

Aus dem Institut für Chemie und Technologie der Milch der
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel

Zellchemische Untersuchungen der Wirkung von Peptiden und Proteinhydrolysaten auf Humanzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Agrar- und
Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Dipl. oec. troph. Anne-Kathrin Pentzien
aus Jena
Kiel, September 2005

Dekan:	Prof. Dr. Siegfried Wolfram
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans Meisel
Zweiter Berichterstatter:	
Tag der mündlichen Prüfung:	16.11.2005

Gedruckt mit Genehmigung
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt im Institut für Chemie und Technologie der Milch der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel, unter der Leitung von Prof. Dr. H. Meisel, im Rahmen des von der EU geförderten Projektes „Hypotensive Peptides from Milk Proteins“ (QLK1-CT20000-00043) sowie einer Kooperation mit der Abteilung für Produktentwicklung und Anwendungstechnik der Gelita AG (Eberbach, D).

Folgenden Personen möchte ich besonders herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. **Hans Meisel**

für die interessante Themenstellung, seine beständige Diskussionsbereitschaft und die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Herren Prof. Dr. **Richard FitzGerald** und Dr. **Danny Walsh**

für die Herstellung der Milchproteinhydrolysate bzw. -permeate, die freundschaftliche Zusammenarbeit im Projekt, verbunden mit einer beständigen Diskussionsbereitschaft.

Herrn **B. Eggersgluß**

für die zur Verfügung gestellten Kollagenhydrolysate und Informationen.

Herrn Dr. **Rainer Hartmann**

für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die mir vieles erleichtert hat.

Herrn **Björn Neumann**

für die Durchführung der Probenanalysen mittels HPLC sowie für die jederzeit gewährte und freundliche Hilfsbereitschaft zur Lösung technischer Herausforderungen.

Frau **Enken Jacobsen**

für die Durchführung der photometrischen Hydroxyprolin- bzw. OPA-Bestimmung und der Aminosäurenanalyse sowie für die herzliche Hilfsbereitschaft in Fragen der Laborarbeit.

Frau **Inge Spreckels**

für die Anfertigung von Photographien sowie die freundschaftliche Hilfsbereitschaft.

den Mitarbeitern des Instituts, der Bibliothek sowie des EU-Projektes, insbesondere:

A. Raabe, B. Grümmer, P.-Ch. Lorenzen, C. Schirmer, K. Borcharding, C. Gebauer, S. Bettsteller, P. Paodonovan, Dr. G. A. Wright für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Theoretischer Hintergrund.....	2
2.1 Proteine und Peptide aus Lebensmitteln.....	4
2.1.1 Proteine und bioaktive Peptide aus Milch.....	5
2.1.1.1 Herstellung und Verfügbarkeit.....	6
2.1.1.2 Bioaktivität.....	7
2.1.2 Gelatine und andere Kollagenhydrolysate.....	30
2.1.2.1 Herstellung.....	30
2.1.2.2 Molekulare Zusammensetzung.....	32
2.1.2.3 Kollagenstoffwechsel im menschlichen Organismus.....	33
2.1.2.4 Wirkungen in biologischen Systemen.....	37
2.2 Morphologie und Funktion des Intestinaltrakts.....	42
2.2.1 Abschnitte und Wandschichten.....	43
2.2.2 Oberflächenvergrößerung.....	44
2.2.3 Intestinales Epithel – Barriere zwischen Darmlumen und Organismus.....	44
2.2.3.1 Enterozyten.....	45
2.2.3.2 Zell-Zell-Verbindungen.....	45
2.2.3.3 Transportmechanismen zur Überwindung der intestinalen Barriere.....	49
2.2.4 Proteinverdauung, -resorption und -biosynthese.....	51
2.2.4.1 Verdauung.....	52
2.2.4.2 Resorption.....	55
2.2.4.3 Biosynthese von Proteinen.....	61
2.2.4.4 Unverdaute Proteine im Dickdarm.....	62
2.3 Leukozyten – Zellen des Immunsystems.....	65
2.4 Einsatz von Zellkulturen zum Nachweis der Wirkung und des intestinalen Transports bioaktiver Substanzen.....	66
2.4.1 Zellisolierung und Kultivierung.....	67
2.4.1.1 Ableitung von Zell-Linien.....	67
2.4.1.2 Kulturbedingungen.....	68
2.4.1.3 Kulturmateriale.....	68
2.4.2 Zelluläre Ereignisse und Nachweismethoden.....	69
2.4.2.1 Zytotoxizität und Antikanzerogenität.....	69
2.4.2.2 Zellviabilität.....	70
2.4.2.3 Zelltod.....	74
2.4.3 Zellkultur-Modellsysteme.....	79
2.4.3.1 Caco-2 Zellen – ein Modellsystem für das Dünndarmepithel.....	79
2.4.3.2 Polymorphkernige Leukozyten – ein Modell für Körperzellen.....	90
3 Material und Methoden.....	93
3.1 Reagenzien, Chemikalien und Medium.....	93
3.2 Geräte, Materialien und Software.....	95
3.3 Zellmaterial, Zellzahlbestimmung, Mikroskopie.....	98
3.3.1 Caco-2 Zellen.....	98
3.3.2 Humane polymorphkernige Leukozyten.....	99
3.3.3 Zellzahlbestimmung im Zell-Counter und Mikroskopische Beobachtung von Zellen.....	100
3.4 Vorversuche: Zellkultivierung.....	101
3.5 Probenmaterial.....	102
3.5.1 ACE-inhibitorische Hydrolysate von Milchproteinfraktionen.....	102
3.5.2 Synthetische Peptide, Milchproteinpräparate und Magermilchpulver.....	104
3.5.3 Kollagenhydrolysate.....	106
3.6 Testansätze für zellchemische Untersuchungen.....	106
3.6.1 Ansetzen der Stammlösungen.....	106
3.6.2 Zellinkubationen und Ansetzen der Testverdünnungen.....	107

3.7 Zellchemische und analytische Methoden zum Nachweis von Testsubstanzen.....	115
3.7.1 Bestimmung der metabolischen Aktivität.....	115
3.7.1.1 WST-1 Test.....	115
3.7.1.2 Neutralrot-Färbung.....	117
3.7.2 Bestimmung der Dipeptidyl-Amino-peptidase IV-Aktivität.....	120
3.7.3 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER).....	125
3.7.4 Untersuchung des Peptidtransports durch Caco-2 Monolayer.....	129
3.7.4.1 Optimierung der Methode.....	130
3.7.4.2 Durchführung der Peptidtransportstudien.....	131
3.7.4.3 Untersuchung des Transportmechanismus.....	133
3.7.5 HPLC-analytische Bestimmung.....	134
3.7.5.1 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssig-Chromatographie (RP-HPLC) zum Peptidnachweis.....	136
3.7.5.2 Ausschlusschromatographie zum Nachweis von Kollagenhydrolysaten.....	141
3.7.6 Aminosäurenanalyse mittels Kationenaustausch-Chromatographie.....	143
3.7.7 Photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung.....	146
3.7.8 Bestimmung der Zellproliferation (BrdU-Test).....	150
3.7.9 Nachweis von Apoptose.....	152
3.8 Statistische Auswertung.....	155
3.8.1 Identifizierung von statistischen Ausreißern.....	155
3.8.2 Identifizierung von statistisch signifikanten Versuchsergebnissen.....	155
4 Ergebnisse.....	156
4.1 Zytotoxizitätsstudien.....	156
4.1.1 Vorversuche: Wirkung von DMSO, HPLC-Analysenpuffer und N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin.....	156
4.1.2 Screening ACE-inhibitorischer Hydrolysate von Milchproteinfraktionen.....	160
4.1.3 Milchproteinfraktionen und ACE-inhibitorische Hydrolysat-Permeate.....	173
4.1.4 Identifizierung potenziell anticancerogener Hydrolysate von Milchprotein.....	181
4.1.5 Screening ACE-inhibitorischer, synthetischer Peptide.....	183
4.1.6 Ausgewählte synthetische Peptide und Milchproteinpräparate.....	186
4.2 Peptid-Transportstudien.....	200
4.2.1 Überprüfung der Integrität von Caco-2 Monolayern in Transportstudien.....	201
4.2.2 Einfluss der Testsubstanzen auf die Caco-2 Monolayer Integrität.....	206
4.2.3 Synthetische Peptide.....	209
4.2.4 Kollagenhydrolysate.....	219
4.2.4.1 Peptidnachweis durch Ausschluss-Chromatographie.....	219
4.2.4.2 Indirekter Peptidnachweis durch photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung.....	228
5 Diskussion.....	236
5.1 Humanzellen – Modell für Entero- und Immunozysten.....	236
5.1.1 Caco-2 Zellen.....	237
5.1.2 Polymorphkernige Leukozyten.....	243
5.2 Zellchemische Methoden zur Identifizierung potenziell zytotoxischer Substanzen und zur Charakterisierung bioaktiver Substanzen.....	244
5.3 Wirkungen von Peptiden und Proteinhydrolysaten auf Humanzellen.....	251
5.3.1 Milchproteinfraktionen, -hydrolysate, -permeate und -präparate.....	251
5.3.2 Synthetische Peptide.....	254
5.3.3 Kollagenhydrolysate.....	258
5.4 Ausblick.....	260
6 Zusammenfassung / Summery.....	262
Literaturverzeichnis.....	266
A Anhang.....	294
A 1 Einleitung.....	294
A 2 Material und Methoden.....	294
A 3 Zytotoxizitätsstudien.....	301
A 4 Peptid-Transportstudien.....	331

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Die Blutdruck-regulierenden Enzymsysteme und ihre Quervernetzung mit dem Neuroendokrinen- und Immunsystem.....	11
Abbildung 2-2:	Bioaktive Abbauprodukte des Angiotensinogen und deren Rezeptoren.....	12
Abbildung 2-3:	Prozess der Gelatineherstellung.....	31
Abbildung 2-4:	Peptid-Verdauung.....	42
Abbildung 2-5:	Modell des molekularen Aufbaus von <i>tight junctions</i> , dargestellt für eine von zwei benachbarten Zellen.....	46
Abbildung 2-6:	Intestinale Transportsysteme.....	50
Abbildung 2-7:	Auflistung der Humanenzyme, die Prolin-haltige Peptidbindungen spalten, unter Einbeziehung der Prolyl-cis-trans Isomerase.....	55
Abbildung 2-8:	Aminosäuren- und Peptid-Transportsysteme im Dünndarm.....	57
Abbildung 2-9:	Colonkarzinogenese – unter Einbeziehung Ernährungs-abhängiger Promotoren und Inhibitoren.....	64
Abbildung 2-10:	Morphologische und biochemische Merkmale der Apoptose nach Induzierung durch das FAS-Rezeptor-Liganden-System.....	75
Abbildung 3-1:	Isolierung und Anreicherung polymorphkerniger Leukozyten nach Spülung der Mundhöhle gesunder Probanden.....	99
Abbildung 3-2:	Effekte einer Kultivierung von Caco-2 Zellen in unterschiedlichen Medien auf den TEER.....	101
Abbildung 3-3:	Schematische Darstellung der NAD ⁺ -abhängigen Reaktion von WST-1 (Substrat) zu Formazan (Produkt: rot).....	115
Abbildung 3-4:	Neutralrot (Strukturformel).....	117
Abbildung 3-5:	Schematische Darstellung der Reaktion von Ala-Pro-p-Nitroanilid zu Ala-Pro und p-Nitroanilin (gelb).....	120
Abbildung 3-6:	Veränderung der Extinktion in Testkavitäten nach Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen mit Ala-Pro-p-Nitroanilid.....	121
Abbildung 3-7:	Veränderung der Extinktion von Testkavitäten nach Inkubation proliferierender und differenzierter Caco-2 Zellen mit 0,5 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid.....	122
Abbildung 3-8:	Effekte (A _{DPP IV}) einer Inkubation mit 0,01 bis 1,0 mmol/L A) Ala-Pro, B) Ala-Trp und C) Lys-Phe auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen.....	122
Abbildung 3-9:	Effekte (A _{DPP IV}) einer Inkubation mit 0,01 bis 1,0 mmol/L A) Val-Phe, B) Val-Tyr und C) Lactalbumin 70 (0,1 bis 7,0 mg Protein/mL) auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	123
Abbildung 3-10:	Versuchsordnung zur Messung des TEER.....	125
Abbildung 3-11:	Versuchsordnung zur Messung des TEER A) bei Raumtemperatur und B) bei 37 °C.....	126
Abbildung 3-12:	Chromatogramme von Sol D nach A) Ausschluss-Chromatographie und B) Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC (C 18)).....	134
Abbildung 3-13:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) synthetischer Dipeptide: A) Ala-Pro, B) Ala-Trp, C) Val-Phe, D) Val-Tyr.....	135
Abbildung 3-14:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) von Dipeptiden: A) 0,05 mmol/L Ala-Trp, B) 0,50 mmol/L Lys-Phe, C) 0,25 mmol/L Val-Tyr, D) 0,20 mmol/L Val-Phe.....	137
Abbildung 3-15:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) A) und B) von 0,2 mmol/L Leu-Lys-Pro - nach Analysen mit unterschiedlichen Laufmittelgradienten A) entsprechend dem Standardprotokoll, B) nach Einsatz eines flachen Gradienten - sowie C) von 1,0 mmol/L Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg).....	138
Abbildung 3-16:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) von Aminosäuren: A) 0,5 mmol/L Phe und B) 0,025 mmol/L Trp.....	138
Abbildung 3-17:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) von A) MES-HBSS und B) Tyrosin....	139
Abbildung 3-18:	Elemente des Aminosäureanalytators LKB 4151 ALPHA PLUS.....	143
Abbildung 3-19:	Reaktionsprinzip zum Nachweis von Hydroxyprolin.....	146
Abbildung 3-20:	Sandwich-ELISA zum Nachweis proliferierender Zellen.....	150
Abbildung 3-21:	Sandwich-ELISA zum Nachweis von Apoptose.....	152

Abbildung 4-1:	Effekte (A_{WST-1} , W_{TEER}) einer Inkubation mit DMSO A) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und B) den TEER differenzierter Caco-2 Zellen.....	157
Abbildung 4-2:	Effekte ($A_{Apoptose}$) einer Inkubation mit DMSO auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	157
Abbildung 4-3:	Effekte (A_{WST-1} , A_{BrdU} , $A_{Apoptose}$) einer Inkubation mit DMSO auf A) die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und DNA-Neusynthese (BrdU-Test) und B) die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender Caco-2 Zellen und PML.....	158
Abbildung 4-4:	Effekte einer Inkubation mit A) 0,2 mol/L und B) 0,5 mol/L HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen.....	158
Abbildung 4-5:	Effekte einer Inkubation mit A) 0,2 mol/L und B) 0,5 mol/L HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen.....	159
Abbildung 4-6:	Effekte einer Inkubation mit HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und Proliferation (BrdU-Test) von PML.....	159
Abbildung 4-7:	Effekte einer Inkubation mit ip6Ado auf die Zeit-abhängige Veränderung des TEER bzw. der metabolischen Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	160
Abbildung 4-8:	Effekte (A_{WST-1}) einer Inkubation mit β -Lactoglobulin bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco2 Zellen.....	173
Abbildung 4-9:	Effekte (A_{WST-1}) einer Inkubation mit A) WPC 75 und B) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen.....	174
Abbildung 4-10:	Effekte (W_{TEER}) einer Inkubation mit β -Lactoglobulin bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).	175
Abbildung 4-11:	Effekte (W_{TEER}) einer Inkubation mit A) WPC 75 und B) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	176
Abbildung 4-12:	Effekte ($A_{DPP IV}$) einer Inkubation mit A) β -Lactoglobulin, B) WPC 75 und C) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	177
Abbildung 4-13:	Effekte (A_{WST-1}) einer Inkubation mit A) β -Lactoglobulin, B) WPC 75 und C) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).	178
Abbildung 4-14:	Effekte (A_{WST-1} , A_{BrdU}) einer Inkubation mit A) β -Lactoglobulin, B) WPC 75 und C) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) bzw. Proliferation (BrdU-Test) von PML....	180
Abbildung 4-15:	Effekte ($A_{Apoptose}$) einer Inkubation mit Natrium-Caseinat und Hydrolysaten auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender und differenzierter Caco-2 Zellen	182
Abbildung 4-16:	Effekte (A_{WST-1} , $A_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Ala-Pro, B) Ala-Trp und C) Val-Phe auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco2 Zellen.....	187
Abbildung 4-17:	Effekte (A_{WST-1} , $A_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit Val-Tyr auf die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen nach Durchführung A) des WST-1 Tests bzw. B) der Neutralrot-Färbung.....	188
Abbildung 4-18:	Effekte (A_{WST-1} , $A_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Ala-Pro und B) Ala-Trp auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	189
Abbildung 4-19:	Effekte (A_{WST-1}) einer Inkubation mit Lys-Phe auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	189
Abbildung 4-20:	Effekte (A_{WST-1} , $A_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Val-Phe und B) Val-Tyr auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	190
Abbildung 4-21:	Effekte (W_{TEER} , $A_{DPP IV}$) einer Inkubation mit A) Ala-Pro, B) Ala-Trp C) Lys-Phe und D) Val-Phe auf den TEER und die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	191

Abbildung 4-22: Effekte (W_{TEER} , $A_{\text{DPP IV}}$) einer Inkubation mit Val-Tyr A) auf den TEER und B) die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	192
Abbildung 4-23: Effekte ($A_{\text{WST-1}}$, $A_{\text{Neutralrot}}$) einer Inkubation mit A) Ala-Pro, B) Ala-Trp und C) Val-Phe auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) polymorphkerniger Leukozyten.....	193
Abbildung 4-24: Effekte ($A_{\text{WST-1}}$, $A_{\text{Neutralrot}}$) einer Inkubation mit Val-Tyr auf die metabolische Aktivität polymorphkerniger Leukozyten, untersucht mittels A) WST-1 Tests und B) Neutralrot -Färbung.....	194
Abbildung 4-25: Effekte (A_{BrdU} , A_{Apoptose}) einer Inkubation mit Ala-Pro auf A) die Proliferation und B) die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung von PML.....	194
Abbildung 4-26: Effekte (A_{BrdU} , A_{Apoptose}) einer Inkubation mit A) Ala-Trp, B) Val-Phe und C) Val-Tyr auf die Proliferation bzw. Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung polymorphkerniger Leukozyten.....	195
Abbildung 4-27: Effekte ($A_{\text{WST-1}}$, $A_{\text{Neutralrot}}$) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 und B) Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen.....	197
Abbildung 4-28: Effekte ($A_{\text{WST-1}}$, $A_{\text{Neutralrot}}$) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 und B) Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen.....	198
Abbildung 4-29: Effekte (W_{TEER}) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 bzw. B) rekonstituierter Magermilch auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	199
Abbildung 4-30: Effekte ($A_{\text{DPP IV}}$) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 bzw. B) Ultralact 35 auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	199
Abbildung 4-31: Effekte ($A_{\text{WST-1}}$, $A_{\text{Neutralrot}}$) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 und B) Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität polymorphkerniger Leukozyten.....	200
Abbildung 4-32: Zeit-abhängige Veränderung des TEER von Caco-2 Zellen (K_N) nach Aussaat auf PC-Membranen einer Kulturfläche von A) 4,7 cm ² bzw. B) 1,1 cm ²	201
Abbildung 4-33: Veränderung des TEER von Caco-2 Zellen (K_N) in Abhängigkeit von der Zellpassagenanzahl und der Inkubationsdauer.....	204
Abbildung 4-34: Effekte (W_{TEER}) einer Inkubation mit A) Gly-Pro und B) Bradykinin auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	206
Abbildung 4-35: Effekte (W_{TEER}) einer Inkubation mit A) Sol D, B) Sol DA, C) Collagel A und D) Collagel BS auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	207
Abbildung 4-36: Effekte (W_{TEER}) einer Inkubation mit Collagel BS-GA auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	208
Abbildung 4-37: Effekte (W_{TEER}) einer A) kontinuierlichen und B) intervallartigen Inkubation mit A) fünf verschiedenen Kollagenhydrolysaten bzw. B) Sol D auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	208
Abbildung 4-38: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) der Negativ-Kontrolle nach Probenentnahme aus A) dem apikalen und B) dem basolateralem Kompartiment.....	209
Abbildung 4-39: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) der Proben aus dem A) apikalen und B) basolateralen Kompartiment, nach A ₁ , B ₁) 45 min und A ₂ , B ₂) 60 min Inkubation intakter Caco-2 Monolayer mit 1 mmol/L Bradykinin.....	210
Abbildung 4-40: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) nach Untersuchung des Transports von 1 mmol/L Bradykinin durch A) eine PC-Membran ($K_{\text{D-AP}}$) und B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T) – die Probenentnahme erfolgte aus dem apikalen Kompartiment ($P_{\text{T-AP}}$) –.....	211
Abbildung 4-41: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) der Negativ-Kontrolle – Probenentnahme aus dem A) apikalen und B) basolateralen Kompartiment.....	212
Abbildung 4-42: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) nach Untersuchung des Transports von 1 mmol/L Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu durch A) eine PC-Membran ($K_{\text{D-BL}}$) und B) einen intakten Caco-2 Monolayer. Die Probenentnahme erfolgte aus dem B ₁) apikalen und B ₂) basolateralen Kompartiment.....	213
Abbildung 4-43: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) A) der Negativ-Kontrolle ($K_{\text{N-BL}}$) sowie B) und C) zweier Proben nach Untersuchung des Transports von Leu-Lys-Pro durch intakte Caco-2 Monolayer, wobei die Probe C) direkt vor der HPLC-Analyse mit 0,2 mmol/L Leu-Lys-Pro angereichert wurde.....	214

Abbildung 4-44:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) nach Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Ala-Trp durch A) eine PC-Membran (K_D) bzw. B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T).....	215
Abbildung 4-45:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18): Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Lys-Phe durch A) eine PC-Membran (K_D) bzw. B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T).....	216
Abbildung 4-46:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18): Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Val-Tyr durch A) eine PC-Membran (K_D) bzw. B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T).....	217
Abbildung 4-47:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18): Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Val-Phe durch A) eine PC-Membran (K_D) bzw. B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T).....	217
Abbildung 4-48:	Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18): Ergebnisse nach Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Dipeptid durch intakte Caco-2 Monolayer: A) Darstellung einer Negativ-Kontrolle (K_N) und der Dipeptide, die in Proben aus basolateralen Kompartimenten nachgewiesen wurden: B) Ala-Trp, C) Val-Phe und D) Val-Tyr.....	218
Abbildung 4-49:	Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: A) Negativkontrolle, B) Diffusionskontrolle (TS_{AP} : 100 mg/mL Sol D) sowie nach Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer, nach Exposition dieser mit C) 10, D) 40 mg/mL Sol D.....	221
Abbildung 4-50:	Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer, nach Exposition dieser mit A) 80 und B) 100 mg/mL Sol D.....	222
Abbildung 4-51:	Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Transports von A) Sol D und B) Sol DA nach 90 min Inkubation von PC-Membranen und intakten Caco-2 Monolayern.....	224
Abbildung 4-52:	Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Transports von A) Collagel A, B) Collagel BS und C) Collagel BS-GA nach 90 min Inkubation von PC-Membranen und intakten Caco-2 Monolayern.....	225
Abbildung 4-53:	Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: A) der Negativ-Kontrolle (K_N) sowie nach Untersuchung des Sol D-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer B) ohne sowie nach Vorbehandlung mit C) Cytochalasin D bzw. D) Palmitoyl-DL-Carnitin.....	227
Abbildung 5-1:	Veränderungen des TEER (RT) von Kontrollzellen (K_N) im Zeitverlauf und nach Aussaat auf PC- bzw. PE-Membranen.....	239
Abbildung A-1:	Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie der A) Negativ-Kontrolle, B) und C) Diffusionskontrollen sowie D) bis F) nach Untersuchung des Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer in Abhängigkeit vom pH-Wert im apikalen Kompartiment (I) pH 7,4, (II) pH 6,0 bzw. in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer A) 60 min, B) 15 – 45 min, C) 60, 90 min, D) 15, 30 min, E) 45, 60 min und F) 90 min.....	295
Abbildung A-2:	Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer in Abhängigkeit vom pH-Wert im apikalen Kompartiment (I) pH 7,4, (II) pH 6,0 bzw. in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer: A) 15, 30 min, B) 45, 60 min und C) 90 min.....	296
Abbildung A-3:	Chromatogramme A) Adsorptions- und B) bis D) Ausschluss-Chromatographie von A) und B) DMEM, C) MES-HBSS, D) HBSS, E) Cytochalasin D und F) Palmitoyl-DL-Carnitin.....	296
Abbildung A-4:	Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie von A) 0,025, B) 0,05, C) 0,1, D) 0,25, E) 0,5 und F) 1,0 mg/mL Sol D (Verdünnungsreihe).....	298
Abbildung A-5:	Chromatogramm einer Analyse von Aminosäurenstandards mittels Alpha Plus LKB 4151, aufgenommen bei einer Wellenlänge von 570 nm.....	298
Abbildung A-6:	Chromatogramm einer Analyse von Aminosäurenstandards mittels Alpha Plus LKB 4151, aufgenommen bei einer Wellenlänge von 420 nm.....	299

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Ausgewählte Komponenten aus Milch und -produkten, die nachweislich ein Krankheitsrisiko vermindern bzw. die Gesundheit eines Konsumenten fördern...	3
Tabelle 2-2:	Auswahl bioaktiver Peptide aus Milchproteinen.....	7
Tabelle 2-3:	Bioaktivitäten verschiedener Peptidfragmente, die durch enzymatische Hydrolyse unterschiedlicher Bakterienkulturen aus Milchprotein freigesetzt wurden.....	8
Tabelle 2-4:	Klassifizierung des Blut(hoch)drucks (Hypertonie) von Erwachsenen.....	9
Tabelle 2-5:	Wirkung und Rezeptorbindung von Angiotensin II (DRVYIHPF) und dessen Spaltprodukten, die in Humanserum nachgewiesen wurden.....	12
Tabelle 2-6:	ACE-inhibitorische Peptide aus Casein.....	15
Tabelle 2-7:	ACE-inhibitorische Peptide aus Molkenprotein.....	16
Tabelle 2-8:	ACE-inhibitorische Peptide, die in der Primärstruktur von Milchproteinen latent vorhanden sind.....	17
Tabelle 2-9:	Multifunktionelle, bioaktive Peptide aus Milchprotein.....	18
Tabelle 2-10:	ACE-inhibitorische Di- und Tripeptide aus Pflanzenproteinen.....	20
Tabelle 2-11:	ACE-inhibitorische Di- und Tripeptide aus tierischen Proteinen.....	21
Tabelle 2-12:	Wirkung und Klassifizierung bioaktiver Peptide als ACE-Substrate, -Inhibitoren bzw. Medikamenten-ähnliche ACE-Inhibitoren.....	22
Tabelle 2-13:	Wirkung bioaktiver Peptide aus Nahrungsproteinen auf den Blutdruck von Probanden mit Hypertonie.....	23
Tabelle 2-14:	Caseinophosphopeptide aus Milchprotein.....	25
Tabelle 2-15:	Opioide Peptide aus Milchprotein.....	27
Tabelle 2-16:	Zytomodulierende Peptide aus Milchprotein.....	28
Tabelle 2-17:	Aminosäuren (AS) Zusammensetzung von Gelatine.....	32
Tabelle 2-18:	Untersuchung (in vivo) der Wirkung von Gelatine, -hydrolysaten (I) auf den Verlauf verschiedener degenerativer Gelenkerkrankungen.....	39
Tabelle 2-19:	Untersuchung (in vivo) der Wirkung von Gelatine, -hydrolysaten (II) auf den Verlauf degenerativer Gelenkerkrankungen.....	40
Tabelle 2-20:	Untersuchung (in vivo) der Wirkung von Gelatine, -hydrolysaten (III) auf den Verlauf degenerativer Gelenkerkrankungen und die Festigkeit von Bindegewebe.....	41
Tabelle 2-21:	<i>Tight junctions</i> -assoziierte Proteine und deren charakteristische Merkmale.....	47
Tabelle 2-22:	Proteasen der luminalen Verdauung.....	52
Tabelle 2-23:	Peptidasen der Bürstensaum-Membran.....	53
Tabelle 2-24:	Aminosäuren-Transportsysteme der intestinalen Bürstensaummembran.....	56
Tabelle 2-25:	Aminosäuren-Transportsysteme der basolateralen Enterozytenmembran.....	61
Tabelle 2-26:	Beispiele für Zellviabilitäts-Nachweismethoden, die sich zur Prüfung der Zytotoxizität entsprechend der EU Norm 30993-5 eignen.....	71
Tabelle 2-27:	Biochemische Apoptose-Merkmale und deren möglicher Nachweis.....	78
Tabelle 2-28:	Methodische Merkmale ausgewählter Transportstudien mit Caco-2 Zellen.....	84
Tabelle 2-29:	Transport bioaktiver Oligopeptide durch intakte Caco-2 Monolayer.....	86
Tabelle 3-1:	Probenmaterial: ACE-inhibitorische Hydrolysate (79/79: mit / ohne simulierter gastrointestinaler Verdauung) aus drei verschiedenen Milchproteinfraktionen	102
Tabelle 3-2:	Proteingehalte der Proben aus β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein...	103
Tabelle 3-3:	Proteingehalte der Proben aus WPC 75.....	103
Tabelle 3-4:	Proteingehalte der Proben aus Natrium-Caseinat.....	104
Tabelle 3-5:	Probenmaterial: Synthetische Peptide.....	105
Tabelle 3-6:	Probenmaterial: Kollagenhydrolysate der Gelita AG.....	106
Tabelle 3-7:	Konzentrationen der Stammlösungen unter Angabe des Lösemittels.....	107
Tabelle 3-8:	Synthetische Peptide und deren Lösemittel.....	107
Tabelle 3-9:	Verdünnungsschema des Peptidlösemittels DMSO.....	109
Tabelle 3-10:	Verdünnungsschema von N ⁶ -(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado).....	110
Tabelle 3-11:	Verdünnungsschema von Ala-Pro-p-Nitroanilid.....	110

Tabelle 3-12:	Verdünnungsschema ACE-inhibitorischer Hydrolysate (79/79: mit / ohne simulierter gastrointestinaler Verdauung) und deren Ausgangssubstanzen (3 Milchproteinfraktionen).....	111
Tabelle 3-13:	Verdünnungsschema ACE-inhibitorischer Permeate und deren Ausgangssubstanzen (Milchproteinfraktionen und WPC 75 Hydrolysat).....	111
Tabelle 3-14:	Verdünnungsschema der synthetischen Peptide.....	112
Tabelle 3-15:	Verdünnungsschema der handelsüblichen Milchproteinpräparate.....	112
Tabelle 3-16:	Verdünnungsschema des Magermilchpulvers (zertifiziertes Referenzmaterial)...	113
Tabelle 3-17:	Verdünnungsschema ausgewählter Dipeptide.....	113
Tabelle 3-18:	Verdünnungsschema der Kollagenhydrolysate (I).....	114
Tabelle 3-19:	Verdünnungsschema der Kollagenhydrolysate (II).....	114
Tabelle 3-20:	Diffusionsstudie mit Sol D.....	130
Tabelle 3-21:	Kennzeichnung der verschiedenen Tests der Transportstudien.....	132
Tabelle 3-22:	Retentionszeiten ausgewählter Aminosäuren und synthetischer Peptide.....	137
Tabelle 3-23:	RP-HPLC (C 18) und Software Valoo®: Kalibrierfunktionen und Nachweisgrenzen ausgewählter Dipeptide.....	139
Tabelle 3-24:	Probenbezeichnung.....	140
Tabelle 3-25:	Probenvolumina (I) nach Transportstudie und zur HPLC-Analyse.....	140
Tabelle 3-26:	Probenvolumina (II) nach Transportstudie und zur HPLC-Analyse.....	142
Tabelle 3-27:	Puffer-Rezepturen für die Analyse nicht oxidiertes Proteinhydrolysate.....	145
Tabelle 3-28:	Probenvolumina (III) nach Transportstudie und zur HyPro-Bestimmung.....	148
Tabelle 4-1:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen.....	161
Tabelle 4-2:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Milchprotein auf die metabolische Aktivität differenzierter Caco-2 Monolayer bzw. polymorphkerniger Leukozyten...	162
Tabelle 4-3:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -Hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (I).....	163
Tabelle 4-4:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (II).....	164
Tabelle 4-5:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten, auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (I).....	164
Tabelle 4-6:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten, auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (II)....	165
Tabelle 4-7:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (I).....	165
Tabelle 4-8:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) -hydrolysaten, auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (II).....	166
Tabelle 4-9:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (I).....	166
Tabelle 4-10:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (II).....	167
Tabelle 4-11:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (I).....	167
Tabelle 4-12:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (II)....	168
Tabelle 4-13:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (I).....	168
Tabelle 4-14:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (II).....	169

