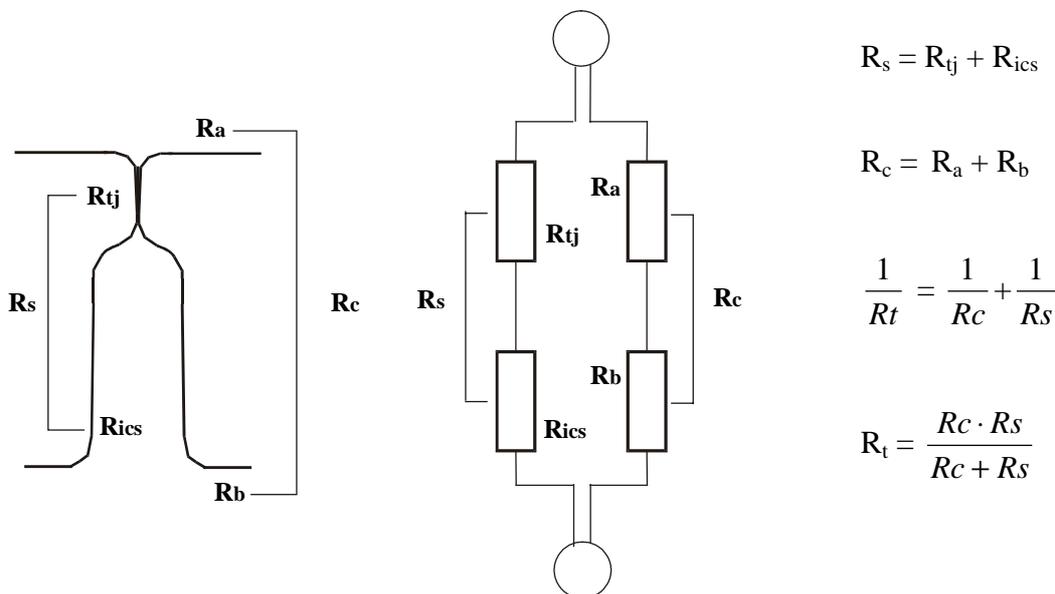


# 1 Literatur

## 1.1 Epithelialer Transport und Gewebewiderstand

Stofftransport durch ein Epithel ist grundsätzlich auf zwei Wegen möglich. Einmal auf transzellulärem Weg, der die Passage durch die apikale und basolaterale Membran einschließt, sowie auf parazellulärem Weg durch die tight-junctions und den Interzellularraum. Im Hinblick auf den Transport von Ionen durch Epithelien werden für die Passagewege aus der Elektrizitätslehre bekannte Darstellungen übernommen, in denen die für die Epithelpassage wichtigen „Barrieren“ als Widerstände dargestellt werden. Bei dieser (Modell)Übertragung addieren sich der Widerstand der apikalen ( $R_a$ ) und basolateralen Membran ( $R_b$ ) zum (gesamt) Zellwiderstand ( $R_c$ ), sowie der Widerstand der tight-junctions ( $R_{tj}$ ) und des Interzellularraums ( $R_{ics}$ ) zum parazellulären Widerstand ( $R_s$ ), da ihre Anordnung im Vergleich einer „Reihenschaltung“ entspricht. Zellwiderstand ( $R_c$ ) und parazellulärer Widerstand ( $R_s$ ) bilden „in Parallelschaltung“ den Gewebewiderstand ( $R_t$ ).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Einzelwiderstände eines Epithels**

Die Gewebeleitfähigkeit ist der reziproke Wert des Gewebewiderstandes.

$$G_t = \frac{1}{R_t} \quad \text{also gilt: } G_t = G_c + G_s$$

Jedes Epithel besitzt einen charakteristischen Gewebewiderstand, anhand dessen eine Einteilung in durchlässige (leaky) bis dichte (tight) Epithelien vorgenommen werden kann.

Als „leaky“ gelten Epithelien mit einem Gewebewiderstand ( $R_t$ ) von  $< 1000 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ . Ihr zellulärer Widerstand ( $R_c$ ) ist größer als der parazelluläre Widerstand ( $R_s$ ) [ $\frac{R_c}{R_s} > 1$ ] und die parazelluläre Leitfähigkeit ( $G_s$ ) beträgt mehr als 50% der Gesamtleitfähigkeit ( $G_t$ ). Solche Epithelien sind z.B. im Dünndarm und im proximalen Nierentubulus zu finden. Als moderat durchlässig, bzw. moderat dicht („moderately leaky“/ „moderately tight“) werden neben dem Colon des Kaninchens (POWELL, 1981) auch der Psalter [ $R_t=717 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $\frac{R_c}{R_s} = 2.1$ ] (SCHULTHEIß, 1995) und der Pansen [ $R_t < 1000 \Omega \cdot \text{m}^{-2}$ ;  $\frac{R_c}{R_s} = 1.4$ ] des Schafes bezeichnet (LANG, 1997). Epithelien, die als „tight“ klassifiziert werden, sind z.B. der Magenfundus oder die Harnblase (POWELL, 1981).

Die Größe des Gewebewiderstandes wird vor allem von der Durchlässigkeit der tight-junctions bestimmt. In „leaky“ Epithelien findet der größte Teil des Stofftransportes auf parazellulärem Wege (passiv) statt, wogegen in weniger durchlässigen Epithelien, deren parazelluläre Passagewege durch dichtere tight-junctions beschränkt sind, der überwiegende Teil der Transportvorgänge transzellulär stattfindet.

