, wenn Lys[Z(NO₂)]-Pro ausgewaschen wurde.

Durch Untersuchungen an Caco-2-Zellen, die ebenfalls den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 exprimieren, konnte darüber hinaus in Fluxexperimenten mit anschließender HPLC-Analyse keine Aufnahme von Lys[Z(NO₂)]-Pro in die Zellen gemessen werden, wenn es in einer Konzentration von 5 mM auf der apikalen Seite angeboten wurde. (Die Studien an Caco-2-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. K. Neubert, Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle, durchgeführt.)

Der Dixon-Plot unter Auftragung der erhaltenen Einwärtsströme ($\%I_{\text{Gly-Gln}}$) von 0,05, 0,1, 0,5 und 2,5 mM Gly-Gln als Funktion steigender Konzentrationen Lys[Z(NO₂)]-Pro (Abbildung 3-31) bestätigt, dass Lys[Z(NO₂)]-Pro ein kompetitiver Inhibitor des elektrogenen Peptidtransportes ist. Der daraus abgeleitete apparente K_i -Wert für die Inhibition des Gly-Gln-Stroms durch Lys[Z(NO₂)]-Pro war $29 \pm 4 \mu\text{M}$.

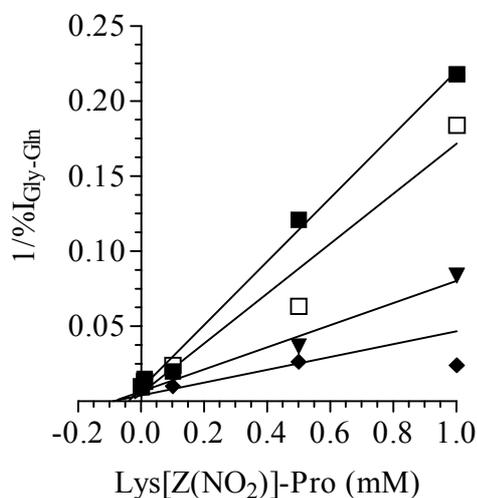


Abbildung 3-31. Dixon-Plot der Gly-Gln induzierten Ströme in An- und Abwesenheit von Lys[Z(NO₂)]-Pro an PEPT1 exprimierenden *X. laevis*-Oozyten.

Mit PEPT1-cRNA injizierte Oozyten wurden mit 0,05 (■), 0,1 (□), 0,5 (▼) oder 2,5 (◆) mM Gly-Gln und steigenden Konzentrationen von Lys[Z(NO₂)]-Pro perfundiert (pH 6,5) und die korrespondierenden Einwärtsströme bei -60 mV Membranpotential durch TEVC-Messungen ermittelt.

Weiterhin wurde untersucht, ob Lys[Z(NO₂)]-Pro auch in der Lage ist, PEPT1 zu inhibieren, wenn es von cytosolischer Seite (*trans*-Seite) appliziert wird. Dazu wurden zunächst PEPT1 exprimierende Oozyten mit 10 mM Gly-Gln perfundiert und die maximalen Einwärtsströme aufgezeichnet. Dann wurden die Oozyten entweder mit 25 nl H₂O, 100 mM D-Phe-Ala oder 100 mM Lys[Z(NO₂)]-Pro injiziert und nach einer 30-minütigen Inkubation wurde eine zweite Messung des durch Gly-Gln induzierten Stromes durchgeführt (Abbildung 3-32).

Die Injektion von Lys[Z(NO₂)]-Pro verminderte dabei signifikant den Gly-Gln-Strom auf 56 ± 5 %. Dieses Ergebnis legt daher den Schluss nahe, dass Lys[Z(NO₂)]-Pro auch an der inneren Substratbindungsdomäne von PEPT1 effizient binden kann.

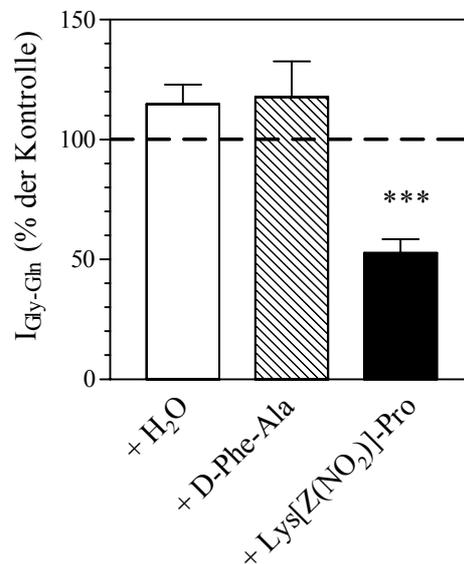


Abbildung 3-32. Elektrophysiologische Analyse der Dipeptid-Ströme nach Injektion von Lys[Z(NO₂)]-Pro in Oozyten.

Pro Ansatz wurde an 5-6 PEPT1-Oozyten die durch Perfusion mit 10 mM Gly-Gln induzierten Einwärtsströme bei einem Haltepotential von -60 mV bestimmt. Anschließend wurden die Oozyten aus der Perfusionskammer entfernt und entweder mit 25 nl H₂O, 100 mM D-Phe-Ala oder 100 mM Lys[Z(NO₂)]-Pro injiziert. Nach 30 min Inkubation in modifizierter Barth-Lösung (pH 6,5) wurden erneut die Einwärtsströme während der Perfusion mit 10 mM Gly-Gln bestimmt. Die durch Gly-Gln an jeder Oozyte induzierten Ströme wurden zu den entsprechenden Einwärtsströmen vor Injektion mit Lys[Z(NO₂)]-Pro, D-Phe-Ala oder H₂O in Beziehung gesetzt (I_{Gly-Gln} (% der Kontrolle)). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM von 5-6 Oozyten. ***, signifikanter Unterschied ($p \leq 0,001$) zum Kontrollwert (ungepaarter t-Test).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Anfügen einer Z-Gruppe an die ϵ -Aminogruppe des Lysin-Restes das Dipeptid Lys-Pro von einem transportierten Substrat in ein nicht-transportiertes Derivat mit einer bedeutend höheren Affinität zu PEPT1 verwandelt. Das Anfügen einer NO₂-Funktion an den hydrophoben Ring der Z-Gruppe erhöht die Affinität der Bindung an PEPT1 weiter. Lys[Z(NO₂)]-Pro stellt damit den ersten Inhibitor von PEPT1 mit einer hohen Affinität zum Transporter und einer reversiblen Art der Interaktion sowohl mit der äußeren als auch der inneren Substratbindungsstelle dar.

3.2.5 Charakterisierung hochaffiner Inhibitoren für PEPT2

Die zuvor dargestellten Untersuchungen identifizierten Lys[Z(NO₂)]-Pro als hochaffinen kompetitiven Inhibitor des intestinalen Peptidtransporters PEPT1. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Substanz auch als hochaffiner Inhibitor mit dem renalen Peptidtransporter PEPT2 interagiert. Darüber hinaus sollte geklärt werden, welche strukturellen Voraussetzungen notwendig sind, die diese Klasse von Verbindungen von transportierten Substraten in nicht-transportierte Inhibitoren verwandelt.

Interaktion von verschiedenen Lys[Z(NO₂)]-Derivaten mit PEPT2

Zunächst wurden daher die apparenten Substrat-Affinitäten des identifizierten PEPT1-Inhibitors Lys[Z(NO₂)]-Pro und drei verwandter Dipeptidderivate, die ebenfalls einen Lys[Z(NO₂)]-Rest aber unterschiedliche C-terminale Aminosäuren (Ala, Val, Sar) besaßen, in Verdrängungsstudien an PEPT2 exprimierenden *Pichia pastoris*-Zellen bestimmt.

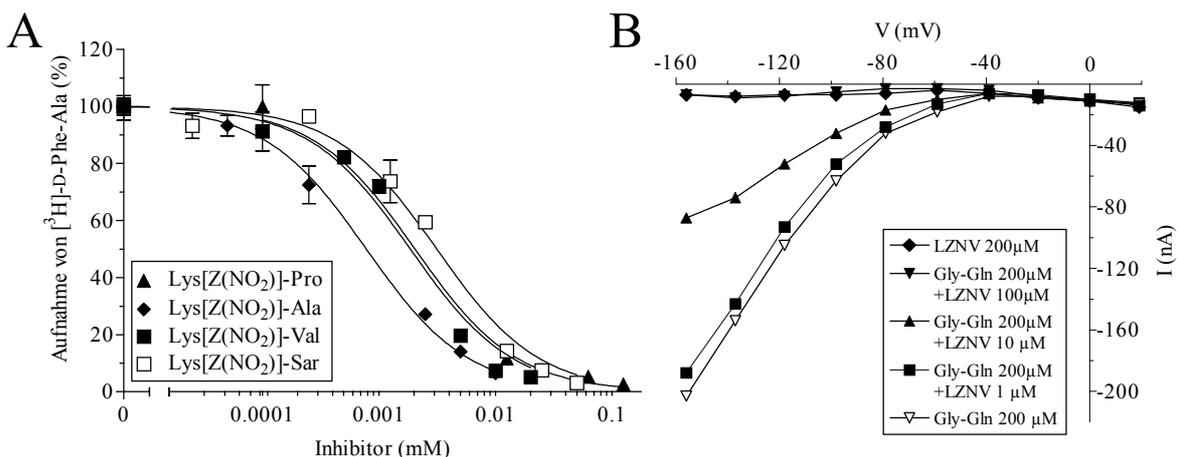


Abbildung 3-33. Charakteristika der Interaktion von Lys[Z(NO₂)]-Derivaten mit PEPT2.

A. Hemmung der [³H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen (2 μCi/ml; pH 6,5, 15 min) durch Lys[Z(NO₂)]-Derivate (0-0,2 mM). Die Aufnahme in Abwesenheit von Inhibitoren wurde auf 100% gesetzt.

B. Strom-Spannungs-Beziehungen wurden über TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt. Die Oozyten wurden mit Barth-Lösung (pH 6,5) mit oder ohne 0,2 mM Gly-Gln und/oder steigenden Konzentrationen von Lys[Z(NO₂)]-Val (0-200 μM) perfundiert.

Wie in Abbildung 3-33A gezeigt, konkurrieren die vier Dipeptidderivate konzentrationsabhängig mit dem radioaktiv markierten Dipeptid [³H]-D-Phe-Ala um die Substratbindung an PEPT2 exprimierenden *P. pastoris*-Zellen. Die erhaltenen K_i-Werte betragen $2,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$ für Lys[Z(NO₂)]-Pro (LZNP), $1,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ für Lys[Z(NO₂)]-Val (LZNV), $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ für Lys[Z(NO₂)]-Ala und $3,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ für Lys[Z(NO₂)]-Sar, womit alle vier Lys[Z(NO₂)]-Derivate sehr hohe Affinitäten für die Interaktion mit PEPT2 zeigten.

Um zu prüfen, dass diese Substanzen auch wirklich Inhibitoren von PEPT2 darstellen, wurden elektrophysiologische Untersuchungen mittels TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten durchgeführt. Wie für LZNV in Abbildung 3-33B gezeigt, konnte kein Substrat-induzierter Einwärtsstrom gemessen werden. Darüber hinaus war Lys[Z(NO₂)]-Val in der Lage, die durch Gly-Gln an PEPT2-Oozyten induzierten Ströme zu inhibieren. Gleiche Ergebnisse wurden auch für die anderen Lys[Z(NO₂)]-Derivate erhalten (Daten sind nicht dargestellt). Die Hemmung des Gly-Gln-Stroms durch Lys[Z(NO₂)]-Val war dosisabhängig und reversibel, was eine kompetitive Interaktion an der Substratbindungsstelle von PEPT2 vermuten lässt.

Um weiterhin den Einfluss der Position der Lys[Z(NO₂)]-Gruppe im Dipeptid für die Wirkung als Inhibitor zu untersuchen, wurden die Derivate Ala-Lys[Z(NO₂)] (ALZN) und Val-Lys[Z(NO₂)] (VLZN) eingesetzt.

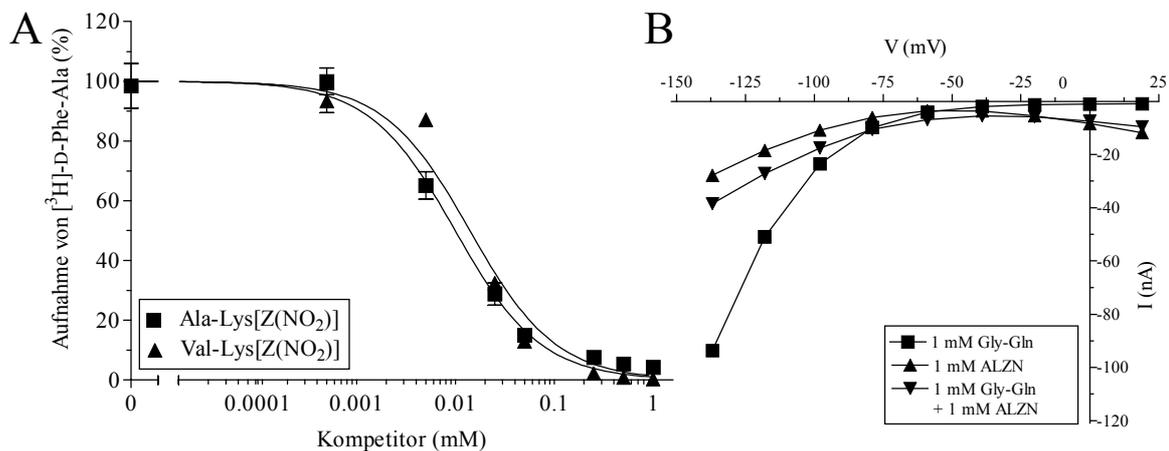


Abbildung 3-34. Interaktion von ALZN und VLZN mit PEPT2.

A. Hemmung der [³H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT2 exprimierende *P. pastoris*-Zellen (2 μCi/ml; pH 6,5, 15 min) durch Lys[Z(NO₂)]-Derivate (0-1 mM). Die Aufnahme in Abwesenheit von Inhibitoren wurde auf 100 % gesetzt.

B. Strom-Spannungs-Beziehungen wurden über TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt. Die Oozyten wurden perfundiert mit Barth-Lösung (pH 6,5) und 0,2 mM Gly-Gln und/oder Ala-Lys[Z(NO₂)].

Wie in Abbildung 3-34 dargestellt, interagierten auch Ala-Lys[Z(NO₂)] und Val-Lys[Z(NO₂)] mit hohen Affinitäten mit PEPT2 (K_i-Werte von 10 ± 4 und 13 ± 1 μM). Im Gegensatz zu den Derivaten mit der Lys[Z(NO₂)]-Gruppe im Aminoterminal induzierten diese Verbindungen, wie für ALZN gezeigt, noch einen Einwärtsstrom in PEPT2 exprimierende Oozyten, der für ALZN in einer Konzentration von 1 mM noch 67 % des von 1 mM Gly-Gln hervorgerufenen Stroms bei einem Haltepotential von -100 mV betrug. Der Einwärtsstrom war reversibel, wenn die Perfusion mit ALZN gestoppt wurde. Auch bei gleichzeitiger Perfusion mit Gly-Gln und ALZN konnte ein Einwärtsstrom gemessen werden (Abbildung 3-34B).

