

1 Diskussion

1.1 Eigene Ergebnisse

1.1.1 Mechanismus des Protonen-gekoppelten Peptidtransporters

Der Transportmechanismus, der in der luminalen Membran von Epithelien des Dünndarms und proximalen Tubulus der Niere nachgewiesen wurde, nimmt Peptide, peptidähnliche Substanzen wie β -Lactam Antibiotika (Cefadroxil) oder ACE (Angiotensin Converting Enzyme)- Hemmer (Captopril) im Cotransport mit Protonen auf. Die treibenden Kräfte für die luminal Peptidaufnahme sind der in das Zellinnere gerichtete Protonengradient sowie das Potential der apikalen Membran (Zellinneres negativ) (Kap.1, Abb.2). Durch die Protonenaufnahme sinkt der intrazelluläre pH-Wert. Dadurch wird ein Na^+/H^+ -Austauscher aktiviert, der ebenfalls in der luminalen Membran lokalisiert ist. Dieser tauscht Protonen gegen Na^+ Ionen aus und wirkt so einer Übersäuerung der Zelle entgegen. Für je ein Proton, das die Zelle verläßt, gelangt ein Na^+ Ion entlang des Na^+ - Gradienten in die Zelle. Der Na^+ - Gradient wird durch die Na/K-ATPase aufrecht erhalten, die auf der basolateralen Seite drei Na^+ -Ionen gegen zwei K^+ -Ionen austauscht. Durch den Eintritt von einem Peptidmolekül zusammen mit einem Proton auf der apikalen Seite, den Austausch des Protons mit Na^+ und den aktiven Heraustransport des Na^+ durch die basolaterale Membran wird eine positive Ladung durch das Epithel transportiert. Der transepitheliale Peptidtransport ist also mit einem Ladungstransfer verbunden und verursacht auf diese Weise *in vitro* eine Zunahme des Kurzschlußstroms. Diese Zunahme des Kurzschlußstroms wäre mit der uns zur Verfügung stehenden Ussingkammer-Technik bis zu einer Meßgenauigkeit von $50 \text{ nEq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ feststellbar.

1.1.2 Ergebnisse der Elektrophysiologie

1.1.2.1 Heu gefütterte Tiere

Die Untersuchungen wurden zuerst an den Vormagenepithelien von Heu gefütterten Tieren bei einem pH-Wert von 7,4 auf mukosaler wie serosaler Kammerseite vorgenommen. Die Verwendung des gleichen pH-Werts auf beiden Kammerseiten entspricht den Standardbedingungen bei Untersuchungen mit der Ussingkammer-Technik. Es wurde davon ausgegangen, daß Heufütterung den ursprünglichen Ernährungsbedingungen entspricht und daher verglichen mit anderen Fütterungsregimen als physiologisch anzusehen ist.

Es ließen sich weder bei den untersuchten Pansen- oder Psalterepithelien signifikante Abweichungen des I_{sc} nach Zugabe von Captopril, Cefadroxil oder Glycyl-Glutamin von der Kontrollgruppe feststellen.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde der pH-Wert der mukosalen Seite auf 6,4 abgesenkt, um so über die Erhöhung der Protonenkonzentration die Triebkraft des Transporters zu verstärken. Bei diesem Ansatz kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung des I_{sc} nach Zugabe von Captopril, Cefadroxil oder Glycyl-Glutamin im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den untersuchten Epithelien von Pansen und Psalter.

1.1.2.2 Kraftfutter gefütterte Tiere

Da bekannt ist, daß energiereiche Fütterung die Aktivität verschiedener Transportsysteme der Vormagenepithelien erhöht (DIRKSEN et al., 1984, DOREAU et al., 1997) und die Peptidresorption im menschlichen Darm durch Erhöhung der Peptidkonzentration in der Umgebung gesteigert wird (WALKER et al., 1998), wurden in einer weiteren Reihe von Versuchen Epithelien von Tieren verwendet, deren Futtermittel 800g Kraftfutter pro Tag enthielt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß sich die durch Kraftfutter erhöhte Fermentation von Stärke und vor allem von Protein stimulierend auf die Ausbildung der Peptidtransportsysteme auswirken könnte. Die Untersuchungen erfolgten zuerst wieder bei einem pH-Wert von 7,4 auf beiden Kammerseiten, der in einem weiteren Ansatz wiederholt mukosal auf 6,4 gesenkt wurde, um auch hier die Triebkraft des Protonen-gekoppelten Peptidtransporters zu erhöhen.

Wiederum kam es bei einem pH-Wert von 7,4 weder bei den untersuchten Pansen- noch bei den Psalterepithelien zu signifikanten Änderungen des I_{sc} nach Zugabe von Captopril, Cefadroxil oder Glycyl-Glutamin. Auch bei einem pH-Wert von 6,4 mukosal änderte sich der I_{sc} nicht signifikant nach Substanzzugabe.

1.1.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Elektrophysiologie

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen keine Hinweise auf einen Protonen-gekoppelten Transportmechanismus für Peptide und peptidähnliche Substanzen geben. Die vorhandene Ussingkammer-Technik erfaßt Stromänderungen $> 50 \text{ nEq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, eine Meßgenauigkeit die für den in unseren Versuchen verwendeten Meßbereich von 0 bis $2 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ausreichend genaue Messungen erlaubt (Anm.: eine Änderung des I_{sc} um $0,1 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ entspricht 100 nEq, es sind also Änderungen bis $0,05 \text{ } \mu\text{Eq}$ genau zu erfassen). Ein Protonen-gekoppelter Peptidtransport < 50

$\text{nEq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ würde also durch die vorhandene Meßtechnik nicht erfaßt werden. Darüber hinaus könnte der Transport auch elektrisch neutral erfolgen. Aus diesem Grunde wurden, um dem aufgezeigten Zweifel entgegenzutreten, Bestimmungen der Transportraten mit radioaktiv markiertem Peptid vorgenommen.

1.1.3 Ergebnisse der Messungen der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid.

Diese Messungen erfassen jede Passage der markierten Substanz durch das Epithel, unabhängig davon ob diese aktiv oder passiv, durch die Zelle oder auf parazellulärem Wege erfolgt. Aus Geweben, die sich in ihren elektrophysiologischen Parametern ähneln, wurden Paare gebildet. Dann wurden zuerst die unidirektionalen Transportraten (J_{ms} , bzw. J_{sm}) bestimmt. Anschließend wird aus ihnen der Nettoflux ($J_{\text{net}}=J_{\text{ms}}-J_{\text{sm}}$) errechnet.

1.1.3.1 Peptidtransportraten am Pansenepithel

1.1.3.1.1 Peptidtransport unter Kontrollbedingungen

Die Transportraten von der mukosalen zur serosalen Seite betragen $6,50 \pm 0,36 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, in der Gegenrichtung (J_{sm}) $9,71 \pm 0,94 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Als Folge ergab sich ein Nettotransport (J_{net}) von $-3,21 \pm 0,85 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, also eine Sekretion in den Pansen. (alle Transportraten sind signifikant von 0 verschieden) (Tab.2). Die ermittelten Transportraten waren sehr gering im Vergleich zu Ergebnissen aus Versuchen am Ileum von Kanninchen (RUBINO et al.,1971), in denen Transportraten im μ -molaren Bereich bestimmt wurden. Ihre untere Grenze betrug $0,59 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$.