## 1.2 Protonen-gekoppelter Peptidtransport in Darm und Niere

Im Zusammenhang mit diesem Kapitel soll vor allen Dingen auf die Übersichtsarbeit von H. DANIEL (1996) hingewiesen werden, in der ein ausgezeichneter Überblick über die Thematik der Protonen-gekoppelten Peptid-Transportmechanismen in Darm und Niere (und die Forschungsergebnisse jüngerer Zeit) gegeben wird. Für die ausführlichere Darstellung der früheren Arbeiten zu diesem Thema sei auf die Übersichtsarbeiten von D.M. MATTHEWS (1975, 1980) verwiesen.

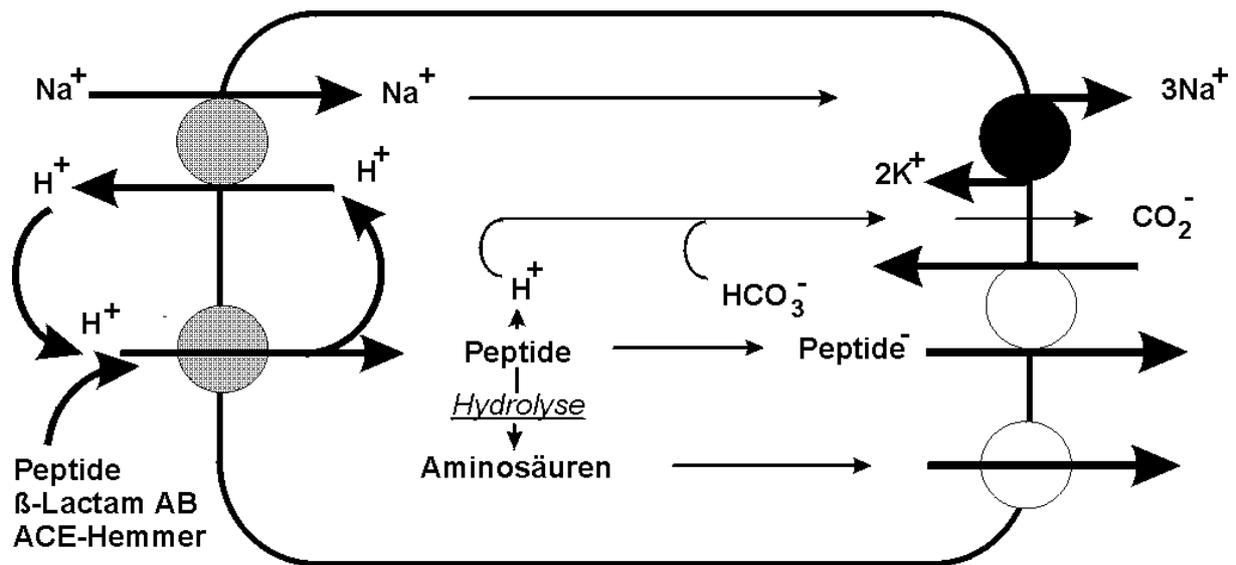
Zusätzlich zu den Transportmechanismen, die den Transport von Aminosäuren ermöglichen, bietet die Aufnahme kurzkettiger Peptide für die Zelle einen effizienten und ökonomischen Weg der Aminosäureaufnahme. Seit vielen Jahren ist in Bakterien und Hefen ein an Protonen gekoppelter Peptid-Transporter bekannt, der zu Beginn der achtziger Jahre auch in der apikalen Membran von Zellen des Dünndarmepithels und im proximalen Tubulus der Niere nachgewiesen wurde. Bei Wirbeltieren waren bis zu diesem Zeitpunkt vergleichbare aktive Transportmechanismen für Peptide nur als  $\text{Na}^+$ - gekoppelte Cotransportsysteme bekannt. Deswegen stellte die Tatsache, daß der Peptidtransporter einen Protonengradienten zur Aufnahme in die Zelle nutzt, eine neue Variation gekoppelter Transportsysteme dar

(GANAPATHY et al., 1981). Vermutet wird dieser Transportmechanismus auch in Epithelien anderer Organe, wie Plazenta, Lunge, in der Blut-Hirn-Schranke und im distalen Nephron. Ebenso soll er an Prozessen der Antigen-Präsentation beteiligt sein (MEREDITH und BOYD, 1995).

Die zelluläre Basis des Peptidtransports wurde mit Hilfe isolierter Membranvesikel aus Bürstensaumzellen des Dünndarms studiert (siehe Abb.2). Der Transport der Peptide in die Zelle ist durch den mit  $H^+$  gekoppelten Cotransport elektrogen und somit abhängig vom Membranpotential. Es wurde gezeigt, daß als Substrate nicht nur Di- und Tripeptide dienen können, sondern auch pharmakologische Substanzen, die ein "Peptid-Rückgrat" besitzen, wie  $\beta$ -Lactam Antibiotika oder ACE (Angiotensin converting enzyme)-Hemmer (FEI et al., 1994).