Daraus lässt sich erkennen, dass die Position der Z(NO₂)-Gruppe im Dipeptid entscheidend für die Transportcharakteristika dieser Substanzklasse ist. Die Fähigkeit zur Inhibition blieb nur dann erhalten, wenn sich die Z(NO₂)-Gruppe in der Seitenkette der N-terminalen Aminosäure befindet.

Einfluss von chemischen Eigenschaften und Position der Schutzgruppe

Um weiter zu charakterisieren, was die Hemmwirkung von Lys[Z(NO₂)]-Dipeptiden bedingt, wurden verschiedene Dipeptidderivate untersucht, die sich in der Art und Position der Schutzgruppe unterschieden. Vergleichbar zu Daten von Lys[Z(NO₂)]-Val und Val-Lys[Z(NO₂)], zeigten auch die Dipeptidderivate Lys(Z)-Ala und Ala-Lys(Z) mit einem Benzoyloxycarbonyl-Rest an der ε-Aminogruppe von Lysin (Abbildung 3-35) eine spezifische Interaktion mit PEPT2 mit K_i-Werten von 23 ± 6 und 9 ± 2 μM (Tabelle 3-12).

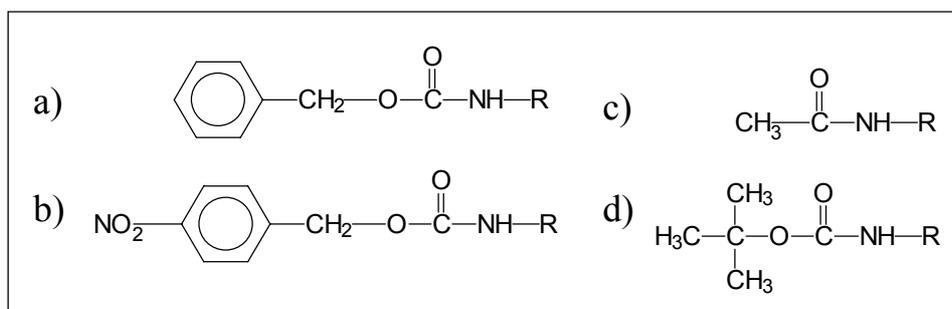


Abbildung 3-35. Strukturen der Schutzgruppen Z, Z(NO₂), Ac und Boc.

Strukturen der Schutzgruppen a) Z, b) Z(NO₂), c) Ac und d) Boc an der ε-Aminogruppe eines Lysins (-NH-R).

Auch hier zeigten lediglich die Dipeptide mit der Schutzgruppe an C-terminaler Position einen Einwärtsstrom an PEPT2 exprimierenden Oozyten, wohingegen Lys(Z)-Ala in einer Konzentration von 5 mM keinen Einwärtsstrom induzierte, aber in der Lage war, den durch 5 mM Gly-Gln-induzierten Strom bis auf 2% zu inhibieren (Tabelle 3-12).

Substanz	K _i (μM)	% I _{Gly-Gln}	Inhibition von I _{Gly-Gln}
Lys(Z)-Ala	23 ± 6	0	+
Ala-Lys(Z)	9 ± 2	82	-
Orn(Z)-Ala	26 ± 10	65	-
Lys(Ac)-Ala	64 ± 7	102	-
Lys(Boc)-Ala	26 ± 8	0	+

Tabelle 3-12. Interaktion von Dipeptidderivaten mit PEPT2.

Apparente K_i-Werte ± SEM wurden aus den IC₅₀-Werten errechnet. Der prozentuale I_{Gly-Gln} wurde aus den I-V-Beziehungen entnommen und repräsentiert den durch 5 mM der Testsubstanz im Verhältnis zu 5 mM Gly-Gln bei einem Membranpotential von -100 mV hervorgerufenen Strom. +/- zeigt an, ob die Testsubstanz in der Lage war, den durch 5 mM Gly-Gln hervorgerufenen Einwärtsstrom signifikant zu inhibieren.

Beim Vergleich der Z- mit den Z(NO₂)-substituierten Derivaten wird deutlich, dass bereits die Benzyloxycarbonyl-Gruppe ausreichte, um ein Dipeptid wie Lys-Ala in ein nicht-transportierbares Derivat zu überführen. Eine zusätzliche NO₂-Gruppe im Benzylring der Z(NO₂)-Gruppe führte zu einer weiteren, hier 10-fachen Affinitätserhöhung.

Um zu untersuchen, ob die Z-Gruppe für die inhibitorische Wirkung dieser Substanzgruppe an der ε-Aminogruppe lokalisiert sein muss, wurde das Dipeptidderivat Orn(Z)-Ala untersucht. Im Vergleich zu Lysin ist die Seitenkette des Ornithins um eine CH₂-Einheit kürzer, weshalb die Z-Gruppe hier am δ-C-Atom lokalisiert ist. Der K_i-Wert für Orn(Z)-Ala ist mit $26 \pm 10 \mu\text{M}$ vergleichbar mit dem für Lys(Z)-Ala (Tabelle 3-12). Trotz ihrer Ähnlichkeiten in den Affinitäten unterscheiden sich Lys(Z)-Ala und Orn(Z)-Ala jedoch in ihren elektrophysiologischen Charakteristika. Die Perfusion von PEPT2-Oozyten mit 5 mM Orn(Z)-Ala induzierte 65% der Gly-Gln-Ströme, was einen elektrogenen Transport über PEPT2 anzeigt. Damit ist die Länge der Aminosäure-Seitenkette des Lysins vermutlich entscheidend für die Konvertierung eines Dipeptides in einen Inhibitor.

Neben der Position der Z oder Z(NO₂)-Gruppe im Dipeptid und der Länge der Aminosäureseitenkette wurde der Einfluss der physikochemischen Eigenschaften der Schutzgruppen untersucht, die für ein inhibitorisches Dipeptid notwendig sind. Dazu wurden mit Lys(Ac)-Ala und Lys(Boc)-Ala zwei weitere Lys-Ala Derivate eingesetzt, die sich in ihrer ε-Aminoschutzgruppe unterschieden (Abbildung 3-35). Der für Lys(Ac)-Ala an PEPT2 ermittelte K_i-Wert lag bei $64 \pm 7 \mu\text{M}$ und der für Lys(Boc)-Ala bei $26 \pm 8 \mu\text{M}$ (Tabelle 3-12). Die aus der Elektrophysiologie erhaltenen Daten zeigten jedoch, dass Lys(Ac)-Ala von PEPT2 elektrogen transportiert wird ($102 \% I_{\text{Gly-Gln}}$), im Gegensatz zu Lys(Boc)-Ala, das selbst keinen Strom hervor rief, jedoch den durch 5 mM Gly-Gln induzierten Strom vollständig hemmte. Hiermit konnte gezeigt werden, dass auch die Größe und der hydrophobe Charakter der Schutzgruppe das Inhibitionspotential der Lys-Ala-Derivate beeinflusst.

Optimierung der Lysin-Dipeptidderivate für die Inhibition von PEPT2

Ausgehend von den bisher erhaltenen Daten zu den Effekten unterschiedlicher Schutzgruppen und ihrer Position in der Aminosäureseitenkette von Peptiden wurden eine Reihe weiterer neuartiger Derivate untersucht, die sich von Lys-Lys ableiten. Diese Derivate besaßen entweder eine Z- oder eine Z(NO₂)-Funktion an der ε-NH₂-Gruppe, woraus die Derivate Lys(Z)-Lys, Lys(Z)-Lys(Z) und Lys(Z)-Lys[Z(NO₂)] (LZLZN) resultierten. Tabelle 3-13 und Abbildung 3-36 fassen die Daten zu ihren Transportcharakteristika an PEPT2 exprimierenden Hefen und Oozyten zusammen.

Substanz	K_i (μM)
Lys-Lys	43 ± 9
Lys(Z)-Lys	0.8 ± 0.1
Lys(Z)-Lys(Z)	0.2 ± 0.1
Lys(Z)-Lys[Z(NO ₂)]	0.04 ± 0.02

Tabelle 3-13. K_i -Werte für die Interaktion von Derivaten des Dipeptids Lys-Lys mit PEPT2.

Apparente K_i -Werte \pm SEM wurden aus den IC_{50} -Werten für die konzentrations-abhängige Hemmung der [³H]-D-Phe-Ala Aufnahme in PEPT2 exprimierende *P. pastoris* Hefen errechnet.

Wie bereits aus den bisherigen Untersuchungen erwartet werden konnte, erhöhte eine Z- oder Z(NO₂)-Gruppe die Affinität zu PEPT2 dramatisch. Die Affinität des Dipeptids Lys-Lys von $43 \pm 9 \mu\text{M}$ konnte schrittweise mehr als 1000-fach auf einen K_i -Wert von $0,04 \pm 0,02 \mu\text{M}$ für LZLZN und damit in den nanomolaren Bereich gesteigert werden. Dieser K_i -Wert stellt die höchste Affinität dar, die bisher für einen Liganden von PEPT2 gemessen werden konnte.

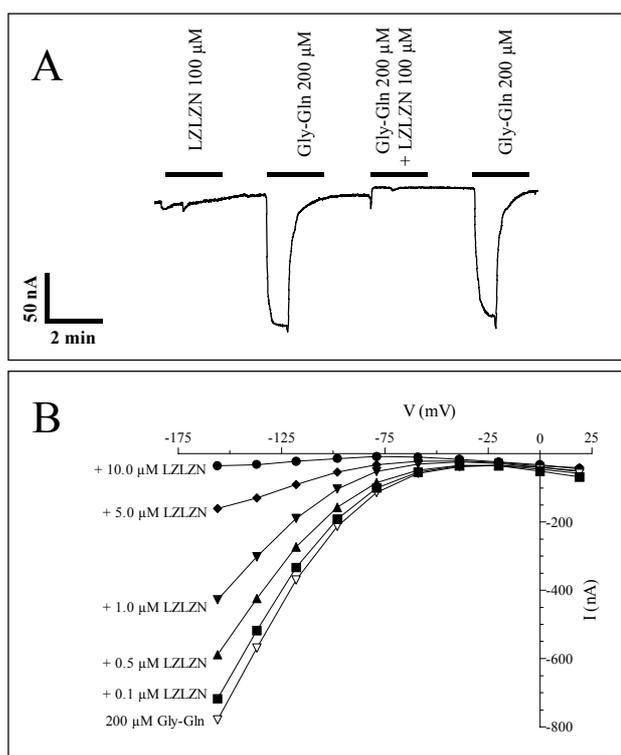


Abbildung 3-36. Elektrophysiologische Charakterisierung von Lys(Z)-Lys[Z(NO₂)] an PEPT2 exprimierenden Oozyten.

A. Eine typische Aufnahme ($n=2-3$) von Substrat-induzierten Einwärtsströmen in PEPT2 exprimierenden Oozyten in Gegenwart von 200 μM Gly-Gln allein und/oder 100 μM Lys(Z)-Lys[Z(NO₂)]. Oozyten waren auf -60 mV Membranpotential geklemmt und in Barth-Lösung (pH 6,5) perfundiert.

B. Strom-Spannungs-Beziehungen wurden über TEVC-Technik an PEPT2 exprimierenden Oozyten bestimmt. Die Oozyten wurden mit Barth-Lösung (pH 6,5) mit oder ohne 0,2 mM Gly-Gln und/oder steigenden Konzentrationen von Lys(Z)-Lys[Z(NO₂)] (0,1-10 μM) perfundiert.

Lys(Z)-Lys[Z(NO₂)] zeigte an PEPT2-Oozyten keinen Einwärtsstrom, hemmte jedoch konzentrations-abhängig und reversibel den Gly-Gln induzierten Strom (Abbildung 3-36).

Insgesamt konnte hiermit gezeigt werden, dass Dipeptide, die einen Lysin-Rest enthalten, durch das Anfügen einer Schutzgruppe mit einer bestimmten Größe und Hydrophobizität an der ϵ -Position der Seitenkette in einen hochaffinen, nicht-transportierbaren, kompetitiven und reversibel interagierenden Inhibitor des Peptidtransporters PEPT2 verwandelt werden können.

3.2.6 Diskussion der Befunde zu den Struktur-Affinitäts-Beziehungen (3.2)

Studien zur Substratspezifität der Peptidtransporter wurden bislang überwiegend durch Verdrängungsstudien an Bürstensaummembran-Vesikeln aus dem Dünndarm und der Niere bzw. mit Zelllinien und in Perfusionsstudien an Darm und Niere durchgeführt (Daniel, H. et al., 1992; Ganapathy, V. et al., 1981; Lister, N. et al., 1995; Thwaites, D. T. et al., 1994). Detaillierte und umfassende Untersuchungen zu Substrat-Affinitätsbeziehungen, wie es sie z.B. für den renalen Peptidtransporter mit Vesikeln bereits gab (Daniel, H. & Adibi, S. A., 1994; Daniel, H. et al., 1992), waren für die klonierten Transporter PEPT1 und PEPT2 bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht durchgeführt worden. Die Annahmen zur Substratspezifität von PEPT1 und PEPT2 basierten daher entweder auf der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klonierten Transporter oder auf Ergebnissen aus methodisch sehr unterschiedlichen Ansätzen an den klonierten Transportern. Für verschiedene Peptide konnte aber bereits gezeigt werden, dass bestimmte Parameter, die charakteristisch für ein bestimmtes Zellsystem sind, wie das Membranpotential, einen Einfluss auf die Affinitäten von Dipeptiden zu den Peptidtransportern besitzen und daher allgemeingültige Aussagen nicht zulässig sind (Amasheh, S. et al., 1997a; Amasheh, S. et al., 1997b).

Aufgrund der Bedeutung von PEPT1 für die intestinale Resorption verschiedener Peptidmimetika und damit deren oraler Bioverfügbarkeit gab es bereits Untersuchungen, in denen durch Computer gestütztes Modeling die strukturellen Anforderungen und molekularen Determinanten von Substraten für eine Interaktion mit dem Peptidtransporter erklärt werden sollten (Li, J. & Hidalgo, I. J., 1996; Swaan, P. W. & Tukker, J. J., 1997). Als limitierend für die Aussagekraft dieser Studien ist allerdings anzusehen, dass zum einen die Anzahl der verwendeten Modellverbindungen sehr gering war und des weiteren die Affinitäten, die in die Berechnungen eingingen, in methodisch sehr unterschiedlichen Studien und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erhoben wurden.