Tabelle 4-15:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (I).....	169
Tabelle 4-16:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (II).....	170
Tabelle 4-17:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (I)....	170
Tabelle 4-18:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (II)...	171
Tabelle 4-19:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (I).....	171
Tabelle 4-20:	Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) PML (II).....	172
Tabelle 4-21:	Übersicht der Hydrolysate von Milchproteinen mit potenziell zytotoxischen Effekten (RZI) auf proliferierende bzw. differenzierte Caco-2 Zellen bzw. PML....	172
Tabelle 4-22:	Effekte (RZI) einer Inkubation mit β -Lactoglobulin bzw. Natrium-Caseinat Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen	175
Tabelle 4-23:	Effekte (RZI) einer Inkubation mit A) β -Lactoglobulin und B) Natrium-Caseinat und deren Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen und PML.....	179
Tabelle 4-24:	Effekte (A_{Apoptose}) einer 24 h Inkubation mit WPC 75 und Natrium-Caseinat und deren Hydrolysate auf die Apoptose-spezifische DNA -Fragmentierung proliferierender Caco-2 Zellen	181
Tabelle 4-25:	Effekte (W_{TEER}) einer Inkubation mit 0,01 und 1 mmol/L synthetischer Peptide auf den TEER vorkultivierter, differenzierter Caco-2 Monolayer	184
Tabelle 4-26:	Effekte ($A_{\text{WST-1}}$) einer Inkubation mit 0,01 und 1 mmol/L synthetischer Peptide auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Monolayer....	185
Tabelle 4-27:	Effekte (A_{Apoptose}) einer Inkubation mit ausgewählten Dipeptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender Caco-2 Zellen	188
Tabelle 4-28:	Effekte (A_{Apoptose}) einer Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung vorkultivierter Caco-2 Zellen.....	192
Tabelle 4-29:	Effekte einer Inkubation mit Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg auf verschiedenen Funktionen von Humanzellen: proliferierende Caco-2 Zellen, Caco-2 Monolayer und PML.....	196
Tabelle 4-30:	TEER von Caco-2 Monolayern (K_N) direkt vor bzw. 2 – 4 h nach jeder Transportstudie (I).....	202
Tabelle 4-31:	TEER von Caco-2 Monolayern (K_N) direkt vor bzw. 2 – 4 h nach jeder Transportstudie (II).....	203
Tabelle 4-32:	TEER von Caco-2 Monolayern (P_T) direkt vor bzw. 2 – 4 h nach jeder Transportstudie.....	205
Tabelle 4-33:	Aminosäuren Zusammensetzung der Fraktionen A-D im Vergleich zu Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)	211
Tabelle 4-34:	RP-HPLC (C 18): Ergebnisse nach Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Dipeptid durch intakte Caco-2 Monolayer.....	219
Tabelle 4-34:	RP-HPLC (C 18): Ergebnisse nach Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Dipeptid durch intakte Caco-2 Monolayer.....	219
Tabelle 4-35:	Ergebnisse der HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) von Kollagenhydrolysaten.....	220
Tabelle 4-36:	Ergebnisse der HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) von Proben aus basolateralen Kompartimenten der Negativ-Kontrollen der Tests 1 – 5.....	220
Tabelle 4-37:	Ergebnisse der HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) von Proben aus basolateralen Kompartimenten der Diffusionskontrollen der Tests 1 – 5.....	220
Tabelle 4-38:	Ausschluss-Chromatographie: Konzentrations-abhängiger Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer.....	222

Tabelle 4-39:	Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung der Unterschiede im Sol D-Transport nach Inkubation von acht verschiedenen Caco-2 Monolayern einer Zellpassage.....	223
Tabelle 4-40:	Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Transports von Kollagenhydrolysaten nach 90 min Inkubation intakter Caco2 Monolayer.....	226
Tabelle 4-41:	Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung der Wirkung von <i>tight junctions</i> -Modulatoren auf den Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer.....	227
Tabelle 4-42:	Konzentration ungebundenen Hydroxyprolins in Kollagenhydrolysaten.....	228
Tabelle 4-43:	Positiv-Kontrollen (K _P): Berechneter Hydroxyprolin-Anteil der fünf Kollagenhydrolysate (100 mg/mL).....	228
Tabelle 4-44:	Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer.....	229
Tabelle 4-45:	Untersuchung des Zeit-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer.....	230
Tabelle 4-46:	Untersuchung des Sol D-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer nach 14 bzw. 21-tägiger Zellkultivierung unter Standardbedingungen (an d ₁₄ bzw. d ₂₁)....	231
Tabelle 4-47:	Untersuchung (I) des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer.....	232
Tabelle 4-48:	Untersuchung (II) des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer.....	233
Tabelle 4-49:	Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer (von BL nach AP).....	233
Tabelle 4-50:	Effekte einer Inkubation mit 0,5 µg/mL Cytochalasin D auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer.....	234
Tabelle 4-51:	Effekte einer Inkubation mit Palmitoyl-DL-Carnitin auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer.....	234
Tabelle 4-52:	Untersuchung des Hydroxyprolin-Transports (freie und Peptid-gebundene Aminosäure – Sol D-) durch intakte Caco-2 Monolayer.....	235
Tabelle 5-1:	Messung des TEER in der Lebensmittelforschung: Methode und Ergebnisse.....	241
Tabelle 5-2:	Zeit-abhängige Veränderung der Aktivität von Enzymen der Bürstensaum-Membran in Caco-2 Zellkulturen.....	242
Tabelle 5-3:	Anzahl der Milchproteinhydrolysate mit potenziell zytotoxischer Wirkung auf Humanzellen.....	252
Tabelle 5-4:	Ausgewählte ACE-inhibitorische Peptide.....	255
Tabelle A-1:	Kooperationspartner dieser Arbeit.....	293
Tabelle A-2:	Effekte einer Caco-2 Zellkultivierung mit verschiedenen Medien auf den TEER...	293
Tabelle A-3:	Effekte (Extinktionen) einer Caco-2 Zellkultivierung mit verschiedenen Medien auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test).....	293
Tabelle A-4:	DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Monolayer nach Kultivierung in DMEM bzw. mit ip6Ado.....	294
Tabelle A-5:	Effekte (Extinktionen) einer 4 h Inkubation mit Dipeptiden auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) – Mittelwerte der Extinktionen -....	294
Tabelle A-6:	Effekte (Extinktionen) einer 4 h Inkubation mit Milchproteinpräparaten auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	295
Tabelle A-7:	RP-HPLC (C 18): Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Ala-Trp.....	296
Tabelle A-8:	RP-HPLC (C 18): Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Lys-Phe.....	297
Tabelle A-9:	RP-HPLC (C 18): Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Val-Phe.....	297
Tabelle A-10:	RP-HPLC (C 18): Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Val-Tyr.....	297
Tabelle A-11:	Ausschluss-Chromatographie: Ergebnisse der HPLC -Analyse einer Verdünnungsreihe mit Sol D.....	297
Tabelle A-12:	Nummerierung der Peaks des Chromatogramms der Aminosäuren-Analyse.....	298
Tabelle A-13:	Ermittlung der notwendigen Proben -Hydrolysedauer für Sol D.....	299
Tabelle A-14:	Effekte des Materials der Reaktionsgefäßes auf die Hydroxyprolin-Bestimmung..	299

Tabelle A-15:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit DMSO auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	300
Tabelle A-16:	Effekte einer Inkubation mit DMEM (K_N) bzw. DMSO auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	300
Tabelle A-17:	Effekte (Extinktionen) einer 24 h Inkubation mit DMSO auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender bzw. differenzierter Caco-2 Zellen sowie polymorphkerniger Leukozyten.....	300
Tabelle A-18:	Effekte (Extinktionen) einer 24 h Inkubation mit DMSO auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und die DNA-Neusynthese (BrdU-Test) proliferierender Caco-2 Zellen und polymorphkerniger Leukozyten.....	301
Tabelle A-19:	Fortsetzung der Ergebnisse aus Tabelle A-18.....	301
Tabelle A-20:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen.....	301
Tabelle A-21:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)...	302
Tabelle A-22:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und Proliferation (BrdU-Test) von PML.....	302
Tabelle A-23:	Effekte einer Inkubation mit N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	302
Tabelle A-24:	Ergänzung zu Tabelle A-23: Angabe der S. E. M.....	303
Tabelle A-25:	Zeit-abhängige Veränderung des TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] von Caco-2 Zellen (K_N).....	303
Tabelle A-26:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)...	303
Tabelle A-27:	Zeit-abhängige Veränderung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test, Extinktionen) von Caco-2 Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden.....	303
Tabelle A-28:	Photometrische Messwerte einer 72 h Inkubation mit DMEM (K_N) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen.....	304
Tabelle A-29:	Photometrische Messwerte nach 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen (Substrate) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen.....	304
Tabelle A-30:	Photometrische Messwerte nach einer 72 h Inkubation mit DMEM (K_N) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)...	305
Tabelle A-31:	Photometrische Messwerte nach einer 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen (Substrate) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	305
Tabelle A-32:	Photometrische Messwerte nach einer 72 h Inkubation mit DMEM (K_N) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten.....	306
Tabelle A-33:	Photometrische Messwerte nach einer 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen (Substrate) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML.....	306
Tabelle A-34:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (I).....	307
Tabelle A-35:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (II).....	307
Tabelle A-36:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (III) ...	308
Tabelle A-37:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (IV)...	308
Tabelle A-38:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (V).....	309
Tabelle A-39:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (VI).....	309

Tabelle A-40:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (I).....	310
Tabelle A-41:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (II).....	310
Tabelle A-42:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (III).....	311
Tabelle A-43:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (IV)....	311
Tabelle A-44:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (V).....	312
Tabelle A-45:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (VI).....	312
Tabelle A-46:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (I).....	313
Tabelle A-47:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (II).....	313
Tabelle A-48:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Molkenproteinkonzentrat WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (III).....	314
Tabelle A-49:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (IV).....	314
Tabelle A-50:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (V).....	315
Tabelle A-51:	Effekte (A_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (VI).....	315
Tabelle A-52:	WST-1 Test: Photometrische Messwerte nach Kultivierung proliferierenden Caco-2 Zellen in DMEM (K_N) und Zuordnung der Testsubstanzen.....	315
Tabelle A-53:	Messwerte des TEER von Caco-2 Monolayern (Negativ-Kontrollen).....	316
Tabelle A-54:	WST-1 Test: Photometrische Messwerte nach Inkubation differenzierter Caco-2 Monolayer (Negativ-Kontrollen) und Zuordnung der Testsubstanzen.....	316
Tabelle A-55:	A) WST-1 und B) BrdU-Test: Photometrische Messwerte nach Inkubation von PML (Negativ-Kontrollen) und Zuordnung der Testsubstanzen.....	316
Tabelle A-56:	Effekte (Extinktionen) einer 24 h Inkubation mit Natrium-Caseinat und Hydrolysaten auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender bzw. differenzierter Caco-2 Zellen und PML.....	318
Tabelle A-57:	Effekte einer Inkubation mit 0,01 und 1 mmol/L synthetischer Peptide auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) – Angabe der S. E. M. -	318
Tabelle A-58:	Zeit-abhängige Effekte auf den TEER differenzierter Caco-2 Monolayer (K_N).....	319
Tabelle A-59:	Effekte einer Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) – Angabe der S. E. M. -	319
Tabelle A-60:	Zeit-abhängige Effekte auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer, K_N).....	319
Tabelle A-61:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen.....	320
Tabelle A-62:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen – Angabe der Extinktionen -	320
Tabelle A-63:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen – Angabe der S. E. M. -	321

Tabelle A-64:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender Caco-2 Zellen.....	321
Tabelle A-65:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)...	321
Tabelle A-66:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)– Angabe der S. E. M. -.	322
Tabelle A-67:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen	322
Tabelle A-68:	Effekte einer 4 bis 192 h Inkubation mit Ala-Pro auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	323
Tabelle A-69:	Effekte einer 4 – 96 h Inkubation mit Lys-Phe auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	323
Tabelle A-70:	Effekte einer 4 – 192 h Inkubation mit Val-Phe auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	323
Tabelle A-71:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Ala-Trp und Val-Tyr auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	324
Tabelle A-72:	Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Ala-Pro auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	324
Tabelle A-73:	Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Ala-Trp auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	324
Tabelle A-74:	Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Lys-Phe auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	325
Tabelle A-75:	Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Val-Phe auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	325
Tabelle A-76:	Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Val-Tyr auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	325
Tabelle A-77:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung differenzierter Caco-2 Zellen.....	326
Tabelle A-78:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten.....	326
Tabelle A-79:	Effekte einer Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten – Angabe der S. E. M.–.....	326
Tabelle A-80:	Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (Neutralrot-Färbung) polymorphkerniger Leukozyten.....	327
Tabelle A-81:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die Proliferation (BrdU-Test) polymorphkerniger Leukozyten.....	327
Tabelle A-82:	Effekte (Extinktionen) einer 4 h Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung polymorphkerniger Leukozyten, untersucht A) in Zellkultur-Überständen und B) in Zell-Lysaten.....	328
Tabelle A-83:	Effekte (Extinktionen bzw. TEER [$\Omega \text{ cm}^2$]) einer Inkubation mit Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg auf verschiedenen Funktionen von Humanzellen: proliferierende Caco-2 Zellen, Caco-2 Monolayer und PML.....	328
Tabelle A-84:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf die metabolische Aktivität (Wst-1 Test und Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen.....	329
Tabelle A-85:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität (Wst-1 Test und Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen.....	329
Tabelle A-86:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf die metabolische Aktivität (Wst-1 Test und Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	329
Tabelle A-87:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität (Wst-1 Test und Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	329
Tabelle A-88:	Effekte einer 4 - 96 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	330

Tabelle A-89:	Effekte einer 4 – 72 h Inkubation mit Magermilchpulver auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	330
Tabelle A-90:	Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	330
Tabelle A-91:	Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Ultralact 35 auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	330
Tabelle A-92:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf die metabolische Aktivität (Wst-1 Test und Neutralrot-Färbung) polymorphkerniger Leukozyten.....	331
Tabelle A-93:	Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität (Wst-1 Test und Neutralrot-Färbung) polymorphkerniger Leukozyten.....	331
Tabelle A-94:	Mittelwerte der Leerwerte [Ω] - Ergebnisse der TEER Messung (I).....	331
Tabelle A-95:	Mittelwerte der Leerwerte [Ω] - Ergebnisse der TEER Messung (II).....	332
Tabelle A-96:	Effekte einer 4 – 96 h Inkubation mit Gly-Pro auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] vorkultivierter Caco-2 Monolayer.....	332
Tabelle A-97:	Effekte einer 4 - 96 h Inkubation mit Bradykinin auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	332
Tabelle A-98:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Sol D auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	333
Tabelle A-99:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Sol DA auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	333
Tabelle A-100:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Collagel A auf den TEER [$\Omega \times \text{cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	333
Tabelle A-101:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Collagel BS auf den TEER [$\Omega \times \text{cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	333
Tabelle A-102:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Collagel BS-GA auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	334
Tabelle A-103:	Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Kollagen Hydrolysaten auf den TEER [$\Omega \times \text{cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	334
Tabelle A-104:	Effekte einer intervallartigen Inkubation mit Sol D auf den TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer).....	334
Tabelle A-105:	Photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung: Messwiederholungen der Leerwerte und Standards	335
Tabelle A-106:	Kalibrierfunktionen der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung.....	335
Tabelle A-107:	K_p : Berechnete Hydroxyprolin-Anteile in Sol D [%] (w/v).....	335
Tabelle A-108:	K_D : Diffusion von 100 mg/mL Kollagenhydrolysaten durch PC-Membranen	335
Tabelle A-109:	K_D : Diffusion von 100 mg/mL Sol D durch PC-Membranen (von AP nach BL).....	336
Tabelle A-110:	K_N : Hydroxyprolingehalt [$\mu\text{L}/P_{T-BL}$] der Proben von differenzierten Caco-2 Zellen..	336
Tabelle A-111:	Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer	336
Tabelle A-112:	Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Zeit-abhängigen Transports von 100 mg/mL Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer ...	337
Tabelle A-113:	Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Sol D-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer nach 14-tägiger Zellkultivierung unter Standardbedingungen	337
Tabelle A-114:	Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Sol D-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer nach 21-tägiger Zellkultivierung unter Standardbedingungen	337
Tabelle A-115:	Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer (I).....	337
Tabelle A-116:	Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer (II).....	338

Tabelle A-117: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Effekte einer Inkubation mit 0,5 µg/mL Cytochalasin D auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer (I).....	338
Tabelle A-118: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Effekte einer Inkubation mit 0,1 mmol/L Palmitoyl-DL-Carnitin auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer (II).....	338
Tabelle A-119: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Effekte einer Inkubation mit <i>tight junctions</i> -Modulatoren auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer.....	338
Tabelle A-120: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Hydroxyprolin-Transports (freie und Peptid-gebundene Aminosäure aus Sol D) durch intakte Caco-2 Monolayer.....	339

Abkürzungsverzeichnis

AI _{Apoptose}	Index der Apoptose-spezifischen DNA -Fragmentierung
AI _{BrdU-Einbau}	Index der DNA-Biosynthese
AI _{DPP IV}	Index der Dipeptidyl-Aminopeptidase IV Aktivität
AI _{Neutralrot}	Index der intrazellulären metabolischen Aktivität
AI _{WST-1}	Index der extrazellulären metabolischen Aktivität
Alca	Alcalase
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AP	apikales Kompartiment
APTS	2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure
BL	BLANK (Leerwert)
BrdU	5'-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Konzentration
Caco-2 Zellen	Colon-Adenocarcinoma Zellen
Caspasen	<u>Cysteiny</u> l- <u>aspartic-acid-proteases</u>
CD	Cluster of Differentiation
CD-15	ein spezifisches Oberflächenprotein polymorphkerniger Leukozyten
Co	Corolase
Coll	Collagen
CPP	Caseinophosphopeptide
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
Cyt	Cytochalasin D
D	Deutschland
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPP IV	Dipeptidyl-Aminopeptidase IV
E	Enzym
EDTA	Etylendiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme linked Immun osorbent Assay
F	Frankreich
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fötale Kälberserum
GIT	Gastrointestinaltrakt
Guo	Guanosin
H	Hydrolysate
HBSS	Hanks Bilanzierte Salz-Lösung (pH 7,4)
HepG2	Leberzelllinie
HG	Hydrolysegrad [%]
HL-60 Zellen	Humane Promyelozytische Leukämiezellen
HP	Hydrolysat-Permeat
HPLC	Hochleistungschromatographie
HT-29 Zellen	Colon-Adenocarcinoma Zellen
I.	Inkubationsdauer [d; h; min]
IL	Interleukine
ip6Ado	N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin
K	Kavität
K _D	Diffusionskontrolle
K _{D-<u>BL</u>}	Diffusionskontrolle – Probeentnahme aus dem basolateralen Kompartiment
K _N	Negativ-Kontrolle
K _P	Positiv-Kontrolle
KO	„Katsuo bushi“ Oligopeptid
Kol.	Kollagen
KRP	Krebs-Ringer Puffer

La 70	Lactalbumin 70
Lg.	Lactoglobulin
MACS	Magnetische Antikörperzellseparierung
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure Monohydrat
MES-HBSS	Hanks Bilanzierte Salz-Lösung angesäuert mit MES (pH 6,0)
MP	Magermilchpulver
MS	Massenspektroskopie
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
n. d.	nicht detektiert
Na-CN	Natrium-Caseinat
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxide
Nr.	Nummer
PaC	Palmitoyl-DL-Carnitin Chlorid
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS _{MACS}	2 mmol/L EDTA und 0,5 % BSA in PBS
PC	Polycarbonat
PE	Polyester
PO	Peroxidase
PP	Polypropylen
Prota	Protamex
PS	Polystyrol
P _T	Probe aus Testkavitäten
P _{T-AP}	Probe aus dem apikalen Kompartiment von Testkavitäten
P _{T-BL}	Probe aus dem basolateralen Kompartiment von Testkavitäten
RT	Raumtemperatur
RZI	Relativer-Zytotoxizitäts-Index
S	Substrat
SHR-Ratten	Ratten mit spontanaufretender Hypertonie
S. E. M.	Standardfehler
sGIV	simulierte gastrointestinale Verdauung
ssp	Subspezies
TEER	Trans -epithelialer elektrischer Widerstand
TFA	Trifluoressigsäure
Trp	Tryptophan
Tryp	TPCK-Trypsin
TS	Testsubstanz
TS _{AP}	Testsubstanz im apikalen Kompartiment
TSE	Transforme Spongioforme Encephalopathie
U 35	Ultralact 35
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WI _{TEER}	Index des transepithelialen elektrischen Widerstands
WPC 75	Molkenproteinkonzentrat 75
WST-1	Cell Proliferation Reagent WST-1
b-Lg.	β-Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein

1 Einleitung

Die zellchemischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden im Rahmen des EU-Projektes „Hypotensive Peptides from Milk Proteins“ (HTPMProt) durchgeführt sowie aufgrund einer Kooperation mit der Gelita AG (Eberbach, D). Die Kooperationspartner dieser Arbeit werden in Tabelle A-1 aufgeführt.

Das EU-Projekt brachte fünf interdisziplinäre Forschergruppen zusammen, mit dem Ziel Peptide aus Milchprotein (Hydrolysate, Hydrolysat-Permeate sowie synthetische Dipeptide) zu identifizieren, die ACE-inhibitorisch (ACE = angiotensin converting enzyme), d.h. potenziell blutdrucksenkend wirken. Weitere Arbeitsschwerpunkte des Projektes waren die Charakterisierung der genannten Substanzen sowie deren Produktion im industriellen Maßstab, verbunden mit der Entwicklung funktioneller Lebensmittel unter Angabe validierter Health Claims (gesundheitsbezogene Werbeaussagen). Des Weiteren wurde die Akzeptanz der Verbraucher gegenüber funktionellen Lebensmitteln untersucht, die ACE-inhibitorische Peptide aus natürlichen Quellen enthalten¹.

Die Charakterisierung der ACE-inhibitorischen Peptide (Hydrolysate, Hydrolysat-Permeate) beinhaltete die Untersuchung der physikochemischen und funktionellen Merkmale (u. a. Löslichkeit, Geschmack), die Identifizierung eines möglichen allergenen Potenzials sowie der Ausschluss eines zytotoxischen Potenzials. Letzteres wurde in den Zytotoxizitätsstudien dieser Arbeit an Humanzellen untersucht, schwerpunktmäßig an Caco-2 Zellen sowie an polymorphkernigen Leukozyten. Hierbei spielten methodische Aspekte zur Anwendung zellchemischer Verfahren als Detektionssysteme für lebensmittelwissenschaftliche Fragestellungen eine besondere Rolle. Peptide, die kein zytotoxisches Potenzial aufwiesen und in physiologisch relevanten Konzentrationen (*in vitro*) ACE-inhibitorisch wirkten, wurden in Humanstudien des Projektpartners zur Untersuchung der Wirkung auf normotensive Probanden bzw. solchen mit kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt.

Bioaktive Peptide (u. a. ACE-inhibitorische Peptide) entfalten ihre Wirkung *in vivo* nur dann, wenn sie ihren Zielort intakt erreichen. Dazu ist es zumeist notwendig, dass diese bzw. Vorläuferpeptide nach der oralen Aufnahme (u. a. integriert in funktionelle Lebensmittel) den Verdauungstrakt intakt passieren und über die Blutbahn zum Wirkungsort transportiert werden. In den Transportstudien dieser Arbeit wurde erstmals die Resorption ACE-inhibitorischer Peptide mit Hilfe des Caco-2 Zellkulturmodells untersucht. Außerdem wurde erstmals der Transport von *in vivo* chondroprotektiven Kollagenhydrolysaten durch das simulierte Dünndarmepithel untersucht.

¹ Walsh, D. et al., 2004

2 Theoretischer Hintergrund

Der Verzehr von Lebensmitteln dient vordergründig der adäquaten Ernährung, der Bedarfsdeckung an Nährstoffen (Kohlenhydrate, Fette, Protein, Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente) und der notwendigen Energie- und Wasserzufuhr. Eine diesbezüglich empfehlenswerte Ernährungsform ist die vollwertige Ernährung, die auf den Referenzwerten der Deutschen Gesellschaft für Ernährung basiert. In neue Konzepte einer optimierten Ernährung werden spezielle Lebensmittel integriert, die neben dem nutritiven einen zusätzlichen physiologischen Nutzen für gesunde Konsumenten aufweisen, in dem sie vor chronischen, ernährungsabhängigen Krankheiten schützen und gleichzeitig den Standards der Lebensmittelsicherheit genügen. Diese Lebensmittel werden als (physiologisch) funktionelle Lebensmittel (*functional food*) bezeichnet. Die Begriffe *Nutraceutical*, *Designer Food*, *Pharmafood*, *Acromedical Food* oder *Health food* werden teilweise synonym eingesetzt. In Japan wurde 1991 das Konzept der „*Foods for Specified Health Use*“ (FOSHU) und ein entsprechendes Siegel eingeführt¹. Seitdem wurden mehr als 300 Produkte als FOSHU zugelassen, die in 3 Gruppen eingeteilt werden: Probiotika, Prebiotika und Biogenika².

Obwohl der Begriff der funktionellen Lebensmittel allgemein gebräuchlich ist, existiert europaweit noch keine einheitliche Definition. Innerhalb des FUFOSSE-Projektes³ wurde deshalb 1998 folgende Arbeitsdefinition formuliert: Ein Lebensmittel⁴ kann als „funktionell“ angesehen werden, wenn hinreichend nachgewiesen ist, dass es eine oder mehrere Körperfunktionen über einen adäquaten nutritiven Effekt hinaus positiv beeinflusst, so dass ein höherer Gesundheitszustand und ein zunehmendes Wohlbefinden oder eine Verringerung des Krankheitsrisikos erreicht werden. Funktionelle Lebensmittel müssen jedoch Lebensmittel bleiben (keine Pillen oder Kapseln), die ihre Wirkung nach Verzehr von solchen Mengen entfalten, die normalen Verzehrsgewohnheiten entsprechen. Ein funktionelles Lebensmittel kann ein natürliches (traditionelles) Lebensmittel sein sowie eines, dem eine natürliche oder modifizierte Komponente zugesetzt und/oder unerwünschte Komponenten entnommen wurden. Funktionelle Lebensmittel sollten für alle Mitglieder einer Population funktional sein oder für eine zugehörige, genau definierte Personengruppe³.

Beispiele für traditionelle und *per se* funktionelle Lebensmittel sind Milch und daraus hergestellte Produkte, die nachweislich wünschenswerte physiologische Wirkungen entfalten (s. Tabelle 2-1) bzw. antikanzerogen wirken⁵ und deshalb „Dairyceuticals“ genannt werden⁶.

¹ Goldberg, I., 1994, Taylor, C. L., 2004

² Yamamoto, N. et al., 2003

³ FUFOSSE-Projekt (1995– 1998): *Functional food Science in Europe*, Diplock, A. et al., 1999

⁴ Deutsches LMBG (§1): „Lebensmittel sind Stoffe, die dazu bestimmt sind, in unverändertem, zubereitetem oder verarbeiteten Zustand von Menschen verzehrt zu werden, ausgenommen sind Stoffe, die überwiegend dazu bestimmt sind, zu anderen Zwecken als zur Ernährung oder zum Genuss verzehrt zu werden“.

⁵ McIntosh, G. H., 2003

⁶ German, J. B. et al., 2003

Tabelle 2-1: Ausgewählte Komponenten aus Milch und -produkten, die nachweislich ein Krankheitsrisiko vermindern bzw. die Gesundheit eines Konsumenten fördern⁷

Komponenten aus Milch und Milchprodukten	Physiologische Wirkungen
	- Risikominderung gegenüber einer Erkrankung + fördert die Gesundheit von/vom
Calcium	- Osteoporose, Bluthochdruck, + Knochen und Zähne
Selen	- Arteriosklerose, Tumorgenese
Caseinophosphopeptide (CPP) [#]	- Osteoporose, Bluthochdruck, + Knochen und Zähne
Folsäure ^{##}	- Neuralrohrdefekt
Konjugierte Linolsäuren	- Arteriosklerose, Tumorgenese
Lactoperoxidase	- Karies
Lactoferrin	- Karies, gastrointestinale Infektionen
Immunglobuline	- gastrointestinale Infektionen, Karies u. a.
Oligosaccharide ^{###}	+ Darm
Sialinsäure ^{###}	+ Zentralnervensystem, Gehirn

[#] CPP werden bei der Verdauung aus Casein freigesetzt und binden vorliegende Mineralstoffe (u. a. Calcium), ^{##} aus Milchprodukten, die *S. thermophilus* enthalten, ^{###} aus Humanmilch: positive Wirkung auf die Entwicklung von Säuglingen; verändert nach Playne⁷.

Die europäische Arbeitsdefinition verdeutlicht, dass eine klare Unterscheidung zwischen (funktionellen) Lebensmitteln und Arzneimitteln⁸ (*medical food* und *drugs*⁹) notwendig ist. Zur Information der Verbraucher über wissenschaftlich gesicherte Wirkungen werden Health Claims (gesundheitsbezogene Aussagen) formuliert, die in den USA und in Japan einer staatlichen Zulassung bedürfen. Ein in den USA zugelassener Health Claim lautet: Eine natriumarme Ernährung kann das Risiko an Bluthochdruck zu erkranken reduzieren¹⁰. In der EU steht eine einheitliche Regelung noch aus. Im EU-Projekt PASSCLAIM¹¹ wurden mögliche Health Claims erarbeitet und 2003 ein Regelungsvorschlag erlassen, dessen Beratung 2004 jedoch wieder ausgesetzt wurde¹². In Deutschland sind krankheitsbezogene Aussagen verboten, zusätzlich gilt das allgemeine Irreführungsverbot (LMBG §§ 18 und 17).

Die Wirkung funktioneller Lebensmittel beruht u. a. auf dem Vorhandensein von bioaktiven Substanzen, die als originäre, bei der Lebensmittelherstellung freigesetzte oder gebildete Komponenten definiert sind, die – über eine mögliche nutritive Bedeutung hinaus – gewünschte, regulatorische Wirkungen im menschlichen Organismus entfalten. Zur Identifizierung und Charakterisierung bioaktiver Substanzen werden ebenso geeignete Methoden benötigt, wie zur nachfolgenden Untersuchung ihres Verhaltens in einer Matrix (technofunktionelle Eigenschaften) bzw. zur Lebensmittelkontrolle im Verlauf des Produktionsprozesses (Qualitätsmonitoring). In diesem Zusammenhang haben sich zellchemische Methoden unter

⁷ Playne, M. J., 2003

⁸ Deutsches Arzneimittel Gesetz: „Arzneimittel ... sind Stoffe, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen Körper Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen...“, Großklaus, R., 2000

⁹ Vgl. Schmidl, M. K., 1993

¹⁰ Eckstein, L. M. & Bruhn, M., 2003

¹¹ PASSCLAIM: Process for the Assessment of Scientific support for Claims on foods, Asp, N.-G. et al., 2003

¹² N. N., 2003 & 2004

Einsatz von Humanzellkultur-Modellsystemen (*in vitro*) als geeignet erwiesen. Zusätzlich ist die bioaktive Wirkung des verzehrten Lebensmittels in Humanstudien nachzuweisen. Dazu ist es notwendig, aussagekräftige Indikatoren oder Biomarker für einen gewünschten Effekt (*in vivo*) zu identifizieren und geeignete Nachweismethoden zu entwickeln¹³.

2.1 Proteine und Peptide aus Lebensmitteln

Proteine sind unverzweigten Aminosäurenketten (Primärstruktur), die eine Sekundär-, Tertiär- und z. T. Quartärstruktur ausbilden (s. 2.2.4.3). Da das Rückgrat (--N-C_α-C-N-C_α-C--) der Ketten immer gleich ist, wird die Individualität der Proteine durch die Seitenketten der gebundenen Aminosäuren bestimmt. Es wird zwischen Oligo-, Polypeptiden und Proteinen unterschieden, die eine Kettenlänge von bis zu 10, 100 und mehr Aminosäuren aufweisen und unter Verwendung griechischer Zahlen benannt werden (Di-, Tri-, Tetrapeptid u.s.w.). Entsprechend einer internationalen Nomenklatur erfolgt die Darstellung der Proteine durch Angabe der Aminosäurenbezeichnung (s. Tabelle 2-17), wobei die amino- (carboxy-) terminalen Aminosäuren jeweils links (rechts) stehen.

In Lebensmitteln pflanzlichen, tierischen und mikrobiellen Ursprungs ist eine Vielzahl an Proteinen vorhanden, die u. a. mit Kohlenhydraten, Lipiden, Porphyrinen, Nucleotiden oder Phosphat verknüpft sind. In der Lebensmittelverarbeitung werden verschiedene technologische (u. a. Schaum-, Gel-, Emulsion-, Teigbildung und Stabilisierung) und sensorische (u. a. neutraler, bitterer, selten auch süßer Geschmack) Eigenschaften der Proteine genutzt. Die Beurteilung der nutritiven Bedeutung der Proteine erfolgt u. a. durch Berechnung der biologischen Wertigkeit (BW)¹⁴, die durch den Gehalt an essentiellen Aminosäuren und deren Verhältnis zueinander bestimmt wird. Diesbezüglich wurden limitierende Aminosäuren identifiziert, z. B. Lysin (Getreide u. a. pflanzliche Proteine), Methionin (Kuhmilch und Fleisch), Threonin (Weizen, Roggen) und Tryptophan (Casein, Mais, Reis), deren Defizit durch gezielte Kombination verschiedenartiger Lebensmittel oder Substitution ausgeglichen werden kann. Daneben existieren weitere Kriterien zur Beurteilung von Proteinen¹⁵, deren Qualität u. a. durch die Bioverfügbarkeit bestimmt wird. Diese ist insbesondere abhängig von der Verdaulichkeit (tierische > pflanzliche Proteine) und Resorption der Proteinbestandteile¹⁶. Die Proteinqualität der Lebensmittel wird u. a. durch enthaltene Proteine mit unerwünschten physiologischen Wirkungen (u. a. Inhibitoren von Verdauungsenzymen, mineralienbindende Phytate oder Toxine) oder durch die Lebensmittelverarbeitung (z. B. durch die Prozessführung: Temperatur, pH, Anwesenheit von O₂, Lagerung) teilweise negativ beeinflusst (z. B.