In den Darstellungen der kumulativen Transporte wurde deutlich, daß die Gesamtmenge an Peptid, die durch das Epithel transportiert wurde, linear mit der Zeit zunahm (Abb. 20 und 21). Dies spricht für einen Diffusionsvorgang oder einen aktiven Transportprozess, der bei den vorliegenden Konzentrationen nicht gesättigt ist. Die Transportraten waren zu jedem Meßzeitpunkt ungefähr gleich groß, ändern sich also mit der Zeit nicht.

Da die Transportrichtung J_{sm} überwog, entspricht der Nettotransport einem Sekretionsvorgang (neg. Vorzeichen).

Auffällig war weiterhin, daß die Werte der Transportrichtung J_{sm} in einem weiteren Streubereich variierten als in der Gegenrichtung J_{ms} . Dies wird besonders durch die Darstellung der Transporte in kumulativer Form deutlich (Abb.21), ist aber auch in Abb.39, in der die Passage von serosal nach mukosal in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit dargestellt

wurde, erkennbar. Die im Vergleich zu Geweben mit nachgewiesenem Peptidtransport niedrigen Transportraten und der überraschende Befund einer Nettosekretion des Peptids unterstützen nicht die Annahme eines tertiär aktiven Transportes von Peptid von der mukosalen zur serosalen Seite, wie er von MATTHEWS und WEBB (1995), sowie MCCOLLUM und WEBB (1998) vermutet wurde. Wahrscheinlich ist, daß es sich bei den niedrigen Transportraten um überwiegend passive Diffusionsprozesse handelt. Aus diesem Grunde wurden zur Objektivierung dieser Hypothese erneut die Transportraten von Phenylalanyl-Alanin vor (Kontrolle) und nach serosaler Zugabe von Ouabain (0,1 mmol/l) bestimmt.

1.1.3.1.2 Peptidtransporte mit und ohne Ouabain

Nach Bestimmung von drei Fluxperioden (Kontrolle) wurde auf der serosalen Epithelseite Ouabain zugegeben, um zu untersuchen, ob sich der Peptidtransport durch Hemmung der Na/K-ATPase Prozesse beeinflussen läßt. Da der Peptidtransport (siehe Abb.1) indirekt an die Aktivität der ATPase gekoppelt ist, müßte eine Hemmung dieser Pumpe die Transportraten beeinflussen.

Verlauf der elektrophysiologischen Parameter

Nach der serosalen Ouabainzugabe fiel der Kurzschlußstrom signifikant ab. Durch die Blockierung der Na/K-ATPase werden alle an diesen Mechanismus gekoppelten, aktiven Vorgänge gehemmt. Deswegen äußert sich die Wirksamkeit von Ouabain in einer Reduktion der gesamten Ionenbewegungen durch das Epithel und damit in einem Abfall des Kurzschlußstroms I_{sc} .

Peptidtransportraten

Die Transportraten in Richtung J_{ms} und J_{sm} , sowie der errechnete Nettotransport unterschieden sich nach Ouabainzugabe nicht signifikant von der Kontrollgruppe vor Zugabe (Tab.4, Abb.38 und 39).

Die Zugabe von Ouabain, dessen Wirksamkeit durch die Verminderung des I_{sc} nachgewiesen wurde, hat keine signifikanten Auswirkungen auf den Peptidtransport am Pansenepithel. Daraus läßt sich schließen, daß die (ohnehin sehr geringen) Transportraten nicht durch einen Transportmechanismus bedingt sind, der an die Na/K-ATPase gekoppelt ist. In diesem Fall hätte eine Veränderung (Verminderung) des Peptidtransports stattfinden müssen.

1.1.3.1.3 Ergebnisse nach Mannitzugabe am Pansenepithel

Die ermittelten, niedrigen Transportraten für Phenylalanyl-Alanin, der ausbleibende Anstieg des I_{sc} nach mukosaler Zugabe von Glycyl-Glutamin und vor allem die gleichbleibenden Fluxraten nach serosaler Zugabe von Ouabain unterstützen die Annahme, daß die geringen Transportraten als passive Diffusion anzusehen sind. Wenn diese Diffusion parazellulär erfolgt, müßte jede Änderung dieser Leitfähigkeit die Transportraten beeinflussen. Eine Beeinflussung der parazellulären Gewebeleitfähigkeit ist durch mukosale Zugabe von Mannit möglich. In drei weiteren Versuchen erfolgte daher nach Bestimmung von drei Fluxperioden (Kontrolle) die Zugabe von Mannit auf der mukosalen Seite. Mannit wird nicht von den Zellen aufgenommen und auf parazellulärem Wege durch das Epithel transportiert. Durch die Mannitzugabe wird die Osmolarität auf der mukosalen Seite erhöht und dadurch eine Erhöhung der parazellulären Leitfähigkeit verursacht (KURKOWSKI und MARTENS, 1999). Wenn der Peptidtransport parazellulär stattfindet, müßten folglich die Peptidtransportraten nach der mukosalen Zugabe von Mannit ebenfalls erhöht sein.

Verlauf der elektrophysiologischen Parameter

Die Leitfähigkeit stieg nach Mannitzugabe am Pansenepithel signifikant von $2,9 \pm 0,29 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf $6,11 \pm 0,70 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ an. (Der I_{sc} unterlag nur einem geringen nicht signifikanten Anstieg) (Abb.30 und 31)

Peptidtransportraten

Die Transporte von mukosal nach serosal, sowie die Transporte der Gegenrichtung stiegen nach Mannitzugabe signifikant an. (J_{ms} von $7,26 \pm 0,3$ auf $17,85 \pm 0,97 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; J_{sm} von $9,66 \pm 1,3$ auf $17,10 \pm 1,12 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) Der errechnete Nettoflux ($J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$) unterschied sich nach Mannitzugabe mit $-0,95 \pm 1,43 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ nicht signifikant von der Kontrollgruppe vor Zugabe ($J_{net} -2,4 \pm 1,09 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$). (Tab.6)

Die Mannitzugabe führte am Pansenepithel zu einer deutlichen Erhöhung der unidirektionalen Transportraten (J_{ms} und J_{sm}). Dieser vermehrte Transport erfolgte in beiden Richtungen in etwa gleicher Größe, so daß sich für den Nettotransport keine signifikanten Veränderungen nach Zugabe von Mannit ergaben. Da die erhöhten unidirektionalen Transporte mit der Erhöhung der Leitfähigkeit korrelierten, ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den Transportraten um parazelluläre Vorgänge handelt.

In Abb. 38 und 39, in denen die Transportraten in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit dargestellt wurden, sowie in Abb.44, die die Transportraten beider Richtungen nach Mannitzugabe sowie die der Kontrollgruppen zeigen, wird dies besonders deutlich.