Entsprechendes gilt auch für die kürzlich publizierten Befunde, in denen unter dem Aspekt der Bedeutung des intestinalen Peptidtransporters PEPT1 für die orale Bioverfügbarkeit von Pharmaka durch vergleichende Konformationsanalyse von Substraten ein 'Template' für die Substraterkennung durch PEPT1 postuliert wurde. Dieses 'Template' basiert auf den Affinitätswerten aus mehr als 10 methodisch unterschiedlichen Untersuchungen und nimmt, trotz des Anspruchs ein 'Template' für PEPT1 darzustellen, keine Differenzierung der Daten nach PEPT1 oder PEPT2 vor (Bailey, et al., 2000).

Daher wurden hier Untersuchungen zu **Struktur-Affinitätsbeziehungen** der beiden Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 durchgeführt, um einen umfassenden und direkten Vergleich der beiden Transporter unter standardisierten Bedingungen zu ermöglichen. Das in 3.1 entwickelte Screeningsystem, das auf der Expression der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 in *Pichia pastoris* basiert, wurde dazu genutzt, um in großem Umfang Verbindungen auf ihre Interaktion mit den Carriern zu untersuchen. Durch elektrophysiologische Untersuchungen an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden *X. laevis*-Oozyten war es darüber hinaus möglich, zwischen der reinen Interaktion der Verbindungen mit der Substratbindungsstelle der Peptidtransporter und dem tatsächlichen elektrogenen Transport zu differenzieren. Die so generierten Daten können als Grundlage und Datenpool dienen, um über Computer-gestütztes molekulares Modeling, z.B. durch 3D-QSAR (dreidimensionale quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen) die strukturellen Eigenschaften der Substrat-Transporter-Interaktion zu ermitteln.

Neben der Anzahl der eingesetzten Substanzen unterschieden sich diese vergleichenden Untersuchungen von einer kürzlich erschienen Arbeit (Terada, T. et al., 2000) vor allem durch drei wesentliche Aspekte:

- ◆ Für alle geprüften Verbindungen wurde nicht nur die Bindung an die Transporter und die Verdrängung eines radioaktiv markierten Dipeptids von der Substratbindungsstelle von PEPT1 und PEPT2 bestimmt, sondern es wurden auch alle Substanzen durch elektrophysiologische Messungen auf ihren elektrogenen Transport hin untersucht.
- ◆ Durch die gleichen Expressionssysteme für PEPT1 und PEPT2 war es möglich, die Transporter unter identischen experimentellen Bedingungen zu charakterisieren.
- ◆ Durch das breite Spektrum an untersuchten Dipeptiden konnten entscheidende Einflussfaktoren wie Hydrophobizität, Ladung oder Größe der Aminosäuren-Seitenketten auf die Transportcharakteristika analysiert werden.

Anhand von mehr als 100 Dipeptiden und Dipeptidderivaten wurden verschiedene Faktoren untersucht, die die Transportcharakteristika von PEPT1 und PEPT2 bestimmen:

- Einfluss einer geladenen Aminosäureseitenkette. Dipeptide mit sauren Aminosäuren führten zu einem größeren Abfall der Affinität bei PEPT2 als bei PEPT1 im Vergleich zu ungeladenen Peptiden und damit zu einem Ausgleich der Affinitätsunterschiede zwischen den beiden Carriern. Hierbei wurden jedoch negativ geladene Seitenketten generell weniger gut toleriert, wenn sie an carboxyterminaler Position im Dipeptid standen.

• Einfluss der Hydrophobizität der Aminosäureseitenkette. Im Gegensatz zu Untersuchungen am renalen Peptidtransporter (Daniel, H. et al., 1992), die durch Verwendung von Glycin-Dipeptiden zeigten, dass die Affinität eines Substrates im wesentlichen von der Hydrophobizität der Aminosäuren-Seitenketten im Peptid bestimmt wird, konnte in diesen Untersuchungen mit Alanin-Dipeptiden kein eindeutiger Zusammenhang festgestellt werden. Eine gewisse Hydrophobizität der Seitenketten scheint zwar eine essentielle Voraussetzung für eine hochaffine Interaktion, allerdings steigt mit zunehmender Hydrophobizität die Affinität nicht in gleichem Maß. Eine Alkylgruppe in der Seitenkette führt, unabhängig von der Länge und Größe der Gruppe, zu einer Zunahme der Affinität verglichen zu einem nicht-alkylierten Glycin-Rest im Peptid. Eine aromatische Seitenkette besitzt vor allem am Aminoterminus einen Affinitäts-erhöhenden Einfluss. Im Unterschied dazu bestätigen die Daten für Pro-Xaa-Dipeptide frühere Annahmen, dass mit steigender Seitenkettenlänge oder durch einen aromatischen Aminosäurenrest und damit zunehmender Hydrophobizität sowohl bei PEPT1 als auch bei PEPT2 ein Anstieg der Affinität dieser Verbindungen zum Transporter erhalten werden kann.

• Einfluss der Stereoisomerie von Aminosäuren in Dipeptiden. Eine Reihe von LL-, DL-LD- und DD-Isomeren von Dipeptiden und Dipeptidderivaten wurde eingesetzt, um zum einen die für die Peptidtransporter bereits gezeigte Enantioselektivität weiter zu untersuchen und zum anderen mögliche Unterschiede zwischen PEPT1 und PEPT2 aufzuzeigen. Generell zeigten die Ergebnisse, dass die früheren Annahmen zur Stereoselektivität der Peptidtransporter bei natürlichen Dipeptiden und ihren Stereoisomeren auch für PEPT1 und PEPT2 gelten (Daniel, H. et al., 1992; Li, J. et al., 1998; Lister, N. et al., 1995). Die Interaktion von einzelnen Stereoisomeren mit den Carriern hängt jedoch stark von der jeweiligen Aminosäuresequenz des Dipeptids ab, was vor allem im Fall der LD-konfigurierten Isomere deutlich wird.

Der Einfluss der chemischen Struktur der untersuchten Substrate war dabei noch größer für Dipeptidderivate, bei denen die ursprüngliche Dipeptidstruktur z.B. durch Seitenkettenmodifikationen verändert wurde. Für diese Verbindungen erscheint es daher noch schwieriger zu sein, den Einfluss der Konfiguration der Stereoisomere auf die Interaktion mit dem Peptidtransporter vorherzusagen.

Obwohl PEPT1 und PEPT2 eine hohe Spezifität gegenüber der LL-Form von Substraten besitzen, zeigen alle Stereoisomere von Dipeptidderivaten mit einer großen hydrophoben Seitenkette in ihrer Sequenz eine erstaunlich gute Affinität zu den Carriern. Sowohl LD-

und was noch bemerkenswerter ist, sogar DD-konfigurierte Isomere können noch beachtliche Affinitäten zu den Carriern aufweisen. Die K_i -Werte z.B. von D-Ala-D-Asp(OBzl) mit 1,32 für PEPT1 und 0,69 für PEPT2 sind nur unwesentlich niedriger als die der DL-Isomere.

Die Unterschiede der Transportcharakteristika der einzelnen Stereoisomere beruhen dabei zunächst auf unterschiedlichen Affinitäten gegenüber den Transportern, was durch Dipeptidderivate wie den verschiedenen Isomeren von Lys(Z)-Ala deutlich wird. Diese induzieren sowohl bei PEPT1- als auch bei PEPT2-exprimierenden Oozyten keinen Einwärtsstrom, werden also nicht elektrogen transportiert. Sie zeigen aber in der Verdrängung von [3 H]-D-Phe-Ala von der Substratbindungsstelle eine stereospezifische Interaktion mit den Carriern.

Allerdings lässt sich auch ein Einfluss der Stereoisomere von Aminosäuren direkt auf den Transport nachweisen. Dabei scheint vor allem die carboxyterminale Aminosäure im Dipeptid eine Rolle zu spielen. Für das LD-Isomer von Ala-Ala wurde bei PEPT1 selbst mit 100 mM Substrat, also einer Konzentration, bei der nach dem K_i -Wert von 6,12 mM die maximale Transportgeschwindigkeit erreicht sein sollte, nur etwa 75% Einwärtsstrom im Vergleich zum LL-Isomer oder Gly-Gln erhalten.

Ein D-Isomer einer Aminosäure im Peptid besitzt damit nicht nur einen Einfluss auf die Substraterkennung durch die Transporter, sondern behindert vermutlich darüber hinaus auch die Konformationsänderungen der Carrier, die während eines Transportzyklus für die Translokation eines Substrates notwendig sind. Das führt vermutlich zu einem niedrigeren Turnover der Transporter und einer verlangsamten Reorientierung der Substratbindungsstelle zur Außenseite der Zellmembran.

- *Einfluss der Aminosäureseitenketten auf den elektrogenen Transport.* Unabhängig von der Variabilität der Aminosäuren-Seitenkette werden alle untersuchten Dipeptide, die in LL-Konfiguration vorliegen, von beiden Carriern als Substrate erkannt und elektrogen über PEPT1 und PEPT2 in die Zellen aufgenommen. Das gilt hierbei auch für solche Dipeptide, die nicht-proteinogene Aminosäuren besitzen, wie z.B. Pípecolinsäure oder Norleucin.

Die K_i -Werte für die untersuchten Dipeptide umfassten im Falle von PEPT1 einen Bereich von 0,08 bis 8,4 mM und variierten für PEPT2 von 0,01 bis 4,2 mM. Die apparenten Affinitäten im Falle von PEPT2 waren dabei bis zu 11-fach höher als die, die für PEPT1 erhalten wurden.

Die Ergebnisse für verschiedene der untersuchten Dipeptide an PEPT1 zeigen eine gute Übereinstimmung zu kürzlich publizierten Daten für die Interaktion dieser Peptide mit dem Peptidtransporter aus Caco2-Zellen (Brandsch, M. et al., 1999). Das unterstreicht wiederum die Eignung der transgenen Hefe als Screeningsystem zur Untersuchung der Peptidtransporter.

Für den Vergleich der Transportcharakteristika von Peptiden und Peptidderivaten zwischen PEPT1 und PEPT2 konnte somit gezeigt werden, dass die beiden Transporter zwar ähnliche aber nicht identische Anforderungen an ihre Substrate besitzen.

Um diese Unterschiede herauszuarbeiten, wurde ein Ansatz gewählt, bei dem sogenannte Minimalsubstrate zum Einsatz kamen.

Im Gegensatz zum intestinalen Peptidtransporter PEPT1 gab es für den klonierten PEPT2 bisher noch keine systematischen Studien, die die **minimalen strukturellen Anforderungen** für die Erkennung und den Transport von Substraten ermittelten. Für PEPT1 liegen Studien zu seiner Substratspezifität vor, und deren Daten erlaubten erste Modelle zur Erkennung von Substraten zu postulieren (Döring, F. et al., 1998; Döring, F. et al., 1998; Borner, V. et al., 1998; Brandsch, M. et al., 1999; Temple, C. S. et al., 1998; Meredith, D. et al., 1998). Da gezeigt werden konnte, dass PEPT2 zwar ähnliche aber nicht identische Anforderungen an Substrate wie PEPT1 besitzt und PEPT2 durch das Vorhandensein in zahlreichen weiteren Geweben neben der Niere auch pharmakologisch ein interessantes Target darstellt, wurden hier systematisch die minimalen strukturellen Merkmale von Substraten erarbeitet. Dazu diente zum einen die Synthese neuartiger Aminosäuren- und Peptidderivate (Synthese durch Dr. B. Hartrodt, Martin-Luther-Universität Halle) und deren Untersuchung in Verdrängungsstudien an PEPT2 exprimierenden *P. pastoris* Zellen andererseits elektrophysiologische Untersuchungen an PEPT2 exprimierenden *X. laevis* Oozyten.

Im Gegensatz zu PEPT1 ist PEPT2 nicht in der Lage, ω -Aminofettsäuren wie die 5-Aminopentansäure (5-APA) zu transportieren. Durch die Einführung einer Carbonylgruppe in das Rückgrat von 5-APA, was zur 5-Amino-4-oxopentansäure führt, erhält man jedoch ein Substrat, das eine Affinität und elektrogenen Transport zeigt, wie Dipeptide. Somit konnte hier erstmals gezeigt werden, dass diese Carbonylfunktion eine essentielle Rolle in der Substraterkennung durch PEPT2 spielt.

Die Ergebnisse für die ω -Aminosäuren-Alanin-Dipeptide zeigen darüber hinaus, dass PEPT2 auch spezifische Anforderungen an die *Positionierung* der freien Aminogruppe im intramolekularen Abstand zur Carbonylgruppe besitzt. Für eine hochaffine Interaktion und den Transport eines Substrates dürfen die Aminogruppe und die Carbonylgruppe des Rückgrates nicht mehr als eine oder zwei Methylengruppen voneinander entfernt sein.

Durch den Einsatz von Alanin- ω -Aminosäuren wurden außerdem detaillierte Informationen zum Einfluss der *Position der terminalen Carboxylgruppe* für eine Interaktion mit PEPT2 erhalten. Ala-5-APA, das in seiner Gesamtlänge vergleichbar zu einem Tripeptid ist, bei dem allerdings eine zweite Peptidbindung fehlt, wird von PEPT2 mit hoher Affinität elektrogen transportiert. Da Tripeptide von PEPT2 ebenso wie Dipeptide als Substrat erkannt werden, konnte damit gezeigt werden, dass die zweite Peptidbindung nicht für eine hohe Affinität und elektrogenen Transport benötigt wird.

Ala-anilide mit verschiedenen Substituenten an para-Position des Phenylrings weisen sehr unterschiedliche Affinitäten und Transportcharakteristika auf. Die Analyse der Bedeutung der unterschiedlichen Substituenten am Phenylring zeigte, dass die als Swain-Lupton-Konstanten bezeichneten und zur Beschreibung des elektrischen Feldes eingesetzten *F*-Werte für diese Substituenten mit den Affinitäten der entsprechenden Verbindungen für die Interaktion mit PEPT2 korrelieren. Die Elektronendichte am aromatischen Ringsystem, die durch die unterschiedlichen mesomeren und induktiven Eigenschaften der para-Substituenten hervorgerufen wird, stellt damit eine kritische Determinante für die Affinitäten der Alanin-Anilide dar.

Für diese Gruppe von Verbindungen kann daraus geschlossen werden, dass für einen Transport der para-Substituent relativ klein und ungeladen sein muss und eine negativ geladene Gruppe an dieser fixierten Position im Phenylring eine Interaktion mit der Substratbindungsdomäne von PEPT2 verhindert. Da die Carboxylgruppe elektrostatisch mit Aminosäuren-Seitenketten des Transporterproteins an dieser Position interagieren könnte, deutet dies auf eine möglicherweise kritische funktionelle Proteindomäne von PEPT2 hin, die nur hydrophobe Interaktionen toleriert.