¹³ Diplock, A. et al., 1999, Meisel, M., 2001

¹⁴ Die Biologische Wertigkeit gibt an, wie viel Gramm Körperprotein durch die Aufnahme von 100 g Nahrungsprotein gebildet wird.

¹⁵ Friedmann, M., 1996

¹⁶ Kies, C., 1981

durch Bildung von Maillard-Produkten). Die Verdaulichkeit von Proteinen aus Leguminosen, kann beispielsweise durch Entfernung antinutritiver Faktoren (u. a. Lectine, Tannine, Trypsin-Inhibitoren) deutlich erhöht werden¹⁷.

Innerhalb der letzten 30 Jahre wurden bioaktive Peptide identifiziert, die latent („versteckt“) in der Primärstruktur verschiedener Nahrungsproteine (insbesondere der Milch¹⁸) vorhanden sind und sich als potenzielle Ingredienzien funktioneller Lebensmittel eignen. Vor dem Einsatz in Lebensmitteln ist es notwendig, die Bioverfügbarkeit und mögliche, unerwünschte bioaktive Effekte (u. a. Toxizität, Allergenität, Kanzerogenität) sowie technofunktionelle Eigenschaften zu ermitteln. Zur Entfaltung der erwünschten physiologischen Wirkungen (*in vivo*) ist es notwendig, dass die bioaktiven (Vorläufer-) Peptide das jeweilige Zielgewebe (u. a. Darm, Gefäßendothel, Nieren, Gehirn) intakt erreichen, sich somit als Hydrolyse-resistent gegenüber Verdauungs-, Plasma- und Leberenzymen erweisen und durch die intestinale Barriere transportiert werden (s. 2.2.4). Erreichen Vorläuferpeptide das Zielgewebe, so muss dort ihre Aktivierung durch gezielte Hydrolyse stattfinden.

Bioaktive Peptide, die sich nachweislich zum Einsatz in funktionellen Lebensmittel eignen, bieten die Möglichkeit für ein neues Bewertungsschema der Proteinqualität, u. a. von Gelatine (s. 2.1.2).

2.1.1 Proteine und bioaktive Peptide aus Milch

Als Milch wird das Gemelk einer Kuh bzw. mehrerer Kühe bezeichnet. Die Unterscheidung von Milchen anderer Säuger erfolgt durch spezielle Kennzeichnung, z. B. Humanmilch. Milch enthält ca. 87 % Wasser, 3,8 % Fett, 3,3 % Protein, 4,7 % Lactose und 0,7 % Asche sowie verschiedene minore Komponenten. Die nutritive Bedeutung der Milch wird insbesondere dadurch hervorgehoben, dass Milch (Kolostrum und reife Milch) in den ersten Lebensmonaten für neugeborene Säuger jeder Spezies als alleiniges Nahrungsmittel für eine optimale Entwicklung ausreicht. Außerdem sind die speziellen physiologischen Wirkungen zu beachten, die verschiedene Milchkomponenten nachweislich bewirken (s. Tabelle 2-1). Des Weiteren wurden innerhalb der letzten 10 Jahre verschiedene milchbasierte funktionelle Lebensmittel entwickelt und auf den Markt gebracht. Dazu gehören Prebiotika, die unverdauliche Ingredienzien (z. B. Galacto-Oligosaccharide, Lactulose) zur Wachstumsförderung von Bifidobakterien enthalten und Probiotika, die spezielle mikrobielle Präparationen integrieren, z. B. Yakult (*L. casei Shirota strain*), Actimel (*L. casei Imunitas*) oder LC1 (*L. johnsonii La 1*). Probiotika beeinflussen die intestinale Mikroflora günstig, fördern die Darmgesundheit, unterstützen das Immunsystem, schützen vor Nahrungsmittelallergien,

¹⁷ Rubio, L. A. & Seiquer, I., 2000

¹⁸ Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003, Meisel, H., 2001, Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2000, FitzGerald, R. J. & Meisel, H., 2000, Meisel, H. & Bockelmann, 1999, Meisel, H., 1997

senken den Plasma-Cholesterinspiegel oder normalisieren eine Hyperproliferation der Kolonschleimhaut (antikanzerogene Wirkung von *L. acidophilus*, *L. bifidum*). Symbiotika enthalten eine Kombination aus unverdaulichen Ingredienzien und probiotischen Spezies¹⁹.

2.1.1.1 Herstellung und Verfügbarkeit

Das Milchprotein besteht aus Casein (α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ -Casein) und Molkenprotein (Albumine und Globuline), zwei majoren Bestandteilen, die im Verhältnis 80 zu 20 vorliegen, und verschiedenen minoren Proteinen (u. a. Lactoferrin, Transferrin, Peptidhormone, Enzyme). Die Fraktionierung und Isolierung der einzelnen Milchproteine erfolgt durch verschiedene Fällungs- und Gerinnungsarten, Filtrationstechniken sowie elektrophoretische und chromatographische Verfahren im Labor- wie industriellen Maßstab. Die Trennung der majoren Peptide ist u. a. durch Säure und Labenzym (Käserei) möglich, dabei entstehen Caseine und Molke. Eine Reduzierung des Salzgehaltes und Konzentrierung des Proteins der Molke erfolgt zumeist durch Ultrafiltration, wobei Molkenproteinkonzentrate (35 – 85 %, z. B. WPC 75: whey protein concentrate) oder –isolate (> 90 %) entstehen. Zur Gewinnung der Albuminfraktion (α - und β -Lactoglobulin, Serumalbumin) aus Molke wird eine thermische Denaturierung durchgeführt und anschließend erfolgt eine Trennung der einzelnen Fraktionen entsprechend ihrer Molekülgröße durch Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration)²⁰.

Die Herstellung bioaktiver Peptide aus Milchprotein (Casein, Molkenprotein, -fraktionen) wird mit verschiedenen Verfahren durchgeführt:

- (1) Isolierung durch enzymatische Verdauung (*in vitro*) oder
- (2) gastrointestinale Verdauung (*in vitro*, *in vivo*) des Vorläuferproteins,
- (3) chemische Synthese bekannter bioaktiver Peptide sowie neuerdings
- (4) Biosynthese durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen²¹.

Die Gewinnung der bioaktiven Peptide (Hydrolysate) aus einem Vorläuferprotein erfolgte in den verschiedenen Studien durch Partialhydrolyse mit gereinigten Pankreasenzymen (Trypsin und Chymotrypsin), Pepsin, Thermolysin, und Prolin-spezifischen Endopeptidasen. Außerdem werden gereinigte Enzyme aus Bakterien, Pilzen, Hefen (u. a. Protease B aus *Saccharomyces cerevisiae*²²), Pflanzen und verschiedenen Tierarten eingesetzt. Zur Charakterisierung der Hydrolysate wurden der Hydrolysegrad und das Molekulargewicht des enthaltenen Peptidgemisches herangezogen²³. Da die bioaktiven Peptide zumeist in der niedermolekularen Fraktion enthalten waren, erfolgte ihre Anreicherung durch chromatographische Verfahren oder Ultrafiltration (zumeist 5, 3, bzw. 1 kD Membranen). Diese

¹⁹ Playne, M. J. et al., 2003, Unger, S., 1999, Mattila-Sandholm, T. et al., 1999

²⁰ Schlimme, E. & Buchheim, W., 1995

²¹ Oh, K.-S. et al., 2002

²² Roy, M. K. et al., 2000

²³ Davis, L., 2003

Herstellungsverfahren wurden für den Labor- und Industriemaßstab optimiert und eingesetzt, unter Berücksichtigung der Good Manufacturing Practice²⁴. Aufgrund der Hydrolyse wurden die technofunktionellen²⁵ und sensorischen Eigenschaften moduliert, wobei die Entstehung von Bitterpeptiden ein bedeutendes Problem bei der Entwicklung funktioneller Lebensmittel darstellt. Bei gentechnischen Herstellungsmethoden ist das Konzept der „substantiellen Äquivalenz“ zu beachten und ein entsprechender Nachweis zu führen²⁶.

2.1.1.2 Bioaktivität

Aus verschiedenen Milchproteinen wurden Peptide mit antihypertensiver (Blutdruck-senkender), antithrombotischer, opioider, zyto- bzw. immunmodulierender oder antibakterieller Aktivität sowie mineralbindende Peptide identifiziert (s. Tabelle 2-2) und durch enzymatische Hydrolyse (*ex* und *in vivo*) in unterschiedlichen Mengen freigesetzt. Bei diesem Vorgehen wurden in der Primärstruktur vom Casein Regionen mit überlappenden Peptidsequenzen identifiziert, die für Peptide mit unterschiedlicher bioaktiver Wirkung stehen. Diese Regionen wurden als „strategische Zonen“ bezeichnet, da sie hochgradig resistent vor proteolytischer Spaltung waren, insbesondere beim Vorhandensein von Prolin²⁷. Außerdem wurden multifunktionelle Peptide identifiziert, die verschiedene bioaktive Wirkungen (*in vitro*) entfalten.

Tabelle 2-2: Auswahl bioaktiver Peptide aus Milchproteinen

(Eigene Darstellung nach SCHLIMME & BUCHHEIM bzw. MEISEL²⁸)

Bioaktive Peptide	Milchproteine	Ausbeute [mg] [#]	Bioaktivitäten
Caso-, Lactokinine	α_S -, β -Casein, α -, β -Lactoglobulin	30 41	antihypertensiv
Lactoferricine, Casocidin, Kappacin	α -, β -Lactoferrin, α -Casein, κ -Casein	n. d.	antimikrobiell
Casoplateline	α_S -, β -Casein	40	antithrombotisch
Caseino- und Lactimmunopeptide	α_S -, β -Casein, α -Lactoglobulin	17	immunmodulierend
Caseinophosphopeptide	α -, β -, κ -Casein	109	mineralbindend
Casomorphine	α_S -, β -Casein	32	
Lactorphine	α -, β -Lactoglobulin	11	opioide
Serorphin	Serumalbumin	11	
Casoxine	κ -Casein	50	

[#] Berechnete Ausbeute aus 1 g Molkenprotein bzw. Casein; n. d. nicht detektiert.

Bioaktive Peptide wurden außerdem während der Fermentation von Milchen (pasteurisierte, ultrahoherhitze, rekonstituierte oder standardisierte Milchen verschiedener Fettgehalte) mit unterschiedlichen Bakterienspezies (s. Tabelle 2-3) freigesetzt. Die Ausbeute antihyper-

²⁴ Walsh, D. J. et al. 2004, Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003, DeSilva, K. et al., 2003, Korhonen, H. & Pihlanto, A., 2003

²⁵ Vgl. Gauthier, S. F. et al., 1993, Zahur, U. H., 1993

²⁶ Frenzel, Th. et al., 2002

²⁷ Adibi, S. A. & Kim, Y. S. 1981

²⁸ Schlimme, E. & Buchheim, W., 1995, Meisel, H., 2000

tensiver Peptide wurde durch Anreicherung der Milchen mit Casein²⁹ sowie durch Optimierung der Prozessbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Kulturdauer etc.) erhöht³⁰. Die antihypertensive Wirkung (*ex* und *in vivo*) war während der Lagerung der Milchprodukte sowie nach simulierter gastrointestinaler Verdauung größtenteils stabil. Die traditionell zur Yoghurtherstellung eingesetzten *Lactobacillus* Subspezies (Starterkulturen) hydrolysierten das Milchprotein derart, dass zunächst keine oder nur wenige antihypertensive Peptide entstanden, die jedoch bei nachfolgender simulierter gastrointestinaler Verdauung freigesetzt wurden³¹. Diese Starterkulturen wiesen eine hohe Aktivität der X-Pro-Dipeptidylaminopeptidase auf, wodurch die Freisetzung intakter Casomorphine (opioide Peptide) verhindert wurde. Dem wurde durch gezielte Prozessführung (niedriger pH-Bereich, hohe Salzkonzentration) begegnet³².

Tabelle 2-3: Bioaktivitäten verschiedener Peptidfragmente, die durch enzymatische Hydrolyse unterschiedlicher Bakterienkulturen aus Milchprotein freigesetzt wurden.

(Eigene Darstellung nach MEISEL & BOCKELMANN; FITZGERALD & MEISEL BZW. ROKKA ET AL.³³)

Bakterienspezies	Vorläuferproteine (Fragment f)	Bioaktivitäten
<i>Lactobacillus (Lb.)</i> ssp. # („Nicht-Starterkulturen)	β-Casein (f 60-68)	opioide
<i>Lactococcus lactis</i>	β-Casein (f 190 – 193)	immunstimulierend
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp.	β-Casein (f 6 – 14), (f 73 - 82)	antihypertensiv
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. ³⁴	β-Casein (f 47 – 52), κ-Casein (f 155 – 60)	antihypertensiv
<i>Lb. helveticus</i> CP 790 (+ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	β-Casein (f 84 – 86) β-Casein (f 74 – 76)	antihypertensiv
<i>Lb. helveticus</i> ##	κ-Casein (f 108 – 110) β-Casein (f 169 – 175)	antihypertensiv
<i>Lb. helveticus</i> ssp. (u. a. CPN 4) ³⁵	α _{s1} -Casein (f 146 – 147), (f 159 – 160) β-Casein (f 114 – 115) κ-Casein (f 58 – 59)	antihypertensiv
<i>Lb. casei</i> ssp.	β-Casein (f 177 – 183) β-Casein (f 193 – 202) β-Casein (f 60 – 63), (f 60 – 70), (f 90 – 96), α-Lactalbumin (f 50 – 53)	antihypertensiv opioide
<i>Lactococcus</i> ssp.	α _{s1} -Casein (f 23 – 34) α _{s1} -Casein (f 23 – 27) α _{s1} -Casein (f 194 – 199)	antihypertensiv

Ssp: Subspezies, ## extrazelluläre Proteasen.

Da innerhalb dieser Arbeit Studien mit antihypertensiven Milchproteinhydrolysaten durchgeführt wurden, wird auf dieses Unterthema ausführlich eingegangen. Die Informationen über die bioaktive Milchpeptide entstammen (wenn nicht anders angegeben) sieben Reviews³⁶.

²⁹ Leclerc, P.-L et al., 2002

³⁰ Ashar, M. & Chand, R., 2003

³¹ Pihlanto-Leppälä, A. et al., 1998

³² Meisel, H. & Bockelmann, W. 1999

³³ Meisel, H. & Bockelmann, 1999, FitzGerald, R. J. & Meisel, H., 2000, Rokka, T. et al., 1997

³⁴ Gobbetti, M. et al., 2000

³⁵ Yamamoto, N. et al., 1999

³⁶ Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003, Meisel, H., 2001, FitzGerald, R. J. & Meisel, H., 2000,

Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2000, Meisel, H. & Bockelmann, W., 1999, Meisel, H., 1998, Meisel, H., 1997

2.1.1.2.1 Antihypertensive Peptide

Die Identifizierung antihypertensiver (Blutdruck-senkender) Peptide erfolgt vorwiegend durch Untersuchung der *in vitro* Wirkung auf das Angiotensin-Umwandlungs-(Converting) Enzym (ACE), so dass die Begriffe antihypertensive bzw. ACE-inhibitorische Peptide häufig synonym eingesetzt werden. Dies ist allerdings nicht korrekt, da der Blutdruck sehr komplex reguliert ist. Beispielsweise wurden *in vivo* Blutdruck-senkende Wirkungen nach oraler Zufuhr von γ -Aminobutyrat³⁷ aus Milch (Humanstudie) bzw. mit Ovokinin (2-7)³⁸ aus Eialbumin (Tierstudie) nachgewiesen, jedoch zeigten beide Substanzen keine *in vitro* ACE-inhibitorische Wirkung.

Bluthochdruck (Hypertension) ist ein gut kontrollierbarer Risikofaktor verschiedener cardio-vaskulärer Erkrankungen, z. B. Myokardinfarkt, Schlaganfall, Arteriosklerose. Allerdings werden die derzeitigen Therapiekonzepte zur Reduzierung des Blutdrucks als unzureichend eingestuft, da diese das Risiko für diese multifaktoriellen Erkrankungen nicht nachhaltig senken³⁹. Das Risiko steigt ab einem Blutdruck über 115 zu 75 mm Hg an, deshalb wurde im 7. Joint National Committee Report eine strengere Bewertung des Blutdrucks von Erwachsenen vorgenommen als 1997 und eine neue Klassifizierung aufgestellt (s. Tabelle 2-4).

Tabelle 2-4: Klassifizierung des Blut(hoch)drucks (Hypertonie) von Erwachsenen⁴⁰

Kategorie	Blutdruck [mm Hg]	
	Systole	Diastole
Normal	120	80
Milde Hypertonie	121 – 139	81 – 90
Hypertonie Stadium I	140 – 159	91 – 99
Hypertonie Stadium II	> 159	> 99

Eine sekundäre Hypertonie (10 %) basiert auf organischen Schäden, u. a. der Nieren. Die Ätiopathogenese der essentiellen Hypertonie (90 %) ist hingegen noch weitgehend unklar. Die Hypertonie wird zu den multifaktoriellen Erkrankungen gezählt. Es gilt als gesichert, dass verschiedene Ernährungsfaktoren einen entscheidenden Einfluss ausüben, u. a. kalorische Überernährung (Übergewicht und Adipositas), eine zu hohe Aufnahme an Kochsalz (gilt nur für „salz-sensitive“ Personen), Cholesterin, Alkohol und/oder eine zu geringe Zufuhr an Kalium, Calcium, (Magnesium), Vitamin D, bioaktiven Peptiden (insbesondere aus der Milch) oder ungesättigten Fettsäuren. Infolge der Ergebnisse der DASH-Studie (Dietary approaches to stopp hypertension) wird zum Schutz vor Bluthochdruck bzw. zur moderaten Reduzierung von diesem (um ca. 5,5/3,0 mmHg) eine Ernährung empfohlen, die reich ist an Milch, -produkten, Obst und Gemüse⁴¹. Außerdem wird ein langfristiges, moderates körperliches Training zur Blutdrucknormalisierung empfohlen⁴².

³⁷ Inoue, K. et al., 2003

³⁸ Yamada, Y. et al., 2002

³⁹ Hollenberg, N. K., 1990

⁴⁰ National Heart, Lung, and Blood Institute, 2003

⁴¹ Groziak, S. M. & Miller, G. D., 2000, McCarron, D. A., 1998

⁴² Krönig, B., 2004

Endogene, Blutdruck-regulierende Peptide

Der Blutdruck wird durch verschiedene Enzymsysteme und das neuroendokrine System (u. a. durch Endorphine, Mineralokortikoide, Vasopressin, Atriumpeptid) komplex reguliert (s. Abbildung 2-1). Die wirksamen Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings ist bekannt, dass das Renin-Angiotensin-System dabei eine Schlüsselrolle übernimmt. Die Endopeptidase Renin (EC 3.4.23.15) wird Aldosteron-abhängig aus juxtaglomerulären Nierenzellen ins Blutplasma sezerniert und spaltet Angiotensinogen, ein aus der Leber stammendes Glykopeptid der α_2 -Globulinfraktion. Das dadurch entstehende Decapeptid Angiotensin I (DRVYIHPFHL) ist ein Substrat der Dipeptidyl-Carboxypeptidase ACE (EC 3.4.15.1) und der Chymase (EC 3.4.21.39) und wird durch diese in ein Dipeptid und Angiotensin II gespalten. Dieses Octapeptid interagiert mit verschiedenen Rezeptoren (AT_1 , AT_2 bzw. R_E), wodurch es seine vasokonstriktorische (Blutdruck-erhöhende) Wirkung entfaltet. Diese ist langanhaltend, da Angiotensinogen II die Proliferation glatter Muskelzellen und die Biosynthese von Elastin und Fibrin stimuliert und dadurch die Presskraft der Gefäßwand erhöht. Zusätzlich aktiviert es über Thrombin die Blutgerinnungskaskade und begünstigt dadurch Veränderungen der Gefäßwände (Arteriosklerose). Angiotensin II interagiert außerdem mit einem weiteren in der Gefäßwand lokalisierten Rezeptor (R_E), wodurch Endothelin Converting Enzym (ECE, EC 3.4.24.71) aktiviert und der potente Vasokonstriktor Endothelin-I gebildet wird. Dieser ist ein Substrat der Nitritoxid-Synthase (NOS, EC 1.14.13.39). Angiotensin II hingegen wird durch die Angiotensinasen A (EC 3.4.11.7) und N (EC 3.4.11.2) hydrolysiert und inaktiviert.

Im Blutplasma werden außerdem Vasodilatoren gebildet, indem Kallikreine das Kininogen (Glykopeptid der α_2 -Globulinfraktion aus der Leber) spalten, wodurch Kallidine entstehen. Diese interagieren über Rezeptoren (B_1 , B_2) mit unterschiedlichen Zelltypen (u. a. Endothel-, glatten Muskel-, Nerven-, Immun-, Instestinalzellen), wodurch verschiedene Zytokine, u. a. Prostaglandine, freigesetzt werden⁴³. In Humanstudien wurde eine bedeutende Blutdruck-regulierende Rolle des vasodilatorischen Bradykinins nachgewiesen. Dieses moduliert außerdem Membranpermeabilitäten (auch im Darm) und stimuliert durch Aktivierung der Nitritoxid-Synthase (NOS, EC 1.14.13.39) das Nerven- und Immunsystem⁴⁴. Außerdem induziert Bradykinin die Proliferation von Prostatatumorzellen⁴⁵.

⁴³ Prado, G. N. et al., 2002, Regoli, D. et al., 1994

⁴⁴ Gainer, J. V. et al., 2003, Eriksson, U. et al., 2002, Moskowitz, D. W., 2002

⁴⁵ Barki-Harrington, L. & Daaka, Y., 2001

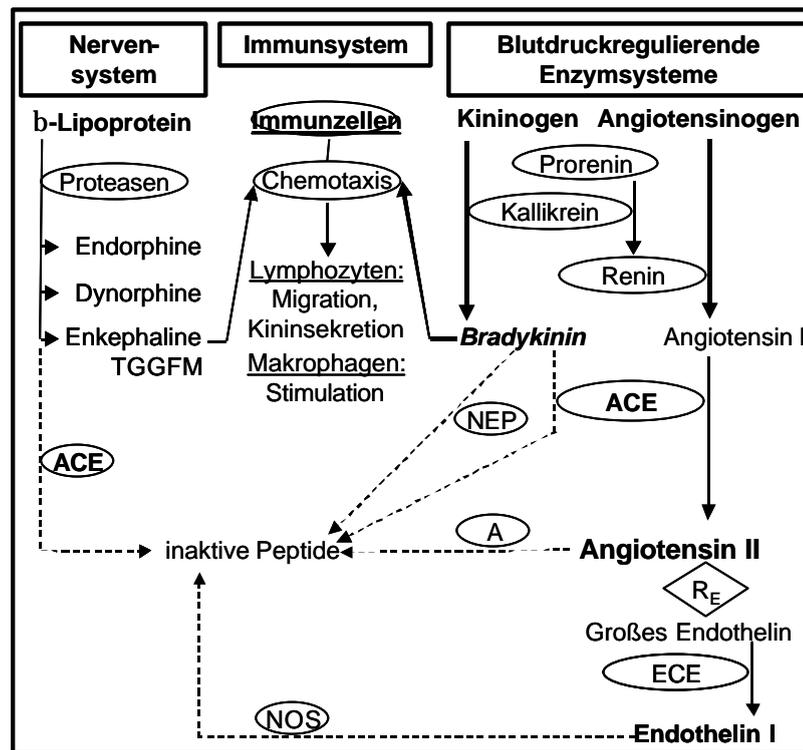


Abbildung 2-1: Die Blutdruck-regulierenden Enzymsysteme und ihre Quervernetzung mit dem Neuroendokrinen- und Immunsystem

Die Bildung der potenten **Vasokonstriktoren** Angiotensin II und Endothelin I sowie der Abbau des **vasodilatatorischen** Bradykinins und verschiedener Neurotransmitter mit endogener opiaten Wirkung (u. a. Enkephaline) wird durch Hemmung des Schlüsselenzyms ACE unterbunden, wodurch der Blutdruck gesenkt und gleichzeitig das Immunsystem stimuliert wird. Weitere Erklärungen s. Text. (Darstellung modifiziert nach MEISEL⁴⁶ unter Einbeziehung von^{43, 44, 45, 48}.)

In der nachfolgenden Abbildung 2-2 ist das komplexe System der Synthese und Wirkung verschiedener Angiotensine dargestellt. Aus Angiotensinogen werden insbesondere die beiden Vasokonstriktoren Angiotensin II und III gebildet, die beide eine hohe Affinität für die Rezeptoren AT₁ (u. a. im Endothel, glatter Muskulatur, Nieren, Gehirn) und AT₂ (in fetalem Gewebe) aufweisen und durch Bindung an diese vor der enzymatischen Spaltung geschützt werden⁴⁷. Die Angiotensinhydrolyse erfolgt durch Angiotensinasen A und N (EC 3.4.11.7 und EC 3.4.11.2), dabei entsteht Angiotensin IV, welches mit dem Rezeptor AT₄ interagiert und dadurch u. a. den Mineralstoff- und Wasserhaushalt sowie das Blutvolumen reguliert.

⁴⁶ Meisel, H., 1997

⁴⁷ Rose, J. M. & Audus, K., 1998

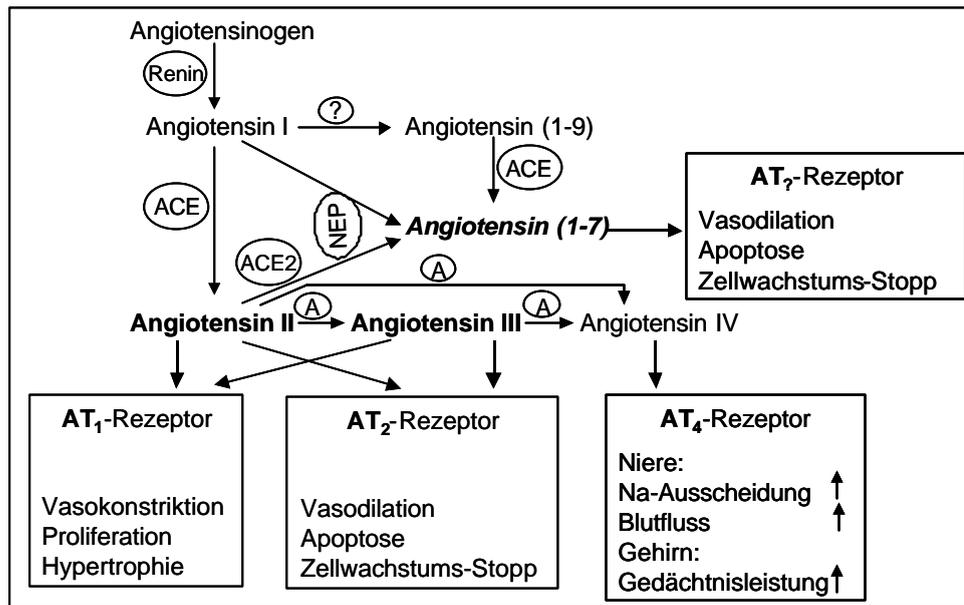


Abbildung 2-2: Bioaktive Abbauprodukte des Angiotensinogen und deren Rezeptoren

(Eigene Darstellung, Quellenangaben s. Text.)

Die Angiotensine I und II werden durch verschiedene Enzyme, u. a. ACE, ACE2 oder Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11), zum vasodilatatorischen Angiotensin (1-7) gespalten. Es wird vermutet, dass auch für dieses Peptid ein Rezeptor (AT_7) zur Wirkungsentfaltung existiert. Diese endogenen bioaktiven Peptide werden nachfolgend durch verschiedene Enzymsysteme gespalten (s. Tabelle 2-5). Allerdings entstehen dabei nicht ausschließlich inaktive Peptide, wie zunächst angenommen wurde⁴⁸.

Tabelle 2-5: Wirkung und Rezeptorbindung von Angiotensin II (DRVYIHPF) und dessen Spaltprodukten, die in Humanserum nachgewiesen wurden.

(Eigene Darstellung nach MATSUI⁴⁸).

Angiotensin (Ang) II und Spaltprodukte	Aminosäuren-Sequenzen ^A	ACE-Inhibitor: Ja (+) / Nein (-)	IC ₅₀ ^B [μmol/L]	Bindung an Rezeptor	
Ang II	Ang (1-8)	DRVYIHPF	+	n. d.	AT ₁ und AT ₂
	Ang (1-7)	DRVYIHP	-	-	?
Ang III	Ang (2-8)	RVYIHPF	+	n. d.	AT ₁ und AT ₂
	Ang (2-4)	RVY	-	-	?
	Ang (3-4)	VY ⁴⁸	+	26,0	?
Ang IV	Ang (3-8)	VYIHPF ⁴⁸	+	6,6	AT ₄ ; AT ₁ -Blocker
	Ang (5-8)	IHPF ⁴⁸	+	11,6	?

^A Angabe der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. ^B IC₅₀, Peptid-Konzentration, die eine 50 %-ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. ? Rezeptorbindung noch unbekannt. - Keine *in vitro* ACE-inhibitorische Wirkung. Abkürzung: Ang. Angiotensin, n.d.: nicht detektiert.

MATSUI ET AL.⁴⁸ identifizierten in humanem Blutplasma die ACE-inhibitorischen (*in vitro*) Spaltprodukte Angiotensin (3-4) und (5-8). Die Inaktivierung dieser Peptide erfolgte durch

⁴⁸ Matsui, T. et al., 1999

Angiotensinasen, deren Aktivität im Blut von Normotonikern höher war als in dem von Hypertonikern⁴⁸.

LE ET AL.⁴⁹ untersuchten die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung der verschiedenen Angiotensin-Rezeptoren führten, und zeigten auf, dass die Aminosäuren R², Y⁴ und F⁸ zur Bindung an den Rezeptor AT₁ unerlässlich sind⁴⁹.

Angiotensin-Converting- (Umwandlungs-) Enzym

Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) ist aufgrund seiner breiten Substratspezifität das Schlüsselenzym der Blutdruckregulierung. Zu den endogenen Substraten gehören Angiotensin I und II (Vasokonstriktoren), Bradykinin (Vasodilator), verschiedene Neurotransmitter (Substanz P: stimuliert Kontraktion glatter Muskelzellen im Darm oder immunstimulierende, schmerzhemmende Enkephaline), Hormone (Neurotensin oder Insulin) sowie chemotaktische Peptide.

Es werden insgesamt 3 verschiedene Formen dieser chloridabhängigen Zn²⁺-Metallo-carboxypeptidase unterschieden: Keimzell- oder Testis-ACE, ACE 2 und das (somatische) ACE. Die Aktivität dieser Enzymformen wird determiniert durch genetische Polymorphismen⁵⁰ und ist in Probanden mit kardiovaskulären Erkrankungen im Vergleich zu Gesunden erhöht⁵¹.

Das ACE-Gen (MG 170 kD) ist auf Chromosom 17 lokalisiert. ACE wird im Gefäßendothel exprimiert sowie in verschiedenen Organen (u. a. in/m Gehirn, Darm, Herz, Lunge, Nieren, Skelettmuskel, Pankreas, Plazenta). ACE ist eine transmembrane Ektopeptidase mit zwei extrazellulären aktiven Zentren (N- und C-Domäne), die jeweils unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Dies impliziert die Möglichkeit, dass Inhibitoren existieren, die nur an eines der beiden aktiven Zentren binden. Der Bindungsmechanismus, welcher der oben genannten breiten Substratspezifität zu Grunde liegt, ist noch weitgehend unbekannt. Struktur-Aktivitätsbeziehungen zwischen verschiedenen ACE-Inhibitoren weisen darauf hin, dass Substrate oder kompetitive Inhibitoren vom Enzym bevorzugt werden, wenn diese C-terminal 3 hydrophobe Aminosäurenreste aufweisen⁵². In Studien mit Dipeptiden wurde die stärkste ACE-Substratbindung mit C-terminalen Tryptophan-, Tyrosin-, Phenylalanin- oder Prolinresten ermittelt. Einige ACE-inhibitorische Peptide aus Milchprotein weisen an dieser Position jedoch Lysin oder Arginin auf. Vermutlich begünstigt die positive Ladung der Guanidino- bzw. ε-Aminogruppen der Aminosäureseitenketten die Substrat-Enzym-

⁴⁹ Le, M. T. et al., 2002

⁵⁰ Ono, Y. et al., 2000, Kawamoto, R. et al., 2002

⁵¹ Johnston, C. I., 1992, Johnston, C. I. & Burrell, L. M., 1995, Kawamoto, R. et al., 2002, Eriksson, U. et al., 2002

⁵² Cheung, H.-S. et al., 1980

Bindung⁵³. Andere ACE-inhibitorische Peptide weisen einen C-terminalen Glycyl-Rest auf, der möglicherweise mit dem Zink-Kation einen Chelatkomplex bildet⁵⁴.