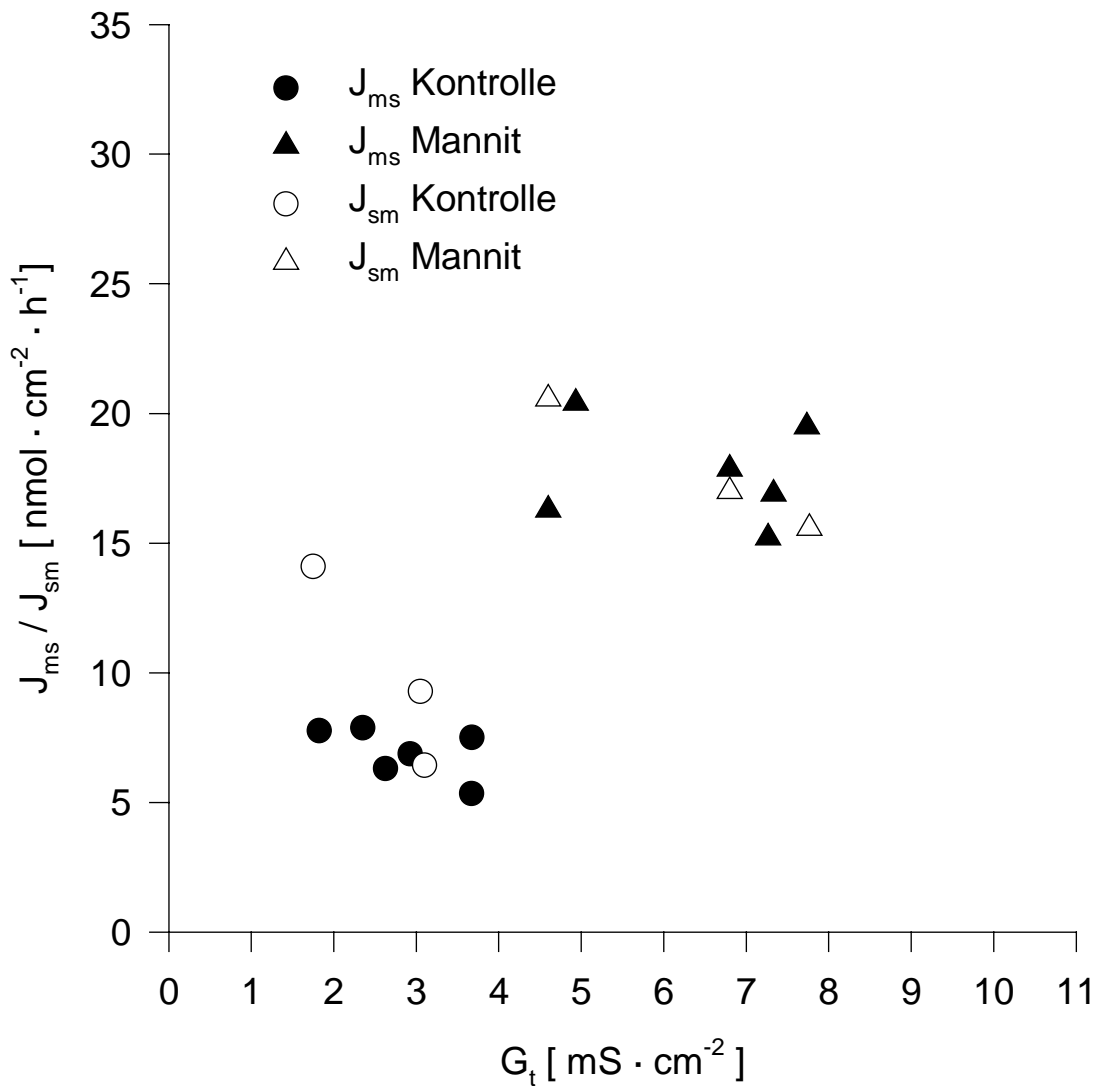


Abb. 44: Peptidtransportraten in Richtung J_{ms} und J_{sm} am Pansenepithel in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit G_t vor und nach Zugabe von Mannit.

1.1.3.2 Peptidtransportraten am Psalterepithel

1.1.3.2.1 Peptidtransportraten unter Kontrollbedingungen

Verlauf der elektrophysiologischen Parameter

Während der ersten drei Fluxperioden verliefen I_{sc} und G_t ohne nennenswerte Veränderungen. Zeitabhängig war ein geringfügiger Abfall von G_t und I_{sc} zu beobachten.

Peptidtransportraten

Die unidirektionalen Transporte entsprachen fast den ermittelten Werten des Pansenepithels (J_{ms} $6,94 \pm 0,51 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; J_{sm} $8,63 \pm 0,74 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$). Der Nettotransport war mit $-1,68 \pm 0,76 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ nicht signifikant von 0 verschieden, zeigte aber mit negativem Vorzeichen eine Tendenz zu einem Sekretionsprozess (Tab.3)., ist also verglichen mit den für das Darmepithel ermittelten Transportraten (RUBINO et al., 1971) ebenfalls sehr gering.

Die Darstellungen der Transportraten in kumulativer Form zeigen, daß die Gesamtmenge an transportiertem Peptid linear mit der Zeit zunahm (Abb.22 und 23) und die Transportrate daher während der gesamten Versuchszeit konstant blieb.

1.1.3.2.2 Zugabe von Ouabain

Auch bei den Psalterepithelien wurde nach Bestimmung von drei Fluxperioden auf der serosalen Epithelseite Ouabain zugegeben, um zu überprüfen, ob sich der Peptidtransport durch Hemmung der Na/K-ATPase vermindern läßt.

Verlauf der elektrophysiologischen Parameter

Der Kurzschlußstrom (I_{sc}) fiel nach Ouabainzugabe von $1,53 \pm 0,12$ auf $0,18 \pm 0,08 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ab. Diese signifikante Verminderung beweist die hemmende Wirkung von Ouabain auf die Na/K-ATPase (siehe Pansen). Die G_t unterlag einem leichten, nicht signifikanten Anstieg.

Peptidtransportraten

Nach Zugabe von Ouabain stieg der Transport in Richtung J_{ms} signifikant von $5,71 \pm 0,38$ auf $8,76 \pm 1,0 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ an (Tab.5). Der Transport in Richtung J_{sm} stieg von $8,29 \pm 1,04$ auf $9,35 \pm 1,42 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, der Nettotransport fiel von $-2,57 \pm 0,95$ auf $-0,59 \pm 0,79 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, beide Veränderungen sind aber nicht signifikant. Die Verminderung des Nettotransports kam nicht durch eine Verminderung der unidirektionalen Transporte, sondern durch eine Erhöhung beider Richtungen, die für die Richtung J_{ms} stärker ausgeprägt war,

zustande. Da der Abfall von J_{net} darüber hinaus nicht signifikant ist, ist davon auszugehen, dass der Transport nicht an die Na/K-ATPase gekoppelt ist.

1.1.3.2.3 Mannitzugabe

Am Psalterepithel wurde ebenfalls in drei weiteren Versuchen nach Ermittlung von drei Fluxperioden (Kontrolle) auf der mukosalen Epithelseite Mannit zugegeben, um die parazelluläre Leitfähigkeit zu erhöhen und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für den Peptidtransport zu untersuchen.

Verlauf der elektrophysiologischen Parameter

Die Leitfähigkeit (G_t) stieg nach Mannitzugabe von $3,7 \pm 0,51$ auf $8,74 \pm 0,86 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ an und blieb während der gesamten Versuchsdauer auf einer Höhe von ca. $8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Abb.31). Der am Psalterepithel gemessene I_{sc} nahm unmittelbar nach der Mannitzugabe signifikant von $1,5 \pm 0,15$ auf $3,65 \pm 0,53 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ zu, fiel aber 20 min danach unter das Ausgangsniveau und blieb während der restlichen Versuchszeit unter $1,0 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Abb.30). Offensichtlich veränderte sich kurzfristig osmotisch bedingt der Transport von Ionen. Die ionale Grundlage für dieser Vorgänge ist nicht bekannt.

Peptidtransportraten

Am Psalterepithel stiegen nach der Mannitzugabe die Transportraten von Phenylalanyl-Alanin in Richtung J_{ms} und J_{sm} signifikant an. Auch der Nettotransport unterlag einem signifikanten Anstieg von $-0,62 \pm 1,13$ auf $5,27 \pm 1,43 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tab.7). Damit bekam der Nettotransport ein positives Vorzeichen, entsprach also einem Resorptionsprozess.