Der wesentliche Unterschied zwischen den Alanin- ω -Aminosäuren, die mit hoher Affinität elektrogen transportiert werden und der Ala-4-aminobenzoesäure liegt in der Alkylkette der ω -Aminosäuren. Diese ermöglicht aufgrund ihrer Flexibilität in der Konformation die erforderliche Positionierung der Carboxylgruppe in der Substratbindungsdomäne. In der eher starren Konformation der Ala-4-aminobenzoesäure ist die COO⁻-Gruppe sterisch so

fixiert, dass eine Interaktion mit einer entscheidenden Domäne im PEPT2-Protein verhindert wird.

Die spezifischen Anforderungen dieser putativen Proteindomäne wurden mit der Ala-3 und der Ala-2-aminobenzoesäure untersucht. Da aufgrund der Veränderung der Position der COO⁻-Gruppe im Ring deutliche Effekte auf die Affinität erhalten wurden, kann das als ein Hinweis auf eine wichtige Region in der Substratbindungsdomäne von PEPT2 gelten. Der Befund, dass nur die meta-substituierte Form elektrogen transportiert wird, kann durch die ähnliche sterische Position der Carboxylgruppe verglichen mit Tripeptiden erklärt werden. Die Translokation von Substraten, die neben der freien Aminogruppe und der Carbonylgruppe des Rückgrates eine terminale Carboxylgruppe besitzen, ist damit nur möglich, wenn die COO⁻-Gruppe in eine bestimmte Position in der Substratbindungstasche gelangt, unabhängig von der Affinität des Substrates.

Über einen Mutageneseansatz zur Untersuchung von PEPT2 könnten diese Substanzen gezielt dazu eingesetzt werden, um diesen entscheidenden Aminosäurenrest in der Substratbindungsdomäne von PEPT2 zu identifizieren.

Ein überraschender Befund war, dass Ala-4-nitroanilid zwar mit hoher Affinität mit PEPT2 interagiert, allerdings nicht über PEPT2 in die Zellen transportiert wird. Andererseits konnte für Ala-4-nitroanilid an Caco2-Zellen und PEPT1 exprimierenden *X. laevis* Oozyten eine hochaffine Interaktion und elektrogener Transport gezeigt werden (Borner, V. et al., 1998). Dieses unterstreicht die markanten Unterschiede zwischen PEPT2 und PEPT1 in der Fähigkeit zum elektrogenen Transport dieser Substanzklasse trotz ihrer Ähnlichkeiten in der Substraterkennung. Mit Ala-4-nitroanilid wurde ein für PEPT2 -nicht aber für PEPT1- spezifischer Inhibitor erhalten, der, zusammen mit den unabhängig davon identifizierten und charakterisierten Lys[Z(NO₂)]-Derivaten als Blocker der Peptidtransporter, eine differenzierte Analyse ihrer Funktion und physiologischer Bedeutung erlaubt.

Durch neuartige Aminosäure-Anilide und modifizierte Dipeptide aus einer N- oder C-terminalen α -Aminosäure und einer ω -Aminosäure an gegenüberliegender Position konnten hier die minimalen strukturellen und chemischen Anforderungen für die Substraterkennung und den Transport durch PEPT2 definiert werden. Diese Anforderungen an Substrate sind die essentielle Länge des Rückgrates, die wichtigen funktionellen Gruppen sowie ihre räumliche Anordnung innerhalb der Substratbindungsdomäne von PEPT2.

Die Verfügbarkeit eines spezifischen, **hochaffinen Inhibitors** gilt als wesentliche Voraussetzung, die bisher experimentell noch unzureichend geklärte quantitative Bedeutung der Peptidtransporter am Aminosäuretransport in Dipeptidform im Dünndarm und der Konservierung von α -Aminostickstoff durch den renalen Peptidtransporter zu untersuchen. Weiterhin kann ein solcher Inhibitor auch als essentielle Voraussetzung angesehen werden, mit dem es möglich wäre, erstmals genaue Informationen über die Lokalisierung und die Struktur der Substratbindungsdomäne der Transporter zu erhalten.

Für verschiedene andere Transportsysteme wie z.B. den Natrium/Glucose-Cotransporter SGLT1 ist ein solcher Inhibitor seit langem bekannt und wurde für verschiedenste Fragestellungen zur Untersuchung des Transporters erfolgreich eingesetzt (Wielert-Badt, S. et al., 2000).

Ausgehend von der Interaktion von Dipeptiden, die in ihren Seitenketten unterschiedliche Modifikationen enthielten, wurden systematisch verschiedene Lysyl-Abkömmlinge synthetisiert und transportphysiologisch charakterisiert. Hierdurch konnten für die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 erstmals spezifische, hochaffine und kompetitive Inhibitoren identifiziert und ihre Interaktion mit den Transportproteinen studiert werden. Die Charakterisierung der Inhibitoren erfolgte dabei an 3 unterschiedlichen Expressionssystemen (PEPT1 und PEPT2 exprimierende *Pichia pastoris* Hefezellen und *X. laevis* Oozyten sowie Caco2-Zellen) sowohl über Verdrängungsexperimente zur Bestimmung der Affinitäten als auch durch elektrophysiologische Untersuchungen sowie durch HPLC-Messungen zum quantitativen Nachweis der Inhibitoren.

Ausgehend von dem zunächst für PEPT1 identifizierten Lys[Z(NO₂)]-Pro, als erstem hochaffinen und kompetitiven Inhibitor, wurden für den Peptidtransporter PEPT2 weitere strukturelle und funktionelle Studien zur Optimierung der Inhibitoren durchgeführt.

Aufgrund der vorausgegangenen Studien war bekannt, dass die physikochemischen Eigenschaften von Aminosäureseitenketten in Dipeptiden wie Hydrophobizität und Ladung die Substrataffinität beeinflussen können. Daher wurden verschiedene Verbindungen mit unterschiedlichen Seitengruppen eingesetzt, für die eine höhere Affinität und damit der Erhalt noch besserer Inhibitoren erwartet wurde.

Generell konnte gezeigt werden, dass Dipeptide, die ein Lysin enthalten, durch die Blockierung der ϵ -Aminogruppe eines N-terminalen Lysin-Restes entweder durch eine Boc-, Z-, oder für eine noch höhere Affinität durch eine Z(NO₂)-Schutzgruppe von einem transportierbaren Substrat in einen effektiven Inhibitor der Peptidtransporter verwandelt

werden können. Wenn sich ein solcher modifizierter Lysin-Rest jedoch in C-terminaler Position eines Dipeptids befindet, bleibt die Fähigkeit dieses Substrats zu einem elektrogeneren Transport erhalten. Das deutet darauf hin, dass zwei unterschiedliche Domänen innerhalb der Substratbindungstasche der Peptidtransporter mit den Seitenketten von Dipeptiden und Derivaten interagieren.

Die aminoterminalen Seitenkette, die die Z- oder Z(NO₂)-Gruppe trägt, muss vermutlich eine ausreichende Länge besitzen, da durch eine Verkürzung der Seitenkette des Lysins um eine CH₂-Einheit zu Ornithin die inhibitorische Wirkung dieser Dipeptidderivate verloren geht. Vermutlich interagiert eine spezifische Aminosäuren-Seitenkette im PEPT1- oder PEPT2-Protein mit der aminoterminalen Z(NO₂)-Gruppe in diesen Dipeptidderivaten und verhindert somit die Konformationsänderung des Peptidtransporterproteins. Entscheidend dafür scheint die Größe der Schutzgruppe oder eine hydrophobe Interaktion des Ring-systems mit Aminosäureseitenketten in der Substratbindungstasche der Peptidtransporterproteine zu sein.

Im Gegensatz zur Substratbindungstasche für die aminoterminalen Aminosäure in Dipeptiden, scheint die Bindungstasche für die carboxyterminale Aminosäure weniger restriktiv für Seitenkettenmodifikationen von Substraten und ihren Transport zu sein. Allerdings beeinflusst eine Modifizierung der carboxyterminalen Seitenkette entscheidend die Affinität. So wurde mit Lys(Z)-Lys[Z(NO₂)] ein Substrat erhalten, das mit einem K_i-Wert von 40 nM die höchste bisher für einen Liganden von PEPT2 bestimmte Affinität zeigt.

Dass die Modifizierung der ε-Aminogruppe eines Lysin-Restes ein vielversprechender Ansatz für die Generierung von Inhibitoren des Peptidtransporters war, wurde auch durch eine kürzlich erschienene Studie (Abe, H. et al., 1999) belegt. Hier überführte die Koppelung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein-Isothiocyanat an die ε-Aminogruppe eines C-terminalen Lysin-Restes (Val-Lys(Flu)) dieses Dipeptid in einen Inhibitor der Aufnahme von Gly-Sar mit hohen Affinitäten zu PEPT1 in Caco-2-Zellen. Diese Studien waren allerdings sehr widersprüchlich in Bezug auf die Spezifität der Interaktion mit PEPT1. Zum einen war der Influx des Derivates nicht durch 10 mM des Dipeptides Gly-Sar hemmbar und zum anderen kam es auch zu einer unspezifischen intrazellulären Akkumulation dieses Derivates. Darüber hinaus war die Aufnahme auch dann gesteigert, wenn es durch das Protonophor Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) zu einer Zerstörung des Protonengradienten als treibende Kraft des Peptidtransportes kam. Gly-Sar dagegen wurde in Gegenwart von CCCP, wie erwartet, nicht mehr transportiert.

Eine weitere Studie zeigt, dass die Substanz 4-Aminomethylbenzoesäure (Meredith, D. et al., 1998) ein nicht translozierter kompetitiver Inhibitor von PEPT1 darstellt. Allerdings besitzt diese Substanz eine Affinität, die um mehr als das 10-fache geringer als die von normalen Dipeptiden ist, weshalb es für den Einsatz als Inhibitor und weitergehende Untersuchungen als ungeeignet erscheint.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Anfügen einer Z-Gruppe an die ϵ -Aminogruppe des Lysin-Restes in Lys-Xaa-Dipeptide a) eine Umwandlung von normal transportierten Substraten in nicht-transportierte Derivate bewirkt und b) diese Derivate eine bedeutend höhere Affinität zu den Peptidtransportern PEPT1 und PEPT2 aufweisen. Das Anfügen einer NO_2 -Funktion an den hydrophoben Ring der Z-Gruppe erhöht lediglich die Affinität zu den Transportern, unter Beibehaltung ihrer Unfähigkeit transportiert zu werden. Die hier vorgestellten Lys[Z(NO_2)]-Derivate stellen damit die ersten spezifischen Inhibitoren der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 dar, die mit hoher Affinität und reversibel an die Transporter sowohl mit der äußeren als auch der inneren Substrat-Bindungsstelle interagieren können.

Für die Peptidtransporter ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, um mit einem solchen Inhibitor neue Einblicke in Funktionsweise und Struktur dieser Proteine zu erhalten:

- Konformations- und Pharmakophoranalyse der Peptidtransporter: Durch den Einsatz eines radioaktiv markierten Inhibitors lassen sich Bindungsstudien an unterschiedlichen Zellsystemen vornehmen. Dadurch wäre es dann möglich, z.B. die Transporterzahl pro Zelle und weiterhin Substrattransport pro Transportermolekül zu bestimmen, wodurch weitere umfassende kinetische Untersuchungen ermöglicht werden.

Zum anderen könnten durch die Einführung einer aktivierbaren Gruppe in das Inhibitor-molekül über Cross-Linking-Experimente und Photoaffinitätsmarkierung eine kovalente Bindung von Substrat an den Transporter erzielt werden. Durch anschließenden proteolytischen Verdau und massenspektrometrische Analyse der hierbei entstandenen Peptidfragmente ließen sich Aussagen zu den Bereichen im Carrierprotein treffen, die die Substrat-bindungsdomäne bilden.

Gerade hierfür erscheint auch das *P. pastoris*-System sehr gut geeignet, da zum einen große Mengen an Transporterprotein für diese Studien erzeugt werden und zum anderen ist, wie für den humanen PEPT1 hier gezeigt werden konnte, durch die Einführung eines myc-Epitops ein einfacher Nachweis des Proteins möglich und darüber hinaus mit dem 6His-Tag eine Möglichkeit zur Reinigung des Proteins gegeben.

- Elektrophysiologische Analysen der Transporter: Für Transportuntersuchungen, um z.B. den genauen Mechanismus und die einzelnen Schritte der Substrattranslokation zu ermitteln, ist die elektrophysiologische Patch-clamp-Technik mit PEPT1 oder PEPT2 exprimierenden Oozyten hervorragend geeignet. Für diese Untersuchungen ist ein geeigneter Inhibitor des Peptidtransporters jedoch eine wesentliche Voraussetzung.

Insgesamt konnten durch den Einsatz von PEPT1 und PEPT2 exprimierenden *Pichia pastoris*-Hefezellen als Screeningsystem in Kombination mit elektrophysiologischen Messungen an *X. laevis* Oozyten neue Einblicke in Funktion und Arbeitsweise der Carrier erhalten werden. Im direkten Vergleich der beiden Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 war es möglich, erstmals die unterschiedlichen minimalen Anforderungen der Carrier an ihre Substrate aufzuzeigen sowie durch eine Vielzahl von Dipeptiden und Derivaten weitere Determinanten für die Substraterkennung und den Transport zu identifizieren. Durch die Isolierung und Charakterisierung von hochaffinen Inhibitoren von PEPT1 und PEPT2 wurden darüber hinaus neue Methoden und Ansätze zur funktionellen und strukturellen Charakterisierung dieser Proteine auf molekularer und zellulärer Ebene möglich.

4 Synopse und Entwicklungsperspektiven

Das wissenschaftliche Interesse an den Peptidtransportern beruht nicht nur auf ihrer nutritiven Bedeutung im Rahmen der Resorption und Konservierung von α -Aminostickstoff durch den Transport von Di- und Tripeptiden. Vielmehr stellen die Peptidtransporter auch unter pharmakologischen Aspekten für die Entwicklung intestinal resorbierbarer und gewebespezifisch einsetzbarer Pharmaka ein interessantes Untersuchungsobjekt dar.

Verschiedene Forschungsschwerpunkte liegen daher zum einen in der Aufklärung ihrer Substratspezifität und der Entwicklung von sogenannten Leitstrukturen, über die sich die Multispezifität der Peptidtransporter, ausgehend von den 8400 physiologischen und vermutlich mehr als 50000 weiteren peptidmimetischen Substraten, erklären ließe. Andere Schwerpunkte sind die Aufklärung der Funktion der Peptidtransporterproteine und die Identifizierung von funktionellen Bereichen wie der Substratbindungsdomäne oder Bereichen, die weitere funktionelle Transportcharakteristika wie pH-Abhängigkeit oder Affinität determinieren.

Als System zur funktionellen und strukturellen Charakterisierung der Peptidtransporter konnte in dieser Arbeit die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* etabliert werden. Durch die Optimierung der Expressionsvektoren, der transgenen Hefestämme und der Kulturbedingungen konnte hierbei eine hohe funktionelle Expressionsrate der Transporter erreicht werden.