Die weitere Aufklärung der Vorgänge auf zellulärer Ebene war vor allem durch folgende Unstimmigkeit von großem Interesse: In Versuchen mit intaktem Gewebe (MATTHEWS und PAYNE, 1980, RUBINO et al., 1971, CHEESEMAN, 1980, GANAPATHY und RADHAKRISHNAN, 1980) wies der Transportmechanismus eine  $Na^+$ -Abhängigkeit auf, wohingegen er bei der Arbeit mit isolierten Membranvesikeln  $Na^+$  unabhängig war (GANAPATHY et al., 1981). Die Erklärung dafür schien ein elektroneutraler Kationenaustauscher zu sein, der ebenfalls in der Bürstensaummembran lokalisiert ist. Dieser Austauscher ermöglicht die  $Na^+$  Aufnahme in die Zelle und schleust dafür jeweils ein Proton heraus (Abb.2). Seine Aktivierung erfolgt durch den fallenden (intrazellulären) pH-Wert bei der an Protonen-gekoppelten Peptidaufnahme. Durch dieses „Protonenrecycling“ wird einer Übersäuerung der Zelle entgegengewirkt (DANIEL und HERGET, 1997).

In der Zelle werden die Peptide zum Teil durch Peptidasen hydrolysiert und als freie Aminosäuren basolateral abgegeben, zum Teil erfolgt der Transport über die basolaterale Membran in peptidgebundener Form. Über die Art des Transportmechanismus existieren widersprüchliche Angaben. Nach MEREDITH und BOYD (1995) erfolgt ein Transport von Peptiden über einen elektroneutralen Anionentransporter in der basolateralen Membran im Austausch gegen Bicarbonat (Abb.2). Andere Arbeitsgruppen postulieren eine Protonen-Abhängigkeit des basolateralen Transportmechanismus, vergleichbar mit dem Transporter der apikalen Membran (THWAITES et al., 1993, DYER et al., 1990).



**Abb. 2: Modell des Protonen-gekoppelten Peptidtransporters (modifiziert nach H. Daniel, 1996)**

Peptide und peptidähnliche Substanzen werden im Cotransport mit Protonen aufgenommen. Triebkräfte sind der nach innen gerichtete Protonengradient, sowie das Potential der apikalen Zellmembran (Zellinneres negativ). Durch die Protonenaufnahme sinkt der intrazelluläre pH-Wert. Dadurch wird ein  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher aktiviert, der ebenfalls in der apikalen Membran lokalisiert ist. Dieser schleust Protonen gegen  $\text{Na}^+$ -Ionen aus und wirkt so einer Übersäuerung der Zelle entgegen. Für je ein Proton, das die Zelle verläßt, gelangt ein  $\text{Na}^+$ -Ion entlang des  $\text{Na}^+$ -Gradienten ins Zellinnere. Der  $\text{Na}^+$ -Gradient wird durch die  $\text{Na}/\text{K}$ -ATPase aufrecht erhalten, die auf der basolateralen Seite drei  $\text{Na}^+$ -Ionen gegen zwei  $\text{K}^+$ -Ionen austauscht. Intrazellulär werden die Peptide zum Teil hydrolysiert und als Aminosäuren ausgeschleust, zum Teil verlassen sie die Zelle basolateral in negativ geladener Form im Austausch gegen Bicarbonat.

Widersprüchlich hierzu sind die Ergebnisse von TERADA et al. (1999), die den Peptidtransport über die basolaterale Membran als wenig abhängig vom Umgebungs pH und nur entlang eines Konzentrationsgefälles charakterisieren. Hieraus wird in dieser Arbeit auf einen passiven Mechanismus in Form von erleichterter Diffusion geschlossen.

In Versuchen an menschlichen Darmzellen konnte gezeigt werden, daß sich die Peptidaufnahme in die Zelle durch Insulin stimulieren und durch Genistein, einen Tyrosinkinase-Hemmer, blockieren läßt (THAMOTHARAN, et al., 1999). Die Steigerung der Peptidaufnahme erfolgt durch eine Erhöhung der Anzahl an Transportmolekülen in der apikalen Zellmembran. Es wurde angenommen, daß die Transportmoleküle in einem cytoplasmatischen Pool vorhanden sind und in die apikale Membran verlagert werden.

Andere Versuche an menschlichen Enterocyten (WALKER et al., 1998) ergaben, daß eine gesteigerte Peptidaufnahme über eine Vermehrung der apikalen Transportmoleküle bei Zunahme der Peptidkonzentration im umgebenden Medium stattfindet. Die Vermehrung der

Transportmoleküle erfolgt durch eine direkte Reaktion der Zelle, unabhängig von hormonaler und neuronaler Kontrolle.

Bis jetzt liegen zwar genügend Beweise für das geschilderte Prinzip des Peptidtransportes vor, doch erscheint es unwahrscheinlich, daß nur ein Mechanismus (Molekül) für diese Transportvorgänge verantwortlich ist, wenn man die Menge und Verschiedenartigkeit der möglichen Substrate betrachtet: Aus 20 proteinogenen Aminosäuren, die im Nahrungsprotein enthalten sind, können nach hydrolytischer Spaltung 400 verschiedene Dipeptide und 8000 verschiedene Tripeptide gebildet werden, die in Ladung, Löslichkeit und molekularem Gewicht stark variieren (DANIEL, 1996).