Die erhöhten Transportraten korrelierten eng mit den erhöhten Leitfähigkeiten. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Transportraten auf passive Diffusionsprozesse zurückzuführen sind (Abb.40 und 41).

1.1.4 Erhöhte Streuung der Transportraten in Richtung J_{sm} am Pansenepithel

Beim Vergleich der Transportraten der einzelnen Richtungen und Epithelien fiel am Pansenepithel eine erhöhte Streuung der Werte in Richtung J_{sm} auf.

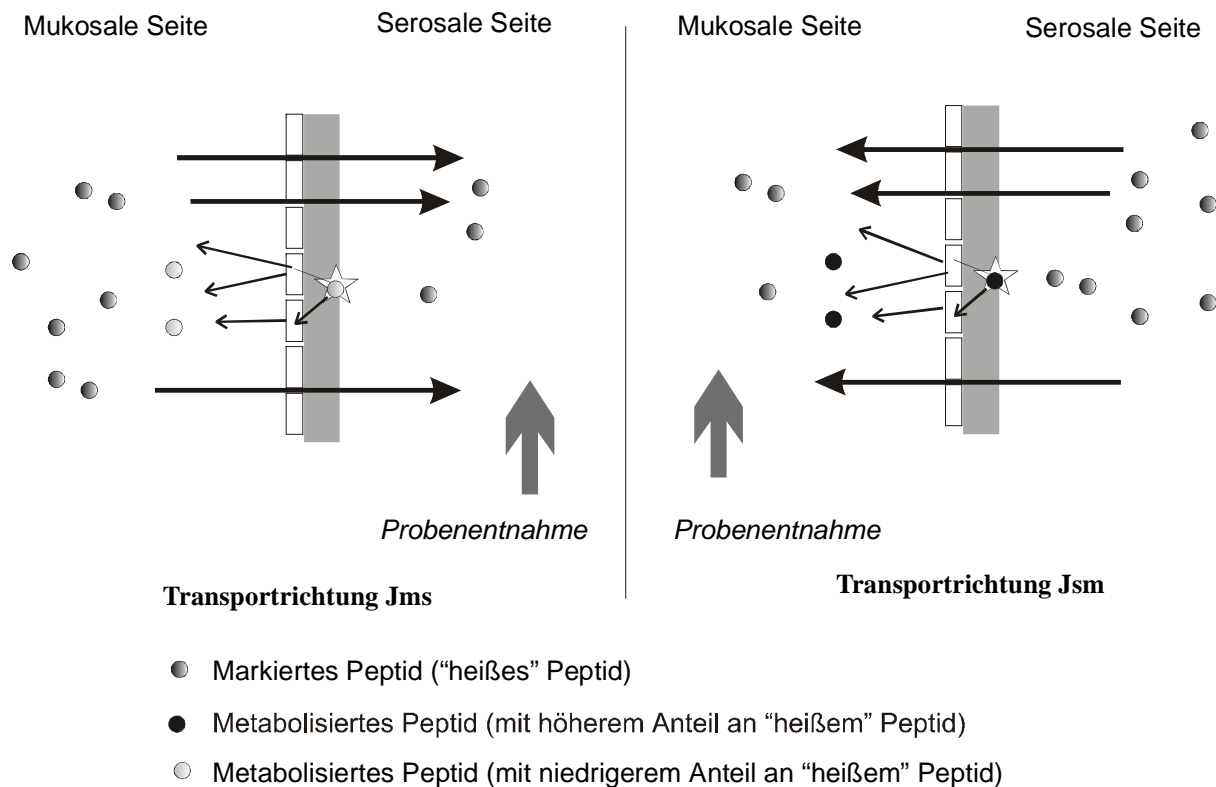


Abb. 45: Mögliche Beeinflussung der Meßergebnisse durch Gewebemetabolismus.

Für den Hauptteil erfolgt die Passage parazellulär. Ein Teil wird im subepithelialen Gewebe metabolisiert und über die basolaterale Membran in die Epithelzellen aufgenommen. Von hier erfolgt die Abgabe in Richtung des kürzesten Diffusionsweges, nach mukosal. So könnten höhere Transportraten der Richtung J_{sm} , sowie die größere Streuung dieser Richtung zu erklären sein.

Dieses Phänomen könnte durch die teilweise erfolgende Umsetzung von Peptid im subepithelialen Gewebe, im Rahmen von Stoffwechselprozessen zur Eigenversorgung des Gewebes erklärt werden. Bei Untersuchungen der Transportrichtung J_{sm} gelangt von der Inkubationslösung des serosalen Kammerkompartiments aufgenommene, markierte Substanz durch das subepitheliale Gewebe und parazellulär durch das Epithel. Ein Teil des Peptids könnte dabei metabolisiert werden, und die Stoffwechselprodukte (Wasser, H^+ u.a.) auf der basolateralen Seite der Epithelzelle ins Zellinnere aufgenommen werden (Abb.45). Die Abgabe der Metaboliten aus der Zelle erfolgt in Richtung des kürzeren Diffusionsweges, also über die luminalen Membran, in die Inkubationslösung der mukosalen Seite. Da diese Prozesse in jedem Gewebe von unterschiedlichem Ausmaß sind, bzw. in verschiedener Geschwindigkeit ablaufen, variieren die gemessenen Transportraten in Richtung J_{sm} stärker. Auch die größere Passagemenge von serosal nach mukosal könnten durch diese Hypothese erklärt werden, da in dieser Transportrichtung durch die basolaterale Aufnahme von Peptidmetaboliten ein zusätzlicher Transportmechanismus eine Rolle spielt. Die

Untersuchungen der Transportrichtung J_{ms} bleiben von diesem Gewebemetabolismus unbeeinflusst, denn zum Einen erfolgt hier die Entnahme der Proben für die Messungen auf der serosalen Kammerseite, zu der ein wesentlich längerer Diffusionsweg besteht, zum Anderen kann in diesem Fall nur die Menge an „heißem“ Peptid, das zuvor durch das Epithel transportiert wurde, vom subepithelialen Gewebe umgesetzt werden, also eine geringere Menge als in die Gegenrichtung, in der das „heiße“ Peptid auf der serosalen Seite leichter die subepithelialen Schichten durchdringen kann. In diese Richtung läuft der Metabolismus vor allem mit der nicht markierten („kalten“) Peptidsubstanz der Pufferlösung ab. Im Pansenepithel ist ein Gewebemetabolismus für kurzkettige Fettsäuren (SCFA) bekannt. In Untersuchungen mit der Ussingkammer-Technik kommt es zu einer Assymetrie in der Verteilung der transportierten Mengen von SCFA, weil die Abgabe der aufgenommenen SCFA aus dem Gewebe polarisiert erfolgt (STEVENS und STETTLER, 1965). Die metabolisierten Substanzen wurden dabei vermehrt auf der mukosalen Kammerseite festgestellt.