Ausgehend von der funktionellen Expression der Peptidtransporter und der Entwicklung neuer Methoden zu ihrer Untersuchung wurden verschiedene Ansätze zur Klärung von Fragen zur Struktur und Funktion der Peptidtransporter ermöglicht:

- Proteinchemische und biophysikalische Ansätze zur Untersuchung der zwei- und dreidimensionalen Struktur der Peptidtransporterproteine: Wie am Beispiel des humanen Peptidtransporters PEPT1 gezeigt wurde, lassen sich große Mengen an rekombinantem Transportprotein in *Pichia pastoris* herstellen. Die Höhe der Expression mit einem Anteil des hPEPT1-Proteins an der gesamten Membranproteinfraktion von 0,6 % ist vergleichbar zur Produktion anderer Membranproteine in *P. pastoris*. Daher erscheint das Hefesystem zur Zeit das vielversprechendste System zur Reinigung der Peptidtransporterproteine zu sein. Möglich wäre hierfür die Reinigung des Peptidtransporterproteins über Metall-Affinitätschromatographie und den C-terminal an das hPEPT1-Protein fusionierten His6-Tag. Nur durch Reindarstellung des Proteins sind letztlich Aussagen zu seiner Struktur zu treffen.

- Zufallsmutagenese zur Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen: Durch die Kombination von hefe genetischen und molekularbiologischen Methoden war es durch den Ansatz der Zufallsmutagenese möglich, neue Bereiche im hPEPT1-Protein zu identifizieren, die einen Einfluss auf funktionelle Eigenschaften des Carriers besitzen. Hierbei konnten mit dem Glycin an Position 476 und dem Isoleucin an Position 382 im hPEPT1-Protein Aminosäuren identifiziert werden, deren Mutation die pH-Abhängigkeit der Dipeptidaufnahme beeinflusst. Durch diesen Ansatz wird es somit möglich sein, verschiedene weitere Aminosäuren bzw. Bereiche im Protein zu identifizieren, die für funktionelle Charakteristika der Transporter verantwortlich sind oder als Teil der Substratbindungsdomäne fungieren.
- Einsatz als Screeningsystem für Struktur-Affinitätsbeziehungen: Aufgrund des nahezu unbegrenzt zur Verfügung stehenden Zellmaterials und der Höhe der funktionellen Expression sowie der Robustheit des Hefesystems eignen sich *Pichia pastoris* Hefezellen für die Untersuchung der Interaktion von Verbindungen mit den Peptidtransportern in großem Umfang. Hierzu wurde ein Schnelltest entwickelt, mit dem es über ein Verdrängungsexperiment möglich ist, umfassend und genau die Affinitäten von Verbindungen für ihre Interaktion mit den Peptidtransportern zu bestimmen. Dieser Assay kann folglich dazu dienen, die strukturellen Erfordernisse an PEPT1 und PEPT2-Substrate aufzuklären, weshalb er im weiteren bereits zu umfassenden funktionellen Analysen der Peptidtransporter eingesetzt wurde. Da mit diesem System darüber hinaus wesentliche Voraussetzungen zu einer möglichen vollständigen oder teilweisen Automatisierung erfüllt sind, wäre mit diesem schnellen Transporttest in großem Durchsatz auch ein Screening von Substanzbibliotheken auf Verbindungen möglich, die mit den Peptidtransportern interagieren.

Ausgehend von *Pichia pastoris* als Screeningsystem in Kombination mit Transportuntersuchungen durch elektrophysiologische Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten wurden vergleichende Studien zu Struktur-Affinitätsbeziehungen der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 durchgeführt.

Mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden ist es gelungen, sowohl für den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 als auch den renalen Peptidtransporter PEPT2 die wesentlichen Aspekte ihrer Substraterkennung auf molekularer Ebene zu determinieren. Aus der Kombination von neuen Befunden in dieser Arbeit und der Bestätigung früherer Hypothesen lassen sich daher die folgenden obligat erforderlichen und fakultativen, lediglich die

Affinität betreffenden, Eigenschaften von Substraten für ihre Erkennung durch PEPT1 und PEPT2 aufzeigen:

- (1) Eine freie endständige Aminogruppe ist eine wesentliche Voraussetzung für Substraterkennung und Transport.
- (2) Die terminale Carboxylgruppe ist nicht obligat für ein Substrat der Peptidtransporter, wenn die zweite Aminosäure im Dipeptid durch ein hydrophobes Ringsystem wie z.B. den aromatischen Phenylring von Aniliden, ersetzt wird.
- (3) Ist jedoch eine terminale Carboxylgruppe in einem Substrat vorhanden, so gilt, dass ihre sterische Anordnung im Substrat entscheidend für die Interaktion mit den Transportern ist und vergleichbar zur räumlichen Positionierung der COO⁻-Funktion in Di- und Tripeptiden sein sollte.
- (4) Der Abstand zwischen der freien Aminogruppe und der Carboxylgruppe muss mindestens der Länge einer Alkylkette aus 4 CH₂-Gruppen, also ca. 500 pm, entsprechen und darf, wenn keine erste Peptidbindung im Substrat vorhanden ist, maximal 630 pm betragen.
- (5) Zumindest für PEPT2 essentiell, für PEPT1 dagegen fakultativ ist die Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung und nicht die Peptidbindung selbst. Die Peptidbindung kann dabei durch eine Ketomethylenfunktion ohne Affinitätsverlust ersetzt werden, jedoch nicht durch den Stickstoff der Peptidbindung.
- (6) Die endständige Aminogruppe und die Carbonylgruppe müssen mindestens durch eine und dürfen maximal durch zwei Methylengruppen voneinander entfernt sein.
- (7) Die zweite Peptidbindung von Tripeptiden ist nicht essentiell für eine hohe Affinität.
- (8) Von den zwei möglichen Konformeren, die aufgrund der *cis/trans*-Konformation der Peptidbindung von Dipeptiden bestehen, wird nur das *trans*-Konformer als Substrat erkannt.
- (9) Die Seitenketten von Aminosäuren in Peptiden sind nicht entscheidend für die Bindung und Erkennung von Substraten durch die Transporter, beeinflussen jedoch ihre Affinität.
- (10) Negativ geladene Seitenketten führen zu einem Affinitätsverlust, hydrophobe und ungeladene Seitenketten erhöhen die Affinität zu den Transportern.
- (11) Die Peptidtransporter sind stereoselektiv. LL-Isomere werden bevorzugt transportiert. Jedoch können durch das Einfügen von großen hydrophoben Resten in Seitenketten von Aminosäuren auch DD-Isomere in Substrate mit guten Affinitäten überführt werden.

(12) Die Modifikation eines N-terminalen Lysins in Dipeptiden durch das Einfügen einer hydrophoben Gruppe an der ϵ -Aminogruppe überführt ein transportierbares Dipeptid in einen hochaffinen und spezifischen Inhibitor der Peptidtransporter.

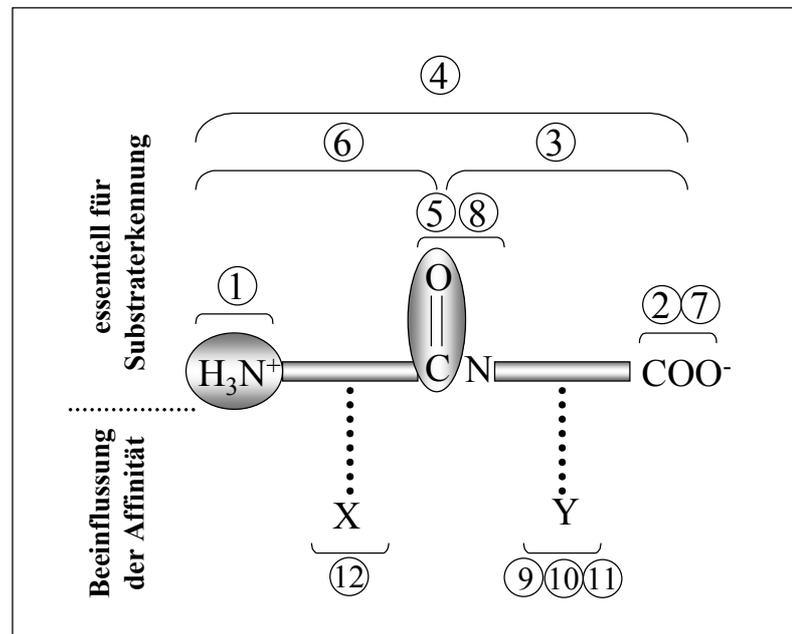


Abbildung 4-1 Anforderungen an Substrate der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2

Diese Befunde beschreiben die wesentlichen Strukturmerkmale zur Substraterkennung der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2. Insgesamt wird deutlich, dass die beiden Transporterisoformentypen zwar über viele Gemeinsamkeiten verfügen, aber auch abweichende Anforderungen an ihre Substrate besitzen. Dieses macht die Transporter damit unterscheidbar und könnte unter Umständen auch die Grundlage für die Entwicklung von neuartigen Verbindungen sein, die selektiv nur mit der jeweiligen Transporterisoform interagieren, wodurch eine gewebespezifische Verabreichung von Pharmaka möglich würde. Diese Daten können weiterhin die Grundlage bilden, um über ein Computer-gestütztes Modeling bessere 'Templates' für die Substraterkennung durch PEPT1 und PEPT2 zu erstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die erfolgreiche Expression der Peptidtransporter in *Pichia pastoris* neue methodische Ansätze geschaffen wurden, die auf molekularer Ebene zum Verständnis dieser Transportproteine unter strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten beitragen können. In dieser Arbeit wurde das *Pichia pastoris*-System dazu eingesetzt, um zum einen die strukturellen Anforderungen von Substraten für ihre Interaktion mit PEPT1 und PEPT2 aufzuzeigen, die minimalen strukturellen Merkmale von Substraten der Peptidtransporter zu bestimmen sowie erstmals hochaffine kompetitive Inhibitoren der Transporter zu isolieren und zu charakterisieren.

Anhang**I. Literaturverzeichnis**

- ABE, H., SATOH, M., MIYAUCHI, S., SHUTO, S., MATSUDA, A., UND KAMO, N. Conjugation of dipeptide to fluorescent dyes enhances its affinity for a dipeptide transporter (PEPT1) in human intestinal Caco-2 cells. *Bioconjug.Chem.* 10[1], 24-31. 1999.
- AMASHEH, S., WENZEL, U., BOLL, M., DORN, D., WEBER, W. M., CLAUSS, W., UND DANIEL, H. Transport of charged dipeptides by the intestinal H⁺/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal Of Membrane Biology* 155[3], 247-256. 1997a.
- AMASHEH, S., WENZEL, U., WEBER, W. M., CLAUSS, W., UND DANIEL, H. Electrophysiological analysis of the function of the mammalian renal peptide transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal Of Physiology London* 504[1], 169-174. 1997b.
- BAILEY, P. D. BOYD C. A. R. BRONK J. R. COLLIER I. D. MEREDITH D. MORGAN K. M. TEMPLE C. S. How to make drugs orally active: A substrate template for peptide transporter PepT1. *Angew.Chem.* 39[3], 506-508. 2000.
- BOLL, M., HERGET, M., WAGENER, M., WEBER, W. M., MARKOVICH, D., BIBER, J., CLAUSS, W., MURER, H., AND DANIEL, H. (1996) Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93[1], 284-289.
- BOLL, M., MARKOVICH, D., WEBER, W. M., KORTE, H., DANIEL, H., UND MURER, H. Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflugers.Arch.* 429[1], 146-149. 1994.
- BORNER, V., FEI, Y. J., HARTRODT, B., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H., NEUBERT, K., UND BRANDSCH, M. Transport of amino acid aryl amides by the intestinal H⁺/peptide cotransport system, PEPT1. *Eur.J.Biochem.* 255[3], 698-702. 1998.
- BRANDSCH, M., BRANDSCH, C., GANAPATHY, M. E., CHEW, C. S., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H⁺/peptide cotransport systems in intestine (PEPT 1) and kidney (PEPT 2). *Biochim.Biophys.Acta* 1324[2], 251-262. 1997.
- BRANDSCH, M., BRANDSCH, C., PRASAD, P. D., GANAPATHY, V., HOPFER, U., UND LEIBACH, F. H. Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter. *FASEB J.* 9[14], 1489-1496. 1995.
- BRANDSCH, M., KNUTTER, I., THUNECKE, F., HARTRODT, B., BORN, I., BORNER, V., HIRCHE, F., FISCHER, G., UND NEUBERT, K. Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H⁺/peptide symporter. *Eur.J.Biochem.* 266[2], 502-508. 1999.
- BRETSCHNEIDER, B., BRANDSCH, M., UND NEUBERT, R. Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm.Res.* 16[1], 55-61. 1999.
- BUSSER, K., GARON, E., UND HIGGINS, D. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*. *Am.Biotechnol.Lab.* 11[13], 10-12. 1993.
- CEREGHINO, J. L. UND CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol.Rev.* 24[1], 45-66. 2000.
- CHEN XZ, STEEL A, UND HEDIGER MA. Functional roles of histidine and tyrosine residues in the H(+)-peptide transporter PepT1. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 272[3], 726-730. 2000.
- CLARE, J. J., RAYMENT, F. B., BALLANTINE, S. P., SREEKRISHNA, K., UND ROMANOS, M. A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology (N.Y.)* 9[5], 455-460. 1991.
- CLARE, J. J., ROMANOS, M. A., RAYMENT, F. B., ROWEDDER, J. E., SMITH, M. A., PAYNE, M. M., SREEKRISHNA, K., UND HENWOOD, C. A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105[2], 205-212. 1991.
- COVITZ, K. M. Y., AMIDON, G. L., UND SADEE, W. Membrane topology of the human dipeptide transporter, hPEPT1, determined by epitope insertions. *Biochemistry* 37[43], 15214-15221. 1998.