Der Nachweis (*in vitro*) der ACE-Aktivität erfolgt durch Spektrophotometrie, Fluorometrie und/oder HPLC-Analyse sowie unter Einsatz von ACE unterschiedlicher Herkunft, z. B. von Kaninchen, Ratte, Rind, Schwein, Affe. Aufgrund dessen wurden mit identischen Substraten unterschiedliche Ergebnisse generiert, so dass eine Standardisierung der Methodendurchführung wünschenswert erscheint⁵⁵. Die Enzymaktivität wird durch Angabe der Materialkonzentration, die 50 % Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt (IC₅₀-Wert) gekennzeichnet. MEISEL entwickelte auf der Grundlage eines künstlichen neuronalen Netzwerks und unter Einsatz bekannter IC₅₀-Werte von ACE-inhibitorischen Dipeptiden eine neue Strategie zur schnellen und erfolgreichen Identifizierung potenter ACE-inhibitorischer Peptidsequenzen⁵⁶. Daneben existiert eine Datenbank, die die Primärstruktur verschiedener Proteine enthält und die schnelle Identifizierung bekannter, bioaktiver Strukturen aus verschiedenen Proteinen (unter Berücksichtigung genetischer Varianten) ermöglicht⁵⁷. In dieser Weise identifizierte bioaktive Peptide stehen nachfolgend durch chemische Synthese zur Verfügung sowie durch gezielte enzymatische Hydrolyse aus dem Primärprotein. Dabei zeigte sich allerdings, dass nicht jede theoretisch denkbare Peptidspaltung stattfindet⁵⁸.

Zur Regulation/Therapie einer Hypertonie werden verschiedene pharmakologische ACE-Inhibitoren (u. a. Captopril: IC₅₀: 0,006 bis 0,023 µmol/L⁵⁹, Benazepril, Enalapril, Lisinopril) eingesetzt. Diese Medikamente werden intestinal resorbiert⁶⁰ und weisen ernstzunehmende Nebenwirkungen auf, u. a. Nierenfunktionsstörungen, Gefäßödeme, Husten, fötale Missbildungen sowie zu starke Blutdrucksenkung bei Überdosierung. Andere Therapieformen sind die Blockierung spezifischer α- bzw. β-Rezeptoren (z. B. AT₁, Saralasin oder Losartan⁶¹), natriuretische Medikamente, Antagonisten der Calciumkanäle oder des Endothelins oder spezifische Hemmung weiterer Enzyme (z. B. der Inhibitoren der Angiotensinasen⁶²). Neuerdings existieren Inhibitoren der Vasopeptidase (z. B. Omapatrilat, Fasidotril), das bedeutet, diese Substanzen hemmen ACE und NEP gleichzeitig⁶³.

⁵³ FitzGerald, R. J. & Meisel, H., 2000

⁵⁴ Wie, et al., 1992

⁵⁵ Hernández-Ledesma, B. et al., 2003

⁵⁶ Meisel, H. et al., 2005

⁵⁷ Dziuba, J. et al., 1999

⁵⁸ Maruyama, S. et al., 1989, Dziuba, J. et al., 1999

⁵⁹ Tauzin, J. et al., 2002

⁶⁰ Swaan, P. et al., 1995

⁶¹ FitzGerald, R. J. et al., 2004, Johnston, C. I. & Burrell, L. M., 1995, Mizuno, K. et al., 1994

⁶² Reaux, A. et al., 2000

⁶³ Bralet, J. & Schwartz, J.-Ch., 2001

Exogene ACE-inhibitorische Peptide

FITZGERALD UND MEISEL⁶⁴ führen ca. 50 verschiedene Caseo- und Lactokinine auf, die aus der Sequenz des Milchproteins identifiziert wurden (s. Tabelle 2-6 und Tabelle 2-7).

Tabelle 2-6: ACE-inhibitorische Peptide aus Casein⁶⁴

Vorläuferproteine (Fragment f)	Aminosäuren- Sequenzen ^A	IC ₅₀ ^B [μmol/L]	Vorläuferproteine (Fragment f)	Aminosäuren- Sequenzen ^A	IC ₅₀ ^B [μmol/L]
α_{s1}-Casein			β-Casein		
(f 1 – 9) ⁶⁵	RPKHPIKHQ	13	(f 6 – 14) ⁶⁶	LNVPGEIVE	300
(f 23 – 34)	FFVAPFPEVFGK ^{##}	77	(f 47 – 52) ⁶⁶	DKIHFP	257
(f 23 – 37)	FFVAP ^{##}	6	(f 57 – 64)	SLVLPVPE	39
(f 24 – 27)	FVAP	10	(f 60 – 66)	YFPFGPIP	500
(f 25 – 27)	VAP	2	(f 73 – 82) ⁶⁶	NIPPLTQTPV	173
(f 27 – 30)	PFPE	> 1000	(f 74 – 76)	IPP [#]	5
(f 28 – 34)	FPEVFGK	140	(f 84 – 86)	VPP [#]	9
(f 28 – 34)	FGK	160	(f 108 – 113)	EMPFPK	423
(f 104 – 109)	YKVPQL	22	(f 169 – 174)	KVLPVP	5
(f 142 – 147)	LAYFYP	65	(f 169 – 175)	KVLPVPQ	1000
(f 143 – 148)	AYFYPE	106	(f 177 – 179)	AVP	340
(f 157 – 164)	DAYPSGAW	98	(f 177 – 181)	AVPYP	80
(f 194 – 199)	TTMPLW [#]	16	(f 177 – 183)	AVPYPQR ^{##}	15
(f 197 – 199)	PLW	36	(f 179 – 181)	PYP	220
(f 198 – 199)	LW	50	(f 181 – 183)	PQR	> 400
α_{s2}-Casein⁶⁷			(f 193 – 198)	YQQPVL	280
(f 25 – 32)	NMAINPSK	60	(f 193 – 202)	YQQPVLGPVR	300
(f 81 – 89)	ALNEINQFY	219	k-Casein		
(f 81 – 91)	ALNEINQFYQK	264	(f 25 – 34)	YIPIQYVLSR	n. d.
(f 92 – 98)	FPQYLQY	14	(f 35 – 41)	YPSYGLNY	n. d.
(f 174 – 179)	FALPQY	4	(f 58 – 59)	YP	720
(f 174 – 181)	FALPQYLK	4	(f 108 – 110)	IPP	5
(f 182 – 184)	TVY	15			
(f 206 – 207)	YL	n. d. ^{####}			

^A Angabe der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. ^B IC₅₀, Peptid-Konzentration, die eine 50 %-ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. [#] Blutdrucksenkende Wirkung im Tierversuch; ^{##} Peptid unterstützt die Wirkung von Bradykinin (Tierversuch); n. d.: nicht detektiert, ^{####} s. jedoch Tabelle 2-8.

Zusätzlich wurden langkettige *in vitro* ACE-inhibitorische Peptide identifiziert, die in die Tabellen nicht aufgenommen wurden, da diese mit großer Wahrscheinlichkeit im Darm hydrolysiert werden⁶⁸. Die aufgeführten Peptide wurden durch enzymatische Hydrolyse sowie durch Synthese gewonnen. Es wurden überwiegend IC₅₀-Werte kleiner 500 μmol/L ermittelt⁶⁹,

⁶⁴ FitzGerald, R. J. & Meisel, H., 2000

⁶⁵ Saito, T. et al., 2000

⁶⁶ Gobbetti, M. et al., 2000

⁶⁷ Tauzin, J. et al., 2002

⁶⁸ Yamamoto, N. et al., 1994

⁶⁹ FitzGerald, R. J. & Meisel, H., 2000

die einem Aktivitätspotenzial entsprachen, für welches SEKIYA ET AL.⁷⁰ eine bedeutende physiologische Wirkung nach oraler Aufnahme postulierten. Diese Annahme ist in Humanstudien noch zu untersuchen und wurde in Tierstudien⁷¹ nur teilweise bestätigt. Tyr-Pro sowie Ala-Leu-Pro-Met (β -Lactosin B) wiesen *in vitro* eine relativ niedrige ACE-inhibitorische Aktivität auf (IC_{50} : 720 bzw. 928 $\mu\text{mol/L}$) und bewirkten in Ratten mit spontaner Hypertonie (SHR; *in vivo*) eine signifikante Senkung des Blutdrucks⁷².

Tabelle 2-7: ACE-inhibitorische Peptide aus Molkenprotein⁶⁴

Vorläuferproteine (Fragment f)	Aminosäuren- Sequenzen ^A	IC_{50} ^B [$\mu\text{mol/L}$]	b-Lactoglobulin (Fragment f)	Aminosäuren- Sequenzen ^A	IC_{50} ^B [$\mu\text{mol/L}$]
a-Lactoglobulin			(f 78 – 80) ⁷³	IPA	141
(f 50 – 51)	YG	1523	(f 81 – 83) ⁷³	VFK	1029
(f 50 – 52) ⁷³	YGL	409	(f 94 – 100) ⁷³	VLDTDYK	946
(f 50 – 53)	YGLF [#]	733	(f 102 – 103)	YL	122
(f 52 – 53)	LF	349	(f 102 – 105)	YLLF	172
(f 99 – 108) ⁷³	VGINYWLAHK	327	(f 104 – 105)	LF	349
(f 104 – 108) ⁷³	WLAHK	77	(f 106 – 111) ⁷³	CMENSA	788
(f 105 – 110)	LAHKAL	621	(f 142 – 145) ⁷⁴	ALPM [#]	928
Serumalbumin			(f 142 – 146) ⁷³	ALPMH	521
(f 208 – 216)	ALKAWSVAR	3	(f 142 – 148)	ALPMHIR	43
b-Lactoglobulin			(f 146 – 148)	HIR	953
(f 9 – 14)	GLDIQK	580	(f 146 – 149)	HIRL	1153
(f 15 – 20)	VAGTWY	1682	(f 147 – 148)	IR	695
(f 22 – 25) ⁷³	LAMA	556	(f 148 – 149)	RL	2493

^A Angabe der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. ^B IC_{50} , Peptid-Konzentration, die eine 50 %-ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. [#] Peptid zeigte im Tierversuch Blutdruck-senkende Effekte.

In der Primärstruktur des Milchproteins sind außerdem verschiedene ACE-inhibitorische (*in vitro*) Di- und Tripeptide enthalten (s. Tabelle 2-8), die ein hohes bioaktives Potenzial (*in vivo*) aufweisen, da sie nach oraler Zufuhr im Darm freigesetzt werden können und deren gastro-intestinale Resorption wahrscheinlich ist (s. 2.2.4.2.1).

⁷⁰ Sekiya, S. et al., 1992 (Englisch-sprachige Kurzfassung)

⁷¹ U. a.: Masuda, O. et al., 1996, Sipola, M. et al., 2002, Nurminen, M.-L. et al., 2000, Yamamoto, N. et al., 1994, Maruyama, S. et al., 1985, Karaki, H. et al., 1990, Fuglsang, A. et al., 2002, Meisel, H. et al., 2005

⁷² Yamamoto, N. et al., 2003, Murakami, M. et al., 2004

⁷³ Pihlanto-Leppälä, A., 2001

⁷⁴ Murakami, M. et al., 2004

Tabelle 2-8: ACE-inhibitorische Peptide, die in der Primärstruktur von Milchproteinen latent vorhanden sind⁷⁵.

Potenzielle Vorläuferproteine	Bioaktive Peptide	IC ₅₀ ^A [µmol/L]	Literatur ^B
β-Lactoglobulin	Ala-Gly	2500,0	76
α _{S2} -Casein	Ala-Leu	1372,5	
β-Casein	Ala-Phe	190,0	76
α _{S1} , β-Casein, β-Lactoglobulin	Ala-Pro	36,7	
β-Lactoglobulin	Ala-Pro-Leu	7227,7	
α _{S1} -Casein	Ala-Trp	6,5	
α _{S1} -Casein	Ala-Tyr	77,4	
α _{S1} , β-, κ-Casein	Ala-Val	2269,9	76
α _{S1} -Casein	Ala-Val-Pro	340,0	77
β-Lactoglobulin	Arg-Leu	2438,9	
α _{S1} , κ-Casein	Arg-Phe	230,0	76
α _{S1} -Casein, α-Lactoglobulin	Gly-Ile	1200,0	
α _{S2} , β-Casein	Gly-Pro	430,0	
α _{S1} -Casein, α-Lactoglobulin	Gly-Tyr	201,7	
β-Lactoglobulin	His-Ile-Arg	953,0	77
β-Casein	His-Leu	5047,8	
κ-Casein, β-Lactoglobulin	Ile-Arg	561,6	
κ-Casein	Ile-Pro	2632,1	
κ-Casein	Ile-Pro-Pro	5,0	
κ-Casein	Ile-Pro-Ile	137,5	
α _{S1} , α _{S2} -Casein	Ile-Gly	1200,0	76
α-Lactoglobulin	Ile-Trp	2,0	76
α _{S1} -Casein, α-Lactoglobulin	Leu-Phe	349,1	76
α _{S1} , β-Casein	Leu-Pro	6028,4	
α _{S1} -Casein	Leu-Trp	8,1	
β-Lactoglobulin	Met-His	635,8	
α _{S1} -Casein	Phe-Gly-Lys	160,0	77
α _{S1} , α _{S2} -Casein	Phe-Tyr	26,4	
α _{S1} -Casein	Pro-Leu-Trp	36,0	77
β-, κ-Casein	Pro-Pro	3581,0	
α _{S1} -Casein	Pro-Tyr-Pro	200,0	77
α _{S1} -Casein, β-Lactoglobulin	Ser-Phe	495,9	
κ-Casein	Ser-Tyr	318,1	
κ-Casein, α-Lactoglobulin	Tyr-Gly	139,4	
α _{S1} , α _{S2} -Casein	Tyr-Leu	122,1	76
α _{S1} -Casein	Tyr-Pro	720,0	77
α _{S1} , α _{S2} , κ-Casein	Val-Ala	523,0	
α _{S1} , β-, κ-Casein ⁷⁸	Val-Ala-Pro	2,0	77
α _{S1} , α _{S2} -Casein, α-, β-Lg.	Val-Phe	51,0	
α _{S1} , α _{S2} , β-Casein	Val-Pro	435,0	
β-Casein	Val-Pro-Pro	9,0	
β-Casein, β-Lactoglobulin	Val-Tyr	12,2	
β-Lactoglobulin	Val-Tyr-Val	31,4	

^A IC₅₀: Peptid-Konzentration, die eine 50 %-ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. ^B Literatur-Quelle: Meisel, H.⁷⁵, wenn nicht anders angegeben. Abkürzungen: β-Lg.: β-Lactoglobulin.

⁷⁵ Unveröffentlichte Ergebnisse, Meisel, H., 2003

⁷⁶ Meisel, H., 2001

⁷⁷ FitzGerald, R. J. & Meisel, H., 2000.

⁷⁸ Yamamoto, N. et al., 1999

In verschiedenen Käseextrakten wurde eine ACE-inhibitorische Aktivität (*in vitro*) nachgewiesen, die u. a. vom Reifegrad abhängig war. Die Aufzählung erfolgte nach abnehmender Wirkung: Roquefort, Leerdamer, Gouda (mittel alt), Emmentaler, Edamer, Gouda (jung), Tilsiter, Camembert, Gouda (alt), Harzer, Parmesan⁷⁹ sowie Gouda (24 und 8 Monate alt), Havarti, Camembert, Edamer und Emmentaler Käse. SAITO ET AL.⁸⁰ wiesen mit diesen Extrakten außerdem Blutdruck-senkende Effekte auf Ratten mit spontaner Hypertonie nach⁸⁰. Als ACE-inhibitorische Peptidsequenzen wurden u. a. identifiziert:

- β -Casein (f58 – 72) aus italienischen Käses (Mozzarella, Crescenza, Italice, Gorgonzola),
- β -Casein (f60 – 68) und α_{s1} -Casein (f1 – 9) aus Gouda,
- α_{s1} -Casein (f1 – 9), (f1-7), (f1-6) aus Festivo⁸¹,
- β -Casein (f58 – 72) und (f193 – 209) u. a. aus Norvegia, Jarlsberg, Cheddar⁸².

Die ACE-inhibitorischen Peptide ($MG_{\text{Peptid}} < 10 \text{ kD}$) eines wasserlöslichen Extrakts aus Emmentalerkäse wurden durch gastrointestinalen Enzyme (*in vitro*) hydrolysiert und in ihrer Wirkung inaktiviert⁸³.

In verschiedenen Studien (*in vitro*) wurden multifunktionelle Peptide identifiziert, die einerseits an somatisches ACE binden und dadurch die Enzymaktivität hemmen und andererseits an opioide Rezeptoren binden (s. Tabelle 2-9 sowie s. 2.1.1.2.3).

Tabelle 2-9: Multifunktionelle, bioaktive Peptide aus Milchprotein

(Eigene Darstellung nach MEISEL bzw. DEDDISH ET AL.⁸⁴)

Bioaktive Peptide	Aminosäuren-Sequenzen ^A	Vorläuferproteine (Fragment f)	Bioaktivität	
			Opioid ^B IC ₅₀ [$\mu\text{mol/L}$]	ACE-inhibitorisch ^C IC ₅₀ [$\mu\text{mol/L}$]
β -Casomorphin-7	YFPFGPI	β -Casein (f 60-66)	14,0	500
α -Lactorphin	YGLF	α -Lg. (f 50 – 53)	67,0	733
β -Lactorphin	YLLF	β -Lg. (f 102 - 105)	38,0	172

^A Angabe der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. ^B Peptid-Konzentration, die nötig ist, die ³H-Liganden Bindung um 50 % zu hemmen. ^C Peptid-Konzentration, die eine 50 %ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. Abkürzung: Lg.: Lactoglobulin

ACE-inhibitorische Peptide wurden nicht ausschließlich aus den Proteinen der Milch isoliert, sondern auch aus Proteinen von(m) Knoblauch⁸⁵, Mais (γ -Zein⁸⁶, α -Zein⁸⁷), Roten Bohnen⁸⁸, Sake⁸⁹, Soja⁹⁰, Weizen (-keim⁹¹, -globulin⁹²), rotem und weißen Wein⁹³ sowie von(m)

⁷⁹ Meisel, H. et al., 1997

⁸⁰ Saito, T. et al., 2000

⁸¹ Korhonen, H. & Pihlanto, A., 2003

⁸² Stepaniak, L. et al., 2001

⁸³ Parrot, S. et al., 2003

⁸⁴ Meisel, H., 1997, Deddish et al., 1997

⁸⁵ Suetsuna, K., 1998, Silagy, C. A. & Neil, H. A. W., 1994

⁸⁶ Maruyama, S. et al., 1989

⁸⁷ Miyoshi, S. et al., 1991

⁸⁸ Kwon, Y. S. et al., 2000

⁸⁹ Saito, Y. et al., 1994

⁹⁰ Chen, J.-R. et al., 2003, Wu, J. & Ding, X., 2001

⁹¹ Matsui, T. et al., 1999, Matsui, T. et al., 2000

Austern⁹⁴, Hühnerei (Eigelb⁹⁵, Albumin⁹⁶), Fischen (Sardinen⁹⁷, Tunfisch⁹⁸, Bonito⁹⁹), Gelatine¹⁰⁰, Huhn⁹⁶ (Muskel⁹⁶), Rind (Blutplasma)¹⁰¹, Schwein (Blutplasma¹⁰², Muskel: Myosin¹⁰³, Troponin C¹⁰⁴), Honig¹⁰⁵, oder aus Bakterien-Extrakten (*Lactobacillus casei*: LEx¹⁰⁶, Gram-negative Bakterien, die auf Samen von Backweizen siedeln¹⁰⁷). Ein Teil der Proteinhydrolysate, -extrakte oder daraus isolierten (synthetischen) Peptide wirkten in Tierstudien (u. a. SHR) Blutdruck-senkend. In den nachfolgenden Tabelle 2-10 und Tabelle 2-11 werden die aus den Peptidpräparationen identifizierten ACE-inhibitorischen Di- und Tripeptide aufgeführt.

OH ET AL.¹⁰⁸ entwickelten eine Methode zur gezielten Biosynthese ACE-inhibitorischer Peptide durch Veränderung des Genoms von *Escherichia coli* BL 21. Diese Bakterienkulturen synthetisierten ein spezielles Polypeptid, welches nachfolgend chromatographisch isoliert und durch Chymosin hydrolysiert wurde. In diesem Hydrolysat waren Ile-Tyr und Val-Lys-Tyr enthalten, welche jeweils einen IC₅₀-Wert von 7 und 4 µmol/L aufwiesen. Der Vorteil dieser Methode war die hohe Ausbeute des ACE-inhibitorischen Peptidgemischs von 35 % im Hydrolysat¹⁰⁸.

Eine ACE-inhibitorische Aktivität wurde auch für intrazelluläre Antioxidantien nachgewiesen (reduziertes Glutathion, Carnosin, Anserin mit folgenden IC₅₀-Werten: 32, 5, 7 µmol/L)¹⁰⁹.

⁹² Kawakami, A. et al., 1995

⁹³ Takayanagi, T. & Yokotsuka, K., 1999

⁹⁴ Suetsuna, K., 2002

⁹⁵ Yoshii, H. et al., 2001

⁹⁶ Fujita, H. et al., 2000

⁹⁷ Matsui, T. et al., 1993

⁹⁸ Yamamoto, N., 1997

⁹⁹ Yokoyama, K. et al. 1992, Yamamoto, N., 1997

¹⁰⁰ Kim, S. - K. et al., 2001, Oshima, G. et al., 1979

¹⁰¹ Lee, S. H. & Song, K. B., 2003

¹⁰² Hazato, T. & Kase, R., 1986

¹⁰³ Nakashima, Y. et al., 2002

¹⁰⁴ Katayama, K. et al., 2004

¹⁰⁵ Matsui, T. et al., 2002

¹⁰⁶ Furushiro, M. et al., 1990, Sawada, H. et al., 1990

¹⁰⁷ Matsumoto, M. & Hosono, A., 2000

¹⁰⁸ Oh, K.-S. et al., 2002

¹⁰⁹ Hou, W.-C. et al., 2003

Tabelle 2-10: ACE-inhibitorische Di- und Tripeptide aus Pflanzenproteinen

(Quellenangabe s. Text)

Pflanzenproteine	Bioaktive Peptide ^A	IC ₅₀ ^B [μmol/L]	Pflanzenproteine	Bioaktive Peptide ^A	IC ₅₀ ^B [μmol/L]
Knoblauch (-pulver^{##})	SY	66	Mais: g-Zein	LPP ^{#*}	10
	GY	72		VW	1
	FY	4	VWY	9	
	NY	33	YW	10	
	SF	130	Sake, Samen (Hydrolysat*)	HY	26
	GF	278		VT	7
	NF	46		FWN	18
Mais: a-Zein	LRP [#]	0,3	IYPRY [#]	4	
	LSP	2	RF	93	
	VSP	10	Soja	IA	153
	LQP	2		FFL	37
	LNP	43	Weizenkeim	TF	18
	LLP	57		LY	6
	VAY	16		YL	16
	LAY	4		AF	15
	FY	25		IY	2
	IRA	6		VR	9
	LAA	13		IVY [#]	1
	VAA	13			
	LQQ	100			

^A Angabe der Aminosäuren-Sequenzen im Ein-Buchstaben-Code. ^B Peptid-Konzentration, die eine 50 %-ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. [#] Nachweis einer antihypertensiven Wirkung an Ratten mit spontaner Hypertonie (SHR). ^{##} Nachweis Blutdruck-senkenden Effekte in Humanstudie an milden Hypertonikern. * Synthetisiertes Peptid. Dieses Peptid ist in der Sequenz des Pentapeptids VHLPP enthalten, welches aus Maisprotein isoliert wurde.

Tabelle 2-11: ACE-inhibitorische Di-, Tripeptide aus tierischen Proteinen

(Quellenangabe s. Text)

Vorläufer-Proteine	Bioaktive Peptide ^A	IC ₅₀ ^B [µmol/L]	Vorläufer-Proteine	Bioaktive Peptide ^A	IC ₅₀ ^B [µmol/L]
Austern	IAE	35	Ei-Albumin	LW [#]	7
	IVE	96		FCF	11
	FE	52	Huhn: Muskel	LKA	9
	VEV	9		LKP [#]	0,3
Bonito „Katsuo bushi“	IY [#]	4	LAP [#]	4	
	FQP	12	IKW [#]	0,2	
	VRP	2	Schwein: Muskel	NPP ^{##}	291
	IKP [#]	3		PPK ^{##}	> 1000
	LRP	1	ITT ^{##}	679	
IRP	2	Blut	LVL	0,6 ^C	
Sardinen	MF	45	Rind: Blut	HPY	2
	RY	51	Gelatine	GPV	5
	MY	193		GPL	3
	LY	39	Schnecken	AEL	57
	TL	82		LVE	14
	IY	11		FY	2
	VF	44		KF	116
	KW	2	IF	930	
	GRP	20	IVY	1	
	RPH	330	IMY	2	
	ALL	3	Honig (Hydrolysate [#])	DGL	2
RVY	206	TKY		2	
Tunfisch	TTN ^{##}	673		LTF	3
	TNP ^{##}	207		FNF	7
	IW	2		AVL	7
	IY	4	GLY	9	
	FQP	12			
	IKP	2			
LNY	81				

^A Angabe der Aminosäuren-Sequenzen im Ein-Buchstaben-Code. ^B Peptid-Konzentration, die eine 50 %-ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. ^C IC₅₀-Wert [µg Peptid / mL]. [#] Nachweis einer antihypertensiven Wirkung an Ratten mit spontaner Hypertonie (SHR). ^{##} Synthetisierte Peptide.

FUJITA ET AL.¹¹⁰ identifizierten im „Katsuo-bushi“ Oligopeptid bzw. im angereicherten Hydrolysat acht verschiedene ACE-inhibitorische Peptide (w/w: 0,17 bzw. 0,34 %). *In vitro*-Studien zeigten, dass die Neutrale Endopeptidase diese Peptide nicht spaltete und ACE das Pentapeptid LKPNM (s. Tabelle 2-13) zu LKP hydrolysierte. Beide Peptide sind potente ACE-Inhibitoren, mit IC₅₀-Werten von 2,4 bzw. 0,32 µmol/L. In Versuchen mit hypertensiven Ratten (SHR) wurde nach intra-venöser Injektion dieser Peptide eine maximale Blutdruck-Reduzierung nach 2 h ermittelt. Die Wirkungsdauer von LKP war kurz (< 8 h), die von LKPNM hingegen langanhaltend (> 8 h)¹¹⁰.

¹¹⁰ Fujita, H. et al., 2001, Fujita, H. et al., 1999

Infolge dieser Beobachtungen erarbeitete die Arbeitsgruppe von FUJITA¹¹¹ ein Klassifizierungsschema für ACE-inhibitorische Nahrungspeptide. Dazu wurde die ACE-inhibitorische Wirkung verschiedener Peptide vor und nach einer Pre-Inkubation mit ACE bzw. Chymotrypsin oder Trypsin untersucht. Dabei wurden Peptide mit unveränderter bzw. verminderter ACE-inhibitorischer Wirkung identifiziert (Inhibitoren bzw. Substrate). Außerdem wurden medikamenten-ähnliche ACE-Inhibitoren identifiziert, die durch die Pre-Inkubation zu typischen Inhibitoren gastrointestinaler Proteasen gespalten wurden (s. Tabelle 2-12)¹¹¹.

Tabelle 2-12: Wirkung und Klassifizierung bioaktiver Peptide als ACE-Substrate, -Inhibitoren bzw. Medikamenten-ähnliche ACE-Inhibitoren

(Darstellung modifiziert nach FUJITA ET AL.¹¹¹)

ACE-inhibitorische Peptide ^A	Ausgangspoteine	IC ₅₀ ^B [µmol/L], Pre-Inkubation ^C		ACE-Stabilität [%]	D BD in SHR ^D [mmHg] (i. v. / oral)
		Ja	nein		
ACE-Substrate					
FKGRYYP	Huhn	0,6	34,0	0	0 / 0
FFGRCVSP	Ei-Albumin	0,4	4,6	0	0 / 0
ERKIKVYL	Ei-Albumin	1,2	6,0	0	0 / 0
ACE-Inhibitoren					
IY	Bonito	2,1	1,9	100	- 45 / - 19
LW	Ei-Albumin	6,8	6,6	100	- 45 / - 22
IW	Bonito	5,1	5,1	100	- 55 / - 22
IKW	Huhn	0,2	0,8	> 95	- 5 / - 17
IKP	Bonito	1,6	1,8	100	- 70 / - 20
LKP	Bonito, Huhn	0,3	0,3	100	- 75 / - 18
IWH	Bonito	3,5	3,5	100	- 70 / - 30
IVGRPR	Bonito	300,0	300,0	100	- 25 / - 17
Medikamenten-ähnliche ACE-I^E					
LKPNM	Bonito	2,4	0,8	80	- 80 / - 23
IWHHT [#]	Bonito	5,8	3,5	80	- 60 / - 26
IVGRPRHQG ^{##}	Bonito	2,4	23,0	0	0 / - 14

^A Angabe der Aminosäuren-Sequenzen im Ein-Buchstaben-Code. ^B Peptid-Konzentration, die eine 50 %-ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. ^C Pre-Inkubation mit (ja) oder ohne (nein) ACE bzw. [#] Chymotrypsin oder ^{##} Trypsin. ^D ? BD: Veränderung des Blutdrucks in Ratten mit spontanaufretender Hypertonie (SHR) nach intravenöser (i. v.) bzw. oraler Verabreichung der ACE-inhibitorischen Peptide. ^E ACE-I: ACE-Inhibitoren.

Wirkung ACE-inhibitorischer Peptide in Humanstudien

Die antihypertensive Wirkung verschiedener Peptide wurde in randomisierten, doppel-blind, Placebo-kontrollierten (außer¹¹³) Humanstudien nachgewiesen (s. Tabelle 2-13).

Die bioaktiven Peptide wurden in Form von Milchproteinhydrolysaten (Casein, Molkenprotein), fermentierter Milch, Fischhydrolysaten (Sardinen, Bonito) oder einem extrahierten, lyophilisierten mikrobiellen Zell-Lysat (Kapseln) über einen längeren Zeitraum verabreicht.

¹¹¹ Fujita, H. et al., 2000

Das jeweilige bioaktive Peptid war in Mengen von 2 bis 6 mg darin enthalten: z. B. Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro, Val-Thr, Leu-Lys-Pro-Asn-Met mit IC₅₀-Werten von 5, 9, 26, 2 µmol/L¹¹².

Das jeweilige Placebo enthielt die antihypertensiven Peptide nicht und entsprach in seiner Darreichungsform und weiteren Zusammensetzung (außer^{113, 114}) der Testsubstanz. Trotzdem wurden teilweise Placeboeffekte ermittelt, die jedoch nur temporär nachweisbar waren. In diesen Humanstudien wurden keine unerwünschten Nebeneffekte ermittelt. Die zusätzlich untersuchte Herz- oder Pulsrate blieb innerhalb der Studiendauer unverändert. Der Blutdruck der Testgruppe wurde moderat reduziert (Ø um 11 zu 7 mm Hg). Außerdem wiesen gesunde Probanden nach Einnahme dieser Testsubstanzen keine Veränderung des Blutdrucks auf.

Tabelle 2-13: Wirkung bioaktiver Peptide aus Nahrungsproteinen auf den Blutdruck von Probanden mit Hypertonie

(Eigene Darstellung, Quellenangaben s. Spalte Literatur (L.))

Probanden mit milder Hypertonie bzw. Hypertonie Stadium I						Kontrollgruppe			L. B		
Peptidquellen	Bioaktive Peptide ^A	Dosis [x/Tag]	Dauer [Wochen]	BD ^B [mmHg]	sBD ^B	dBD ^B	BD ^B [mmHg]	sBD ^B		dBD ^B	Placebo
Casein-Hydrolysat ^C	-	20 g	4	- 4,6	-6,6	-	-	-	-	ohne	113
Lex ^D	PS-Glycopeptid ^E	800 mg	8	- 9,0	- 6,0	- 6,0	- 5,0	-	-	Dextrin	114
Sauermilch ^F	IPP, VPP	100 mL ^G	8	-14,1	-6,6	- 4,0	- 1,4	-	-	gesäuerte Milch	115
Sardinen-Muskel ^H	VT	200 mL ^I	4	-10,0	- 5,3	- 8,5	- 6,0	-	-	Getränk ohne VT	116
Bonito ^J	u. a. LKPNM	10 Tbl. ^K	5	-11,7	- 6,9	-	-	-	-	10 Tbl. ^L	117
Molkenprotein ^M	-	20 g	6	-11,0	- 7,0	-	-	-	-	BiPRO ^M	118
Sauermilch ^N	IPP, VPP	150 mL ^P	8	-10,1	- 9,4	- 4,1	- 2,0	-	-	Sauermilch	119
			21	-15,4	- 9,3	- 9,4	- 5,5	-	-		120

^A Angabe der Aminosäuren-Sequenzen der Peptide im Ein-Buchstaben-Code. ^B Abkürzungen: BD: Blutdruck, sBD: systolischer BD, dBD: diastolischer BD, L.: Literatur, ^C Casein-Hydrolyse mit Trypsin, ^D *Lactobacillus casei* YIT 9018 Zell-Lysate wurden extrahiert, lyophilisiert. ^E Polysaccharid(PS)-Glycopeptid-Komplex aus der Zellwand der Mikroorganismen, ^F Calpis[®] (Calpis Food Industry Co., Japan): Sauermilch fermentiert mit *Lactobacillus helveticus* und *Saccharomyces cerevisiae* ssp., ^G 100 mL Sauermilch enthält 2,6 mg bioaktive Peptide, ^H Sardinenmuskel hydrolysiert mit alkalischer Protease aus *Bazillus licheniformis*, ^I 200 mL enthalten 6 mg VT, ^J getrockneter Bonito (traditioneller, japanischer Fisch: „Katsuo bushi“) wird durch Thermolysin hydrolysiert. ^K Die Tabletten (Tbl.) enthalten 1,5 mg „Katsuo bushi“ Hydrolysat mit 5 mg LKPNM, ^L die Tabletten (Tbl.) enthalten 1,5 mg „Katsuo bushi“ Pulver, ^M BioZate[®] 1: Molkenproteinhydrolysat, BiPRO[®]: Molkenproteinisolat (DAVISCO foods international, USA), ^N Evolus[®] (Valio, F): Sauermilch fermentiert durch *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H, ^P 150 mL enthalten ca. 6 mg IPP und VPP.