1994 gelang es zum erstenmal, den Peptidtransporter aus Zellen eines Säugetieres zu klonen. Aus der Darmmukosa von Kaninchen wurde m-RNA isoliert und in Oocyten von *Xenopus laevis* injiziert. Die Oocyten wurden mittels radioaktiv markierter Peptide auf Transportaktivität untersucht, wobei sich zeigte, daß sie das Transportprotein auf ihrer Oberfläche exprimiert hatten (FEI et al., 1994; BOLL et al., 1994). 1995 gelang dies auch für das Transportprotein im proximalen Tubulus der Niere (BOLL et al., 1996). Die Peptidtransporter, pepT1, im Dünndarm und pepT2 in der Niere arbeiten nach dem gleichen Prinzip, unterscheiden sich aber in ihrer molekularen Struktur, sowie hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Substrataffinität (DANIEL, 1996).

Da der Peptidtransport als Folge des gleichzeitigen Protonentransportes durch die Membran elektrogen ist, erzeugt die Protonen-gekoppelte Substrat(Peptid)aufnahme einen nach innen gerichteten Stromfluß, der mittels Voltage-Clamp-Technik meßbar ist. Durch die Kopplung des Transports an Protonen fällt bei der Substrataufnahme der intrazelluläre pH ab. Simultane Messungen des Membranpotentials und des intrazellulären pH-Wertes an Oocyten mit exprimiertem pepT2-Transportprotein zeigten, daß nach Zugabe von Cefadroxil ( $\beta$ -Lactam Antibiotikum) zuerst eine Depolarisation der Zellmembran und danach ein Abfall des intrazellulären pH-Wertes erfolgten (BOLL et al. 1994, FEI et al., 1994).

Genauere Untersuchungen über den intrazellulären pH-Abfall wurden an Mäuseenterocyten durchgeführt (STEWART et al., 1999). Nach Zugabe von Phenylalanyl-Alanin in ein umgebendes Medium wurde die Ausbreitung des fallenden pH-Wertes in der Zelle mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops beobachtet. Das Peptid wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,1-20 mmol/l) zugegeben, die ein unterschiedlich starkes Absinken des pH<sub>i</sub> zur Folge hatten. Die Zugabe von 1mmol/l Peptid führte zu einem Abfall des intrazellulären

pH von 7,36 auf 7,25 (Mittelwerte). 0,5 mmol/l ließen den  $\text{pH}_i$  von 7,37 auf 7,32 sinken. Nach Zugabe von 10 mmol/l fiel der  $\text{pH}_i$  um  $0,16 \pm 0,09$  pH Einheiten.

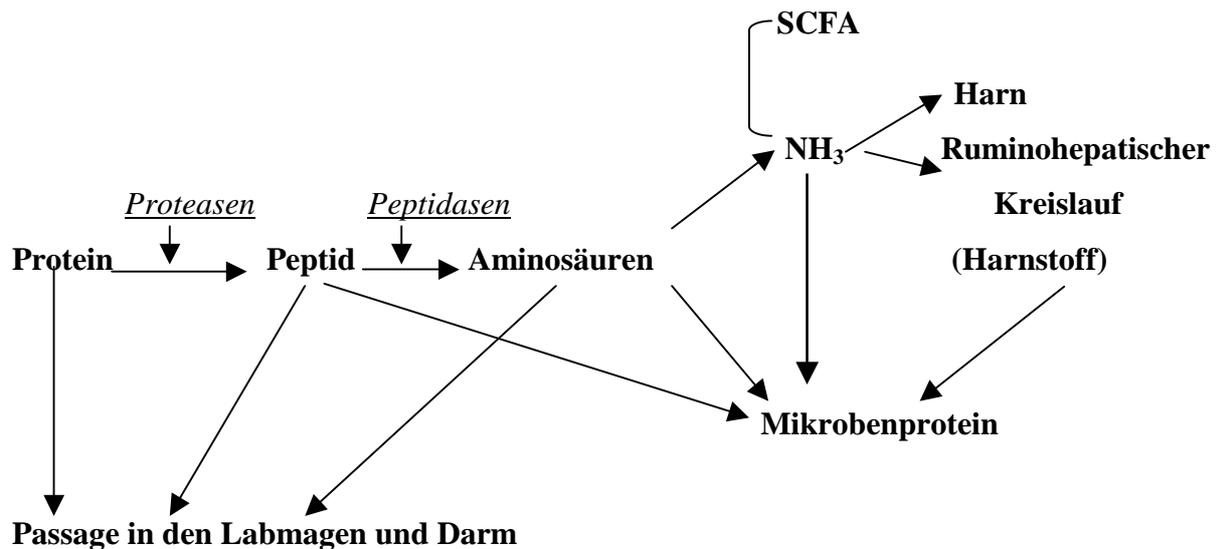
Die Untersuchungen des Peptidtransportes an BCEFC gefärbten Monolayern der humanen Darmzelllinie Caco-2 ergaben einen Abfall des intrazellulären pH von 7,4 auf 7,1 nach Zugabe von 20 mmol/l Gly-Sar auf der apikalen Seite der Zellen (THWAITES et al., 1993).

Da der Protonen-gekoppelte Peptidtransporter bislang vor allem in monogastrischen Spezies untersucht wurde, führten WOLFFRAM et al. (1998) Untersuchungen am Darm von Wiederkäuern durch. Mit Hilfe von isolierten Membranvesikeln aus dem Bürstensaum gelang der Nachweis des Transporters in Zellen des proximalen Jejunums und Ileums von Rindern.