- CRANE, D. I. UND GOULD, S. J. The *Pichia pastoris* HIS4 gene: nucleotide sequence, creation of a non-reverting his4 deletion mutant, and development of HIS4-based replicating and integrating plasmids. *Curr.Genet.* 26[5-6], 443-450. 1994.
- CREGG, J. M., MADDEN, K. R., BARRINGER, K. J., THILL, G. P., UND STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol.Cell Biol.* 9[3], 1316-1323. 1989.
- CREGG, J. M., VEDVICK, T. S., UND RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N.Y.)* 11[8], 905-910. 1993.
- DANIEL, H. Function and molecular structure of brush border membrane peptide H⁺ symporters. *J.Membr. Biol.* 154[3], 197-203. 1996.
- DANIEL, H. UND ADIBI, S. A. Functional separation of dipeptide transport and hydrolysis in kidney brush border membrane vesicles. *FASEB J.* 8[10], 753-759. 1994.
- DANIEL, H. UND ADIBI, S. A. Transport of beta-lactam antibiotics in kidney brush border membrane. Determinants of their affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter. *J.Clin.Invest.* 92[5], 2215-2223. 1993.
- DANIEL, H. UND HERGET, M. Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am.J.Physiol. Renal Physiol.* 42[1], F1-F8. 1997.
- DANIEL, H., MORSE, E. L., UND ADIBI, S. A. Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane. *J.Biol.Chem.* 267[14], 9565-9573. 1992.
- DANIEL, H., MORSE, E. L., UND ADIBI, S. A. The high and low affinity transport systems for dipeptides in kidney brush border membrane respond differently to alterations in pH gradient and membrane potential. *J.Biol.Chem.* 266[30], 19917-19924. 1991.
- DANTZIG, A. H. Oral absorption of beta-lactams by intestinal peptide transport proteins. *Adv. Drug Del. Rev.* 23[1-3], 63-76. 1997.
- DE HOOP, M. J., CREGG, J., KEIZER-GUNNINK, I., SJOLLEMA, K., VEENHUIS, M., UND AB, G. Overexpression of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 291[2], 299-302. 1991.
- DÖRING, F., DORN, D., BACHFISCHER, U., AMASHEH, S., HERGET, M., UND DANIEL, H. Functional analysis of a chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J. Physiol. (London)* 497[3], 773-779. 1996.
- DÖRING, F., KLAPPER, M., THEIS, S., UND DANIEL, H. Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotor for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 250[2], 531-535. 1998.
- DÖRING, F., MICHEL, T., ROSEL, A., NICKOLAUS, M., UND DANIEL, H. Expression of the mammalian renal peptide transporter PEPT2 in the yeast *Pichia pastoris* and applications of the yeast system for functional analysis. *Mol. Membr. Biol.* 15[2], 79-88. 1998.
- DÖRING, F., THEIS, S., UND DANIEL, H. Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PepT1 in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 232[3], 656-662. 1997.
- DÖRING, F., WALTER, J., WILL, J., FOCKING, M., BOLL, M., AMASHEH, S., CLAUSS, W., UND DANIEL, H. Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J.Clin.Invest.* 101[12], 2761-2767. 1998.
- DÖRING, F., WILL, J., AMASHEH, S., CLAUSS, W., AHLBRECHT, H., UND DANIEL, H. Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J.Biol.Chem.* 273[36], 23211-23218. 1998.
- ECKART, M. R. UND BUSSINEAU, C. M. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr.Opin.Biotechnol.* 7[5], 525-530. 1996.
- ELLIS, S. B., BRUST, P. F., KOUTZ, P. J., WATERS, A. F., HARPOLD, M. M., UND GINGERAS, T. R. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol.Cell Biol.* 5[5], 1111-1121. 1985.
- FALK, S., OULIANOVA, N., UND BERTELOOT, A. Kinetic mechanisms of inhibitor binding: relevance to the fast-acting slow-binding paradigm. *Biophys.J.* 77[1], 173-188. 1999.

- FEI, Y. J., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.* 58:239-61, 239-261. 1998.
- FEI, Y. J., KANAI, Y., NUSSBERGER, S., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H., ROMERO, M. F., SINGH, S. K., BORON, W. F., UND HEDIGER, M. A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature.* 368[6471], 563-566. 1994.
- FEI, Y. J., LIU, J. C., FUJITA, T., LIANG, R., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporters PEPT1 and PEPT2 using PEPT1-PEPT2 and PEPT2-PEPT1 chimeras. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 246[1], 39-44. 1998.
- FEI, Y. J., LIU, W., PRASAD, P. D., KEKUDA, R., OBLAK, T. G., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H⁺/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry* 36[2], 452-460. 1997.
- FEI, Y., SUGAWARA, M., LIU, J., LI, H. W., GANAPATHY, V., GANAPATHY, M. E., UND LEIBACH, F. H. cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochim.Biophys.Acta* 2000.Jun.21.;1492.(1.):145.-54
- FRILLINGOS, S., SUN, J., GONZALEZ, A., UND KABACK, H. R. Cysteine-scanning mutagenesis of helix II and flanking hydrophilic domains in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 36[1], 269-273. 1997.
- FUCENTESE, M., WINTERHALTER, K. H., MURER, H., UND BIBER, J. Functional expression and purification of histidine-tagged rat renal Na/Phosphate (NaPi-2) and Na/Sulfate (NaSi-1) cotransporters. *J.Membr.Biol.* 160[2], 111-117. 1997.
- FÜRST, P. Old and new substrates in clinical nutrition. *J.Nutr.* 128[5], 789-796. 1998.
- Fürst, P., Pogan, K., und Stehle, P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. *Nutrition.* 13[7-8], 731-737. 1997.
- GANAPATHY, M. E., HUANG, W., WANG, H., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. alacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 246[2], 470-475. 1998.
- GANAPATHY, V. UND LEIBACH, F. H. Carrier-mediated reabsorption of small peptides in renal proximal tubule. *Am.J.Physiol.* 251[6 Pt 2], F945-F953. 1986.
- GANAPATHY, V. UND LEIBACH, F. H. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycyl-L-proline. *J.Biol.Chem.* 258[23], 14189-14192. 1983.
- GANAPATHY, V., BURCKHARDT, G., UND LEIBACH, F. H. Characteristics of glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *J.Biol.Chem.* 259[14], 8954-8959. 1984.
- GANAPATHY, V., BURCKHARDT, G., UND LEIBACH, F. H. Peptide transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles studied with a potential-sensitive dye. *Biochim.Biophys.Acta* 816[2], 234-240. 1985.
- GANAPATHY, V., MENDICINO, J. F., UND LEIBACH, F. H. Transport of glycyl-L-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit. *J.Biol.Chem.* 256[1], 118-124. 1981.
- GANAPATHY, V., MENDICINO, J., PASHLEY, D. H., UND LEIBACH, F. H. Carrier-mediated transport of glycyl-L-proline in renal brush border vesicles. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 97[3], 1133-1139. 1980.
- GANAPATHY, V., MENDICINO, J., UND LEIBACH, F. H. Evidence for a dipeptide transport system in renal brush border membranes from rabbit. *Biochim.Biophys.Acta* 642[2], 381-391. 1981.
- GANAPATHY, V., MIYAMOTO, Y., TIRUPPATHI, C., UND LEIBACH, F. H. Peptide transport across the animal cell plasma membrane: recent developments. *Indian J.Biochem.Biophys.* 28[5-6], 317-323. 1991.
- GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 54[6], 741-750. 2000.
- GEMMILL, T. R. UND TRIMBLE, R. B. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim.Biophys.Acta* 1426[2], 227-237. 1999.
- GIBSON, M. M., PRICE, M., UND HIGGINS, C. F. Genetic characterization and molecular cloning of the tripeptide permease (tpp) genes of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* 160[1], 122-130. 1984.
- GREENER, A., CALLAHAN, M., UND JERPSETH, B. An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Mol.Biotechnol.* 7[2], 189-195. 1997.

- GRONEBERG, D. A., NICKOLAUS, M., SPRINGER, J., DORING, F., DANIEL, H., UND FISCHER, A. Localization of the Peptide Transporter PEPT2 in the Lung : Implications for Pulmonary Oligopeptide Uptake. *Am.J.Pathol.* 158[2], 707-714. 2001.
- GROVES, J. D., FALSON, P., LE MAIRE, M., UND TANNER, M. J. Functional cell surface expression of the anion transport domain of human red cell band 3 (AE1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93[22], 12245-12250. 1996.
- HAGTING, A., KUNJI, E. R., LEENHOUTS, K. J., POOLMAN, B., UND KONINGS, W. N. The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J.Biol.Chem.* 269[15], 11391-11399. 1994.
- HAN, H. K., DEVRUEH, R. L. A., RHIE, J. K., COVITZ, K. M. Y., SMITH, P. L., LEE, C. P., OH, D. M., SADEE, W., UND AMIDON, G. L. 5'-amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm.Res.* 15[8], 1154-1159. 1998.
- HAN, H. K., RHIE, J. K., OH, D. M., SAITO, G., HSU, C. P., STEWART, B. H., UND AMIDON, G. L. CHO/hPEPT1 cells overexpressing the human peptide transporter (hPEPT1) as an alternative in vitro model for peptidomimetic drugs. *J.Pharm.Sci.* 88[3], 347-350. 1999.
- HANSCH, C., LEO, A., UNGER, S. H., KIM, K. H., NIKAITANI, D., UND LIEN, E. J. "Aromatic" substituent constants for structure-activity correlations. *J.Med.Chem.* 16[11], 1207-1216. 1973.
- HAWTHORNE, S. J., MACEY, M., HOWELLS, G., UND WALKER, B. A high-throughput microtiter plate-based calcium assay for the study of protease-activated receptor 2 activation. *Anal.Biochem.* 290[2], 378-379. 2001.
- HIGGINS, D. R. UND CREGG, J. M. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol.Biol.* 103:1-15., 1-15. 1998.
- HOROWITZ, B., EAKLE, K. A., SCHEINER-BOBIS, G., RANDOLPH, G. R., CHEN, C. Y., HITZEMAN, R. A., UND FARLEY, R. A. Synthesis and assembly of functional mammalian Na,K-ATPase in yeast. *J.Biol.Chem.* 265[8], 4189-4192. 1990.
- INUI, K., TOMITA, Y., KATSURA, T., OKANO, T., TAKANO, M., UND HORI, R. H⁺ coupled active transport of bestatin via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 260[2], 482-486. 1992.
- ISLAND, M. D., NAIDER, F., UND BECKER, J. M. Regulation of dipeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae* by micromolar amino acid concentrations. *J.Bacteriol.* 169[5], 2132-2136. 1987.
- KRAMER, W., GIRBIG, F., GUTJAHR, U., KLEEMANN, H. W., LEIPE, I., URBACH, H., UND WAGNER, A. Interaction of renin inhibitors with the intestinal uptake system for oligopeptides and beta-lactam antibiotics. *Biochim.Biophys.Acta* 1027[1], 25-30. 1990.
- LANDRO, J. A., TAYLOR, I. C., STIRTAN, W. G., OSTERMAN, D. G., KRISTIE, J., HUNNICUTT, E. J., RAE, P. M., UND SWEETNAM, P. M. HTS in the new millennium. The role of pharmacology and flexibility. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods.* 44[1], 273-289. 2001.
- LE COUTRE, J., WHITELEGGE, J. P., GROSS, A., TURK, E., WRIGHT, E. M., KABACK, H. R., UND FAULL, K. F. Proteomics on full-length membrane proteins using mass spectrometry. *Biochemistry* 39[15], 4237-4242. 2000.
- LEIBACH, F. H. UND GANAPATHY, V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu.Rev.Nutr.* 16:99-119, 99-119. 1996.
- LI, J. UND HIDALGO, I. J. Molecular modeling study of structural requirements for the oligopeptide transporter. *J Drug Target.* 4[1], 9-17. 1996.
- LI, J., TAMURA, K., LEE, C. P., SMITH, P. L., BORCHARDT, R. T., UND HIDALGO, I. J. Structure-affinity relationships of Val-Val and Val-Val-Val stereoisomers with the apical oligopeptide transporter in human intestinal Caco-2 cells. *J Drug Target.* 5[5], 317-327. 1998.
- LIANG, R., FEI, Y. J., PRASAD, P. D., RAMAMOORTHY, S., HAN, H., YANG-FENG, T. L., HEDIGER, M. A., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J.Biol.Chem.* 270[12], 6456-6463. 1995.
- LISTER, N., SYKES, A. P., BAILEY, P. D., BOYD, C. A., UND BRONK, J. R. Dipeptide transport and hydrolysis in isolated loops of rat small intestine: effects of stereospecificity. *J.Physiol.* 484[Pt 1], 173-182. 1995.

- LIU, W., LIANG, R., RAMAMOORTHY, S., FEI, Y. J., GANAPATHY, M. E., HEDIGER, M. A., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim.Biophys.Acta* 1235[2], 461-466. 1995.
- MACKENZIE, B., FEI, Y. J., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. The human intestinal H⁺/oligopeptide cotransporter hPEPT1 transports differently-charged dipeptides with identical electrogenic properties. *Biochim.Biophys.Acta* 1284[2], 125-128. 1996.
- MACKENZIE, B., LOO, D. D., PANAYOTOVA-HEIERMANN, M., UND WRIGHT, E. M. Biophysical characteristics of the pig kidney Na⁺/glucose cotransporter SGLT2 reveal a common mechanism for SGLT1 and SGLT2. *J.Biol.Chem.* 271[51], 32678-32683. 1996.
- MATTHEWS, D. M. Experimental approach in chemical pathology. *Br.Med.J.* 3[776], 659-664. 1971.
- MATTHEWS, D. M. Intestinal absorption of peptides. *Physiol.Rev.* 55[4], 537-608. 1975.
- MATTHEWS, D. M. UND ADIBI, S. A. Peptide absorption. *Gastroenterology* 71, 151-161. 1976.
- MATTHEWS, D. M., ADDISON, J. M., UND BURSTON, D. Evidence for active transport of the dipeptide carnosine (beta-alanyl-L-histidine) by hamster jejunum in vitro. *Clin.Sci.Mol.Med.* 46[6], 693-705. 1974.
- MATTHEWS, D. M., BURSTON, D., UND ADDISON, J. M. Transport of glycylsarcosine by hamster small intestine in vitro. *Clin.Sci.* 42[5], 29P. 1972.
- MEREDITH, D. UND BOYD, C. A. Oligopeptide transport by epithelial cells. *J.Membr.Biol.* 145[1], 1-12. 1995.
- MEREDITH, D. UND BOYD, C. A. Structure and function of eukaryotic peptide transporters. *Cell Mol.Life Sci.* 57[5], 754-778. 2000.
- MEREDITH, D., BOYD, C. A. R., BRONK, J. R., BAILEY, P. D., MORGAN, K. M., COLLIER, I. D., UND TEMPLE, C. S. -aminomethylbenzoic acid is a non-translocated competitive inhibitor of the epithelial peptide transporter PepT1. *J.Physiol.London.* 512[3], 629-634. 1998.
- MIYAMOTO, Y., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. Identification of histidyl and thiol groups at the active site of rabbit renal dipeptide transporter. *J.Biol.Chem.* 261[34], 16133-16140. 1986.
- MULLIS, K. B. UND FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50. 1987.
- PAULSEN, I. T. UND SKURRAY, R. A. The POT family of transport proteins. *Trends.Biochem.Sci.* 19[10], 404. 1994.
- PERRY, J. R., BASRAI, M. A., STEINER, H. Y., NAIDER, F., UND BECKER, J. M. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol.Cell Biol.* 14[1], 104-115. 1994.
- RAMAMOORTHY, S., LIU, W., MA, Y. Y., YANG-FENG, T. L., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. Proton/peptide cotransporter (PEPT 2) from human kidney: functional characterization and chromosomal localization. *Biochim.Biophys.Acta* 1240[1], 1-4. 1995.
- RUBIO-ALIAGA, I., BOLL, M., UND DANIEL, H. Cloning and characterization of the gene encoding the mouse peptide transporter PEPT2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 276[2], 734-741. 2000.
- RUETZ, S., RAYMOND, M., UND GROS, P. Functional expression of P-glycoprotein encoded by the mouse *mdr3* gene in yeast cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90[24], 11588-11592. 1993.
- SAITO, H., OKUDA, M., TERADA, T., SASAKI, S., UND INUI, K. Cloning and characterization of a rat H⁺/peptide cotransporter mediating absorption of beta-lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J.Pharm.Exp.Ther* 275[3], 1631-1637. 1995.
- SAITO, H., TERADA, T., OKUDA, M., SASAKI, S., UND INUI, K. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim.Biophys. Acta Biomembranes* 1280[2], 173-177. 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., UND MANNIATIS, T. L. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S., UND COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74[12], 5463-5467. 1977.
- SAUER, N. UND STOLZ, J. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* 6[1], 67-77. 1994.
- SCHERTLER, G. F. X. Overproduction of membrane proteins. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 2, 534-544. 1992.