¹¹² Fujita, H. et al., 1999

¹¹³ Sekiya, S. et al., 1992 (Englisch-sprachige Kurzfassung)

¹¹⁴ Nakajima, K. et al., 1995

¹¹⁵ Hata, Y. et al., 1996, Kajimoto, O. et al., 2001 (Englisch-sprachige Kurzfassung)

¹¹⁶ Kawasaki, T. et al., 2000

¹¹⁷ Fujita, H. et al., 2001

¹¹⁸ Pins, J. et al., 2002

¹¹⁹ Seppo, L. et al., 2002

¹²⁰ Seppo, L. et al., 2003

Die Ergebnisse der Humanstudien entsprachen der Zielsetzung funktioneller Lebensmittel und es wurden folgende Produkte auf die jeweiligen Märkte gebracht: Calpis® (Calpis Food Industry Co., Japan)¹²¹, Evolus® (Valio Ltd., Finnland)¹²², BioZate® (DAVISCO foods international, USA)¹²³, Anti-A.C.E. Peptides™ (Natural Factors, USA)¹²⁴. Das letztere Produkt wird in Form von Kapseln vertrieben, die „Katsuo bushi“ Oligopeptid (KO, ein zugelassenes FOSHU) enthalten (1,5 g KO / 3 Kapseln). Der langfristige Verzehr von 3 g KO pro Tag bewirkte eine Reduzierung des systolischen Blutdrucks um 13 mm Hg (Humanstudie). Das Ausgangsprodukt („Katsuo-bushi“) hingegen wies keine Blutdruck-modulierenden Effekte auf¹²⁵.

Intestinaler Transport und Hydrolyse-Resistenz ACE-inhibitorischer Peptide

Das Lactokinin (f 142 – 148) ALPMHIR war stabil gegenüber einer simulierten gastrointestinalen Verdauung¹²⁶ und passierte in sehr geringen Mengen das simulierte Dünndarmepithel (Caco-2 Zellkultur)¹²⁷. In einer nachfolgenden Studie mit Endothelzellen der Schweineaorta bewirkte ALPMHIR eine reduzierte Freisetzung von Endothelin-1 (Vasokonstriktor)¹²⁸. Das Heptapeptid wurde von Enzymen des Humanserums (*in vitro*) hydrolysiert: nach 1 h waren ca. 10 verschiedene Spaltprodukte nachweisbar. Gleichzeitig wurde eine von 77 auf 21 % abnehmende ACE-inhibitorische Aktivität ermittelt. In einer Humanstudie mit 5 normotensiven Probanden wurden keine Blutdruck-senkenden Effekte beobachtet und das Peptid war in den Blutseren dieser Probanden nicht nachweisbar (Nachweisgrenze: 3 ng/mL)¹²⁹.

MATSUI ET AL.¹³⁰ untersuchten die Stabilität von Ile-Val-Tyr (IVY: aus Weizenprotein) im Humanplasma (*in vitro*). Die Menge des zugesetzten Tripeptids war innerhalb von 1,5 h halbiert und nach 24 h vollständig abgebaut. Dieser Abbau wurde durch Zugabe von Bestatin (Aminopeptidase-Inhibitor) gehemmt. Aufgrund dessen schlussfolgern die Autoren, dass zunächst das Tri- (IVY) und nachfolgend das entstandene Dipeptid (VY) durch Aminopeptidasen des Plasmas gespalten wurden. Beide Peptide wirkten ACE-inhibitorisch und wiesen IC₅₀-Werte von 0,5 bzw. 5,0 µmol/L auf. VY ist außerdem ein Spaltprodukt vom Angiotensin II (s. Tabelle 2-5). In einer nachfolgenden Humanstudie mit Normotonikern wurden ein Transport von exogenem VY durch die intestinale Barriere ins Blutplasma sowie ein teilweiser Abbau durch intestinale Enzyme nachgewiesen. Die Plasma-Konzentration nahm in Abhängigkeit von der oralen Zufuhrmenge (3, 6, 12 mg) zu und erreichte nach 2 h das Maximum. Damit wurde eine im Vergleich zu anderen Peptiden (z. B. Gly-Gly) langsamere und zu Imidapril (Medikament) vergleichbare Resorptionsgeschwindigkeit ermittelt und eine

¹²¹ Handelsprobe aus Tokio (Japan)

¹²² Produktinformationsbroschüre der Firma Valio Ltd.: www.valio.com, 2002

¹²³ www.daviscofoods.com, 10.03.2003

¹²⁴ www.willner.com/descriptions/40866htm, 05.05.2003

¹²⁵ Fujita, H. et al., 1999

¹²⁶ Mullally, M. M. et al., 1997

¹²⁷ Vermeirssen, V. et al., 2002

¹²⁸ Maes, W. et al., 2004

¹²⁹ Walsh, D. J. et al., 2004

¹³⁰ Matsui, T. et al., 1999, 2000, 2002

Halbwertszeit von 3,1 h berechnet. Die einmalige, orale Zufuhr bewirkte keine akuten Blutdruck-senkenden Effekte. Allerdings wurden diese in Humanstudien durch langfristige Zufuhr eines Drinks aus Sardinenmuskelhydrolysat (enthält VY) nachgewiesen (s. Tabelle 2-13)¹³⁰.

Der Nachweis einer Blutdruck-senkenden Wirkung in Humanstudien gibt einen Hinweis darauf, dass die bioaktive Substanz resorbiert wurde. Allerdings ist der Nachweis des Transports gesondert zu führen, durch Identifikation der oral zugeführten bioaktiven Substanz im Humanserum oder durch Transportstudien mit humanen Zellkulturen (s. 2.4.3.1.3).

2.1.1.2.2 Mineralbindende Peptide

Caseinophosphopeptide (CPP, s. Tabelle 2-14) entstehen aus Phosphat-reichen Caseinregionen, wobei die folgende Sequenz häufig identifiziert wurde: S*S*S*EE. Die Phosphorylierung der Serinreste (S*) unterliegt genetischen Polymorphismen und erfolgt in der Milchdrüse posttranslational.

Tabelle 2-14: Caseinophosphopeptide aus Milchprotein

(Eigene Darstellung nach MEISEL & FITZGERALD; MEISEL; REYNOLDS¹³¹).

Vorläuferproteine (Fragment f)	Aminosäuren-Sequenzen ^A	Anzahl der Phosphatreste
α_{S1} -Casein (f 1 – 32)	KNTMEHVS*S*S*EESIIS*QETYKQEKMAINPSK	4
α_{S1} -Casein (f 43 – 58)	DIGS*ES*TEDQAMEDIM	2
α_{S1} -Casein (f 55 – 64)	GS*S*S*EES*AEV	4
α_{S1} -Casein (f 59 – 79)	QMEAES*IS*S*S*EEIVPNBVEQK	5
α_{S1} -Casein (f 66 – 74)	S*S*S*EEIVPN	3
α_{S2} -Casein (f 1 – 21)	LNTMEHVS*S*S*EESIIS*QETYL	4
α_{S2} -Casein (f 46 – 70)	NANEEEYSIG S*S*S*EES*AEVAYEEVL	4
β -Casein (f 7 – 18)	NVPGEIVES*LS*S*	3
β -Casein (f 29 – 41)	KIEKFQS*EEQQQT	1
β -Casein (f 33 – 48)	FQS*EEQQQTEDELQDK	1
β -Casein (f 1 – 25/28)	RELEELNVPGEIVES*S*S*EESITR	4

^A Bezeichnung der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code; S*: Phosphoserin.

Im Gastro-Intestinaltrakt (GIT) bzw. im Lebensmittel vorliegende CPPs binden Mineralstoffe (Calcium, Magnesium, Eisen) und schützen diese vor der Fällung im alkalischen Milieu sowie vor Bindung u. a. an Phytat (z. B. aus Sojaprodukten)¹³² oder Maillardprodukten, z. B. in erhitzter Milch¹³³, wodurch die Bioverfügbarkeit im Darm (*in vivo*, *in vitro*) erhöht wird. Die Mineralstoffbindung erfolgt durch die Phosphatreste sowie durch (angrenzende) Aminosäuren, da auch nicht phosphorylierte Peptide aus Molkenprotein mineralbindende Fähigkeiten aufweisen. In verschiedenen Studien wurden Bindungskapazitäten ermittelt, für

Calcium: 1 mol CPP bindet ca. 40 mol Calcium (7,4 – 24,0 mg Ca²⁺ pro mg CPP)

Eisen: 1 mol CPP bindet ca. 4 mol Eisen.

¹³¹ Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003, Meisel, H., 2001, Reynolds, E. C., 2003

¹³² Hansen, M. et al., 1996

¹³³ Navarro, P. et al., 2000, Seiquer, I. et al., 2001

CPPs wurden *in vivo* im GIT (u. a. humaner distaler Dünndarm) nach Aufnahme von Milch, fermentierten Milchprodukten und Casein sowie von CPP-Präparationen nachgewiesen. In Humanstudien zeigte sich, dass die CPP-Präparationen weniger Hydrolyse-resistent gegenüber intestinalen Enzymen waren als CPP, die nach Verzehr von Milch oder Yoghurt gastrointestinal freigesetzt wurden. Demnach existierte ein intrinsisches System der Milch, welches CPP vor der Hydrolyse oder/und Dephosphorylierung schützte¹³⁴.

CPPs wiesen kein allergenes Potenzial auf und eigneten sich als Ingredienzien funktioneller Lebensmittel, wobei nachweislich die Mineralstoffzufuhr erhöht wurde¹³⁵,

- zur Prävention vor Osteoporose, Bluthochdruck, Anämien,
- zur Optimierung Kuhmilch-basierter Säuglingsnahrung,
- zum Schutz vor Karies (durch Remineralisation und Schutz vor Demineralisation, auch durch verschiedene Molkenproteinfragmente¹³⁶).

Kommerziell erhältliche Caseinophosphopeptide sind Recaldent™ (Australien) und Phospho Peptide CE 90 CPP (DMV international, Niederlande¹³⁷). Diese Produkte werden u. a. als Ingredienzien für funktionelle Lebensmittel, Säuglingsnahrung oder Zahncremes angeboten.

Außerdem erwiesen sich CPP als natürliche Antioxidantien, indem sie die Lipidoxidation in Lebensmitteln hemmten¹³⁸.

2.1.1.2.3 **Opioide Peptide**

An die im Nervengewebe, Endothel, Immunsystem und GIT vorhandenen Opiatrezeptoren binden typische (endogene) und atypische (exogene) Liganden. Opioide Milchpeptide wurden aus Caseinen und Molkenproteinen gewonnen und wirkten als Agonisten oder Antagonisten (s. Tabelle 2-15), die durch Naloxon in ihrer Wirkung gehemmt wurden. Hierbei wird zwischen drei verschiedenen Rezeptoren unterschieden, die folgende physiologische Funktionen beeinflussen:

- μ -Rezeptor: Emotionen, Darmmotilität,
- δ -Rezeptor: Emotionen,
- κ -Rezeptor: Sedierung, Nahrungsaufnahme.

Exogene und endogene (u. a. Endorphine, Enkephaline, Dynorphine) Opiate unterscheiden sich in speziellen Nterminalen Aminosäuren-Sequenzen und weisen in diesen Regionen zusätzlich Strukturanaloga auf, die die Bindung an die Opiatrezeptoren determinieren: ein N-terminal gebundener Tyrosinrest (außer α -Casein-Opiate), ein weiterer aromatischer Rest an der 3. oder 4. Position und ein Prolinrest an der 2. Position.

¹³⁴ Meisel, H. et al., 2003

¹³⁵ Playne, M. J. et al., 1993, Reynolds, E. C., 2003

¹³⁶ Grenby, T. H. et al., 2001

¹³⁷ www.DMV.com, 1998

¹³⁸ Diaz, M. et al., 2003

Opioide Milchpeptide entstanden während der Fermentation von Milch oder/und während der Verdauung (*in vivo*) im GIT. Da einige der Peptide eine hohe Bioaktivität aufwiesen, ist zu vermuten, dass nutritiv unbedeutende Mengen einen messbaren biologischen Effekt verursachen. Opioid Peptide veränderten das soziale Verhalten von Labortieren, wirkten schmerzlindernd (analgetische Effekte aller Opiate), modulierten den postprandialen Metabolismus durch Stimulation der Insulin- und Somatostatin-Sekretion, verlängerten die gastrointestinale Transitzeit und erhöhten die Wasser- und Elektrolyt-Resorption.

Tabelle 2-15: Opioid Peptide aus Milchprotein

(Eigene Darstellung nach Meisel & FitzGerald; Meisel¹³⁹)

Bioaktive Peptide	Vorläuferproteine (Fragment: f)	Aminosäuren-Sequenzen ^A	IC ₅₀ ^B [µmol/l]	Rezeptor-typen
Agonisten				
β-Casomorphin-11	β-Casein (f 60 – 70)	YFPFGPIPNSL	10,0	µ
β-Casomorphin-7	β-Casein (f 60 – 66)	YFPFGPI	14,0	µ
β-Casomorphin-5	β-Casein (f 60 – 64)	YFPFG	1,1	µ
α _{S1} -Caseinexorphin	α _{S1} -Casein (f 90 – 96)	RYLGYLE	1,2	δ
α-Lactorphin	α-Lg. (f 50 – 53)	YGLF	67,0	µ
β-Lactorphin	β-Lg. (f 102 – 105)	YLLF	38,0	µ
Serorphin	Serumalbumin (f 399 – 404)	YGFNA	85,0	?
Antagonisten				
Casoxin A	κ-Casein (f 35 – 42)	YPSYGLNY	400,0	µ und κ
Casoxin B	κ-Casein (f 58 – 61)	YPYY		µ und κ
Casoxin C	κ-Casein (f 25 – 34)	YIPIQYVLSR	50,0	µ und κ
Casoxin 6	κ-Casein (f 33 – 38)	SRYPY x OCH ₃	15,0	µ und κ

^A Angabe der Aminosäuren-Sequenzen der Peptide im Ein-Buchstaben-Code. ^B Peptid-Konzentration, die eine 50 %-ige Hemmung der ACE-Aktivität bewirkt. ? Rezeptorbindung noch unbekannt. Abkürzung: Lg.: Lactoglobulin.

Die multifunktionellen Casomorphine werden u. a. in den Milchdrüsen gebildet und über die Humanmilch vom Säugling aufgenommen. Es wird vermutet, dass diese Peptidfragmente intakt resorbiert werden und das Immunsystem positiv beeinflussen. Außerdem gelangen die Casomorphine aus den Milchdrüsen in die maternale Blutbahn und zeigen positive Effekte auf das Kardiovaskularsystem. Allerdings ist die physiologische Signifikanz dieser Effekte noch unklar. Die analgetischen und antidiarrhoealen Effekte der natürlichen Casomorphine werden durch chemische Modifizierung verstärkt.

2.1.1.2.4 Zytomodulierende Peptide

Die zytomodulierende Wirkung bioaktiver Peptide aus der Milch wurde unter Einsatz von Zellkulturen (u. a. Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Epithelzellen u. a. von Mäusen, Ratten oder vom Menschen sowie Mikroorganismen) durch Messung einer Veränderung der Proliferation bzw. der DNA-, Antikörper- und Proteinsynthese untersucht¹⁴⁰.

¹³⁹ Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2000, Meisel, H., 2001

¹⁴⁰ Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003, Meisel, H., 2001

Das Casokinin β -Casein (f 177 – 183) stimulierte die Proliferation und das Wachstum von Fibroblasten der Maus. Es wurde vermutet, dass im Casein sowie Lactoferrin weitere Zellwachstumsfaktoren integriert sind, die die Entwicklung des GIT von Säuglingen unterstützten. REGESTER ET AL.¹⁴¹ isolierten verschiedene Wachstumsfaktoren (u. a. IGF-I, II, TGF- β) in einem ultrafiltrierten Molkenproteinextrakt. Dieser Extrakt wurde daraufhin als Arzneimittel, zur Therapie oberflächlicher Entzündungen und chronischer Wunden eingesetzt¹⁴¹.

Caseinfragmente (u. a. aus Yoghurt) zeigten antiproliferative Effekte auf Tumorzellen (u. a. Caco-2, HL-60 Zellen). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht genau bekannt. In Studien mit humanen Leukämiezellen (HL-60) wurde nachgewiesen, dass die Phosphatgruppen an der Wirkung nicht beteiligt waren, da die Apoptose-induzierende Wirkung mit (de)phosphoryliertem β -Casein (f 1 – 25) 4(0) P nachweisbar war¹⁴². Opiatrezeptoren schienen hingegen beteiligt zu sein, da β -Casomorphine und α -Casein-exorphine (s. Tabelle 2-16) die Proliferation humaner Prostata Tumorzellen hemmten.

Tabelle 2-16: Zytomodulierende Peptide aus Milchprotein

(Eigene Darstellung nach Meisel & FitzGerald; Meisel¹⁴⁰).

Nr.	Vorläuferproteine (Fragment f)	Bezeichnungen	Bioaktivitäten
1	α_{S1} -Casein (f 59 – 79) 5 P	Caseinophosphopeptid	immunmodulierend, mineralbindend
2	α_{S1} -Casein (f 90 – 96)	α -Caseinexorphin	zytomodulierend, opioid
3	α_{S2} -Casein (f 1 – 32) 4 P	Caseinophosphopeptid	immunmodulierend, mineralbindend
4	α_{S1} -Casein (f 194 - 199)	α -Immunocasokinin	immunmodulierend, ACE-inhibitorisch
5	β -Casein (f 1 – 25/28) 4 P	Caseinophosphopeptid	immunmodulierend, mineralbindend, zytomodulierend
6	β -Casein (f 60 - 66)	Casomorphin (β -Casomorphin-7)	immunmodulierend, zytomodulierend, ACE-inhibitorisch, opioid
7	β -Casein (f 177 - 183)	β -Casokinin	zytomodulierend, ACE-inhibitorisch
8	β -Casein (f 193 - 202)	β -Casokinin (β -Casokinin-10)	immunmodulierend, ACE-inhibitorisch
9	β -Casein (f 63 - 68)	Casoimmunopeptid	immunmodulierend
10	β -Casein (f 191 - 193)	Casoimmunopeptid	immunmodulierend
11	κ -Casein (f 38 – 39)	Caseinoimmunopeptid	immunmodulierend
12	α -Lg. ^A (f 18 – 20)	Lactoimmunopeptid	immunmodulierend
13	α -Lg. ^A (f 18/19, 50/51)	Lactoimmunopeptid	immunmodulierend
14	Lactoferrin (f 17 – 41)	Lactoferricin	immunmodulierend, antimikrobiell

^A Abkürzung: Lg.: Lactoglobulin

In Studien mit lyophilisiertem Goudaextrakt wurde die Proliferation von HL-60 Zellen durch Induktion des natürlichen Zelltods (Apoptose: s. 2.4.2.3) gehemmt. Auf diesen Stimulus reagierten Tumorzellen stärker als gesunde Humanzellen (periphere Blutlymphozyten: PBL). Die Autoren postulierten, dass Apoptose- ebenso wie Immun-stimulierende Peptide aus Milchprotein eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der gastrointestinalen Tumor-Entstehung

¹⁴¹ Regester, G. O. et al., 2003

¹⁴² Meisel, H. & Günther, S., 1998, Hartmann, R. et al., 2000

spielen¹⁴³. Diese Sicht wurde durch Studien mit α -Lactalbumin aus Humanmilch unterstützt. α -Lactalbumin änderte seine typische tertiäre Struktur bei Anwesenheit einer spezifischen Fettsäure (C 18:1) derart, dass dieses Molekül ausschließlich in Tumorzellen Apoptose induzierte. SVENSSON ET AL.¹⁴⁴ schlussfolgerten daraus, dass diese und weitere, noch unbekannte Moleküle der Muttermilch für das reduzierte Krebsrisiko von gestillten Kleinkindern ebenso wie stillenden Müttern (z. B. gegenüber Brustkrebs) verantwortlich sind¹⁴⁴.

Die Proliferation humaner PBL wurde durch β -Casomorphin-7 und β -Casokinin-10 Konzentrations-abhängig moduliert, wobei eine Konzentration $>10^{-1}$ $\mu\text{mol/L}$ stimulierend wirkte. In weiteren Studien wurde mit Caseinophosphopeptiden eine zunehmende Immunglobulinproduktion (IgA und IgG) in Milzzellen (Maus) und humanen PBL nachgewiesen¹⁴⁵.

Die Proliferation und Proteinsynthese humaner PBL wurde außerdem durch Tyr-Gly und Tyr-Gly-Gly (11, 13 und 12 in Tabelle 2-16) stimuliert¹⁴⁶. Diese Peptide bewirkten in pre-AIDS-Patienten einen Schutz vor Infektionen. Außerdem wurde die Replikation des HI-Virus durch chemisch modifiziertes α -Lactoglobulin gehemmt¹⁴⁷.

STEVENSON ET AL.¹⁴⁷ fassen immunmodulierende Effekte der Molkenprotein-, Caseinpeptide sowie anderer Milchkomponenten (Lactoferrin, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Nukleotide) zusammen. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass die in Immunzellen exprimierten Rezeptoren für biologisch aktive Mediatoren dabei eine Rolle spielen, dass beispielsweise an die in humanen Lymphozyten exprimierten μ -Rezeptoren nicht nur Endorphine, sondern auch opioide Peptide binden und so ihre immunreaktive Wirkung entfalten. Außerdem wird vermutet, dass an der immunstimulierenden Wirkung der Caseinophosphopeptide die Phosphoserreste beteiligt sind, die wahrscheinlich ein allergenes Epitop¹⁴⁸ des Caseins sind. Unspezifische, stimulierende Effekte sind außerdem möglich, da Immunzellen glutaminhaltige Peptide verstoffwechseln^{147, 148}.

Weiterhin wird vermutet, dass humane und bovine Caseine das Immunsystem Neugeborener und Erwachsener positiv beeinflussen und dadurch vor bakteriellen und viralen Infektionen schützen. Die mucosale Immunität wird durch oral zugeführte Caseinophosphopeptide erhöht. Außerdem unterstützen antimikrobielle Peptide (u. a. Lactoferrin, Lactoferricin oder Casocidin-I, Isracidin) die Immunabwehr im Darm gegen verschiedene Pathogene, u. a. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* sowie *Candida albicans*¹⁴⁹.

¹⁴³ Meisel, H. & Günther, S., 1998, Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003

¹⁴⁴ Svensson, M. et al., 2000, Hakansson, A. et al., 1995

¹⁴⁵ Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003, Hartmann, R. et al., 2000

¹⁴⁶ Kayser, H. & Meisel, H., 1996

¹⁴⁷ Stevenson, L. & Knowles, G., 2003

¹⁴⁸ Bernard, H. et al., 2000

¹⁴⁹ Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003, Sha, N. P., 2000, Clare, D. A. & Swaisgood, H. E., 2000

2.1.1.2.5 *Antithrombotische Peptide*

Antithrombotische Peptide (Casoplateline) wurden aus dem C-terminalen Part des κ -Caseins (Glykomakropeptid) isoliert (u. a. κ -Casein (f 112 – 116): KNQDK). Diese Peptide wurden im humanen GIT nach Zufuhr von Milch oder Yoghurt aus Casein freigesetzt, intakt resorbiert und ins Blut aufgenommen. Die Casoplateline hemmten Konzentrations-abhängig die ADP-induzierte Blutplättchen-Aggregation sowie die Bindung an Fibrinogen. Allerdings ist die physiologische Bedeutung dieser Wirkung noch unbekannt. Auf molekularer Ebene bestehen große Ähnlichkeiten zwischen der Blut- und Milchgerinnung¹⁵⁰.

2.1.2 Gelatine und andere Kollagenhydrolysate

Gelatine ist ein Lebensmittel⁴ aus der Gruppe der Hydrokolloide, welches 1975 und 2003 von der FDA als sicher eingestuft wurde (generally recognized as safe) und durch chemisch-thermische Verfahren aus dem Binde- und Stützgewebe (Kollagen: ca. 300 kD) von Säugetieren gewonnen wird. Je nach Herstellungsprozess entstehen dabei unterschiedliche Spaltprodukte (ca. 100 kD) mit wunschgemäßen physikalisch-chemischen (u. a. Gelstärke, Viskosität, Farbe, Klarheit) und sensorischen Eigenschaften (Geruchs-, Geschmacksneutralität). Gelatine wird zur Herstellung von verschiedenen Süß-, Back-, Fleischwaren oder Milchprodukten eingesetzt, insbesondere zur Stabilisierung einer Gelstruktur oder von Schäumen. Aufgrund des hohen Wasserbindungsvermögens eignet sich Gelatine zur Herstellung diätetischer Lebensmittel (Reduzierung von Fett bzw. Zucker) und die adsorptiven Eigenschaften werden u. a. bei der Klärung von Getränken ausgenutzt. Außerdem wird Gelatine als Rohstoff in der Tierfuttermittel-, Pharma- und Photoindustrie eingesetzt¹⁵¹.

Kollagenhydrolysate (ca. 3 kD) entstehen durch enzymatische Hydrolyse aus Kollagen und sind geschmacks- und geruchsneutral. Weitere gewünschte Eigenschaften sind: Löslichkeit in kaltem Wasser, Bildung und Stabilisierung von Schäumen bzw. einer Struktur (positives mouth-feeling). Kollagenhydrolysate weisen laut Herstellerangaben außerdem einen gesundheitlichen Zusatznutzen auf und werden deshalb zum Einsatz in diätetischen oder funktionellen Lebensmitteln empfohlen¹⁵².

2.1.2.1 Herstellung

Als Ausgangsmaterial der Gelatine-Produktion dient Bindegewebe insbesondere von Rindern und Schweinen sowie von Geflügel oder Fischen. Der Herstellungsprozess ist in Abbildung 2-3 schematisch dargestellt. Wird eine hochkonzentrierte Gelatinelösung mit speziellen

¹⁵⁰ Meisel, H. & FitzGerald, R. J., 2003, Meisel, H., 2001, Chabance, B. et al., 1998

¹⁵¹ Broschüre der GME, Belgien: „Alles über Gelatine“

¹⁵² Informationen der Gelita AG (Eberbach, D)

Enzymen versetzt, so entstehen Kollagenhydrolysate, die nachfolgend sprühgetrocknet und gelagert werden¹⁵⁵.

Der Gelatine-Produktionsprozess ist durch die europäische Vorschrift (1999/724/CE) des Verbandes der „Gelatine Manufacturers of Europe“ verbindlich geregelt. Dieser Standard wird auch von amerikanischen und asiatischen Gelatineproduzenten eingehalten. Außerdem werden die weltweiten Standards des Qualitätsmanagements und Risikokontrollsystems (ISO 9000 ff, Hazard Analysis of Critical Control Points) eingehalten sowie die BSE-Vorschrift 2001/999/EC, die es verbietet, Risikomaterial des Rindes (Schädel, Rückenmark, Wirbel von Rindern, die älter als 12 Monate sind) zur Gelatineherstellung einzusetzen¹⁵³. Zur Bewertung des potenziell möglichen TSE-Risikos von Gelatine wurden verschiedene Studien durchgeführt. Dabei wurde eine Reduktion der Infektiosität nachgewiesen, die zum Schutze der menschlichen Gesundheit ausreichend ist¹⁵⁴.

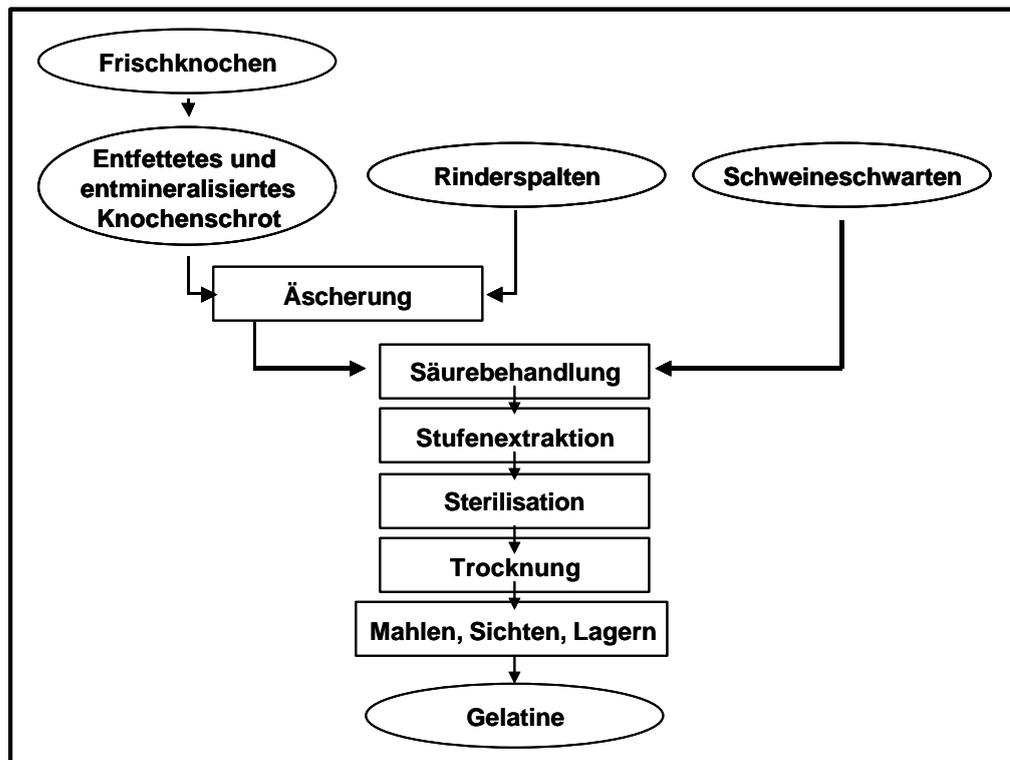


Abbildung 2-3: Prozess der Gelatineherstellung

(Eigene Darstellung nach Informationen der Gelita AG¹⁵⁵).

¹⁵³ GME, 2003: www.gelatine.org/de/gelatine/legislation/140.htm, Stand 16.06.03

¹⁵⁴ Gelita up to date, Europäische Ausgabe, Oktober 2003, Nr. 13

¹⁵⁵ Gelita AG in Eberbach, 2000: „Die Gelatine Produktion“

2.1.2.2 Molekulare Zusammensetzung

Gelatine bzw. Kollagenhydrolysate bestehen zu 84 % aus Protein und enthalten außerdem 14 % Wasser, 0,1 % Fett, Mineralsalze und Spurenelemente (Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium sowie Selen und Jod) sowie Vitamin B₆ (Pyridoxin). Der Energiegehalt wird mit 337,7 kcal (1435 kJ) angegeben¹⁵⁶. Im Gegensatz zu vielen anderen tierischen Lebensmitteln ist Gelatine frei von Purinen und Cholesterin¹⁵⁷.

Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Gelatine ist in Tabelle 2-17 aufgeführt. Charakteristisch ist der Gehalt an Glycin, Prolin, die hohe Anzahl unterschiedlicher Ladungen im Molekül und das Vorkommen der Aminosäuren-Derivate Hydroxyprolin (HyPro) und Hydroxylysin. Da Hydroxyprolin ausschließlich in Bindegewebe-haltigen Lebensmitteln (u. a. Gelatine, Fleischwaren) nachweisbar ist, dient es als Markersubstanz und wird zur Berechnung des BEFFE-Wertes (Bindegewebe-seiweiß-freies Fleischeiweiß) herangezogen sowie neuerdings zum Nachweis von Gelatine in Milchprodukten¹⁵⁸. In Abhängigkeit vom Herstellungsprozess der Gelatine sind Asparagin und Glutamin bzw. Aspartat und Glutamat nachweisbar¹⁵⁹.

Tabelle 2-17: Aminosäuren (AS) Zusammensetzung von Gelatine

(Darstellung modifiziert nach SOUCI und LÖFFLER & PETRIDES und BABEL¹⁶⁰).