### **1.3 Proteinspaltung und Resorption im Vormagen**

Das Nahrungsprotein wird im Pansen der Wiederkäuer zum größten Teil mikrobiell abgebaut, ein anderer Teil (ca. 20-40 %) passiert den Vormagen unverändert als sogenanntes Durchflußprotein (UDP = undegradable dietary protein). Für den Proteinmetabolismus im Vormagen sind vor allem die Bakterien verantwortlich. Protozoen und zu noch geringerem Anteil Pilze spielen eine untergeordnete Rolle, obwohl auch ihr Fehlen negative Auswirkungen auf die proteolytischen Vorgänge haben kann (BRODERICK et al., 1991).

Der mikrobielle Abbau ist abhängig von der Wasserlöslichkeit und Struktur der Proteine. Bestimmte Bindungen, chemische oder physikalische Behandlung verlangsamen, andere strukturelle Eigenheiten beschleunigen den Abbau (BRODERICK und WALLACE, 1988) Bsp.: Casein besitzt eine lineare Struktur und wird deswegen schnell abgebaut, Ovalbumin dagegen besitzt viele Disulfidbrücken und wird deshalb langsam hydrolysiert. Von den Mikroorganismen abgegebene Proteasen und Peptidasen hydrolysieren die Nahrungsproteine zu Peptiden und freien Aminosäuren, die in nachfolgende Bereiche des Magen-Darm-Traktes weiterwandern oder von den Mikroorganismen selbst als Energiequelle und zur Synthese mikrobeneigener Proteine verwandt werden. Bei der zur Energiegewinnung erfolgenden Fermentation von freien Aminosäuren durch die Mikroorganismen entstehen flüchtige Fettsäuren (SCFA: short chain fatty acids ) und Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ). Beide Substanzen können durch die Pansenwand resorbiert werden, wobei Ammoniak über den ruminohepatischen Kreislauf (in Form von in der Leber gebildetem Harnstoff) wieder in den Pansen rezirkulieren kann (Abb.3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der mikrobiellen Umsetzungen von Futterproteinen**

Bei ausreichenden Mengen an Kohlenhydraten und Energie kann Ammoniak wieder für die mikrobielle Proteinsynthese verwendet werden, das im Labmagen und vor allem im Dünndarm ebenfalls verdaut wird.

Durch die Synthese von mikrobiellen Proteinen sind Wiederkäuer in gewissem Grad unabhängig von der äußeren Zufuhr essentieller Aminosäuren, da auch diese bei den Synthesevorgängen gebildet werden können. Die Nettoresorption von freien Aminosäuren durch die Pansenwand ist gering und somit zu vernachlässigen (MARTENS et al., 1974).

Neuere Studien zeigten, daß in der Pansenflüssigkeit vor allem Peptide als Proteinspaltprodukte vorhanden sind, wohingegen freie Aminosäuren hauptsächlich intrazellulär in den Mikroorganismen zu finden sind (WALLACE et al., 1993). Darüberhinaus wurde gezeigt, daß die Hydrolyse bestimmter, schnell hydrolysierbarer Proteine, wie z. B. Casein, eine beträchtliche Akkumulation von Peptiden in der Pansenflüssigkeit zur Folge hat, da die Proteinspaltung wesentlich schneller erfolgt als die weitere Nutzung durch die Mikroorganismen. Dagegen bewirken Proteine, die einem langsameren Abbau unterliegen, keinen signifikanten Anstieg des Peptidspiegels (Siehe Tab. 1).

**Tab. 1: Konzentration von Peptiden in der Pansenflüssigkeit in Abhängigkeit vom Futterprotein und der Zeit nach der Fütterung. Bestimmte Proteine bewirken nach Hydrolyse durch die Mikroorganismen im Pansen einen Anstieg der Konzentration extrazellulärer peptidgebundener Aminosäuren. Diese Konzentration ist abhängig von der Art des gefütterten Proteins, der Fütterungsfrequenz etc.**

Art des Versuchs	Futterprotein	Basiskonz. der peptidgebundenen AS	Max. Konzentration der peptidgebundenen AS nach Fütterung bzw. Peptidzugabe	Dauer der erhöhten Peptidkonz. nach Fütterung, bzw. Peptidzugabe	Autor
<i>In vivo</i>	Sojaprotein	412 mg/l	1559mg/l	1 - 16h	CHEN, SNIFFEN, RUSSEL, 1987
	Sojaprot autoklaviert	460 mg/l	1139mg/l		
	Sojaextrakt und Fischmehl	404 mg/l	1011 mg/l		
	Heu und Kraftfutter	400mg/l	1200mg/l	1 - 8h	CHEN, RUSSEL, SNIFFEN 1987
	Heu und Kraftfutter +Harnstoff, Casein oder Ovalbumin	Casein: 0,2mmol/l Ovalbumin: 0,2-0,3mmol/l	Casein: 3,8 mmol/l	1 - 3h	BRODERICK WALLACE, 1988
	gemischt		1.02µmol/ml (=140µg/ml)		WALLACE, et al. 1993
<i>in vitro</i>	Casein		400mg/l	2h-7h	RUSSEL, SNIFFEN, VAN SOEST, 1983
	Casein		800µmol/g	30min-120min	BRODERICK CRAIG 1989
	Casein Lösl.Soja-protein		400-500 mg N/l (≈2500 mg Peptide/l)*	-96h	CHEN, RUSSEL 1991

\*errechnet mit einem Ausgangswert von 16% N-Gehalt im Protein.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

Der mikrobielle Abbau der Proteine verursacht in Abhängigkeit von der Menge und Qualität der verfütterten Proteine sowie von der Wiederverwendung der Abbauprodukte eine Freisetzung von Peptiden. Insbesondere nach der Hydrolyse schnell abbaubarer Proteine kommt es zu einer vorübergehenden Erhöhung der Peptidkonzentration. Somit wäre also Substrat für eine Peptidresorption aus dem Vormagenbereich vorhanden.