- SEYFANG, A., KAVANAUGH, M. P., UND LANDFEAR, S. M. Aspartate 19 and glutamate 121 are critical for transport function of the myo-inositol/H⁺ symporter from *Leishmania donovani*. *J.Biol.Chem.* 272[39], 24210-24215. 1997.
- SILBERNAGL, S., GANAPATHY, V., UND LEIBACH, F. H. H⁺ gradient-driven dipeptide reabsorption in proximal tubule of rat kidney. Studies in vivo and in vitro. *Am.J.Physiol.* 253[3 Pt 2], F448-F457. 1987.
- SKOPICKI, H. A., FISHER, K., ZIKOS, D., BLOCH, R., FLOURET, G., UND PETERSON, D. R. Multiple carriers for dipeptide transport: carrier-mediated transport of glycyl-L-proline in renal BBMV. *Am.J.Physiol.* 261[4 Pt 2], F670-F678. 1991.
- SLEIGH, S. H., TAME, J. R., DODSON, E. J., UND WILKINSON, A. J. Peptide binding in OppA, the crystal structures of the periplasmic oligopeptide binding protein in the unliganded form and in complex with lysyllysine. *Biochemistry* 36[32], 9747-9758. 1997.
- SREEKRISHNA, K., BRANKAMP, R. G., KROPP, K. E., BLANKENSHIP, D. T., TSAY, J. T., SMITH, P. L., WIERSCHKE, J. D., SUBRAMANIAM, A., UND BIRKENBERGER, L. A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190[1], 55-62. 1997.
- STEHLE, P., ZANDER, J., MERTES, N., ALBERS, S., PUCHSTEIN, C., LAWIN, P., UND FÜRST, P. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet* 1[8632], 231-233. 1989.
- STEINER, H. Y., NAIDER, F., UND BECKER, J. M. The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol.Microbiol.* 16[5], 825-834. 1995.
- STEINER, H. Y., SONG, W., ZHANG, L., NAIDER, F., BECKER, J. M., UND STACEY, G. An *Arabidopsis* peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *Plant Cell* 6[9], 1289-1299. 1994.
- SUN, J., VOSS, J., HUBBELL, W. L., UND KABACK, H. R. Proximity between periplasmic loops in the lactose permease of *Escherichia coli* as determined by site-directed spin labeling. *Biochemistry* 38[10], 3100-3105. 1999.
- SWAAN, P. W. UND TUKKER, J. J. Molecular determinants of recognition for the intestinal peptide carrier. *J.Pharm.Sci.* 86[5], 596-602. 1997.
- SWAAN, P. W., STEHOUWER, M. C., UND TUKKER, J. J. Molecular mechanism for the relative binding affinity to the intestinal peptide carrier. Comparison of three ACE-inhibitors: enalapril, enalaprilat, and lisinopril. *Biochim.Biophys.Acta* 1236[1], 31-38. 1995.
- TALMONT, F., SIDOBRE, S., DEMANGE, P., MILON, A., UND EMORINE, L. J. Expression and pharmacological characterization of the human mu-opioid receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 394[3], 268-272. 1996.
- TAMAI, I., LING, H. Y., TIMBUL, S. M., NISHIKIDO, J., UND TSUJI, A. Stereospecific absorption and degradation of cephalexin. *J.Pharm.Pharmacol.* 40[5], 320-324. 1988.
- TAMAI, I., NAKANISHI, T., NAKAHARA, H., SAI, Y., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H., UND TSUJI, A. Improvement of L-dopa absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PepT1. *J.Pharm.Sci.* 87[12], 1542-1546. 1998.
- TARLOW, M. J., SEAKINS, J. W., LLOYD, J. K., MATTHEWS, D. M., CHENG, B., UND THOMAS, A. J. Intestinal absorption and biopsy transport of peptides and amino acids in Hartnup disease. *Clin.Sci.* 39[6], 18P-19P. 1970.
- TEMPLE, C. S., STEWART, A. K., MEREDITH, D., LISTER, N. A., MORGAN, K. M., COLLIER, I. D., VAUGHANJONES, R. D., BOYD, C. A. R., BAILEY, P. D., UND BRONK, J. R. Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. *J.Biol.Chem.* 273[1], 20-22. 1998.
- TERADA, T., SAITO, H., MUKAI, M., UND INUI, K. Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H⁺/peptide cotransporter, PEPT1. *Febs Letters* 394[2], 196-200. 1996.
- TERADA, T., SAWADA, K., IRIE, M., SAITO, H., HASHIMOTO, Y., UND INUI, K. Structural requirements for determining the substrate affinity of peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Pflugers Arch.* 440[5], 679-684. 2000.
- THWAITES, D. T., BROWN, C. D., HIRST, B. H., UND SIMMONS, N. L. Transepithelial glycylsarcosine transport in intestinal Caco-2 cells mediated by expression of H(+)-coupled carriers at both apical and basal membranes. *J.Biol.Chem.* 268[11], 7640-7642. 1993.

- THWAITES, D. T., HIRST, B. H., UND SIMMONS, N. L. Direct assessment of dipeptide/H⁺ symport in intact human intestinal (Caco-2) epithelium: a novel method utilising continuous intracellular pH measurement. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 194[1], 432-438. 1993.
- THWAITES, D. T., HIRST, B. H., UND SIMMONS, N. L. Substrate specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (Caco-2): identification of substrates that undergo H⁽⁺⁾-coupled absorption. *Br.J.Pharmacol.* 113[3], 1050-1056. 1994.
- TSUJI, A. Tissue selective drug delivery utilizing carrier-mediated transport systems. *J.Control.Release.* 62[1-2], 239-244. 1999.
- URBATSCH, I. L., BEAUDET, L., CARRIER, I., UND GROS, P. Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry* 37[13], 4592-4602. 1998.
- WATERHAM, H. R., DIGAN, M. E., KOUTZ, P. J., LAIR, S. V., UND CREGG, J. M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186[1], 37-44. 1997.
- WEISS, H. M., HAASE, W., MICHEL, H., UND REILANDER, H. Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT5A 5-hydroxytryptamine receptor and the human beta2-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem.J.* 330[Pt 3], 1137-1147. 1998.
- WEISS, H. M., HAASE, W., MICHEL, H., UND REILANDER, H. Expression of functional mouse 5-HT5A serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett.* 377[3], 451-456. 1995.
- WENZEL, U., DIEHL, D., HERGET, M., KUNTZ, S., UND DANIEL, H. Regulation of the high-affinity H⁺/peptide cotransporter in renal LLC-PK1 cells. *J.Cell Physiol.* 178[3], 341-348. 1999.
- WENZEL, U., THWAITES, D. T., UND DANIEL, H. Stereoselective uptake of beta-lactam antibiotics by the intestinal peptide transporter. *Br.J.Pharmacol.* 116[7], 3021-3027. 1995.
- WHITELEGGE, J. P., LE COUTRE, J., LEE, J. C., ENGEL, C. K., PRIVE, G. G., FAULL, K. F., UND KABACK, H. R. Toward the bilayer proteome, electrospray ionization-mass spectrometry of large, intact transmembrane proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96[19], 10695-10698. 1999.
- WIELERT-BADT, S., LIN, J. T., LORENZ, M., FRITZ, S., UND KINNE, R. K. Probing the conformation of the sugar transport inhibitor phlorizin by 2D-NMR, molecular dynamics studies, and pharmacophore analysis. *J.Med.Chem.* 43[9], 1692-1698. 2000.
- WILL, A., CASPARI, T., UND TANNER, W. Km mutants of the *Chlorella monosaccharide/H⁺* cotransporter randomly generated by PCR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91[21], 10163-10167. 1994.
- WILL, A., GRASSL, R., ERDMENGER, J., CASPARI, T., UND TANNER, W. Alteration of substrate affinities and specificities of the *Chlorella Hexose/H⁺* symporters by mutations and construction of chimeras. *J.Biol.Chem.* 273[19], 11456-11462. 1998.
- WUNSCH, E. *Synthese von Peptiden.* Houben-Weyl. Methoden der organischen Chemie. 1974. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. Muller, E.
- YANG, C. Y., DANTZIG, A. H., UND PIDGEON, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm.Res.* 16[9], 1331-1343. 1999.
- YEUNG, A. K., BASU, S. K., WU, S. K., CHU, C., OKAMOTO, C. T., HAMMALVAREZ, S. F., VONGRAFENSTEIN, H., SHEN, W. C., KIM, K. J., BOLGER, M. B., HAWORTH, I. S., ANN, D. K., UND LEE, V. H. L. Molecular identification of a role for tyrosine 167 in the function of the human intestinal proton-coupled dipeptide transporter (hPepT1). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 250[1], 103-107. 1998.

II. Eigene Veröffentlichungen

Döring F, **Theis S**, Daniel H.

Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PepT1 in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*.

Biochem Biophys Res Commun. 1997 Mar 27;232(3):656-62.

Döring F, Klapper M, **Theis S**, Daniel H.

Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*.

Biochem Biophys Res Commun. 1998 Sep 18;250(2):531-5.

Knutter I, **Theis S**, Hartrodt B, Born I, Brandsch M, Daniel H, Neubert K.

A novel inhibitor of the mammalian peptide transporter PEPT1.

Biochemistry. 2001 Apr 10;40(14):4454-8

Theis S, Döring F, Daniel H.

Expression of the myc/His-Tagged Human Peptide Transporter hPEPT1 in Yeast for Protein Purification and Functional Analysis.

Protein Expr Purif. 2001 Aug;22(3):436-42.

Theis S, Hartrodt B, Kottra G, Neubert K, Daniel H.

Defining minimal structural features in substrates of the H⁺/peptide cotransporter PEPT2 by use of novel amino acid and dipeptide derivatives.

Molecular Pharmacology 2001, akzeptiert zur Publikation im Oktober 2001.

III. Abkürzungsverzeichnis

α Abu	α -Aminobuttersäure	G	Guanin
4-ABA	4-Aminobuttersäure	T	Thymin
4-AMBA	4-Aminomethylbenzoesäure	U	Uracil
4-APAA	4-Aminophenyllessigsäure	Boc	tert-Butyloxycarbonyl
5-APA	5-Aminopentansäure	bp	Basenpaare
6-AHA	6-Aminohexansäure	BSA	Bovines Serumalbumin
7-AHA	7-Aminoheptansäure	BSMV	Bürstensaummembranvesikel
8-AOA	8-Aminooctansäure	Caco-2	humane Kolonkarzinom-Zelllinie
Ac	Acetyl	cDNA	komplementäre DNA
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym	Ci	Curie
AE	Ala-Eth	cRNA	komplementäre RNA
AH	Ala-His	Da	Dalton
Aib	Aminoisobuttersäure	ddNTP	Didesoxynukleotid
Aminosäuren:		DEPC	Diethylpyrocarbonat
A	Ala Alanin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
C	Cys Cystein	dNTP	Desoxynukleotid
D	Asp Aspartat	DTT	Dithiothreitol
E	Glu Glutamat	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F	Phe Phenylalanin	Einheiten:	
G	Gly Glycin	M	mega
H	His Histidin	k	kilo
I	Ile Isoleucin	m	milli
K	Lys Lysin	μ	mikro
L	Leu Leucin	n	nano
M	Met Methionin	p	piko
N	Asn Asparagin	f	femto
P	Pro Prolin	Eth	Ethionin
Q	Gln Glutamin	g	Gravitationskonstante
R	Arg Arginin	g	Gramm
S	Ser Ser	GAP	Glycerinaldehyddehydrogenase
T	Thr Threonin	GS115	<i>P. pastoris</i> Wildtypstamm
V	Val Valin	h	Stunde
W	Trp Tryptophan	HIS4	Histidindehydrogenase-Marker
Y	Tyr Tyrosin	I	Strom
AOX	Alkoholoxidase	I-V	Strom-Spannung
Basen der Nukleinsäuren:		K_i	Inhibitorkonstante
A	Adenin	K_m	Michaelis-Menten-Konstante
C	Cytosin	Kon.	Kontrolle

KPP	Kaliumphosphatpuffer	<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis</i>
LE	Leu-Eth	<i>PmeI</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
LZN	Lys[Z(NO ₂)]	<i>Sall</i>	<i>Streptomyces albus</i>
M	Molarität	<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>
m	Meter	<i>XhoI</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>
MD	Minimal Dextrose Medium		
MGY	Minimal Glycerin Medium	RNA	Ribonukleinsäure
min	Minuten	RT	Raumtemperatur
MM	Minimal Methanol Medium	Sar	Sarkosin
M _R	molare Refraktion	SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
Mut	Phänotyp Methanolverwertung	sec	Sekunden
Nle	Norleucin	SEM	<i>standard error of the mean</i>
OBzl	Benzylester		Standardabweichung des Mittelwertes
OD	Optische Dichte bei 600 nm (1OD~ 5×10 ⁷ <i>P.pastoris</i> -Zellen)	SGLT1	Na ⁺ /Glucose-Cotransporter
Om	Ornithin	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>	TEVC	Two-electrode-voltage-clamp
PCR	Polymerasekettenreaktion	TMD	Transmembrandomäne
PEG	Polyethylenglykol	V _m	Membranpotential
PEPT1	intestinaler Peptidtransporter	V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
PEPT2	renaler Peptidtransporter	<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Pip	Pipecolinsäure	Xaa	beliebige Aminosäure
Restriktionsenzyme: <i>Bakterienstämme</i>		YPD	Yeast-Extract-Peptone-Glucose
<i>AvrII</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	Z	Benzylloxycarbonyl
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	Z(NO ₂)	4-Nitrobenzylloxycarbonyl
<i>Bsp119I</i>	<i>Bacillus</i> Species (119I)	Zeo	Zeocin