Merkmale der Aminosäuren (AS)	Trivialnamen	AS Gehalt in Gelatine [g / 100 g]
hydrophobe AS	Alanin	9,27
	Glycin	23,00
	Isoleucin*	1,37
	Leucin*	2,74
	Methionin*	0,76
	Phenylalanin*	1,98
	Prolin	13,00
	Tryptophan*	0,006
hydrophile AS	Valin*	2,13
	Lysin*	3,80
Positive Ladung (basische AS)	Arginin	7,45
	Histidin*	0,61
	Glutamin	k. A.
Keine Ladung (neutrale AS)	Asparagin	k. A.
	Serin	3,50
	Threonin*	1,82
	Cystein**	Spuren
Negative Ladung (saure AS)	Aspartat	5,63
	Glutamat	9,58
	Tyrosin**	0,30
AS-Derivate	4-Hydroxyprolin	11,10
	e-Hydroxylysin	Spuren

* Essentielle Aminosäuren, ** bedingt (semi-) essentielle Aminosäuren, k. A.: keine Angaben.

¹⁵⁶ Souci, S. et al., 2000

¹⁵⁷ Kasper, H., 2003

¹⁵⁸ Nakano, T. & Ozimek, L., 2003

¹⁵⁹ Babel, W., 1996

¹⁶⁰ Verändert nach Souci, S. et al., 2000, Löffler, G. & Petrides, P. E., 1997, Babel, W., 1996

Auf Grund des geringen Gehaltes an schwefelhaltigen Aminosäuren (Met, Cys) und Tryptophan, weist Gelatine eine geringe biologische Wertigkeit auf. Diese (semi-) essentiellen Aminosäuren werden jedoch durch eine Mischkost (u. a. durch Milch- oder Muskelproteine), bei gesunder Ernährung, in ausreichender Menge aufgenommen.

2.1.2.3 Kollagenstoffwechsel im menschlichen Organismus

Kollagen ist das quantitativ bedeutendste Protein des menschlichen Organismus. Es wird von Bindegewebszellen (Fibroblasten) und deren Abkömmlingen (u. a. Chondrozyten, Osteoblasten, glatte Muskelzellen) synthetisiert, ebenso Elastin und verschiedene Glykoproteine (polyanionische Proteoglykane, Hyaluronat, Nektine u. a.). Diese Substanzen werden in die Zellumgebung sezerniert und bilden die extrazelluläre Matrix. Kollagen verleiht Geweben (u. a. im Knochen, Knorpel, Sehnen) und Organen (u. a. Leber, Lunge) mechanische Stabilität und strukturelle Integrität und bildet Netzwerke in Basalmembranen von Endothel- und Epithelzellschichten (z. B. Dünndarmepithel), die als Molekularsieb und Substrat zur Zelladhäsion dienen und zusätzlich das Zellwachstum und die Differenzierung beeinflussen.

Es werden 19 verschiedene Kollagentypen (3 Haupttypen und Minoritäten-Kollagene) unterschieden, die in unterschiedlichen Anteilen in den verschiedenen Geweben synthetisiert werden. Charakteristisches Merkmal aller Kollagene ist, dass zumindest ein Teil des Moleküls aus drei (identischen oder nichtidentischen) α -Polypeptid-Ketten besteht, die in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden sind und eine Primärstruktur aus einer sich wiederholenden Tripeptid-Sequenz (Glycin-X-Y)_n aufweisen, wodurch ein Drittel aller Aminosäuren im Kollagenmolekül Glycyl-Reste sind. Prolin kommt in X- oder Y-Position vor, während Hydroxyprolin ausschließlich in der Y-Position gebunden ist¹⁶¹.

2.1.2.3.1 Biosynthese

Die verschiedenen Kollagene werden von 30 Genen codiert. Durch Translation der mRNA an den Polyribosomen entsteht zunächst das Prä-Prokollagen (in dem noch kein Hydroxyprolin oder -lysin integriert ist, da es für diese Aminosäuren keine Basentriplets gibt). Nachfolgend wird von dem Prä-Prokollagen ein Signalpeptid abgespalten, wobei α -Prokollagen entsteht. Dieses beginnt mit der Ausbildung einer links gewundenen Helix, wobei am C- und N-terminalen Ende nicht-helikale Abschnitte (Telo- und Registerpeptide) verbleiben. Die verschiedenen, gleichzeitig synthetisierten Prokollagene werden in den Golgi-Apparat transportiert und in sekretorische Vesikel verpackt. Dort lagern sich drei α -Prokollagen-Ketten aneinander und beginnen Reißverschluss-artig mit der Ausbildung einer rechts gewundenen Tripelhelix (Tertiärstruktur). Kurz zuvor werden ca. 50 % der Prolyl- und 10 – 80 % der Lysyl-Reste enzymatisch hydroxyliert und die nicht-helikalen Bereiche werden glykosyliert (Galaktose, Glukose). Dadurch steigt die Schmelztemperatur der Polypeptidketten von 25 auf 37 °C an. Die Stabilisierung der Tripelhelix erfolgt durch Bildung von Disulfidbrücken und intra-

¹⁶¹ Babel, W., 1996

molekularen Wasserstoffbrücken-Bindungen. Diese hydroxylierten Prokollagenmoleküle werden in den Extrazellularraum sezerniert, wo spezifische Proteinase die Registerpeptide abspalten und die Hydroxylysyl-Reste glykosylieren.

Die tripelhelikalen Kollagenmoleküle (l: 300 nm, Ø 1,4 nm) lagern sich parallel zueinander an der Oberfläche vorhandener Mikrofibrillen (Quartärstruktur) an und bilden Pentamere (Ø 4 nm). Dieser Prozess findet im neutralen pH-Bereich der extrazellulären Matrix statt, wird durch die charakteristische Verteilung positiver und negativer Ladungen des Kollagenmoleküls reguliert und führt zur Erhöhung des Schmelzpunktes auf 52 °C. Die Mikrofibrillen werden nachfolgend durch enzymkatalysierte Ausbildung kovalenter Bindungen (Quervernetzung) stabilisiert, wodurch der Schmelzpunkt erneut ansteigt, auf 67 °C. Gleichzeitig entstehen u. a. Hydroxylysyl-Pyridinolin bzw. Desoxypyridinolin, die entscheidenden Einfluss auf die Zugfestigkeit des Kollagens u. a. in Knorpel bzw. Knochen haben. Nachfolgend lagern sich Mikrofibrillen (gleicher bzw. unterschiedlicher Kollagentypen) zu Fibrillen zusammen.

2.1.2.3.2 Abbau und Ausscheidung

Die Kollagenfibrillen der unterschiedlichen Bindegewebe weisen unterschiedliche Halbwertszeiten auf (Haut/Muskel/Leber: 200/60/30 Tage). Diese sind während entzündlicher Prozesse (z. B. Arthritis), der Wundheilung oder im alternden Gewebe jedoch verkürzt.

Der Kollagenabbau erfolgt durch Zink-haltige Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die u. a. von Fibroblasten gebildet und als inaktive Vorstufen in den Extrazellular-Raum sezerniert werden. Dort werden die MMP durch limitierte Proteolyse aktiviert bzw. durch spezifische Inhibitoren (Tissue inhibitors of metalloproteinasen: TIMP) gehemmt. Normalerweise existiert ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP, dessen Regulation noch nicht in allen Einzelheiten bekannt ist. Störungen des Gleichgewichts führen zumeist zum Kollagenabbau.

Die MMP sind für einzelne Kollagene spezifisch und hydrolysieren Gly-Leu oder Gly-Ile Bindungen, wodurch zwei Polypeptid-Fragmente (Schmelztemperatur: 29 – 32 °C) entstehen, die bei Körpertemperatur zerfallen und nachfolgend von proteolytischen Enzymen gespalten werden. Dabei entstehen verschiedene Fragmente, die über die Synovialflüssigkeit ins Blut gelangen und dort u. a. als Kollagenabbau-Marker detektierbar sind. Das Cartilage Oligomeric Matrix Protein ist ein wichtiger Marker zur frühzeitigen Erkennung eines Knorpelabbaus, zur Untersuchung von Therapieerfolgen sowie zur Prognostizierung des weiteren Krankheitsverlaufs¹⁶². Beim Kollagenabbau entstehen Hydroxyprolin enthaltende Peptide und freies Hydroxyprolin, welches nicht reutilisiertbar ist, sondern in der Leber abgebaut und über den Urin ausgeschieden wird. Die Hydroxyprolin-Konzentration im Urin ist deshalb ein Indikator für den Kollagenumsatz, der u. a. bei Knochenerkrankungen erhöht ist.

¹⁶² Haberhauer, G. et al., 2003

2.1.2.3.3 Resorptions-, Verteilungs- und Exkretionsstudien

Die duodenale Resorption und renale Exkretion von Hydroxyprolin wurde 1962 von PROCKOP ET AL.¹⁶³ an zwei Nieren-gesunden Probanden untersucht. Diese ernährten sich zunächst Hydroxyprolin-arm (1 Woche) und tranken anschließend einen Gelatine-haltigen Saft (25 g / 250 mL). Im Blutserum und Urin wurde nachfolgend eine Konzentrations-Zunahme (Maximum nach 2 h) an freiem und Peptid-gebundenem Hydroxyprolin nachgewiesen. Im Serum wurden ca. 8 % Peptid-gebundenes Hydroxyprolin ermittelt, welches vermutlich resorbiert wurde. Dies wurde angenommen, da nach Einnahme einer Aminosäuren-Mischung, welche eine zur Gelatine vergleichbare Zusammensetzung aufwies, die Peptid-gebundene Hydroxyprolin-Konzentration im Serum nicht anstieg. Resorbierte Hydroxyprolin-haltige Peptide scheinen im Serum Hydrolyse-resistent zu sein, da sie sehr rasch eliminiert und mit dem Urin (Maximum nach 2 h) ausgeschieden wurden. Aufgrund dessen wurde geschlussfolgert, dass Hydroxyprolin aus der Nahrung nicht in die Kollagenbiosynthese einfließt¹⁶³. Diese Ergebnisse wurden 1966 durch BRONSTEIN ET AL.¹⁶⁴ in einer Studie mit gesunden Probanden und Patienten mit Zöliakie, Teil-Gastroektomie und Pankreasinsuffizienz bestätigt. Die Resorption und Exkretion von freiem und Peptid-gebundenem Hydroxyprolin war einzig bei Patienten mit Pankreasinsuffizienz erniedrigt, im Vergleich zu gesunden Probanden¹⁶⁴.

Die *in vivo* Verteilung von resorbiertem Hydroxyprolin wurde 1999 von OESSER ET AL.¹⁶⁵ an Mäusen untersucht. Dazu wurde zunächst eine mit ¹⁴C-Prolin radioaktiv-markierte Gelatine aus der Haut von Ratten hergestellt und über eine Magensonde an Mäuse der Gruppe A verabreicht. Mäuse der Gruppe B erhielten ¹⁴C-Prolin und 10 mg nicht-markierte Gelatine pro Körpergewicht (kg). In beiden Mäusegruppen wurde eine rasche Resorption nachgewiesen, indem im Darm nach 6h nur noch 90 % der anfänglichen Radioaktivität messbar war. Im Blutplasma bzw. in der Haut beider Gruppen wurde nach 6 bzw. 12 h das Maximum der Radioaktivität ermittelt. Im Knorpel hingegen war über den gesamten untersuchten Zeitraum (0 - 96 h) die Radioaktivität in der Gruppe A im Vergleich zur Gruppe B erhöht. Die Autoren folgerten daraus, dass ein heterogenes Peptidgemisch, welches bei der Verdauung von Gelatine entsteht und resorbiert wird, sich bevorzugt im Knorpel ansammelt. Eine Akkumulation aufgrund eines veränderten Aminosäuren-Metabolismus (Prolin versus ¹⁴C-Prolin) wurde ausgeschlossen, da in der Leber der Tiere beider Gruppen eine jeweils vergleichbare Radioaktivität gemessen wurde. Zusätzlich wurde unter Einsatz einer speziellen Präparation eines Mäuse-Darmabschnitts (der „gut-sac“ Methode) die Resorption von Peptiden aus Kollagenhydrolysaten untersucht. Demnach passierten Peptide mit Molekulargewichten zwischen 1 bis 10 kD (HPLC-Analyse, SDS-Elektrophorese) das Epithel. Das Problem dieser Methode liegt darin, dass die vollständige Integrität des Darmepithels nicht nachweisbar ist¹⁶⁵.

¹⁶³ Prockop, D. et al., 1962

¹⁶⁴ Bronstein, H. D. et al., 1966

¹⁶⁵ Oesser, St. et al., 1999

Nachfolgend untersuchten OESSER ET AL.¹⁶⁶ die Wirkung von bovinem Kollagen I und II (nativ und hydrolysiert) und hydrolysiertem Weizenprotein auf die Kollagen II Biosynthese in bovinen Chondrozyten und dessen Sekretion in die extrazelluläre Matrix mit Hilfe eines ELISA Tests. Die dabei nachweisbare Kollagen II-Menge, die von bovinen Chondrozyten (Kontrollzellen) synthetisiert und sezerniert wurde, nahm in Abhängigkeit von der Kulturdauer zu. Nach Zellinkubation mit 0,5 mg/mL Kollagen I – Hydrolysat wurden signifikant höhere Kollagen II-Gehalte als in der Negativ-Kontrolle ermittelt. Diese stimulierende Wirkung war Konzentrations-abhängig, wobei die stärksten Effekte nach Inkubation mit 0,5 bis 5 mg/mL Kollagen I – Hydrolysat (MG 3,3 kD) ermittelt wurden. Eine vergleichbare Stimulierung der Kollagen II Synthese und Sezernierung wurde nach Inkubation mit 0,5 mg Kollagen I - (MG 1,9 kD) und Kollagen II - Hydrolysat (MG 3,1 kD) nachgewiesen. Hingegen bewirkte die Kultivierung der bovinen Chondrozyten mit 0,5 mg/mL Weizenprotein-Hydrolysat bzw. nativen Kollagenen im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung. Die Autoren folgerten, dass die intrazelluläre Kollagen II-Biosynthese boviner Chondrozyten durch extrazellulär vorliegende Kollagen-Fragmente (MG < 10 kD) stimuliert wird¹⁶⁶.

2.1.2.3.4 Pathologie

Ein atypischer Kollagen-Stoffwechsel ist vererbbar (Gen-Mutationen). Zu den erworbenen Veränderungen des Kollagen-Stoffwechsels gehören degenerative bzw. entzündliche Gelenkerkrankungen (Arthrose, Arthritis), die u. a. durch Übergewicht, Adipositas, wiederholte und starke mechanische Belastungen, Gelenkfehlstellungen, neuropatische Veränderungen oder Stoffwechselerkrankungen (u. a. Diabetes mellitus, Gicht, Fettstoffwechselstörungen) hervorgerufen werden. Die Rheumatische Arthritis ist vermutlich eine Autoimmunerkrankung, wobei der auslösende Mechanismus noch unbekannt ist¹⁶⁷. Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen dem Lebensalter und der Anzahl von Arthrosen nachgewiesen¹⁶⁸.

Eine Arthrose ist eine chronische Erkrankung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass an allen beteiligten Geweben des betroffenen Gelenks (Knorpel, Knochen, Bänder, Kapseln, Muskeln) Veränderungen zu beobachten sind. Aufgrund eines Initialschadens an der Knorpeloberfläche werden der Abbau von Kollagen und Proteoglycanen und die Einlagerung von Wasser begünstigt und Chondrozyten-Nekrosen beobachtet. Überlebende Chondrozyten lagern sich am Defektrand zu Cluster zusammen und bilden vermehrt extrazelluläre Matrix, welche mikroskopisch als azellulärer Bereich sichtbar ist. Diese Reparaturmechanismen verlaufen langsam, da der gefäßlose Knorpel ausschließlich durch die Gelenkflüssigkeit ernährt wird. Außerdem findet keine Zellregeneration statt, so dass die vorhandenen, differenzierten Chondrozyten die notwendige Regenerations-Promotorleistung erbringen müssen. Diese ist bei einer hohen Folge an Initialschäden zu gering, so dass die Knorpelzerstörung in tiefere Regionen fortschreitet sowie Entzündungen (Synovitis) verursacht. Dabei werden einerseits

¹⁶⁶ Oesser, St. et al., 2003

¹⁶⁷ Löffler, G. & Petrides, P. E., 1997, Kraus, Ch. & Schwarz, E., 2001

¹⁶⁸ Kasper, H., 2003

lysosomale Enzyme freigesetzt, die den Kollagenabbau begünstigen und andererseits wird die Knorpelernährung beeinträchtigt, wodurch die Stoffwechselaktivität der vorhandenen Chondrozyten abnimmt. Die Funktionsfähigkeit des Knorpels ist in dieser Phase stark eingeschränkt. Nimmt die Knorpelzerstörung weiter zu, so führt dies letztendlich zu Veränderungen am subchondralen Knochen und es kommt zu Gelenkdeformierungen¹⁶⁹.

2.1.2.4 Wirkungen in biologischen Systemen

1950 wurde durch TYSON¹⁷⁰ nachgewiesen, dass eine tägliche Gelatine-Zufuhr ein gestörtes Nagelwachstum (gebrochene, splinternde Nägel) korrigiert. Diese Ergebnisse wurden 1957 durch ROSENBERG ET AL.¹⁷¹ bestätigt. Aufgrund dessen wurde zunächst vermutet, dass Gelatine auch auf andere Keratin-haltige Gewebe (Haare, Haut) einen stabilisierenden Einfluss ausübt. 1976 wiesen SCALA ET AL.¹⁷² in zwei aufeinander folgenden Studien (Sommer- und Winterperiode) einen zunehmenden Kopfhaarwuchs (Länge, Dichte, Dehnbarkeit) durch langfristige Gelatinezufuhr (14 g Gelatine pro Tag, 62 Tage) nach. 1984 bestätigten MORGANTI ET AL.¹⁷³ diese Ergebnisse durch orale Zufuhr eines Gelatine-Cystin-Gemisches. In einer weiteren Studie wurde 1990 eine Verbesserung der Hautqualität (Feuchtigkeit und Elastizität) aufgezeigt. Die Autoren folgerten, dass diese Wirkung vermutlich auf eine gesteigerte Kollagen-Biosynthese zurückzuführen sei¹⁷⁴.

Nachfolgend wurden in verschiedenen Ländern unterschiedliche Humanstudien (s. Tabelle 2-18 bis Tabelle 2-20) durchgeführt, die den Einfluss der oralen Zufuhr von Kollagenhydrolysaten oder Gelatine auf die Entwicklung degenerativer Gelenk- (Arthrose, Arthritis, Rheumatische Arthritis) und Knochen-Erkrankungen (Osteoporose) untersuchten. Es wurde jeweils ein positiver Einfluss von Kollagen-Hydrolysat bzw. Gelatine auf die untersuchten Parameter (u. a. Schmerz-Score, Gelenkbeweglichkeit, Bindegewebsfestigkeit) nachgewiesen und gleichzeitig wurden keine unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet. Aufgrund dessen wurde eine langfristige Einnahme dieser Kollagen-, Gelatine-Präparate empfohlen, die die Knorpelzerstörung verhinderte oder zumindest hemmte. Da die nachgewiesenen positiven Wirkungen vom Vorhandensein stoffwechselaktiver Chondrozyten abhängig waren (s. auch 2.1.2.3.4), wurde ein frühzeitiger Beginn der Kollagenhydrolysat bzw. Gelatine-Substitution empfohlen¹⁷⁵.

Der Mechanismus der in den Humanstudien nachgewiesenen chondroprotektiven Wirkung von Gelatine/Kollagenhydrolysaten ist derzeit noch unbekannt. Zunächst wurde vermutet,

¹⁶⁹ Bruns, J. & Steinhagen, J., 2000

¹⁷⁰ Tyson, T. L., 1950

¹⁷¹ Rosenberg, S. et al., 1957

¹⁷² Scala, J. et al., 1976

¹⁷³ Morganti, P. & Randazzo, S. D., 1984

¹⁷⁴ Morganti, et al., 1990

¹⁷⁵ Oberschelp, U. 1985, Seligmüller, K. & Happel, 1989, Adam, M., 1991, Seeligmüller, K. & Happel, 1993, Trentham, D. E. et al., 1993, Moskowitz, R. W., 2000, Weh, L. & Petau, C., 2001

dass die Beseitigung eines Mangels an Kollagen-spezifischen Aminosäuren (u. a. HyPro) diese positive Wirkung verursacht hätte. Dem steht jedoch gegenüber, dass Hydroxyprolin nicht reutilisiert werden kann (s. 2.1.2.3.3). Aufgrund dessen vermuten OESSER ET AL.¹⁶⁶, dass bioaktive Peptide diese positive Wirkung verursachten, worauf auch die Zellkulturstudien von DING ET AL.¹⁷⁶ hinwiesen. In diesen Studien wurde die Wirkung von oral zugeführtem bovinem Kollagen II auf Ratten untersucht (Model für humane Rheumatische Arthritis). Dazu wurde die Schwellung des rechten Knöchels ausgewertet und die Produktion von Entzündungsmediatoren (IL-1, TNF, NO, Malondialdehyd) in kultivierten Synovialzellen (Fibroblasten) untersucht. Die Kollagen II - Zufuhr reduzierte Dosis-abhängig die Schwellung des rechten Knöchels im Vergleich zur Kontrollgruppe und hemmte in den entsprechenden Synovialzellen die Produktion der Entzündungsmediatoren¹⁷⁶.

Bemerkenswert sind die Ergebnisse weiterer Zellkulturstudien, in denen die Produktion der Entzündungsmediatoren in Synovialzellen gesunder Kontroll-Ratten nach Inkubation mit Kollagen II nicht beeinflusst wurde. Eine Synthese-Hemmung war jedoch auch in diesen Zellen induzierbar, nach Inkubation mit Blutserum der mit Kollagen gefütterten, kranken Ratten sowie durch Ko-Inkubation mit Peyer´s Patches Zellen. Es wurde geschlussfolgert, dass dieser Effekt durch TGF- β verursacht wurde, welches in Peyer´s Patches Zellen aufgrund einer Inkubation mit Kollagen II produziert und über die Blutbahn in den Knorpel transportiert wurde. Diese Hemmung wurde durch TGF- β Antikörper antagonisiert¹⁷⁷.

Die chondroprotektive Wirkung von Gelatine/Kollagenhydrolysaten sowie anderer Kollagenbestandteilen (Glucosamine, Chondroitin-Sulfat u.a.)¹⁷⁸ ist insbesondere deshalb von großem Interesse, da für die degenerativen und entzündlichen Gelenk- und Knochenerkrankungen keine kausalen, sondern Symptom-bezogene Therapien existieren (u. a. physikalische Therapie, Schmerzlinderung, Dämmung von Entzündungen, Reduzierung von Übergewicht) sowie die Injektion chondroidaler Bestandteile in das Gelenk oder Operationen. Da die Medikamente langfristig katabole Nebenwirkungen auf den Bindegewebe- und Gelenkknorpelstoffwechsel zeigten, eignen sich diese nur zur Behandlung akuter Beschwerden¹⁷⁹.

Infolge der Humanstudien-Ergebnisse wurde von der Firma GELITA Health Products GmbH 2004 ein flüssiges Kollagen-Hydrolysat (30 x 10 g / 25 mL) mit dem Markennamen „CH alpha[®]“ auf den Markt gebracht. Es wird empfohlen, dieses Präparat mindestens 3 Monate täglich (á 25 mL) einzunehmen, um dadurch einem Knorpelverschleiß vorzubeugen sowie die Knorpelregeneration bei Alters- oder Belastungs-bedingtem Verschleiß zu unterstützen¹⁸⁰.

¹⁷⁶ Ding, C. H. et al., 2003

¹⁷⁷ Ding, C. H. et al., 2003, Vgl. auch: Arend, W. P., 2001

¹⁷⁸ Deal, Ch. L. & Moskowitz, R. W., 1999, Houpt, J. B. et al., 1999, Towheed, T. E., 1998

¹⁷⁹ Petzold, E. et al., 1985

¹⁸⁰ Produktinformation der Firma GELITA Health Products GmbH

Tabelle 2-18: Untersuchung (in vivo) der Wirkung von Gelatine, -hydrolysaten (I) auf den Verlauf verschiedener degenerativer Gelenkerkrankungen.

Literatur	Studiendesign	Untersuchte Parameter	Ergebnisse in der Gruppe mit Testsubstanz Einnahme	Schlussfolgerung
1985, Ober-schelp et al.	<p>Deutschland Vergleichende Studie, Probanden: 154 mit (I) Chondropathia patella (II) Kox-, Gonarthrosen, (III) Juveniler Aufbaustörung der Wirbelsäule Alter: (I) Ø 23, (II) Ø 51, (III) Ø 20 Jahre Testsubstanz: 1 Beutel/d Gerontamin® aus Gelatine, L-Cystin, Retinolacetat Unterteilung der Gruppen (I) – (III): (A): Physikalische Therapie (B): PT + Gerontamin® (C): Gerontamin® Dauer: 3 Monate</p>	<p>Gruppen (I) – (III): Schmerz-Score sowie (I): Gelenkbeweg- lichkeit und Reibe- geräusche u. a. (II): Gelenk- beweglichkeit (III): allgemeine Beweglichkeit, Rundrücken etc.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Deutliche Schmerz- Reduzierung sowie Erhöhung der Beweglichkeit nach Einnahme von Gerontamin® • Vergleichbare, positive Behandlungserfolge in Gruppe B und C • Keine unerwünschten Nebenwirkungen 	<ul style="list-style-type: none"> • Gerontamin® wirkt bei jungen und älteren Probanden gleichermaßen schmerzlindernd und erhöht die Beweglichkeit. Die physikalische Therapie bringt diesbezüglich keine Vorteile im Vergleich zur Gerontamin® Zufuhr.
1989, Seelig-müller und Haspel	<p>Deutschland Probanden: 356 mit Gon-, Cox-, Polyarthrosen, Osteoporose Testsubstanz: 7 g Gela-Faban®/Tag (Gelatine + L-Cystin) Dauer: 3 – 6 – 12 Monate</p>	<p>Schmerz-Score Veränderung des Medikamentenver- brauchs (Anti- rheumatika u. a.) Beweglichkeit der Gelenke</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Reduzierung der Schmerzen und des Medikamenten- Verbrauchs, Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit, Keine unerwünschten Nebenwirkungen 	<ul style="list-style-type: none"> • Eine langfristige Zufuhr des Kombinations- präparates wirkt günstig auf den Krankheits- verlauf, ist möglich, da keine unerwünschten Nebenwirkungen auftreten.

Tabelle 2-19: Untersuchung (in vivo) der Wirkung von Gelatine, -hydrolysaten (II) auf den Verlauf degenerativer Gelenkerkrankungen

Literatur	Studiendesign	Untersuchte Parameter	Ergebnisse in der Gruppe mit Testsubstanz-Einnahme	Schlussfolgerung
1991 Adam et al.	Tschechoslowakei Randomisierte Doppel-Blind-Studie, Probanden: 81 (52) mit Arthrose Alter: Ø 56 Jahre Testsubstanz/d: 10 g TS / 20 Tabletten a) Kollagen-Hydrolysat b) Gelatine-Hydrolysat c) Gelatine+ L-Glycin+CaHPO ₄ d) Hühnerweiß Dauer: 2 * 60 Tage + 2 Monate Behandlungsfreie Zeit	<ul style="list-style-type: none"> Schmerz-Score mit 13 verschiedenen Beschwerden-Zeichen Verbrauch von Analgetika / Antiphlogistika Blut-Analyse: u. a. Kollagen-Antikörper titer Röntgenologische Untersuchungen 	<p>Testsubstanzen a)- c):</p> <ul style="list-style-type: none"> Schmerz-Reduktion Reduktion des Medikamenten Verbrauchs Marginale Gewichtsreduktion Kein Einfluss auf Blutparameter und röntgenologische Befunde Keine Nebeneffekte <p>Testsubstanz D:</p> <ul style="list-style-type: none"> Keine Veränderungen 	<p>Wirkung von Testsubstanzen a)- c):</p> <ul style="list-style-type: none"> ist vergleichbar, führt zur signifikanten Verbesserung des Krankheitsbildes (Arthrose). <p>Testsubstanz d)</p> <ul style="list-style-type: none"> zeigt keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf.
1993 Trentham, et al.	USA Randomisierte Doppel-Blind-Studie, Probanden: 60 (59) mit Arthritis Alter: Ø 50 Jahre Testsubstanz / d: 0,1 – 0,5 mg Gelatine Dauer: 3 Monate	<p>Bestimmung der</p> <ul style="list-style-type: none"> Anzahl geschwollener, entzündeter, schmerzender Gelenke. Notwendigen Gehzeit für 15 m. 	<ul style="list-style-type: none"> Signifikante Reduzierung der Beschwerden der Gehzeit. Keine Nebeneffekte: Kollagen II löst keine Allergie aus 	<p>Gelatine zeigt einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Rheumatischen Arthritis.</p>
1993, Seelig-müller et al.	Deutschland Randomisierte Doppel-Blind-Studie, Probanden: 519 (359) mit (Poly-) Arthrose Alter: Ø 52 Jahre Testsubstanz: 7 g Granulat / Tag aus 1,8 g L-Cystein und 98,2 g Gelatine pro 100 g Dauer: 6 – 15 Monate	<ul style="list-style-type: none"> Schmerz-Score Messung der maximalen Gehstrecke. 	<ul style="list-style-type: none"> Reduzierung des mittleren Schmerz-Scores und dessen Spannweite Verlängerung der maximalen Gehstrecke Nebeneffekte nur bei 7 Patienten: Übelkeit, Erbrechen, Soor-Befall u. a. 	<ul style="list-style-type: none"> Die Kombination aus L-Cystein und Gelatine beeinflusst den Kollagen-Stoffwechsel positiv. Möglichst frühzeitiger Therapie-Beginn nötig.

Tabelle 2-20: Untersuchung (in vivo) der Wirkung von Gelatine, -hydrolysaten (III) auf den Verlauf degenerativer Gelenkerkrankungen und die Festigkeit von Bindegewebe.

Literatur	Studiendesign	Untersuchte Parameter	Ergebnisse in der Gruppe mit Testsubstanz-Einnahme	Schlussfolgerung
1996, Adam et al. aus 2000, Moskowitz et al. (Review)	Tschechoslowakei Randomisierte Doppel-Blind-Studie, Probanden: 121 (94) Frauen mit Osteoporose Alter: > 40 Jahre (postmenopausal) Testsubstanz: Calcitonin (intra muscular verabreicht) Calcitonin + 10 g Kollagen-Hydrolysat Laktose 6 Monate Placebo: Dauer:	<ul style="list-style-type: none"> • Urin Status: (Desoxy-, Pyridinolin, Ca^{2+}, P) • Röntgen: rechter Unterarm, Kreuzbein • Knochendichtemessung: rechter Unterarm • Blutserum: u. a. Ca^{2+} 	<ul style="list-style-type: none"> • (Desoxy-) Pyridinolin-Ausscheidung sinkt in beiden Gruppen, jedoch signifikant stärker nach Einnahme von Calcitonin + Kollagen-Hydrolysat, • Keine signifikanten Unterschiede bezüglich röntgenologischer und Dichtegradienten Untersuchungen 	<ul style="list-style-type: none"> • Oral zugeführtes Kollagen-Hydrolysat hemmt den Kollagenabbau stärker als die alleinige Calcitonin Gabe
2000, Moskowitz et al. (Review)	USA, Großbritannien, Deutschland Randomisierte Doppel-Blind-Studien Probanden: 389 mit Osteoarthritis Alter: 45 – 80 Jahre Testsubstanz: 10 g Kollagen-Hydrolysat/Tag Fruktose u. a. 24 + 8 Wochen Placebo: Dauer:	<ul style="list-style-type: none"> • Schmerz-Score • Bewegungs-, Funktions-Score • Allgemeines Befinden der Probanden 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine signifikanten Veränderungen in USA, GB, jedoch • Signifikante Reduzierung der Schmerzen und Verbesserung der Beweglichkeit in Deutschland • Nebenwirkungen: u. a. Übelkeit, Erbrechen 	<ul style="list-style-type: none"> • Unerklärliche Unterschiede zwischen den Ländern • Große Effekte bei Probanden, die vor der Studie besonders starke Beschwerden aufwiesen
2001, Weh et al.	Deutschland Probanden: 24 mit Bindegewebsschwäche Alter: Ø 47 Jahre Testsubstanz: 10 g Gelatine-Hydrolysat/Tag Kein Placebo Dauer: 6 Monate	<ul style="list-style-type: none"> • Messungen mit einem Finger-Hyperextensometer: maximaler Winkel, relatives Integral der Regressionskurve 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine signifikante Änderung des max. Winkel • Signifikante Zunahme des Integrals im Vergleich zur Ausgangssituation 	<ul style="list-style-type: none"> • Die Bindegewebe-Festigkeit nimmt zu, durch orale Gelatine Zufuhr.