Die Resorption von freien Aminosäuren durch das Pansenepithel ist sehr gering (MARTENS et al., 1974), so daß für eine mögliche Aminosäure-Resorption aus dem Vormagenbereich nur die peptidgebundene Form von Bedeutung sein könnte.

## **1.4 Untersuchungen zur Peptidresorption aus den Vormägen**

### **1.4.1 Durchblutungsmessungen**

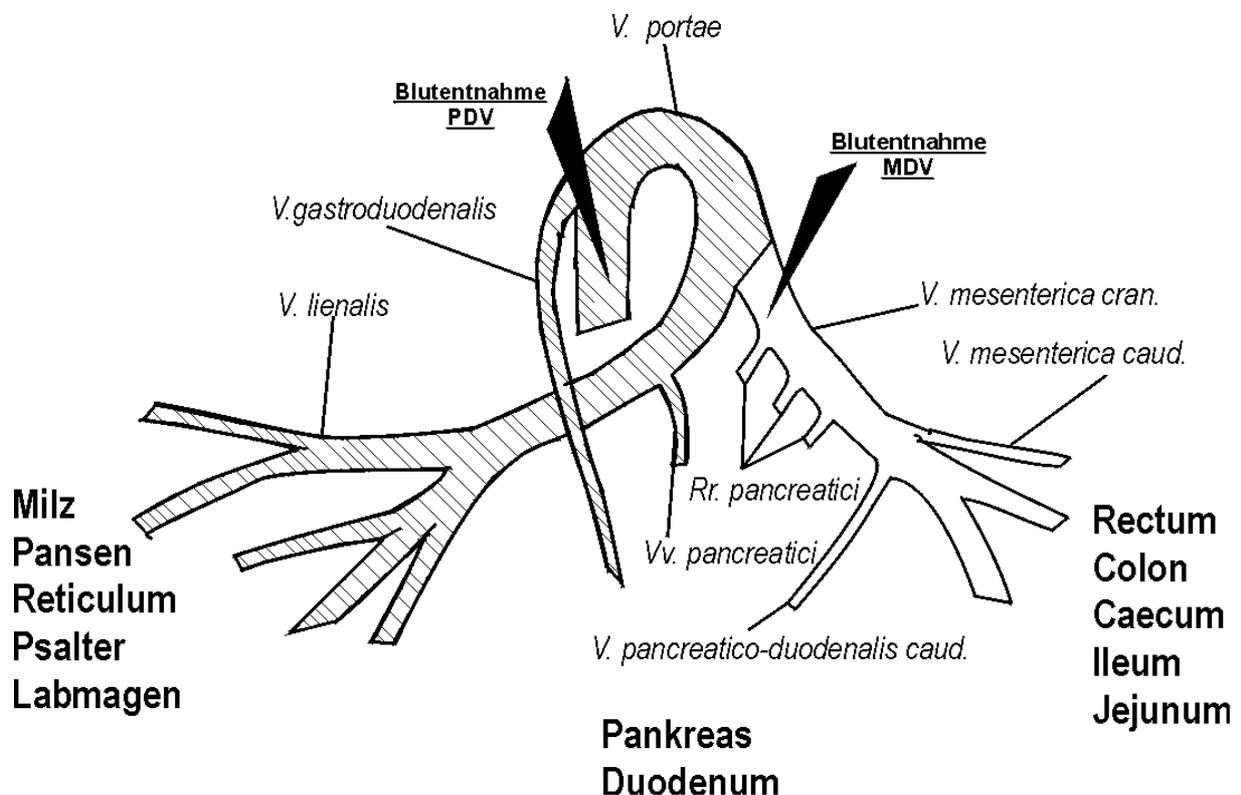
In mehreren Versuchen, in denen Durchblutungsmessungen verschiedener Abschnitte des Magen-Darm-Kanals vorgenommen wurden, wurden sehr hohe Konzentrationen an peptidgebundenen Aminosäuren im Vergleich zu freien Aminosäuren im Plasma des portalen und mesenterialen Blutes festgestellt, deren Herkunft jedoch zunächst unklar war (MC CORMICK und WEBB, 1982, DANILSON et al., 1987). Eine logische Erklärung schien die Resorption von Peptiden aus dem Gastrointestinaltrakt zu sein, allerdings wurde auch in Betracht gezogen, daß sie durch den Proteinturnover oder durch synthetische Aktivität der portal versorgten Organe entstanden sein könnten (KOELN et al., 1993).