1.1.5 Vergleich der Membranwiderstände von Pansen und Psalterepithel

Jedes Gewebe besitzt einen charakteristischen Gewebewiderstand, der sich aus dem zellulären Widerstand (R_c) und dem parazellulären Widerstand (R_s) zusammensetzt (Kap. 1). Anhand des Verhältnisses der Widerstände zueinander erfolgt die Klassifizierung in durchlässige bis dichte Epithelien (POWELL, 1981). Sowohl das Pansenepithel [$R_t < 1000 \Omega \cdot m^2$; $\frac{R_c}{R_s} = 1,49$] (LANG, 1997) als auch das Psalterepithel des Schafes [$R_t = 717 \Omega \cdot cm^2$; $\frac{R_c}{R_s} = 2,1$] (SCHULTHEIß, 1995) werden als moderat dicht klassifiziert. Beim Vergleich der Transportraten in Abhängigkeit von der Gewebeleitfähigkeit (G_t) ergeben sich für beide Gewebe ähnliche Werte (Abb. 46 und 47). Da beide Gewebe eine vergleichbare (parazelluläre) G besitzen, ist dies ein weiterer Hinweis auf die parazelluläre Natur des Peptidtransportes.

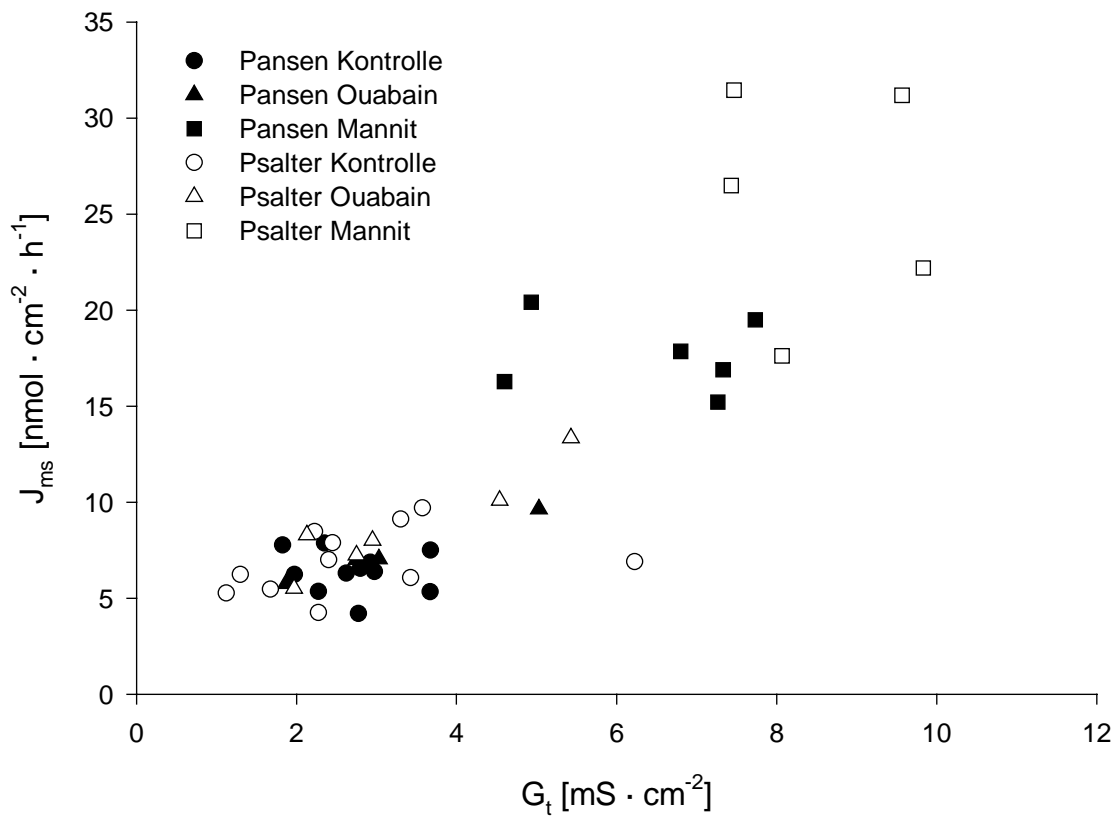


Abb. 46: Darstellung der Transportraten in Richtung J_{ms} in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit (G_t) an Pansen- und Psalterepithel, vor und nach Zugabe von Ouabain, bzw. Mannit.

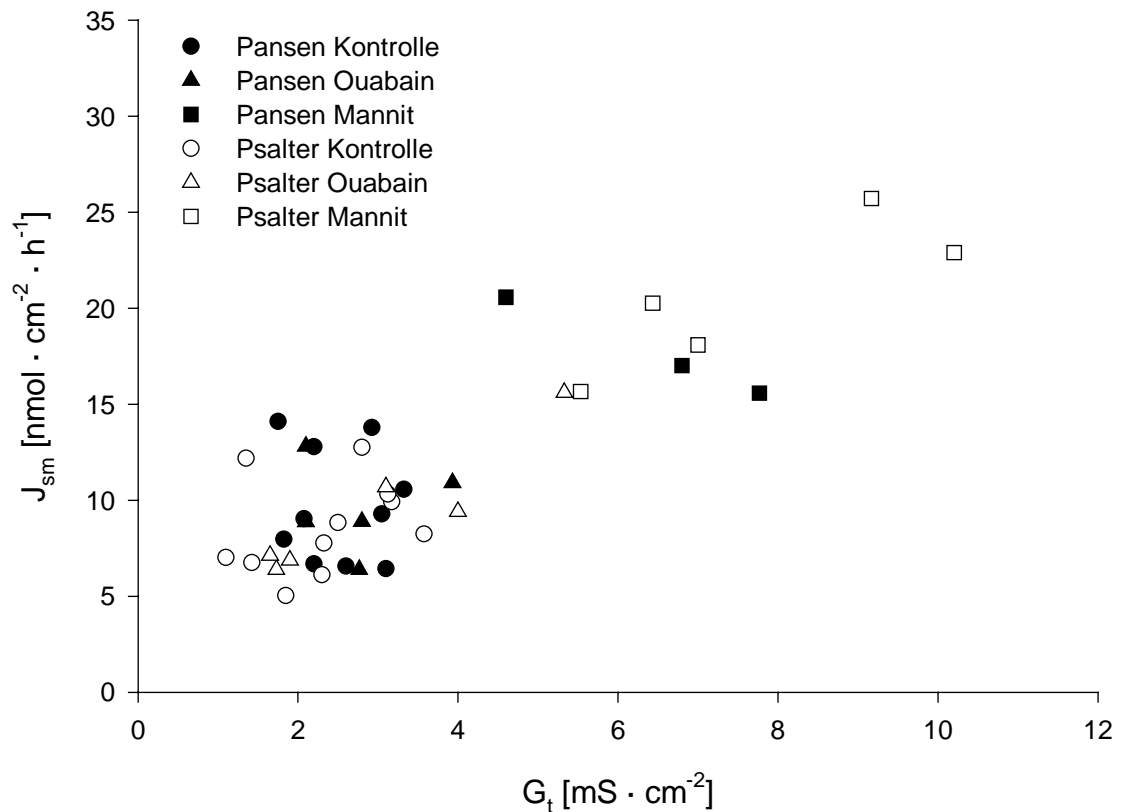


Abb. 47: Darstellung der Transportraten in Richtung J_{sm} in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit (G_t) an Pansen- und Psalterepithel, vor und nach Zugabe von Ouabain, bzw. Mannit.