2.2 Morphologie und Funktion des Intestinaltrakts

Nahrung wird in der Mundhöhle beim Kauen mit Speichel vermischt und grob zerkleinert. Der gleitfähige Bolus wird durch den Schluckakt über den Rachen und die Speiseröhre in den Magen transportiert und dort mit dem Magensaft vermischt und innerhalb von 0,5 bis 6 h weiter zerkleinert auf Partikelgrößen <2 mm. Der Chymus wird über den Magenpförtner portionsweise (70 bis 100 mL) in den Dünndarm entlassen. Innerhalb von 7 bis 9 h werden die enthaltenen Makromoleküle durch luminale und Bürstensaum-Enzyme zu Mono- bis Oligomeren hydrolysiert, die zusammen mit anorganischen Ionen und Wasser vom intestinalen Epithel resorbiert und nachfolgend über Blut- und Lymphbahnen im Organismus verteilt werden. Unverdaute Reste gelangen in den Dickdarm, verbleiben dort 12 bis 120 h, werden über den Mastdarm zum After transportiert und ausgeschieden (s. Abbildung 2-4).

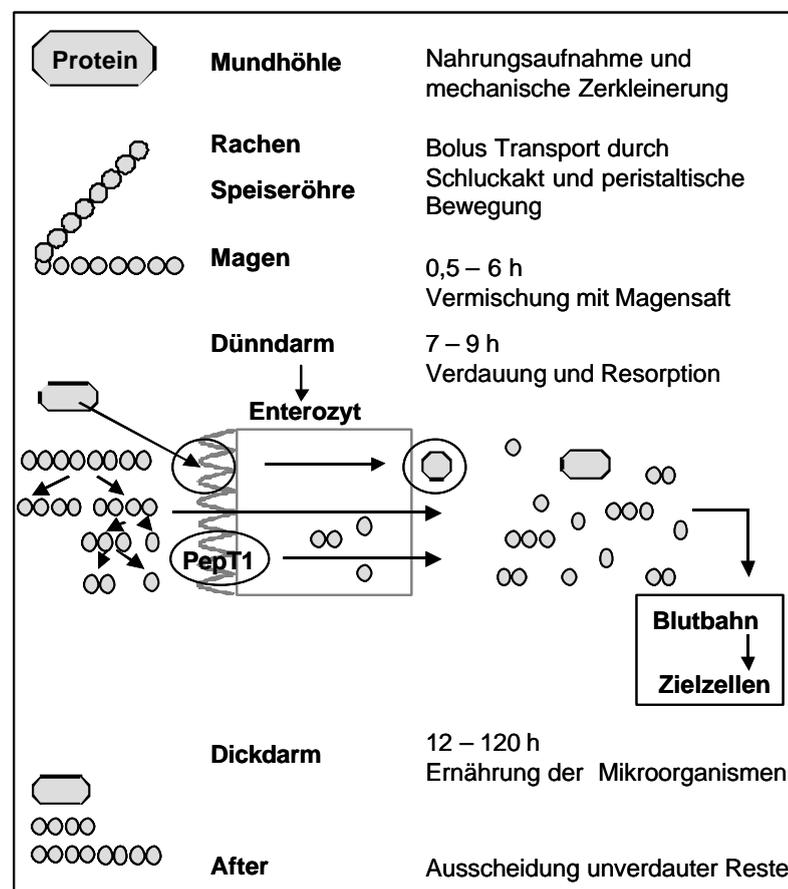


Abbildung 2-4: Peptid-Verdauung

Die Verdünnung der Nahrungsbestandteile durch Verdauungssäfte wurde von BORGSTROM ET AL.¹⁸¹ untersucht, indem Probanden eine definierte Protein-, Fett- und Kohlenhydrat-haltige Testmahlzeit verabreicht wurde. Anschließend wurde ermittelt, dass die Nahrungsbestand-

¹⁸¹ Borgstrom, B. et al., 1957

teile in Intervallen innerhalb von 4 h aus dem Magen in den Dünndarm entlassen wurden und dort um einen geschätzten Faktor von 4 bis 5 verdünnt vorlagen¹⁸¹.

Die komplexen Funktionen des Gastro-Intestinaltrakts (GIT: Motilität, Sekretion, Resorption, Zellproliferation, –differenzierung, Immunkompetenz) werden durch das Zusammenspiel von Nerven und (Gewebs-) Hormonen geregelt und sind noch nicht in allen Details bekannt. Es ist außerdem zu beachten, dass die in den nachfolgenden Unterkapiteln aufgeführten Erkenntnisse aus *in vitro*-Studien stammen und unter Einsatz von aufgereinigten Enzymen bzw. Einzel-Proteinen, mit Zellen oder Vesikeln verschiedener Gewebe sowie aus Tierversuchen gewonnen wurden¹⁸².

2.2.1 Abschnitte und Wandschichten

Der Darm (Intestinum) ist ein schlauchförmiges Hohlorgan, welches in Dünn- und Dickdarm unterteilt wird. Der Dünndarm hat eine Länge von 3 bis 4 m (*in vivo*) bzw. von 6 bis 8 m im entspannten Zustand (*post mortem*) und besteht aus den Abschnitten Zwölffingerdarm (Duodenum: 20 bis 30 cm), Leerdarm (Jejunum: 1,5 bis 2,5 m) und Hüft darm (Ileum: 2 bis 3 m). Es schließt sich der Dickdarm (1,5 bis 1,8 m) an, bestehend aus Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Colon ascendens, transversum und descendens), Sigmoid (colon sigmoideum) und Mastdarm (Rectum)¹⁸³.

Wird der Gastro-Intestinaltrakt im Querschnitt betrachtet, so unterteilt sich dieser von außen nach innen in vier verschiedene Wandschichten: Tela serosa (Bindegewebe), Tunica muscularis (Muskelgewebe) mit äußerem Stratum longitudinale und innerem Stratum circulare (dazwischen liegt die Fibrae obliquae, die nur im Magen existiert), Tela submucosa (Kollagen- und elastische Fasern, mit Meissner- und Auerbach-Plexus, Immunzellen und Brunner-Drüsen). Es schließt sich die Tunica mucosa (Schleimhaut) an, mit der Lamina muscularis mucosae (schraubenförmig verlaufende glatte Muskulatur), der Lamina propia mucosae (retikuläres Bindegewebe, u. a. mit Immunzellen, Blut- und Lymphgefäßen) und der Lamina epithelialis mucosae, welche das Lumen auskleidet.

¹⁸² Alpers, D. H., 1987, Van Dyke, R. W., 1989

¹⁸³ Stevens, A., 1997

2.2.2 Oberflächenvergrößerung

Im Dünndarm, dem Hauptresorptionsort der Nahrungsbestandteile, befinden sich morphologische Besonderheiten zur Oberflächenvergrößerung: Die Plicae circulares (Kerckring-Falten) sind ca. 1 cm hohe Falten der Telae submucosa und mucosa. Von diesen Falten erheben sich 0,5 bis 1,5 mm hohe und ca. 0,15 mm dicke, blattartige bis fingerförmige Ausstülpungen der Laminae propria und muscularis mucosae ins Darmlumen, die Zotten (Villi). In die Täler zwischen den Zotten senken sich die Lieberkühnschen Krypten in die Tiefe (200 bis 400 μm), bis zur Lamina muscularis mucosae. Zotten und Krypten sind von einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel überzogen, dessen Zellen (u. a. Enterozyten), an ihrer luminalen Seite Ausstülpungen der Zellmembran (700 – 3000 pro Zelle) aufweisen, die Mikrovilli. Diese sind 0,5 bis 1,5 μm lang und ca. 0,15 μm breit¹⁸⁴.

Die Oberflächenvergrößerung ist im Duodenum am stärksten ausgeprägt. Die Anzahl und Höhe der Falten, Zotten und Mikrovilli nimmt vom Jejunum zum Ileum ab. Im Gegensatz dazu nimmt die Tiefe der Krypten zu. Dies setzt sich im Colon fort, wo keine Zotten mehr beobachtet werden¹⁸⁵. Aufgrund dieser Veränderungen ist die genaue Kontaktoberfläche des Dünndarms nicht bestimmbar. Im Vergleich zu einem gedachten Zylinder (l: 280 cm, \varnothing 4 cm) wird die Oberfläche ca. 600-fach vergrößert, dies entspricht einer Oberfläche des Dünndarms von 200 bis 400 qm ¹⁸⁶.

2.2.3 Intestinales Epithel – Barriere zwischen Darmlumen und Organismus

Das einschichtige Darmepithel integriert unterschiedliche Zelltypen, die durch Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden sind. In den Krypten werden Stamm-, Paneth-, endokrine sowie Becherzellen beobachtet. Das Zottenepithel wird größtenteils durch absorbierende Enterozyten gebildet, sowie aus mucus-sezernierenden Becherzellen, entero-endokrinen Zellen und Epithel-assoziierten Immunzellen, z. B. Lymphozyten. In den Bereichen, in denen das Epithel die Peyer's Plaques überzieht, werden Antigen transportierende M-Zellen (*microfold*-Zellen) beobachtet¹⁸⁷.

Die zur Zellteilung befähigten Stammzellen des Dünndarmepithels sind in den Lieberkühnschen Krypten angesiedelt. Ein Teil dieser undifferenzierten Zellen verbleibt in der G_0 -Phase des Zellzyklus, differenziert und migriert innerhalb von 3 bis 6 Tagen zur Zottenspitze. Die

¹⁸⁴ Kühnel, W., 1999, Trier, J. S., 1989

¹⁸⁵ Kühnel, W., 1999, Trier, J. S., 1989

¹⁸⁶ Rehner, G. & Daniel, H., 2002, Schmidt, R., 1993

¹⁸⁷ Trier, J. S., 1989, Madara, J. L., 1987

reifen Enterozyten unterliegen einem hohen *turnover* und werden aufgrund von Apoptose nach 48 bis 72 h ins Darmlumen entlassen¹⁸⁸.

2.2.3.1 Enterozyten

Reife Enterozyten sind hochprismatische Zellen (Höhe: 15 - 30 μm , Breite: 5- 10 μm), mit basalem Zellkern. Im Zytoplasma liegen u. a. Mitochondrien, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Reticulum, Ribosomen, Lysosomen, Mikrotubuli. Es sind polarisierte Zellen, deren basolaterale Membran (7 bis 9 nm) über die lamininhaltige Basalmembran (ca. 30 nm) die Verbindung zur Lamina propria mucosae, mit den Blut- und Lymphgefäßen, und somit zum Inneren des Organismus, herstellt. Die apikale Zellmembran (10 bis 11 nm) besteht aus drei laminaren Schichten und ragt als Bürstensaum (*brush border*: ca. 1,5 μm) ins Darmlumen. Der Bürstensaum besteht aus Mikrovilli (700 bis 3000 pro Zelle), den blatt- bis fingerförmigen 0,5 bis 1,5 μm langen und ca. 0,15 μm breiten Ausstülpungen der Membran. Jeder Mikrovillus enthält Aktinfilamente (kontraktile Strukturen), die in einem komplexen Maschenwerk aus Intermediärfilamenten (terminales Netz bzw. perijunktionaler Aktin-Myosinring) des apikalen Zellpols verankert sind.

Die Mikrovilli werden von der Glykokalix und einer dünnen Wasserschicht (*unstirred water-layer*) überzogen. Die Glykokalix ist (*in vivo*) resistent vor enzymatischem Abbau, wird von Endothelzellen produziert und enthält Filamente, die in Verbindung mit der Zellmembran stehen, sowie verschiedene funktionelle Proteine wie Bürstensaumenzyme (z. B. Glucosidasen, Galactosidasen, Peptidasen, alkalische Phosphatase, Desoxyribonucleasen und Ribonucleasen) und Rezeptoren (z. B. für den Cobalamin-Intrinsic-Faktor, Gallensalze oder Fettsäuren). Das Vorhandensein dieser funktionellen Proteine (Differenzierungsmerkmale) nimmt von der Krypten- zur Zottenregion zu¹⁸⁹.

2.2.3.2 Zell-Zell-Verbindungen

Benachbarte Epithelzellen bilden lateral netzförmige Haftsysteeme (Zell-Zellkontakt-Komplexe) aus: 0,2 bis 0,5 μm unter dem apikalen Zellpol, auf Höhe des terminalen Netzes (des perijunktionalen Aktin-Myosinrings) werden *tight junctions* (Zonula occludens) elektronenmikroskopisch beobachtet, die dort ein 100 bis 600 nm tiefes zirkumferenzielles Band ausbilden. In lateraler Richtung schließen sich die Zonula adhaerens und Desmosomen an, die für die mechanische Stabilität des Endothels verantwortlich sind. Die Breite der Zellzwischenräume ist vom Flüssigkeitsfluss und osmotischen Gradienten zwischen dem intestinalen Lumen und der Serosa abhängig und variiert zwischen 0,03 bis 3 μm . Hemidesmosomen hingegen befestigen die Zellen auf extrazellulärer Matrix (Basalmembran)¹⁹⁰.

¹⁸⁸ Kühnel, W., 1999, Rehner, G. & Daniel, H., 1999

¹⁸⁹ Kühnel, W., 1999, Trier, J. S., 1989, Madara, J. L., 1987, Rehner, G. & Daniel, H., 1999

¹⁹⁰ Madara, J. L., 1987

2.2.3.2.1 Molekularer Aufbau von *tight junctions*

Die Hypothese, dass *tight junctions* aus zylindrischen Lipidmizellen bestehen, wurde zumindest teilweise widerlegt¹⁹¹. Die benachbarten Epithelzellen kontaktieren extrazellulär über transmembrane Proteine (Occludine) miteinander. Diese sind intrazellulär über periphere Adapterproteine mit dem Zytoskelett (insbesondere Aktinfilamente) verbunden und kontaktieren außerdem mit verschiedenen Signalproteinen (s. Abbildung 2-5 u. Tabelle 2-21).

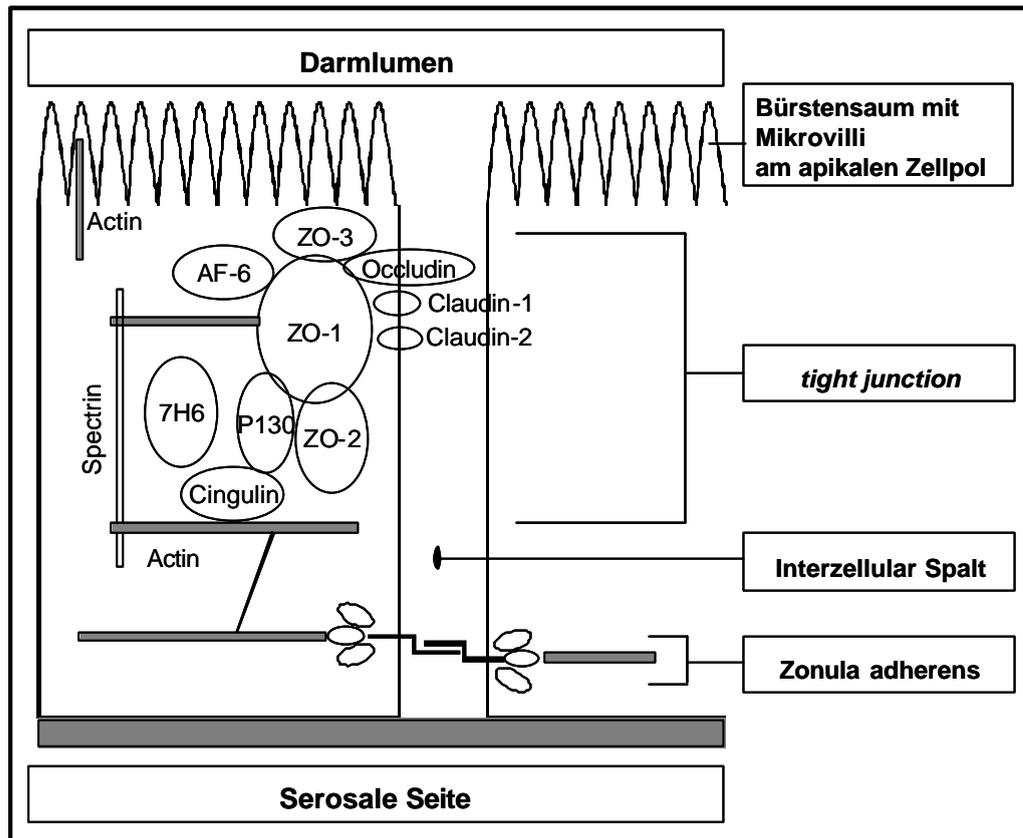


Abbildung 2-5: Modell des molekularen Aufbaus von *tight junctions*, dargestellt für eine von zwei benachbarten Zellen.

(Darstellung modifiziert nach CITI, unter Einbeziehung von GASBARRINI & MONTALTO; MADARA; MATTER & BALDA; STEIN & KROTTA¹⁹²).

Aufgrund der intrazellulären Kontakte üben *tight junctions* einen regulativen Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung aus. Die Bildung der *tight junctions* ist abhängig von der Verfügbarkeit von Uvomorulin (L-CAM), einem Protein der Zonula adhaerens, und von einer spezifischen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (die durch Calcium-Chelatoren manipulierbar ist). Proliferierende Enterozyten synthetisieren und speichern *tight junctions*-Vorläufer-

¹⁹¹ Stein, J. & Krotta, G., 1997

¹⁹² Citi, S., 1994, Gasbarrini, G. & Montalto, M., 1999, Madara, J. L., 1987, Matter, K. & Balda, S., 2003, Stein, J. & Krotta, G., 1997

proteine, die zu einem späteren Zeitpunkt durch (eine) Protease(n)¹⁹³ gezielt gespalten werden und sich zur funktionellen Einheit zusammenlagern (unter Aufwendung von Energie)¹⁹². Das extrazelluläre Occludin-Netzwerk bildet Poren, deren Stränge negative Ladungen tragen. Das Netz verhindert die Passage von Makromolekülen (> 1,9 kD im Rattenepithel¹⁹⁴) aus dem Lumen in den Organismus und ist selektiv permeabel für wasserlösliche, niedermolekulare Substanzen. Die Passage positiv geladener und neutraler Moleküle wird gegenüber der von negativ geladenen Molekülen begünstigt¹⁹⁵.

Tabelle 2-21: *Tight junctions*-assoziierte Proteine und deren charakteristische Merkmale

(Eigene Darstellung nach GASBARRINI & MONTALTO; MATTER & BALDA; STEIN & KROTTA¹⁹⁶).

Transmembranale Proteine	Adapterproteine	Signalproteine
Occludin (65 kD) * 504 Aminosäure, * 2 extrazelluläre Schleifen, * 4 hydrophobe, transmembrane Helices, * N- und C-terminales Ende im Zytoplasma	Zonula occludens Proteine * sind membranassoziiert: ZO-1 (220 kD): * 2 Isoformen Vorkommen in verschiedenen Zelltypen * Verbindung zum Zytoskelett * Signalprotein ZO-2 (160 kD): * Guanylat-Kinase Aktivität ZO-3 (130 kD)	Cytosolische GTPasen rab 13 (24 kD), rab 3 B (25 kD), Rho A (?) * Regulation der <i>tight junctions</i> -Bildung Protein Kinasen A+C Phospholipasen u. a.
Claudin-1 und -2 (33 kD) * 4 transmembrane Helices	Protein- 130 (130 kD) * Bindung mit ZO-1 und -2 wahrscheinlich 7H6-Antigen (155 kD) * Entfernung von Plasmamembran: 40 nm Cingulin (108 - 230kD) * Entfernung von Plasmamembran: 40 - 60 nm * Nachweis in allen polarisierten Epithelzellen * Verbindung zwischen <i>tj</i> und Zytoskelett AF-6 (180/195 kD) * 2 Isoformen * Aufgabe: Modulation der ZO-1 Funktion	

Die Struktur der *tight junctions* ist in allen Darmregionen gleich, jedoch die Anzahl der Stränge und die Tiefe des zirkumferenziellen Bandes nimmt im Dünndarm von proximal nach distal sowie von der Krypten- zur Zottenregion zu. Der Porenradius nimmt vom Jejunum in Richtung Colon ab¹⁹⁷. *Tight junctions* sind dynamische Strukturen, die sich aufgrund von intra- oder extrazellulären Einflüssen verändern. Eine Erhöhung der Porendichtigkeit wird nach Auftreten intraluminaler Noxen beobachtet. Dagegen wird eine verringerte Strangzahl

¹⁹³ Bacher, A. et al., 1992

¹⁹⁴ Phillips, T. E. et al., 1987

¹⁹⁵ Knipp, G. T. et al., 1997, Pauletti, G. M. et al., 1996

¹⁹⁶ Verändert nach: Gasbarrini, G. & Montalto, M., 1999, Matter, K. & Balda, S., 2003, Stein, J. & Krotta, G., 1997

¹⁹⁷ Madara, J. L., 1987, Stein, J. & Krotta, G., 1997

ermittelt, wenn Leukozyten das Epithel permeieren¹⁹⁸ und Neurotransmitter bewirken eine zunehmende Öffnung der Poren¹⁹⁹.

2.2.3.2.2 Parazelluläre Permeabilität

Die parazelluläre Permeabilität ist ein Maß für die Fähigkeit hydrophiler Substanzen das intestinale Epithel (Zell-Monolayer) durch *tight junctions*-Poren zu passieren und wird durch Einsatz niedermolekularer, hydrophiler Markersubstanzen oder Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz bestimmt (s. 2.4.2.2). Diese basiert auf einem transmembranalen Na⁺-Konzentrationsgradienten (s. Abbildung 2-8), der in gesunden Zellen aufgrund eines trans-mucosalen Konzentrations-, und/oder osmotischen Gradienten (*solvent drag*) aufrechterhalten wird. Die Natrium Kationen werden anschließend durch aktiven Ionentransport (Na⁺/K⁺-ATPase) in die Zelle aufgenommen.

Die Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz erfolgt durch Anlegen eines Wechselstroms an das Zellsystem und die Änderung der Stromstärke wird mit Elektroden detektiert. Nachfolgend wird unter Anwendung des Ohmschen Gesetzes der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) berechnet²⁰⁰. Dieser korreliert negativ mit der parazellulären Permeabilität und ist ein Maß für das Vorhandensein von *tight junctions* und deren Porendichtigkeit. Experimentell ist nachgewiesen, dass der hohe elektrische Widerstand von Zellmembranen keinen Einfluss auf die Höhe des TEER hat. Dieser wird durch die Anzahl und Struktur der *tight junctions* determiniert: Bei arithmetischer Zunahme von *tight junctions*-Strängen steigt der parazelluläre Widerstand logarithmisch an²⁰¹. Die Höhe des TEER (der parazellulären Permeabilität) nimmt im Dünndarm von proximal nach distal zu (ab)²⁰².

Die komplexen Mechanismen zur Regulation von Struktur und Funktion der *tight junctions* sind Gegenstand derzeitiger Forschungen. Es wurden verschiedene (bio-)chemische Faktoren identifiziert, die auf unterschiedliche *tight junctions*-Komponenten modulierend wirkten. Eine erhöhte parazelluläre Permeabilität wurde beobachtet nach²⁰³:

- **Kontraktion des perijunctionalen Aktin-Myosinrings** (Caco-2 Zellen, MDCK), die verursacht wurde u. a. durch:
 - * intrazellulär vorliegende, divalente Kationen und ATP,
 - * Inhibitoren der Tyrosinphosphatase, z. B. Vanadat.
- **Depolymerisation von Aktin (Caco-2 Zellen, T84, MDCK) verursacht durch:**
 - * Cytochalasin B und D,
 - * Pflanzenzytokine,
 - * Phalloidin.

¹⁹⁸ Madara, J. L., 1987, Gumbiner, B. M., 1993

¹⁹⁹ Phillips, Th. E. et al., 1987

²⁰⁰ Armstrong, W. M., 1987

²⁰¹ Madara, J. L., 1987

²⁰² Schmidt, R., 1993

²⁰³ Gasbarrini, G. & Montalto, M., 1999, Matter, K. & Balda, S., 2003, Stein, J. & Krota, G., 1997

- **Direkte/indirekte Aktivierung der Proteinkinase C (verschiedene Epithelzellen, Caco-2 Zellen, T84) verursacht durch:**
 - * Aktivatoren der PKC: Phorbolster, Vasopressin, Angiotensin II u. a.
 - * hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration
 - * Pathogene: Vibrio Cholera (ZO-Toxin).
- **reduzierte Occludin-Synthese aufgrund der induzierten NO-Synthase Expression (in Caco-2 Zellen, T84, MDCK) durch:**
 - * NO-Donatoren
 - * NO-freisetzende Faktoren: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β .

MA ET AL.²⁰⁴ wiesen an Caco-2 Monolayern nach, dass durch Cytochalasin B (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zerstörte Aktin-Myosinfilamente durch intrazellulär vorliegende Proteine unter Energieaufwand regeneriert wurden. Dazu war keine Protein-Neusynthese notwendig. Die gezielte, reversible Öffnung von *tight junctions*-Poren wurde u. a. durch Einsatz von Gallensäurederivaten (z. B. Cholylsarcosin)²⁰⁵ oder speziellen Hydrogelen²⁰⁶ induziert, die im Zellkulturversuch keine zytotoxischen Wirkungen zeigten. Der Vorteil dieser Effekte liegt darin, dass bei gleichzeitiger Inkubation (oralen Zufuhr) mit bioaktiven Peptiden (z. B. Desmopressin), deren normalerweise niedrige Resorption (ca. 1 %) erhöht wurde²⁰⁷.

2.2.3.3 Transportmechanismen zur Überwindung der intestinalen Barriere

Nahrungsbestandteile überwinden das intestinale Epithel aufgrund von passiven oder aktiven Transportmechanismen.

Transzellulärer Transport

Treibende Kräfte des passiven transzellulären Transports (einfache und erleichterte Diffusion) sind transmembrane Unterschiede von Konzentrationen oder elektrischer Ladung. Eine Konzentrations-abhängige Diffusion durch die Lipiddoppelschicht oder wassergefüllte transmembrane Porenproteine ($r \cong 0,15 \text{ nm}$, dies entspricht dem Radius des Wassermoleküls) ist theoretisch für jedes Molekül denkbar und wird insbesondere von dessen Molekülgröße und Lipophilie (Hydrophobizität und Hydrogenbindungspotenzial²⁰⁸) beeinflusst. Hydrophobe Substanzen (O_2 , N_2 , Benzol) diffundieren am schnellsten, gefolgt von kleinen (Wasser, Harnstoff, Glycerin, CO_2) und großen, ungeladenen, polaren Molekülen (Glucose, Saccharose). Für anorganische Ionen (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- etc.) und geladene, organische Moleküle (Lactat, geladene Aminosäuren u. a.) ist die Lipiddoppelschicht eine schwer zu überwindende Barriere. Wird die Konzentrations-abhängige Diffusion solcher Substanzen durch spezielle Membranproteine (Carrier-Proteine) begünstigt, so entspricht dies der erleichterten Diffusion (s. Abbildung 2-6).

²⁰⁴ Ma, Th. Y. et al., 1995

²⁰⁵ Michael, S. et al., 2000

²⁰⁶ Dorkoosh, F. A., 2002

²⁰⁷ Michael, S. et al., 2000, Dorkoosh, F. A., 2002

²⁰⁸ Pauletti, G. M., 1997

Kennzeichen aktiver Transportvorgänge ist der akkumulierende Substanztransport (gegen einen Konzentrationsgradienten) unter Aufwendung von Energie und mittels integralen Carrier-Proteins. Der primär aktive Transport ist direkt mit einer exergonen Reaktion (z. B. Na^+/K^+ -ATPase) gekoppelt. Beim sekundär aktiven Transport wird ein primär entstandener Konzentrationsgradient wieder abgebaut, um dadurch eine zweite Substanz akkumulierend zu transportieren (z. B. Aminosäure/ Na^+ -Symporter). Aktive Transporte sind Substratspezifisch und folgen einer Sättigungskinetik, sie sind kompetitiv oder spezifisch hemmbar²⁰⁹.

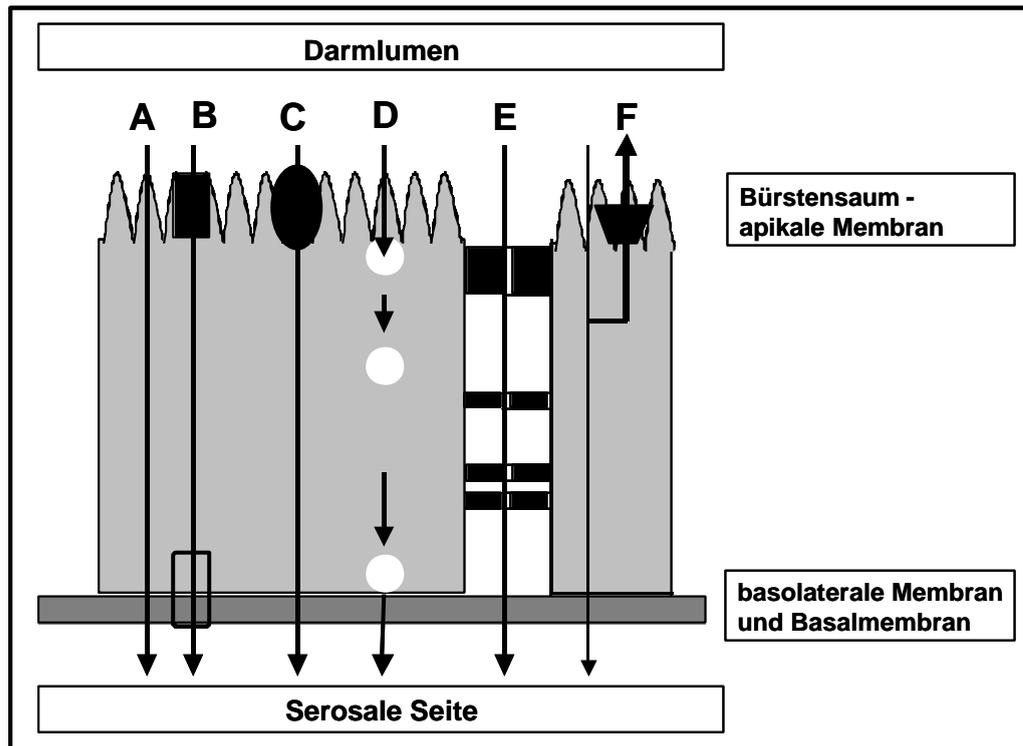


Abbildung 2-6: Intestinale Transportsysteme:

A passiver, **B** und **C** aktiver transzellulärer Transport, vermittelt durch Carrier-Protein(e), **D** Endozytose, **E** parazellulärer Transport, **F** Efflux-System (Re-Sekretion)

Endozytose (Transzytose) ist ein weiterer transzellulärer Transportmechanismus, bei dem extrazelluläre Partikel und Flüssigkeiten durch Membranvesikel in die Zelle aufgenommen werden. Es werden die Rezeptor-vermittelten Mechanismen (Clathrin- (un-)abhängige bzw. Rezeptor-Liganden vermittelte Internalisierung) von den langsameren, Nicht-Rezeptor-vermittelten Transporten (Flüssigphase- und Adsorptive Endozytose) unterschieden.

Im Falle der Rezeptor-vermittelten Endozytose bindet das Substrat (z. B. LDL, Insulin, IgA oder auch das Influenza Virus) an ein spezielles Membranprotein. Daraufhin stülpt sich die Membran ein, das Molekül und extrazellulär gelöste Stoffen werden umschlossen und nach

²⁰⁹ Rehner, G. & Daniel, H., 2002

Anlagerung von Clathrin (dimeres Protein; *coated pits*) in Form von endocytotischen Vesikeln (*coated vesicle*) ins Zytoplasma aufgenommen. In einem ATP-abhängigen Prozess werden der Rezeptor und die Clathrine durch ein konstitutives Hitzeschockprotein ausgetauscht. Das Substrat befindet sich nun im Endosom (pH 5,5) und wird an seinen Bestimmungsort, z. B. zur basolateralen Membran (Transzytose), transportiert oder lysosomal hydrolysiert. Es werden u. a. IgG-Ferritin oder Cholera Toxin in solchen Vesikeln (50 bis 300 nm) internalisiert. Der Mechanismus der Clathrin-unabhängigen Rezeptorvermittelten Endozytose ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die Nicht-Rezeptor-vermittelte Endozytose ist ein unspezifischer Vorgang der Clathrin-(un)-vermittelt stattfindet. Durch Flüssigphase-Endozytose werden gelöste Makromoleküle und extrazelluläre Flüssigkeiten internalisiert. Geladene, hydrophobe Makromoleküle werden durch Adsorptive-Endozytose effektiv intrazellulär aufgenommen. Diese Vorgänge sind im Vergleich zur Rezeptor-vermittelten Endozytose viel langsamer. Die internalisierten Makromoleküle passieren die Zelle in verschiedenen Vesikelarten, werden an der basolateralen Membran externalisiert oder lysosomal hydrolysiert und teilweise wieder verwendet²¹⁰.

Parazellulärer Transport

Beim parazellulären Transport passieren wasserlösliche, niedermolekulare Substanzen (max. 0,11 bis 0,15 nm) die flexibel regulierten, netzförmigen *tight junctions*-Poren (s. 2.2.3.2.2) aufgrund von osmotischen, hydrostatischen, chemischen und/oder elektrischen Gradienten sowie durch *solvent drag*²¹¹.