In weiterführenden Untersuchungen (WEBB et al., 1993) über den *in vivo* Flux von Peptiden und von freien Aminosäuren über die portal versorgten Organe von Kälbern und Schafen wurde versucht, die Mengen der Peptide erneut zu quantifizieren und deren Herkunft genauer zu klären. Zu diesem Zwecke wurden Blutproben aus Bauchorta, Pfortader und Mesenterialvene analysiert. Der mesenteriale (MDV) und portale (PDV) Blutfluß wurden bestimmt und der nichtmesenteriale Blutfluß (nonMDV) als deren Differenz errechnet (siehe Abb. 4: venöse Blutversorgung des Magen-Darm-Trakts). Die Ergebnisse zeigten, daß resorbierte Peptide, wie schon in früheren Experimenten ermittelt, einen wesentlichen Anteil an der Aminosäureversorgung des Tieres besitzen. Ferner wurde rechnerisch ermittelt, daß das venöse Blut der nicht-mesenterial versorgten Gewebe (Mägen, Duodenum und Milz) erstaunlich hohe Mengen an Peptiden enthält:

<u>Kälber:</u>	Peptidmenge im mesenterialen Blut:	49,48 g/d
	Peptidgehalt im nicht mesenterialen Blut:	427,74 g/d
<u>Schafe:</u>	Peptidgehalt im mesenterialen Blut:	52,01 g/d
	Peptidgehalt im nicht mesenterialen Blut:	308,4 g/d

(WEBB et al., 1993)

In Anbetracht der Höhe des Peptidgehaltes im nicht mesenterialen Blut verglichen mit freien Aminosäuren und Peptiden im mesenterialen Blut wurde unter anderem daher auch eine Resorption aus den Vormägen in Betracht gezogen.



**Abb. 4: Venöse Blutversorgung des Magen-Darm-Traktes. Schematische Darstellung der Hauptäste der V. Portae.**

Der (errechnete) nicht-mesenteriale Blutfluß ist schraffiert dargestellt. Er ergibt sich aus dem portalen (gesamt) Blutfluß, abzüglich des mesenterialen Blutflusses (nicht schraffiert). Milz, Pansen, Reticulum und Labmagen sind nicht-mesenterial, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon und Rectum sind mesenterial und Pankreas und Duodenum sowohl mesenterial, als auch nicht-mesenterial versorgt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch SEAL und PARKER 1996, die einen ähnlichen Versuch durchführten. Ihre Blutproben stammten aus Carotis, Mesenterialvene und Pfortader von jungen Rindern. Im portalen Blut wurde verglichen mit mesenterialem Blut ein ungefähr doppelt so hoher Anteil peptidgebundener AS festgestellt:

Peptidgehalt im mesenterialen Blut:	2,07 mol/d,
Peptidgehalt im portalen Blut:	5,04 mol/d
Errechneter Peptidgehalt des nicht mesenterialen Blutes:	2,97mol/d

Daraus schlossen Sie ebenfalls, daß, wenn diese Peptide im Magen-Darm-Trakt resorbiert wurden, der Magenbereich als möglicher, nicht mesenterialversorgter Resorptionsort in Frage käme.

#### **1.4.2 Peptidtransport isolierter Epithelien**

Zur Klärung der oben erwähnten Phänomene führten MATTHEWS und WEBB, (1995) *in vitro* Experimente mit isolierten Pansen- und Blättermagen-Epithelien durch, in denen die Passage verschiedener Peptide geprüft wurde. Hierzu wurden steigende Konzentrationen von L-Carnosin [0, 6, 12, 24 oder 96 mmol/l], L-35S-Methionin (Anm.: „aktives Methionin“ = Adenin-Methionin-Thetin) und L-35-S-Methionylglycine [0.375, 0.75, 1.5, 3,6 oder 12 mmol/l] verwendet und ein pH-Gradient von pH 6.0 mucosal und pH 7.4 serosal erstellt, wie er in früheren Experimenten zur Darstellung carriervermittelter Prozesse verwendet wurde (GANAPATHY und LEIBACH, 1981). Die Transportfunktion des isolierten Paltarepithels wurde in einem vorhergehenden Experiment durch die Bestimmung der Transportrate für Butyrat nach mucosaler Zugabe überprüft.

Carnosin, Methionin und Methionylglycine wurden von der mucosalen zur serosalen Seite transportiert, ohne hydrolysiert zu werden. Der lineare Zusammenhang zwischen Transportrate und Zeit weist darauf hin, daß sich der Transport bei den im Experiment verwendeten Konzentrationen nicht sättigen ließ. Dies spricht für eine Transportform, die nicht durch Carrier vermittelt wird. Die Absorptionsrate war für Methionin zu jeder Zeit größer als für Methionylglycin. Das Blättermagenepithel wies gegenüber dem Pansenepithel für alle Substanzen erhöhte Transportraten auf.

In einer weiteren Reihe von Experimenten zur Peptidresorption an isolierten Vormagenepithelien wurde der Einfluß verschiedener Peptide aufeinander und die Beeinflussung durch Zugabe flüchtiger Fettsäuren untersucht (MC COLLUM und WEBB, 1998). Blättermagenepithelien wurden mit <sup>14</sup>C markiertem Glycyl-Sarkosin (0,1 mmol/l)

allein und in Kombination mit verschiedenen Peptiden (jedes 5 mmol/l) inkubiert. Dabei zeigte sich, daß die Gly-Sar Aufnahme ins Gewebe durch die anderen Substanzen gehemmt wurde. Daraus wurde geschlossen, daß ein aktiver Transportmechanismus vorhanden ist, um den die Peptide konkurrieren. Das Auftreten von Gly-Sar in der Pufferlösung der serosalen Seite wurde durch Zugabe der anderen Peptiden nicht gehemmt, obwohl sie in 50-facher Konzentration zugegeben wurden. Die Transportrate von Gly-Sar durch das Gewebe auf die serosale Seite stieg (quadratisch mit der Zeit ) an. Dies spricht im Gegenteil zu obigen Erkenntnissen nicht für Transporter vermittelte Prozesse. Es wurde die Möglichkeit angenommen, daß initial ein aktiver Mechanismus die Permeabilität des Epithels erhöht, so daß dann vermehrt Peptide auf passivem (parazellulärem) Weg durch das Epithel gelangen können.