1.1.6 Diskussion der Ergebnisse der Messungen des intrazellulären pH-Wertes

Durch die Kopplung des Transports an Protonen bewirkt der Peptidtransportmechanismus bei der Substrataufnahme eine Erhöhung der intrazellulären H^+ -Ionen Konzentration und damit ein Abfallen des intrazellulären pH-Wertes. Für den Transporter in Epithelzellen des Dünndarms wurde in zahlreichen Versuchen ein Absinken des intrazellulären pH-Wertes nach Zugabe von Peptiden zu einem umgebenden Medium nachgewiesen (siehe Kap.1.). Bei den von STEWART et al. (1999) durchgeführten Untersuchungen an Mäuseenterocyten führte die Zugabe von Phenylalanyl-Alanin in verschiedenen Konzentrationen zu einem unterschiedlich starken Absinken des pH_i . 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 pH_i von 7,32 auf 7,37 sinken. Nach Zugabe von 10 mmol/l fiel der pH_i um $0,16 \pm 0,09$ pH Einheiten.

Die Untersuchungen des Peptidtransport 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 bei einem extrazellulären pH von 6,0 auf der apikalen Seite

der Zellen. Bei einem extrazellulären pH von 7,4 verringerte sich der pH_i nach Zugabe von Gly-Gln um ca. 0,05 pH Einheiten (THWAITES et al., 1993).

Simultane Messungen des Membranpotentials und des intrazellulären pH-Wertes an *Xenopus leavis* Oocyten mit exprimiertem pepT2-Transportprotein zeigten, daß nach Zugabe von 2,5 mmol/l Cefadroxil bei einem extrazellulären pH von 6,5 zuerst eine Depolarisation der Zellmembran und danach ein Abfall des intrazellulären pH-Wertes um 0,5 pH-Einheiten erfolgten (BOLL et al.1994).

Auch in den Versuchen von MATTHEWS et al., 1996 die ein exprimiertes Transportprotein in *X.l.*-Oocyten untersuchen, erzeugt Peptidzugabe zu einem umgebenden Medium einen Abfall des intrazellulären pH.

1.1.6.1 Messung des pH_i bei einem Umgebungs pH von 7,4

Die Messungen wurden zuerst bei einem pH von 7,4 des umgebenden Mediums durchgeführt, um osmotische Effekte auf die isolierten Pansenepithelzellen ausschließen zu können.

Nach 5min (300sec) wurde der Pufferlösung Phenylalanyl-Alanin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. (Abb.42). Nach der Zugabe erfolgten bei allen verwendeten Konzentrationen im Mittel pH-Veränderungen zwischen 0,01 und 0,02 pH-Einheiten. (Nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ stieg der pH_i von $6,97 \pm 0,04$ auf $6,99 \pm 0,05$ am Meßzeitpunkt 350 sec., nach Zugabe von 500 $\mu\text{mol/l}$ erfolgt ein Abfall von $6,93 \pm 0,04$ auf $6,92 \pm 0,04$. Wurde der Pufferlösung 1 mmol/l Peptid zugefügt fiel der pH_i von $6,97 \pm 0,03$ auf $6,95 \pm 0,03$ am nächsten Meßzeitpunkt.) Keiner der erfolgten Veränderungen des pH_i ist von signifikanter Größe.

1.1.6.2 Messung des pH_i bei einem Umgebungs pH von 6,4

Um den zum Zellinneren gerichteten Protonengradienten zu erhöhen und damit die Triebkraft des Transportprozesses zu verstärken, wurde der pH-Wert der umgebenden Pufferlösung kurz vor Beginn der Messung auf 6,4 gesenkt. Die Peptidzugabe erfolgte zum Zeitpunkt 300 sec in Konzentrationen von jeweils 100 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l. In Abb.43 ist zu erkennen, daß kein signifikanter Abfall des pH_i nach Zugabe von Peptid erfolgt, sondern der intrazelluläre pH stetig über den gesamten Meßzeitraum fällt.

1.1.7 Zusammenfassung der Diskussion eigener Ergebnisse

Mit der Methode der elektrophysiologischen Messungen war kein Protonen-gekoppelter Transportmechanismus für Peptide oder peptidähnliche Substanzen nachweisbar. Um elektrisch neutrale aktive Mechanismen, passive Prozesse oder Transporte, die einen I_{sc} unter der Nachweisgrenze von $50 \text{ nEq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ induzieren, zu untersuchen, wurden Messungen mit radioaktiv markiertem Peptid (Phenylalanyl-Alanin) vorgenommen.

Die unidirektionalen Transportraten bewegten sich für beide Epithelien zwischen 5 und 10 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, die Nettotransporte entsprachen mit negativem Vorzeichen einem Sekretionsprozess.

Die (ohnehin geringen) Transporte ließen sich nicht durch Ouabain hemmen, aber durch Mannit in Abhängigkeit von der Zunahme der G_t steigern. An Pansen und Psalterepithel wurden etwa gleich große Transportraten von Peptiden bestimmt, die bei beiden Geweben in einer ähnlichen Abhängigkeit zur Gewebeleitfähigkeit standen. Da auch die parazelluläre Leitfähigkeit beider Gewebe ähnlich ist, kann auf einen parazellulären Transportmechanismus geschlossen werden.

Ein elektrogener Transportmechanismus, der die Meßempfindlichkeit der Kurzschlußstrommessungen unterschreitet, kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da gezeigt wurde, daß die Erhöhung der Transportraten mit der Erhöhung der parazellulären Leitfähigkeit korreliert.

Mittels der Messungen des intrazellulären pH an isolierten Zellen des Pansenepithels konnte weder bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4 noch bei einem extrazellulären pH von 6,4 ein Absinken des pH_i nach Zugabe von Phenylalanyl-Alanin festgestellt werden.

Die eigenen Ergebnisse stützen nicht die Annahme, daß Vormagenepithelien den aus Darm und Niere bekannten Transporter aufweisen. Damit stehen sie im Widerspruch zu den Ergebnissen und Hypothesen anderer Arbeitsgruppen.

1.2 Diskussion der Ergebnisse und Hypothesen anderer Arbeitsgruppen

1.2.1 In vitro Ergebnisse WEBB et al.

1.2.1.1 Anmerkungen zum Versuchsansatz

Die von MATTHEWS und WEBB (1995) und von MC COLLUM und WEBB (1998) durchgeführten Messungen von Transportraten von markiertem Peptid am Psalterepithel, die

in einem der Ussingkammer ähnlichen Versuchsaufbau durchgeführt wurden, hatten nur den Nachweis einer Permeabilität in Richtung J_{ms} (mukosal nach serosal) zum Thema. Die Gegenrichtung sowie ein Nettoflux wurden nicht ermittelt. Diese Ergebnisse lassen keine eindeutigen Schlußfolgerungen auf den Transportmechanismus zu. Der verwendete Versuchsaufbau ermöglichte keine Kontrolle der Elektrophysiologie. Die Vitalität des Epithels wurde über die Zugabe von Butyrat in einem vorhergehenden Experiment kontrolliert.

1.2.1.2 Vergleich der Ergebnisse

Die von MATTHEWS und WEBB (1995) und von MC COLLUM und WEBB (1998) ermittelten Passageraten für markierte Peptide von mukosal nach serosal ergaben sehr geringe Transportraten in vergleichbarer Größenordnung mit den von uns ermittelten Transporten in Richtung J_{ms} . Zur näheren Erläuterung sind beide Ergebnisse im folgenden dargestellt.

Eigene Ergebnisse:

Transport von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3- 3H] (2mmol/l) durch das Epithel, vor Zugabe von Ouabain oder Mannit bezogen auf das Epitheltrockengewicht (**nmol/mg dry tissue/h**)*.