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Modell des Peptidtransporters an einer intestinalen oder renalen Epithelzelle	8
Abbildung 1-2. Struktur-Modell von PEPT1 und schematischer Homologievergleich mit PEPT2.....	9
Abbildung 1-3. Strukturvergleich zwischen dem Tripeptid Tyr-Gly-Ala und Cefadroxil	13
Abbildung 1-4. Mikroskopische Aufnahme einer knospenden <i>Pichia pastoris</i> Zelle.....	16
Abbildung 3-1. Expression von hPEPT1 in <i>P. pastoris</i> nach Transformation unterschiedlicher Konstrukte	33
Abbildung 3-2. Aufnahme von [³ H]-D-Phe-Ala in hPEPT1 exprimierende <i>P. pastoris</i> -Zellen als Funktion der Inkubationszeit, der optischen Dichte, des pH-Wertes im Medium und der Substratkonzentration.	35
Abbildung 3-3. Immunoblot-Analyse des in <i>Pichia pastoris</i> exprimierten hPEPT1-Proteins.....	37
Abbildung 3-4. Hemmung der Aufnahme von [³ H]-D-Phe-Ala durch unterschiedliche Substanzen in hPEPT1 exprimierenden <i>P. pastoris</i> -Zellen.	39
Abbildung 3-5. Struktur der Dipeptide Alanin-Ethionin (Ala-Eth) und Leucin-Ethionin (Leu-Eth).....	42
Abbildung 3-6. Hemmung der Aufnahme von [³ H]-D-Phe-Ala durch Ala-Eth und Leu-Eth in hPEPT1 und PEPT2 exprimierenden <i>P. pastoris</i> -Zellen.	42
Abbildung 3-7. Wachstumstest auf Leu-Eth und Ala-Eth-haltigen Nährböden.....	43
Abbildung 3-8. Wachstumstest auf Ala-His-haltigen Nährböden mit unterschiedlichen pH-Werten.....	44
Abbildung 3-9. Schematische Darstellung zur Erzeugung und Selektion von Mutanten des Peptidtransporters hPEPT1.....	45
Abbildung 3-10. Vorgehensweise zur Identifizierung und Charakterisierung von Mutationen auf der cDNA von hPEPT1-Transportmutanten	48
Abbildung 3-11. PCR zur Isolierung der mut-hPEPT1-cDNA's ausgehend von genomischer DNA der hPEPT1-Mutanten.	48
Abbildung 3-12. pH-Abhängigkeit der Aufnahme von [³ H]-D-Phe-Ala in den hPEPT1-Wildtypstamm und in die mutanten Q34- und R14-Stämme.....	49
Abbildung 3-13. Darstellung der zur Sequenzierung verwendeten Primer.....	50
Abbildung 3-14. Hemmung der [³ H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende Hefezellen durch Ala-Ala.	64
Abbildung 3-15. Vergleich der K _i -Werte für die Interaktion verschiedener Ala-Xaa (A) und Xaa-Ala (B) Dipeptide mit PEPT1 und PEPT2.	66
Abbildung 3-16. Vergleich der K _i - bzw. der K _{i(corr)} -Werte für die Interaktion verschiedener Pro-Xaa (A) und Xaa-Pro (B) Dipeptide mit PEPT1 und PEPT2.....	69
Abbildung 3-17. K _i -Werte für die Interaktion verschiedener Dipeptide mit PEPT1 und PEPT2.	71
Abbildung 3-18. Strom-Spannungs-Beziehungen von Ala-Ala und Gly-Gln an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden <i>X. laevis</i> -Oozyten.....	71
Abbildung 3-19. Hemmung der [³ H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende Hefezellen durch Ala-Ala-Dipeptide.	73
Abbildung 3-20. Strom-Spannungs-Beziehungen von Ala-Ala und -Stereoisomeren an PEPT1 und PEPT2 exprimierenden <i>X. laevis</i> -Oozyten.....	76

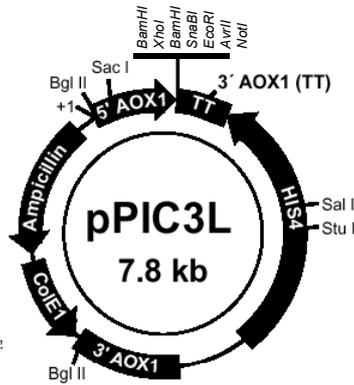
Abbildung 3-21. Elektrophysiologische Untersuchungen von Isomeren verschiedener Dipeptide an PEPT1 und PEPT2.....	77
Abbildung 3-22. Charakteristika der Interaktion von ω -Aminofettsäuren mit PEPT2.....	79
Abbildung 3-23. Charakteristika der Interaktion von ω -Aminosäuren-Alanyl-Dipeptiden mit PEPT2.....	81
Abbildung 3-24. Charakteristika der Interaktion von Alanin- ω -Aminosäure-Dipeptiden mit PEPT2.....	83
Abbildung 3-25. Interaktion von Alanin-Arylamiden mit PEPT2.....	84
Abbildung 3-26. Hemmung des Gly-Gln-induzierten Einwärtsstroms durch Ala-4-nitroanilid.....	86
Abbildung 3-27. Charakterisierung der Interaktion von Ala-2- und Ala-3-aminobenzoessäure mit PEPT2.....	87
Abbildung 3-28. Strukturformel von Lys-Pro und der Derivate Lys(Z)-Pro und Lys[Z(NO ₂)]-Pro.....	89
Abbildung 3-29. Inhibition der Aufnahme von [³ H]-D-Phe-Ala durch Lys-Pro-Derivate.....	89
Abbildung 3-30. Aufnahme der Strom-induzierten Einwärtsströme in PEPT1 exprimierende Oozyten.....	90
Abbildung 3-31. Dixon-Plot der Gly-Gln induzierten Ströme in An- und Abwesenheit von Lys[Z(NO ₂)]-Pro an PEPT1 exprimierenden <i>X. laevis</i> -Oozyten.....	91
Abbildung 3-32. Elektrophysiologische Analyse der Dipeptid-Ströme nach Injektion von Lys[Z(NO ₂)]-Pro in PEPT1 exprimierende Oozyten.....	92
Abbildung 3-33. Charakteristika der Interaktion von Lys[Z(NO ₂)]-Derivaten mit PEPT2.....	93
Abbildung 3-34. Interaktion von ALZN und VLZN mit PEPT2.....	94
Abbildung 3-35. Strukturen der Schutzgruppen Z, Z(NO ₂), Ac und Boc.....	95
Abbildung 3-36. Elektrophysiologische Charakterisierung von Lys(Z)-Lys[Z(NO ₂)] an PEPT2-Oozyten.....	97
Abbildung 4-1. Anforderungen an Substrate der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2.....	112

V. Tabellenverzeichnis

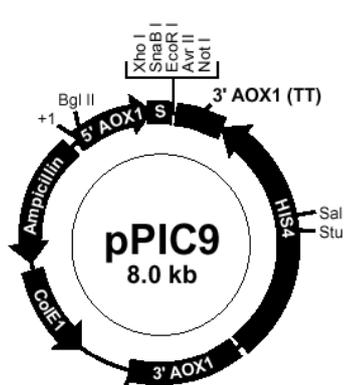
Tabelle 1-1. Relevante Komponenten von Vektoren zur Protein-Expression in <i>P. pastoris</i>	17
Tabelle 3-1. Kinetische Charakteristika von hPEPT1 nach Expression in verschiedenen Medien.	36
Tabelle 3-2. Affinitäten ausgewählter Verbindungen für die Hemmung der Aufnahme von [³ H]-D-Phe-Ala in hPEPT1 exprimierende Hefezellen.	40
Tabelle 3-3. Schema zur Identifikation von hPEPT1-Mutanten durch selektive Wachstumstests.	46
Tabelle 3-4. pH-Abhängigkeit der [³ H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in Wildtyp- oder mutante hPEPT1-Protein exprimierende Hefezellen.	47
Tabelle 3-5. Identifikation der Mutationen auf der cDNA der hPEPT1-Transpormutanten Q34 und R14.	50
Tabelle 3-6. Inhibitionskonstanten von Ala-Xaa- und Xaa-Ala-Dipeptiden für die [³ H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende <i>P. pastoris</i> -Zellen.	65
Tabelle 3-7. Inhibitionskonstanten von Pro-Xaa- und Xaa-Pro-Dipeptiden für die [³ H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende <i>P. pastoris</i> -Zellen.	68
Tabelle 3-8. Inhibitionskonstanten von verschiedenen Dipeptiden für die [³ H]-D-Phe-Ala-Aufnahme in PEPT1 und PEPT2 exprimierende <i>P. pastoris</i> -Zellen.	70
Tabelle 3-9. Affinitäten verschiedener Stereoisomere von Dipeptiden und Dipeptidderivaten für ihre Interaktion mit PEPT1 und PEPT2.	74
Tabelle 3-10. ω-Aminofettsäuren und ω-Aminoacyl-Alanin Derivate und ihre Interaktion mit PEPT2.	80
Tabelle 3-11. Interaktion der Alanin-Arylamide mit PEPT2 und die Rolle der aromatischen Substituenten-Konstanten.	85
Tabelle 3-12. Interaktion von Dipeptidderivaten mit PEPT2.	95
Tabelle 3-13. K _i -Werte für die Interaktion von Derivaten des Dipeptids Lys-Lys mit PEPT2.	97

VI. Plasmide und Oligonukleotide

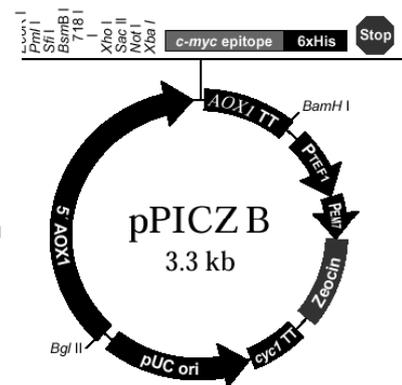
A) Plasmide



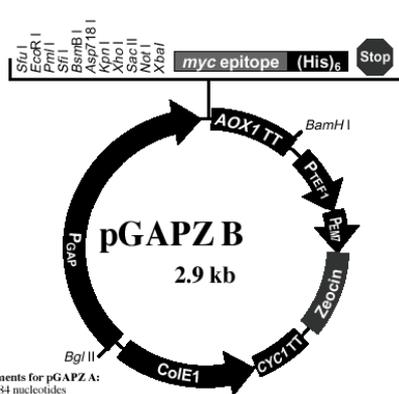
pPIC3L (hergestellt im Labor von Prof. Dr. H. Daniel, Insitut für Ernährungswissenschaft, Gießen)



pPIC9 (Invitrogen, Sandiego, USA)

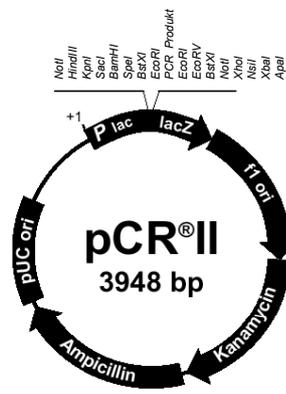


pPICZB (Invitrogen, Sandiego, USA)

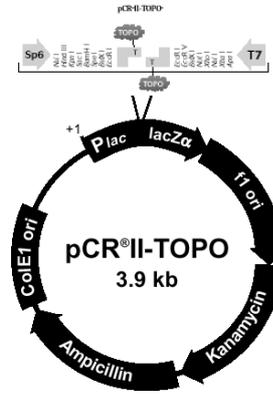


Sequenzen für pGAPZ A:
54 nucleotides

pGAPZB (Invitrogen, Sandiego, USA)



pCRII (Invitrogen, Sandiego, USA)



pCRII-TOPO (Invitrogen, Sandiego, USA)

B) Oligonukleotide zur Sequenzierung

Name

Sequenz

pGAPfw

5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGA-3'

3AOX1

5'-GCAAATGGCATTCTGACATCCTC-3'

1H498f

5'-GGAGATCAGTTTGAAGAGGGC-3'

1H1049f

5'-CCTGATCGTGATCATGGTCCC-3'

1H1591f

5'-GCTACAATGCCAGCACATAACC-3'

1H1815b

5'-GCGGGATTTGCAGAGCCATG-3'

1H1231b

5'-CCTTTGGGAAGACTGGAAG-3'

1H699b

5'-CAATCAGGGCTACAGCCATG-3'

VII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben oder mich ganz einfach nur auf diesem spannenden Feld der Wissenschaft die letzten Jahre begleitet haben.

An allererster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. H. Daniel bedanken, nicht nur für die Betreuung dieser Arbeit und die Überlassung des Themas, sondern vor allem dafür, dass Sie mich in die „Abgründe“ der Ernährungswissenschaft geführt hat und es immer verstanden hat, durch ihre Faszination für das Grundlegende zu motivieren.

Bei PD Dr. Frank Döring möchte ich mich dafür bedanken, dass er meine Begeisterung für einen zunächst einmal so unspektakulär erscheinenden Organismus wie Hefen als Modell zur Charakterisierung von Prozessen des Menschen geweckt hat.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Ernährungswissenschaft in Gießen und Freising, insbesondere bei Elisabeth Fischer und Beate Hecker, die in Gießen viele Substanz-Screenings mit Hefen durchführten. Bei den Weihenstephanern sage ich ganz besonders Helene Prunkl und Reiner Reichelmeier Danke, da sie durch die fachmännische Pflege der Frösche sowie den Elektrophysiologie-Messungen maßgeblich zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Isabel Rubio und Michael Boll möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, aber vor allem für die langjährige Freundschaft und die unzähligen `Diskussionsabende` bei einem kühlen Licher oder Weihenstephaner bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön auch an Maja Klapper, für das Korrekturlesen und den `kritischen Blick`.

Da ich meine Arbeit sowohl in hessischem als auch in bajuwarischem Hoheitsgebiet durchführen durfte, denk ich gerne sowohl an die Gießener Truppe als auch an das Weihenstephaner Team zurück. Danke Euch allen für die die freundliche Atmosphäre und die schönen Momente auch jenseits der Wissenschaft.

VIII. Lebenslauf

Stephan Theis
Vogelsang 11
67146 Deidesheim

geboren am 11.12.1971 in Neustadt a.d. Weinstraße
Familienstand: ledig

Schulbildung

1978 - 1982 Grundschule in Deidesheim
1982 - 1991 Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium in Neustadt a.d. Weinstraße
Abitur: Mai 1991

Zivildienst

08/1991 – 09/1992 Bildungs- und Exerzitenhaus Herz-Jesu-Kloster in
Neustadt a.d. Weinstraße

Hochschulausbildung

10/1992 – 09/1997 Studium der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften
an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
Fachrichtung: Ernährungswissenschaft
01/1996 – 01/1997 Diplomarbeit in Biochemie der Ernährung
Thema: „Heterologe Expression und Funktionsanalyse des
intestinalen Peptidtransporters PepT1 in der methylotrophen
Hefe *Pichia pastoris*“

Promotion

seit 11/1997 Promotion als wissenschaftlicher Angestellter zunächst am
Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-
Universität Gießen und seit März 1999 an der
Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan,
Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Daniel