Ein weiterer Versuchsansatz zeigte, daß die Aufnahme von Gly-Sar (0,1 mmol/l) in das Epithel durch flüchtige Fettsäuren (Acetat 50 mmol/l, Propionat 40 mmol/l, Butyrat 10 mmol/l) gehemmt wird. Die SCFA beeinträchtigen aber nicht das Auftreten von Gly-Sar im serosalen Puffer. Die Ergebnisse stützen die Hypothese der Peptidresorption über die Vormagenepithelien unter der Beteiligung von aktiven, transportervermittelten und passiven Prozessen, wie z.B. parazellulärem Transport.

### **1.5 Exprimiertes Transportprotein in *Xenopus laevis* Oocyten**

1996 gelang es MATTHEWS et al., ein Peptid-Transportsystem in Oocyten von *Xenopus laevis* zu exprimieren. Dazu wurde in defollikulierte Oocyten von *X. l.* aus dem Blättermagenepithel von Schafen isolierte poly(A)<sup>+</sup>RNA injiziert. Dann wurde die Fähigkeit zur Aufnahme von Glycin-Sarkosin aus einem umgebenden Medium bei verschiedenen pH-Werten beobachtet. Die Aufnahme von Glycin-Sarkosin stieg mit steigender Protonenkonzentration der Umgebung, wobei die Steigungskurve zum Teil lineare, zum Teil quadratische Anteile besaß. Bei einem pH-Wert von 5,5 ließ sich die Glycin-Sarkosin Aufnahme sättigen.

Daraus wurde geschlossen, daß die Zellen des Blättermagens mRNA produzieren, die Proteine codiert, die protonenabhängige Dipeptid-Transportaktivität zeigen. Gly-Sar diente als Substrat für den geklonten H<sup>+</sup>-Peptid-Cotransporter (FEI et al., 1994) und wurde deswegen ausgewählt. Da der Transport vom pH-Wert abhängt, wurde auch hier angenommen, daß die Transportvorgänge durch eine geladene Form des Peptids stimuliert werden oder Protonen als treibende Kraft benutzen.

In einem weiteren Experiment wurden ähnlich behandelte Oocyten mit der Technik der Mikroelektrode auf Transportfähigkeit untersucht (PAN et al., 1997). Di- bis Tetrapeptide riefen eine Depolarisation der Membran hervor, wodurch Transportaktivität angezeigt wird. Peptide, die größer als Tetrapeptide waren, wurden nicht transportiert. Außerdem erfolgte die Aufnahme von Peptiden in die Oocyten nur bei einem externen (Pufferlösung) pH-Wert von 5,5. Bei einem pH des umgebenden Mediums 7,5, fand kein Transport statt, so daß von einer Protonenabhängigkeit des Transportprozesses ausgegangen werden kann.

Aufgrund dieser Versuche scheint es also naheliegend, für das Vormagenepithel die Existenz eines ähnlichen Transportsystems wie für Darm oder Niere anzunehmen.

## **1.6 Zusammenfassung und eigene Fragestellung**

In Epithelien von Dünndarm und proximalem Nierentubulus existiert ein Transportmechanismus, der von einem Protonengradienten getrieben, Peptide durch die apikale Zellmembran befördert. Dieser Mechanismus wird auch in anderen Geweben des Körpers vermutet.

In den Vormägen der Wiederkäuer werden Nahrungsproteine mikrobiell gespalten. Die Geschwindigkeit dieses Prozesses hängt unter anderem von der Molekülstruktur des Proteins ab, so daß einige Proteine langsam, andere schnell gespalten werden. Bei den Proteinen, die der schnellen Spaltung unterliegen, kommt es zu einer vorübergehenden Akkumulation und damit zu einer beträchtlichen Erhöhung der Peptidkonzentration.

In Durchblutungsmessungen wurden im venösen Blut des Magen- und Dünndarmbereichs erhebliche Peptidkonzentrationen festgestellt, die auf eine mögliche Resorption aus den Vormägen zurückzuführen sind. In Versuchen mit isolierten Psalterepithelien wurde eine Passage von Peptiden von der mukosalen zur serosalen Seite nachgewiesen. Es wurde angenommen, daß sowohl aktive als auch passive Mechanismen beteiligt sind. Ferner gelang es mit isolierter mRNA einen Transportmechanismus in *X. l.* Oocyten zu exprimieren, der Peptide transportierte.

Mit Hilfe der Ussingkammer-Technik und intrazellulären pH-Messungen kann eine Aussage über die Qualität des Transportmechanismus getroffen werden (aktiv oder passiv). Darüber hinaus können quantitative Feststellungen über die Menge des transportierten Peptids und damit über die physiologische Relevanz des Transportmechanismus vorgenommen werden. Absicht dieser Arbeit war es, diesen Transportmechanismus mit Hilfe dieser Techniken genauer zu charakterisieren, da seine Existenz, wenn mit Niere und Darm vergleichbare

Peptidmengen transportiert würden, erhebliche Auswirkungen auf die momentan gültigen Grundsätze der Proteinbewertung bei Wiederkäuern hätte.