	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	N/n
Pansen	0.41	0.61	-0.20	6/10
Psalter	0.69	0.68	-0.17	6/11

*Umrechnung der Transportraten auf mg Trockengewicht :siehe Anhang

Ergebnisse Mc Collum/Webb:

In den zum Vergleich herangezogenen Versuchen von MC COLLUM und WEBB (1998) wurde die Passage von Glycyl-Sarkosin (*konc. Gly-Sar 0.1mmol/l*) in Kombination mit anderen Peptiden (*konc. 5 mmol/l*) durch das Psalterepithel untersucht. Die Inkubationszeit betrug 60 min. Es wurden die Peptidmenge in der Pufferlösung der serosalen Kammerseite und die Peptidmenge, die sich in oder auf dem Epithel befand, separat bestimmt. Man ging davon aus, daß das Peptid in oder auf dem Epithel zum Zeitpunkt der Messung zur serosalen Seite transportiert wurde.

Zugebene Peptidkombination	Konzentration in /auf dem Epithel (nmol/mg dry tissue)	Transportierte Menge im serosalen Puffer (nmol/mg dry tissue)	Gesamtmenge an transportiertem Peptid* (nmol/mg dry tissue)
-----------------------------------	---	--	--

GS (=Gly-Sar)	0.55	0.1	0.65
GS+Gly	0.46	0.23	0.69
GS+Met-Gly	0.13	0.16	0.29
GS+Gly-Leu	0.09	0.14	0.23
GS+Car	0.22	0.29	0.51
GS+Met-Gly-Met-Met	0.12	0.24	0.36

Inkubationszeit 60 min

* Die Gesamtmenge wurde aus der Konzentration von transportiertem Peptid im serosalen Puffer und dem Peptidgehalt in /auf dem Epithel errechnet.

Beim Vergleich der Gesamtkonzentration von Glycyl-Sarkosin (0,65 nmol/mg dry tissue), die von der Arbeitsgruppe WEBB ermittelt wurde, mit den von unserer Arbeitsgruppe ermittelten Passageraten für D-Phenylalanyl-L-Alanin [$2,3\text{-}^3\text{H}$] am Psalterepithel (0,69 nmol/mg dry tissue) wird klar, daß für den Transport von Peptid durch das Psalterepithel vergleichbare Ergebnisse ermittelt wurden. Ähnlich verhält es sich mit den anderen untersuchten Peptidkombinationen (siehe Tab.), bzw. mit den von uns ermittelten Passageraten für das Pansenepithel (0,41 nmol/mg dry tissue).

1.2.1.3 Umrechnung der Transportraten auf die gesamte Epithelfläche von Pansen und Psalter

Um einen Bezug zwischen den *in vitro* ermittelten Transportraten und den Ergebnissen der Durchblutungsmessungen (Kap.2, WEBB et al., 1992, 1993; SEAL und PARKER, 1996) abzuleiten und darüber hinaus eine Vorstellung über die mögliche Größenordnung der Peptidresorption aus dem ganzen Organ zu erhalten, wurden die Daten von der *in vitro* verwendeten Epithelfläche von 3,14 cm² auf die gesamte Vormagenfläche umgerechnet. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde darüber hinaus ein Resorptionszeitraum von 24h angenommen. Die Umrechnung erfolgte anhand der ermittelten Epitheltrockengewichte (siehe Anhang), die auf das gesamte Trockengewicht des Epithels von Pansen, Psalter und Netzmagen von Schafen (40-45kg) (MARTENS und RAYSSIGUIER, 1979) bezogen wurden. In gleicher Weise wurde mit den *in vitro* Ergebnissen der Arbeitsgruppe WEBB verfahren.

Trockengewicht des Epithels in g: Pansen 55,4 ± 19.3; Psalter 7,0 ± 2,7; (Reticulum 7,6 ± 2,0)

Um auch die mögliche Peptidaufnahme durch den Netzmagen erfassen zu können, wurde für ihn die gleiche Resorptionsrate wie für den Pansen angenommen.

Berücksichtigt wurden in dieser Rechnung nur die Transportraten von mukosal nach serosal.

Jms Fluxe unserer Arbeitsgruppe:

Pansen: $0,41 \text{ nmol/mg dry tissue/h} \times 55400\text{mg} \times 24 \Rightarrow 545136 \text{ nmol/Pansen/24h} = 545,14 \mu\text{mol/Pansen/24h} = \mathbf{0,55 \text{ mmol Pansen/24h}}$

Psalter: $0,69 \text{ nmol/mg dry tissue /h} \times 7000\text{mg} \times 24 \Rightarrow 115920 \text{ nmol/Psalter/24h} = 115,9 \mu\text{mol/Psalter/24h} = \mathbf{0,12 \text{ mmol/Psalter/24h}}$

Netzmagen (Annahme der gleichen Transportkapazität wie für den Pansen)

$0,41 \text{ nmol/mg dry tissue /h} \times 7600\text{mg} \times 24 \Rightarrow 74784 \text{ nmol/Netzmagen/24h} = 74,8 \mu\text{mol} = \mathbf{0,075 \text{ mmol/Netzmagen/24h}}$

$\Rightarrow \mathbf{0,76 \text{ mmol/“Vormagen“/24h} = 0,00076 \text{ mol/“Vormagen“/24h}}$

$= \mathbf{0,152\text{g/“Vormagen“/24h}}$ [molares Gewicht=200]

Die Rechnung ergibt für die von uns ermittelten Ergebnisse eine Resorption von 0,55 mmol aus dem Pansen, 0,12 mmol aus dem Psalter und 0,075 mmol aus dem Netzmagen in 24 Stunden. Insgesamt könnten also, wenn die Resorptionskapazität der ermittelten J_{ms} Fluxe als Grundlage genommen wird, aus einem Schafsvormagen 0,755 mmol Peptid in 24 h resorbiert werden. Geht man von einem molaren Gewicht von 200 aus, bedeutet das eine Menge von 0,152 g Peptid.

WEBB et al: Transporte J_{ms} , Psalterepithel (Annahme der Resorption in gleicher Größenordnung für Pansen und Netzmagen)(Annahme der Organhöchstgewichte):

Gly-Sar:

epitheliale Konz+Konz im serosalen Puffer

$= 0,65 \text{ nmol/mg dry tissue} \times 74700\text{mg} \times 24 \Rightarrow \mathbf{1,165 \text{ mmol/Pansen/24h}}$

$0,65 \text{ nmol/mg dry tissue} \times 9700\text{mg} \times 24 \Rightarrow \mathbf{0,171 \text{ mmol/Psalter/24h}}$

$0,65 \text{ nmol/mg dry tissue} \times 9600\text{mg} \times 24 \Rightarrow \mathbf{0,15 \text{ mmol/Netzmagen/24h}}$

$\Rightarrow \mathbf{1,49 \text{ mmol/“Vormagen“/24h} = 0,00149 \text{ mol/“Vormagen“/24h}}$

$= \mathbf{0,298\text{g/“Vormagen“/24h}}$ [molares Gewicht=200]

Für die Umrechnung der von MATTHEWS und WEBB (1995) und von MC COLLUM und WEBB (1998) angegebenen Ergebnisse wurden die Konzentrationen von Glycyl-Sarkosin im Epithel und in der serosalen Pufferlösung addiert. Darüber hinaus wurden die höchsten Gewichte für die Organe angenommen, und für Pansen und Netzmagen die Transportrate des Psalterepithels verwendet. Für die ermittelten Passageraten wäre eine Resorption von 1,165

mmol Peptid aus dem Pansen, 0,171 mmol aus dem Psalter und 0,15 mmol aus dem Netzmagen in 24 h möglich. Das ergibt 1,49 mmol für den gesamten Vormagenbereich und entspricht damit einer Menge von 0,298g Peptid, die in 24 h aus einem Schafsvormagen resorbiert werden könnten. Diese Berechnung führte zu Werten, die (s.u.) offensichtlich für die Praxis nicht relevant sind. Aus diesem Grunde sind Extrapolationen von *in vitro* Ergebnissen auf *in vivo* Verhältnisse immer problematisch. Führt man jedoch eine entsprechende Berechnung mit Transportraten von Ionen (Na^+ und Mg^{++}) durch, deren physiologische Bedeutung unstrittig ist, dann zeigt sich, daß Berechnungen dieser Art die mögliche Bedeutung von Transportvorgängen durchaus aufzeigen können.

1.2.1.4 Vergleich der ermittelten Transportraten für Peptid mit den Transportraten von Mg^{++} und Na^+

Die ermittelten Transportraten der Transportrichtung J_{ms} für Mg^{++} (LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996) sowie für Na^+ (MARTENS et al., 1991) sind in folgender Tabelle im Vergleich zu den von uns ermittelten Peptidtransportraten am Pansenepithel dargestellt. Die Ergebnisse wurden jeweils in vergleichbarer Technik mit der Ussingkammer ermittelt.

Tab. 10: Transportraten am Pansenepithel. Vergleich der Passagemengen verschiedener Substanzen in Transportrichtung J_{ms} .

Mukosale Konzentration der verglichenen Substanzen	Mg ⁺⁺ (2 mmol/l)	Na ⁺ (147 mmol/l)	Peptid (Phen-Ala-Ala) (2 mmol/l)
Transportraten in nmol · cm ⁻² · h ⁻¹	40-80 (60)	6000-8000 (6-8)μEq · cm ⁻² · h ⁻¹ *	6,50 ± 0,36
Transportraten in nmol/mg dry tissue/h	2.5-5.0 (3.75)	375-500 (437,5)	0.41
Möglicher Transport über die gesamte Pansenfläche	4,9 mmol/24h	581,7 mmol/24h	0,56 mmol /24h

* Die Passagerate einwertiger Ionen kann in Eq · cm⁻² · h⁻¹ angegeben werden, da in diesem Fall die Maßeinheiten von Ladung und Molmasse übereinstimmen.

Die Transporte von Mg⁺⁺ liegen ungefähr 10 × höher, die von Na⁺ ungefähr 1000× höher als die für Peptide ermittelten Passageraten. Für Na⁺ als auch Mg⁺⁺ sind sowohl aktive, zelluläre Transportmechanismen im Pansenepithel als auch deren physiologische Relevanz bekannt. Vergleicht man die Größenordnungen mit dem Peptidtransport über das Pansenepithel, wird dessen geringeres Ausmaß und damit der mögliche Beitrag zur Peptidversorgung des Tieres deutlich.

1.2.2 Die Annahme des Transportmechanismus wurde aus Durchblutungsmessungen abgeleitet

In den von WEBB et al.(1992) durchgeführten Untersuchungen wurde im nicht-mesenterialen Blut von Schafen eine netto Peptidresorptionsrate von **308,4 g/d** gemessen. Die Ergebnisse der von dieser Arbeitsgruppe und auch von uns durchgeführten *in vitro* Versuche führen aber über die gesamte Resorptionsfläche des Organs hochgerechnet zu Werten die ca. um den Faktor 1000 niedriger liegen und stehen somit im Widerspruch zu den durchgeführten *in vivo* Messungen.

Auch SEAL und PARKER (1996) stellten im Rahmen von Durchblutungsmessungen eine hohe „Nettomenge“ an Peptid im nicht-mesenterialen Blut von **2,97mol/d** fest. Das entspräche, (bei einem angenommenen molaren Gewicht eines Dipeptids von 200) in etwa einer Menge von **594 g/d**.

Für das Ileum von Kanninchen, in dem der Protonen-gekoppelte Peptidtransporter nachgewiesen ist, wurden Transportraten zwischen 0,1 und 2,0 μmol · cm⁻² · h⁻¹ ermittelt,

also ca. 10-100-fach höher als für das Vormagenepithel. Würde die aus den *in vitro* Passageraten errechnete mögliche Peptidresorption ebenfalls um 10 erhöht, wäre sie immer noch 100 mal geringer als die Ergebnisse der Durchblutungsmessungen (0,149 g Peptid in 24h \times 10 = 1,49 g Peptid in 24h).

Die Ergebnisse der Durchblutungsmessungen stehen also im Widerspruch zu den Ergebnissen der *in vitro* ermittelten Passageraten.

In der Literatur wird die Möglichkeit diskutiert, daß Peptide im Proteinturnover oder durch synthetische Aktivität der portal versorgten Organe entstanden sein könnten (KOELN et al., 1993). Nicht mesenterieell versorgt sind Milz, Pansen, Reticulum, Psalter und Labmagen, sowohl mesenterieell als auch nicht-mesenterieell versorgt sind Pankreas und Teile des Duodenums. (Kap.2, Abb.4).

Da Pansen und Psalter nicht für die hohe Peptidkonzentration im „nicht-mesenterieellen Blut“ verantwortlich sein können, müßten also andere Organe (Reticulum, Labmagen, Milz, Pankreas oder Teile des beginnenden Duodenums) eine beträchtliche Menge an Peptiden resorbieren oder synthetisieren.

Bei näherer Betrachtung der Durchblutungsmessungen von SEAL und PARKER ergeben sich Unstimmigkeiten beim Vergleich des Stickstoff-Gehalts im Futters mit dem Gehalt an resorbiertem Stickstoff in Form von NH_3 , freien AS und peptidgebundenen AS aus dem Magen-Darm-Trakt.

Tab. 11: Stickstoffgehalt der Futtermation im Vergleich zur Menge resorbierten Stickstoffs. (Seal und Parker, 1995)

<u>N-Aufnahme</u> (=N-Gehalt der Futtermation)	110g/d
<u>Resorbiert:</u>	
NH_3 :	1,26mol/d = 17,6 gN/d
Total AS:	2,983mol/d = 298gAs/d = 44,7gN/d
Total Peptide:	5,037 mol/d = 503,7gPeptide/d = <u>75,6g N/d</u>
Total N resorbiert:	137,9 gN/d

Die Menge des im Magen-Darm-Trakt resorbierten Stickstoffs wäre mit 137,9 g/d größer als die mit dem Futter aufgenommene Stickstoffmenge von 110 g/d. Aus diesem Grunde sind Fehler bei der Befunderhebung nicht auszuschließen.

1.2.3 Exprimiertes Transportprotein in *Xenopus laevis* Oocyten (siehe auch Kap.2)

Es kann bei Gewinnung der poly(A)⁺RNA, die in die Oocyten injiziert wurde, nicht festgestellt werden, in welchem Bereich der Zelle sie „unter normalen Umständen“ zur Ausbildung eines Protonen-gekoppelten Transportmechanismus gedient hätte. So wären intrazelluläre Transportmechanismen oder Transporter in der basolateralen Membran (DYER et al., 1990) möglich. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß die isolierte m-RNA gar nicht aus Zellen des Epithels, sondern aus Zellen der darunterliegenden Gewebeschichten stammt, die bei der Präparation (das Epithel wurde bis zur Lam. muscularis entfernt) versehentlich mit verwendet wurden.