2.2.4 Proteinverdauung, -resorption und -biosynthese

Ein gesunder Erwachsener befindet sich bei einer täglichen Zufuhr von 32 g hochwertigem Protein im Stickstoffgleichgewicht. Mit einer durchschnittlichen westeuropäischen Ernährung werden täglich ca. 100 g Protein zugeführt. Zusätzlich werden 50 bis 70 g Protein aus dem Organismus (Speichel, Magen-, Darmsaft, Galle, Pankreas, abgeschiedenen (Mucosa-)Zellen) in den Darm sezerniert. Davon werden 70 bis 150 g als freie Aminosäuren resorbiert. Diese Aminosäuren bilden einen Pool, der in ständigem Austausch mit dem Körperprotein (ca. 10 kg) steht. Es werden täglich ca. 300 g Protein synthetisiert und ca. 2 g Protein durch Hautabschilferungen sowie 20 bis 70 g Protein in Form von Harnstoff (ca. 90 %) bzw. freien Ammoniak (ca. 10 %) mit dem Urin über die Nieren ausgeschieden.

Das Nahrungsprotein weist eine relativ hohe Verdaulichkeit von 85 – 95 % auf. Der Prozess der Proteinverdauung und -resorption findet im Dünndarm (hauptsächlich im Jejunum und

²¹⁰ Swaan, P. W., 1998, Shen, W.-Ch. et al., 1992

²¹¹ Rehner, G. & Daniel, H., 2002, Armstrong, W. M., 1987, Pauletti, G. M. et al., 1997

Ileum) statt und wird in 5 Stadien untergliedert: (1) luminale und (2) Bürstensaum - Verdauung, (3) Bürstensaum-Membrantransport, (4) Verdauung im Zytoplasma und (5) Transport durch die basolaterale Membran. Der limitierende Schritt ist der Aminosäuren-Transport durch die apikale Enterozytenmembran²¹².

2.2.4.1 Verdauung

Die luminale Proteinverdauung beginnt im Magen durch Vermischen mit gastralem Sekret (ca. 2 L/d). Das Pepsinogen wird durch Säurehydrolyse bzw. Autokatalyse aktiviert. Pepsin weist ein Aktivitäts-Optimum im niedrigen pH-Bereich auf. Allerdings unterliegt der pH des Magens starken Schwankungen (pH 1,9 – 6,5), die u. a. durch Proteine verursacht werden. Der portionsweise ins Duodenum entlassene Chymus wird durch pankreatisches Sekret (0,7 bis 2,5 L/d), Galle (0,6 bis 1 L/d) und duodenales Sekret im Bulbus duodeni weiter verdünnt und auf ein Volumen von ca. 2 L eingestellt. Dadurch wird das Substratangebot der im Dünndarmlumen vorliegenden Enzyme reguliert und gleichzeitig der pH optimiert (pH-Werte zwischen 6 – 7, u. a. verursacht durch Bikarbonat, Mucine).

Die fünf Pankreas-Proteasen (Peptidasen) gelangen als inaktive Proenzyme ins Lumen des Duodenums, werden dort in ihre aktive Form überführt und hydrolysieren Nahrungsproteine zu Oligopeptiden (ca. 60 %) und freien Aminosäuren (AS: ca. 40 %; s. Tabelle 2-22).

Tabelle 2-22: Proteasen der luminalen Verdauung²¹³

Enzyme	Proenzyme	Herkunft	Merkmale	Spaltung von Peptidbindungen an/am	Produkte
Endopeptidasen					
Pepsin I (A), Pepsin II (C)	Pepsinogen	Magen	Aspartat - Proteinase, niedriger pH	hydrophoben Aminosäuren (AS): Phe, Met, Leu, Trp u. a.	Peptide
Trypsin	Trypsinogen	Pankreas	Neutrale Serin Protease	Lys, Arg	Peptide
Chymotrypsin	Cymotryp- sinogen	Pankreas	Neutrale Serin Protease	aromatischen, neutralen AS	Peptide
Elastase	Proelastase	Pankreas	Neutrale Serin Protease	aliphatischen AS	Peptide
Exopeptidasen					
Carboxypepti- dase A	Pro-CP A	Pankreas	Metalloenzym (Zn)	C-terminalen Ende aromatischer AS	Aromatische AS, Peptide
Carboxypepti- dase B	Pro-CP B	Pankreas	Metalloenzym (Zn)	Arg, Lys	Arg, Lys, Peptide

Die luminalen Enzyme verflüssigen die mucöse Glykokalix und spalten z. T. die Enzyme des Bürstensaums. Gesunde Enterozyten begegnen diesem Abbau durch rasche Neusynthese²¹⁴. Bemerkenswert ist außerdem, dass Pankreas-Peptidasen keine Peptidbindungen

²¹² Van Dyke, R. W., 1989

²¹³ Verändert nach Van Dyke, R. W., 1989

²¹⁴ Erickson, R. H. & Kim, M. D., 1990, Rehner, G. & Daniel, H., 2002

mit Glutaminsäure oder Prolin spalten, die insbesondere in Kollagen, Gliadin oder auch bioaktiven Peptiden aus Milchproteinen enthalten sind²¹⁵.

Im sauren Mikroklima (pH 5,5 - 6,8) des Bürstensaums findet die terminale Proteinverdauung durch spezielle Peptidasen (s. Tabelle 2-23) statt, die vermutlich noch nicht vollzählig identifiziert wurden.

Tabelle 2-23: Peptidasen der Bürstensaum-Membran

(Eigene Darstellung nach VAN DYKE; ALPERS bzw. TOBEY²¹⁶).

Enzyme	Substrate und Aktivitätsmerkmale	Produkte
Endopeptidasen	hydrolysieren internale Peptidbindungen:	
Enterokinase	von Trypsinogen (Initiierung der luminalen Verdauung)	
Neutrale Endopeptidasen (EC 3.4.24.11)	von α -Casein, Insulin u. a. Proteinen an hydrophoben Aminosäuren	Peptide
Oligopeptidasen:	hydrolysieren N-terminale Peptidbindungen:	
Aminopeptidasen (AP)	AP sind Metalloenzyme (Zn, Ca, Co).	Aminosäuren, Di-, Tripeptide
AP N (EC 3.4.11.2; CD 13)	Neutrale Aminosäuren-Oligopeptid	
AP A (EC 3.4.11.7)	Saure Aminosäuren-Oligopeptid	
AP P (EC 3.4.11.9)	Prolin-Oligopeptid	
AP W (EC 3.4.11.16)	X-Trp, X-Trp-Oligopeptid	
Dipeptidyl-AP IV (DPP IV; EC 3.4.14.5; CD 26)	X-Pro-Oligopeptid X-Ala-Oligopeptid X-Lys-Oligopeptid DPP IV ist eine Serin-Protease.	X-Pro, XAla, XLys, Oligo-, Dipeptide
Carboxypeptidasen:	hydrolysieren C-terminale Peptidbindungen:	
Dipeptidyl-Carboxypeptidase (EC 3.4.15.1)	Angiotensine, Oligopeptid-Pro Synonym: Angiotensin-Umwandlungs-Enzym	Dipeptide
γ-Glutamyl-Transpeptidase	Peptide mit gebundenem γ -Glutamyl, z. B. Glutathion	Peptide, γ -Glutamyl-Aminosäure
Folat Conjugase	Polyglutamyl Folate	Pteroylglutaminsäure
Carboxypeptidase M	Peptid-Lys, Peptide-Arg	basische Aminosäuren
Carboxypeptidase P	Peptid-Pro	Pro
Dipeptidasen:	hydrolysieren Dipeptide zu AS	
Zink-stabile Asp-Leu-Peptidase	Dipeptide, insbesondere Asp-Leu	Aminosäuren
Gly-Leu-Peptidase	Dipeptide, insbesondere Gly-Leu Metalloenzym (Zn)	Aminosäuren
Glutathion Dipeptidase	Cys-X (stammt vom Glutathion)	Aminosäuren
Membrane Dipeptidase	Dipeptide (Glutathion Konjugate)	Aminosäuren

Die bekannten Peptidasen sind zumeist dimere Glykoproteine, die in reifen Enterozyten synthetisiert und in deren apikale Membran integriert werden. Das jeweilige aktive Zentrum ragt ins Darmlumen und kontaktet dort mit den entsprechenden Substraten, insbesondere mit Oligopeptiden. Dabei werden Aminosäuren, Di- und Tripeptide freigesetzt, die das Darmepithel passieren können. Die Expression und Aktivität dieser intestinalen Peptidasen (Differenzierungsmarker) nimmt von der Krypten- zur Villusregion bzw. vom proximalen zum

²¹⁵ Auricchio, S. et al., 1978

²¹⁶ verändert nach: Van Dyke, R. W., 1989, Alpers, D. H., 1987 & 1994, Tobey, N. 1985

distalen Dünndarm zu und ist im Colon nicht bzw. in sehr geringer Konzentration nachweisbar²¹⁷. Die Neusynthese der Peptidasen des Bürstensaums wird wahrscheinlich durch deren Substrate induziert und durch Hunger gehemmt. Es wurde eine Aktivitätshemmung durch hydrophobe Aminosäuren beobachtet, deren physiologische Konsequenz noch unklar ist²¹⁸.

Ein Teil der Bürstensaum-Peptidasen wird außerdem in anderen Geweben exprimiert, z. B. die Dipeptidyl-Carboxypeptidase (ACE: s. S. 13) sowie die Dipeptidyl-Amino-peptidase IV (DPP IV). Die Funktion der intestinalen ACE ist noch nicht vollständig geklärt und umfasst wahrscheinlich die Oligopeptidhydrolyse sowie regulatorische Aufgaben²¹⁹.

Die DPP IV ist ein multifunktionales, ubiquitär vorkommendes Zelloberflächenenzym, welches u. a. in Endothel-, Nieren-, Leber- und Immunzellen (CD 26) exprimiert wird. Dieses dimere Membranglykopeptid (MG 150 kD) weist eine Nterminale β -Propeller Struktur und eine C-terminale α -, β -Hydrolase Domäne auf, die Peptidbindungen an der C-terminalen Seite eines Prolinrestes spalten²²⁰. Aufgrund der breiten Substratspezifität (u. a. gegenüber Neuro-, Immuno-, Hormonpeptide) ist die DPP IV an der Regulation der Immunantwort, von Entzündungsreaktionen, des Peptid-Hormon-Metabolismus und der Entstehung verschiedener Autoimmun- und psychiatrischen Erkrankungen beteiligt. Die DPP IV hat außerdem einen Einfluss auf die Ernährung, durch Spaltung des Neuropeptids Y, einem Hormon, welches u. a. die Sättigung, den Appetit und die Magenperistaltik reguliert, und verschiedene Serumpeptide, die den Glucosestoffwechsel regulieren²²¹. Außerdem wird die Enzymexpression durch Prolin-haltige Nahrungspeptide (Kollagen, α -Casein, Gliadin) stimuliert²²².

Exkurs: Humanenzyme, die Prolin-haltige Peptidbindungen spalten

Die hohe Proteolyseresistenz Prolin-haltiger Proteine bzw. bioaktiver Peptide („strategische Zonen“) aus Lebensmitteln liegt darin begründet, dass im humanen Organismus nur relativ wenige Enzyme existieren, die Prolin-haltige Peptidbindungen spalten (s. Abbildung 2-7).

Die zyklische Aminosäure Prolin (α -Pyrrolidincarbonsäure) wurde in der Primärstruktur vieler funktioneller Proteine identifiziert, u. a. von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen, Immunglobulinen, Membranrezeptoren oder -transportern. Das Öffnen/Schließen von Transportkanälen beispielsweise erfolgt u. a. durch cis-trans-Isomerie des gebundenen Prolins. Außerdem schützt Prolin diese Proteine vor einem unspezifischen, proteolytischen Abbau, z.

²¹⁷ Alpers, D. H., 1987, Tobey, N. et al. 1985, Pauletti, G. M. et al., 1997, Erickson, R. H. & Kim, M. D., 1990, Erickson, R. H. et al., 1999

²¹⁸ Alpers, D. H., 1987

²¹⁹ Stevens, B. R. et al., 1988

²²⁰ Abbott, C. A., 1999 & 2000

²²¹ Hildebrandt, M. et al., 2000

²²² Erickson, R. H. et al., 1999

B. sekretorisches IgA im Darm. Pathogene (Bakterien und Viren) hingegen sezernieren spezifische Protease, die Prolin-haltige Peptidbindungen hydrolysieren²²³.

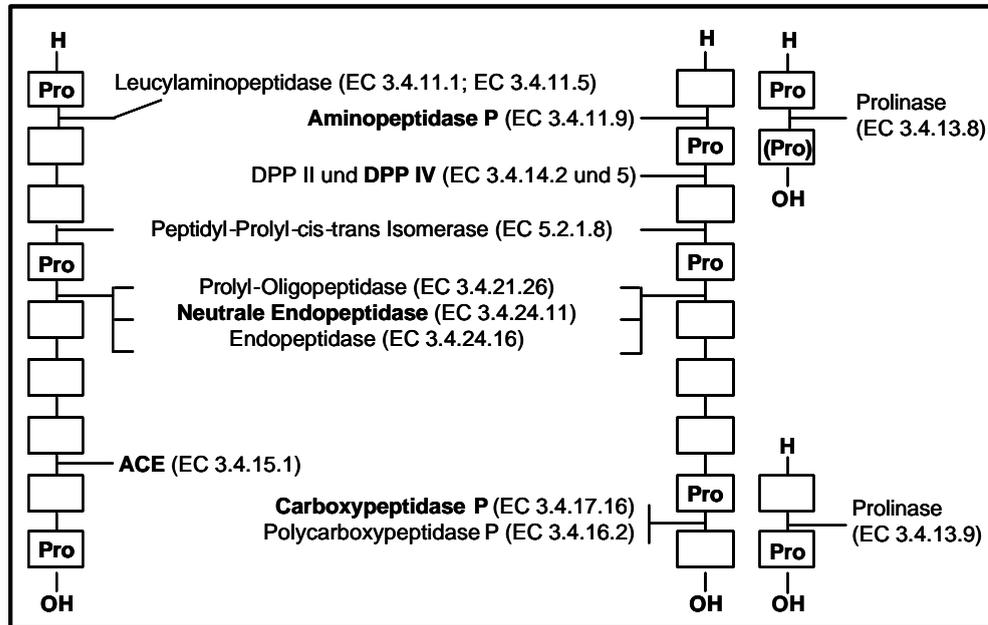


Abbildung 2-7: Auflistung der Humanenzyme, die Prolin-haltige Peptidbindungen spalten, unter Einbeziehung der Prolyl-cis-trans Isomerase

(Darstellung modifiziert nach VANHOOF²²⁴). Fett markiert wurden die Enzyme, die u. a. im Darm exprimiert werden.

2.2.4.2 Resorption

Intraluminal verbleiben aufgrund der effektiven Verdauungsvorgänge nur wenige Proteine (hochmolekulare Substanzen), von denen ein Teil aufgrund von (un-) spezifischer Endozytose resorbiert wird. Dieser Vorgang ist aus nutritiver Sicht zu vernachlässigen. Die im adulten Intestinum resorbierten Makromoleküle (max. 100 bis 200 μm ; z. B. intaktes Chymotrypsin, Immunglobuline, Albumine, β -Lactoglobulin, Vitamine (Folat, Vitamin B₁₂), Transferrin oder auch Phytohaemagglutinine, Pathogene bzw. deren Toxine) werden durch MZellen (*membranous cells*) und durch Enterozyten aufgenommen. Beide Zelltypen präsentieren Antigene den Zellen des Darm-assoziierten lymphoiden Gewebes (GALT; engl.: *gut associated lymphoid tissue*), welches von zentraler Bedeutung für die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen und die Sekretion von Antikörpern bzw. Entzündungsmediatoren ist. Des Weiteren werden regulatorische Peptide wie Insulin oder Thyreotropin-releasing Hormon (TRH, u. a. aus Casein) intakt resorbiert und entfalten ihre Wirkung im Organismus. Der Säugling nimmt durch Endozytose Immunglobuline (v. a. IgA) aus der Muttermilch auf²²⁵.

²²³ Vanhoof, G. et al., 1995

²²⁴ Verändert nach: Vanhoof, G. et al., 1995

²²⁵ Gardner, M. L. G., 1983 & 1988, Heyman, M. & Desjeux, J. F., 1992, Roberts, P. et al., 1998, Seifert, S. & Sass, W., 1990, Swaan, P. W., 1998

2.2.4.2.1 Transport durch die Bürstensaummembran

Der Resorption der im Dünndarm aus Proteinen freigesetzten Aminosäuren wird durch deren Seitenketten determiniert: Größe, chemische Reaktivität, Ladung und Molekulargewicht. Neben der passiven Diffusion neutraler (z. B. Ala) und hydrophober Aminosäuren existieren verschiedenen transmembrane Transportsysteme (s. Tabelle 2-24). Der Transport der meisten Aminosäuren erfolgt elektrogen und ist sekundär aktiv, da ein Na^+ -Gradient genutzt wird (s. Abbildung 2-8). Für β -Alanin, L-Alanin, Prolin und α -Methylaminoisobutyrate (*in vitro*) wurde zusätzlich ein Na^+ -unabhängiger, H^+ -gekoppelter Transport nachgewiesen²²⁶.

Tabelle 2-24: Aminosäuren-Transportsysteme der intestinalen Bürstensaummembran

(Modifizierte Darstellung nach HOPFER; TSUJI & TAMAI²²⁶.)

Transport-Systeme	Substrate (Aminosäuren: AS)	Na^+ -Abhängigkeit	Anmerkungen
B	neutrale α -L-AS	ja	ältere Bezeichnung: Neutral <i>brush border</i> (NBB) System
B^{0,+}	neutrale α -L-AS, basische AS, Cystein	ja	
b^{0,+}	neutrale α -L-AS, basische AS, Cystein	nein	
PHE	Phe, Met	ja	
IMINO	Imino-AS, Pro	ja	Cl^- -Cotransport
b	β -AS, insbesondere Taurin	ja	Cl^- -Cotransport
X_{G,A}	saure AS	ja	K^+ oder H^+ -Cotransport
Y⁺	basische AS, Cys	ja	Aktivität steigt bei hoher Proteinzufuhr
y⁺	basische AS, Cys	nein	Aktivitätshemmung durch neutrale AS
L	neutrale AS, Leu	nein	breite Selektivität, kein β -Ala Transport

Im Dünndarm vorliegende Oligopeptide (u. a. Gly-Pro) sind zum Teil Hydrolyse-resistent gegenüber den Peptidasen der Bürstensaummembran (*in vivo* und *in vitro*)²²⁷ und werden in Abhängigkeit von ihren physikochemischen Eigenschaften trans- oder parazellulär resorbiert (s. Abbildung 2-8). Grundlage des transzellulären Transports ist der Wechsel der Peptide aus der wässrigen, luminalen in die lipophile, membranale Phase. Dieser Vorgang ist Energieaufwendig (Desolvationsenergie) und wird durch ein niedriges Wasserstoffbrücken-Bindungspotenzial begünstigt. Eine Senkung dieses Potenzials wird durch Interaktion zwischen Peptiden (z. B. Morphinen, Cyclosporin A) und der Bürstensaummembran katalysiert, aufgrund einer resultierenden intramolekularen Konformationsänderung²²⁸. Ein anderer Teil der lipophilen Oligopeptide permeiert das intestinale Epithel passiv²²⁹. Allerdings reicht die Lipophilie als alleiniges Merkmal zur Vorhersage des wahrscheinlichen Transportweges nicht aus²³⁰.

²²⁶ Hopfer, U., 1987, Tsuji, A. & Tamai, I., 1996

²²⁷ Gardner, M. L. G., 1983, Gardner, M. L., 1991, Shimizu, M. et al., 1997

²²⁸ Pauletti, G. M., 1997, Burton, Ph. S. et al., 1992

²²⁹ Conradi, R. A. et al., 1992, Burton, P. S. 1992

²³⁰ Pauletti, G. M. et al., 1997

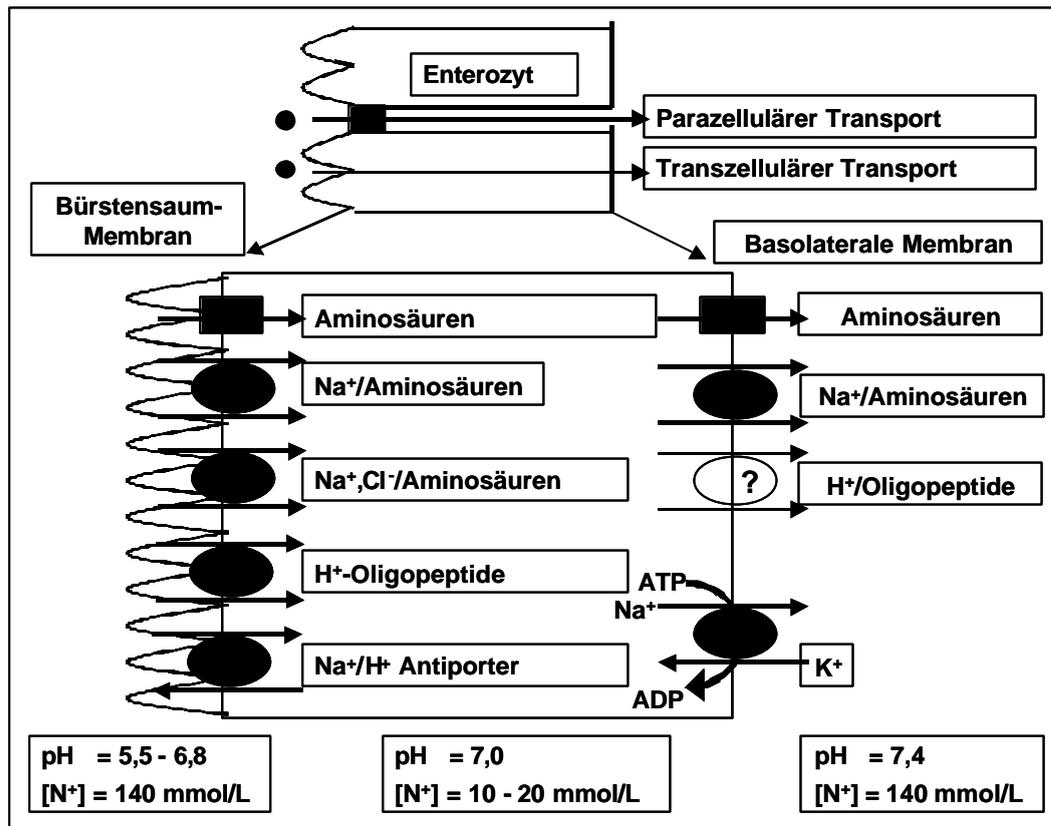


Abbildung 2-8: Aminosäure- und Peptid-Transportsysteme im Dünndarm

(Quellenangabe s. Text.)

Ein parazellulärer Transport ist für niedermolekulare Peptide nachgewiesen und dominiert die intestinalen Resorptionsvorgänge direkt nach einer Mahlzeit (ca. 85 % aller passiven Transporte), wobei verschiedene Interaktionen günstigen Einfluss nehmen: Der Cotransport von Na^+ und Glucose bzw. Aminosäuren bewirkt eine Kontraktion des perijunctionalen Aktin-Myosinrings, wodurch die Poren der *tight junctions* sich weiten und die Nährstoffresorption aufgrund von *solvent drag* vermehrt stattfindet. Die Bedeutung aktiver Transportvorgänge hingegen steigt mit abnehmender intraluminaler Nährstoffkonzentration an²³¹.

Das Vorhandensein von Dipeptid-Transportsystemen (s. 2.2.4.2.1) wurde lange vor deren Identifizierung postuliert²³² und an Patienten mit Hartnup-Syndrom oder Cysteinurie indirekt nachgewiesen. Diese Patienten resorbierten bestimmte freie Aminosäuren nicht, nahmen sie jedoch in Form von Dipeptiden auf²³³. Es wird vermutet, dass noch nicht alle Aminosäure- bzw. Peptidtransportsysteme identifiziert wurden und dies in naher Zukunft durch Einsatz neuer Methoden (u. a. Polymerasekettenreaktion, Genanalysen) gelingen wird²³⁴.

²³¹ Madara, J. L. & Pappenheimer, J. R., 1987

²³² Adibi, S. A., 1977, Matthews, D. M., 1983

²³³ Alpers, D. H., 1987, Matthews, D. M., 1983, Van Dyke, R. W., 1989

²³⁴ Webb, K. E., 1990

Oligopeptid Transporter

PepT1 ist der erste identifizierte intestinale Protonen-Oligopeptid-Transporter. Nachfolgend wurden der Human-Intestinal-Peptid-Transporter 1 (HPT1: Cadherin Transporter Familie) und der Peptid-Transporter-1 (PHT-1, ein Peptid-Histidin-Transporter) identifiziert, die sowohl im GIT als auch in verschiedenen anderen Geweben exprimiert wurden. Die Oligopeptidtransporter weisen eine breite sowie überlappende Substratspezifität auf (auch gegenüber Peptid-ähnlichen Substanzen, wie β -Lactamantibiotika), wodurch die Aufklärung der Transport-Mechanismen erschwert ist. Es wird außerdem vermutet, dass weitere Peptidtransporter existieren und/oder dass ein Teil der Peptide über andere, bekannte Systeme, z. B. den Monocarboxylsäure-Transporter, aufgenommen werden²³⁵. Der Umfang der Aminosäuren-Aufnahme in Form von Di- und Tripeptiden ist noch unklar (20 – 80 %)²³⁶.

PepT1 und ein assoziiertes Protein (PepT1-RF) werden durch Gene des 13. Chromosoms codiert²³⁷. Das PepT1-Molekül besteht aus 708 Aminosäuren mit 12 transmembranen Domänen, sechs extra- und fünf intrazellulären Loops. Auf den extrazellulären Loops liegen besonders hydrophobe Anteile und mehrere N-Glykosylierungs-Bindungsstellen. Die N- und C-terminalen Molekülsequenzen liegen intrazellulär, ebenso die Bindungsstellen für die Proteinkinasen C und A, die auf unterschiedlichen Loops lokalisiert sind. Das 208 Aminosäuren lange PepT1-RF-Peptid wird häufig in der Nähe von PepT1 identifiziert und ist wahrscheinlich für dessen pH-Sensitivität verantwortlich²³⁸. Die PepT1-Expression wird u. a. durch Insulin reguliert²³⁹ und durch verschiedene Faktoren moduliert. Eine Protein-reiche Nahrung bzw. eine parenterale Ernährung erhöht die Expression, durch Fasten wird sie gesenkt (Ratten)²⁴⁰. Diese Peptid-spezifische regulatorische Komponente wurde auch im Caco-2 Zellkulturversuch nachgewiesen²⁴¹.

Der H⁺/Oligopeptid Transporter PepT1 wird im Dünndarm ausschließlich in differenzierten Enterozyten (Villusregion), in der apikalen Membran, exprimiert²⁴². Dieser Transporter ist ein tertiär-aktives System, welches einen zelleinwärts gerichteten Protonengradienten für einen elektrogenen und gegen einen Konzentrations-Gradienten erfolgenden Peptidtransport nutzt, unter Einbeziehung der Na⁺/K⁺-ATPase und dem Na⁺/H⁺-Austauscher. Dieser Transport ist nicht primär Na⁺-abhängig, benötigt jedoch das saure *brush border*-Mikroklima (pH 6,1 bis 6,8), dass durch den Na⁺/H⁺-Austauscher aufrechterhalten wird²⁴³.

²³⁵ Herrera-Ruiz, D. et al., 2001, Yang, Ch. Y. et al., 1999

²³⁶ Rehner, G. & Daniel, H., 2002, Gardner, M. L. G., 1983

²³⁷ Urti, A., 2000

²³⁸ Hedinger, M. S., 1994, Urti, A., 2000

²³⁹ Urti, A., 2000

²⁴⁰ Katsura, T. & Inui, K., 2003

²⁴¹ Ford, D. et al. 1999

²⁴² Walker, D. et al., 1997

²⁴³ Ganapathy, V. & Leibach, F. H., 1983, Daniel, H., 1997, Chen, H. et al., 2001, Kennedy, D. J. et al., 2002

Als Transportmechanismus postulieren MACKENZIE ET AL.²⁴⁴, dass zunächst ein Proton und anschließend das Peptid an den Transporter binden und beide die Membran anschließend passieren²⁴⁴. Dieser Transport erfolgt entsprechend einer Sättigungskinetik in bidirektionaler Richtung, wobei die Substratsbindungsaffinität intrazellulär niedriger als extrazellulär ist. Ein stöchiometrisches Transportverhältnis von 1:1 wurde für Protonen und neutrale bzw. basische Peptide ermittelt. Für Peptidanionen hingegen werden zwei Möglichkeiten der Transportkinetik diskutiert: Ein Transportverhältnis von 2:1 oder der Protonen-, Substrat-Cotransport (1:1), gekoppelt an den Transport eines weiteren Anions (z. B. Hydroxylion oder Hydrogencarbonat-Anion)²⁴⁵.

Obwohl der Bindungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, wurden Substrat-Strukturmerkmale identifiziert, die als notwendig angesehen werden, damit eine Bindung an den Transporter PepT1 erfolgt²⁴⁶:

- C-terminal: eine freie Carboxylgruppe oder eine Gruppe die zur Wasserstoffbrücken-Bindung fähig ist, eine Aminosäure in L-Konfiguration,
- N-terminal: eine freie Aminogruppe oder eine schwach basische Gruppe,
- Nettoladung: geringer als 2-fach positiv.

Allerdings weist nicht jedes der transportierten Peptide alle genannten Strukturmerkmale auf. Ein PepT1 vermittelter Transport wurde für unterschiedliche (Di-)Peptide im Caco-2 Zellkulturversuch nachgewiesen, z. B. für: Gly-Pro, Gly-Sar, Lys-Pro und Derivate, Gly-Gln²⁴⁷, Gly-Leu, Gly-Lys, Gly-Gln²⁴⁸ oder Val-Val, Val-Val-Val²⁴⁹. Zusätzlich wurden Substrate identifiziert, die keine intramolekulare Peptidbindung aufweisen (z. B. δ -Aminolevulinsäure und ω -Amino-Fettsäuren)²⁵⁰ oder Moleküle, die zwar an den Transporter binden, jedoch die Membran nicht permeieren²⁵¹. Zur Vorhersage der Substrat-Transporter-Bindungsaffinität entwickelten BAILEY ET AL.²⁵² ein Computer-unterstütztes 3-D-Model. Demnach weist das PepT1-Molekül Analogien zu der oben genannten Substratstruktur auf. Mit hoher Affinität binden an PepT1 u. a. Gly-Phe, Ala-Gly, Gly-Ala, Gly-Lys, Gly-Asp, Gly-Sar und Gly-Pro²⁵².

PepT1 weist eine hohe Transportkapazität und eine ungewöhnlich breite Substratspezifität auf, für die 400 bzw. 8000 möglichen Di- bzw. Tripeptide, die durch Kombination der 20 proteinogenen Aminosäuren denkbar sind. Des Weiteren scheinen intakte (Hydrolyse-

²⁴⁴ Mackenzie, B. et al., 1996

²⁴⁵ Krotta, G. et al., 2002

²⁴⁶ Yang, Ch. Y. et al., 1999

²⁴⁷ Knütter, I. et al., 2001

²⁴⁸ Daniel, H. 1997

²⁴⁹ Tamura K. et al., 1996

²⁵⁰ Katsura, T. & Inui, K., 2003

²⁵¹ Pauletti, G. M. et al., 1996

²⁵² Bailey, P. D. et al., 2000

resistente) Tetrapeptide auch zu den PepT1-Substraten zu gehören²⁵³, jedoch keine Aminosäuren. Der Peptid-Transport vollzieht sich schneller als die Aminosäurenresorption²⁵⁴. Neben Nahrungspeptiden transportiert PepT1 verschiedene Medikamente (mit Peptid-ähnlicher Struktur): β -Lactam Antibiotika, ACE-Inhibitoren (Captopril, Enalapril, Lisinopril), Renin-Inhibitor, Antikancerogene (Bestatin)²⁵⁵ oder Thrombin-Inhibitor²⁵⁶ sowie Dipeptidyl-Bisphosphonate²⁵⁷. PepT1 ist kompetitiv hemmbar, z. B. durch 10 mmol/L Gly-Pro oder durch spezifische Inhibitoren, die eine hohe Bindungsaffinität aufweisen und sich als Hydrolyse-resistent erwiesen haben (D-Ala-Lys-AMCA und Lys-[Z(NO₂)]-Pro)²⁵⁸. Da die PepT1-Aktivität direkt vom Protonengradienten abhängig ist, verursacht eine Hemmung des NHE 3, z. B. durch VIP, einen reduzierten Dipeptid- bzw. Antibiotika-Transport²⁵⁹.

P-Glykoprotein

In der Bürstensaummembran der Enterozyten wird ebenso wie in Tumorzellen ein Effluxsystem beobachtet, das P-Glykoprotein (170 bis 180 kD), dessen physiologische Aufgabe die Begrenzung der Substanzaufnahme (Peptide) durch (Re-) Sekretion ins Darmlumen ist. Dieser Transporter wird durch das humane MDR 1-Gen codiert, zeigt eine breite Substratspezifität und ist verantwortlich für die häufig beobachtete Multi-Medikamenten-Resistenz²⁶⁰.

2.2.4.2.2 Intrazellulärer Metabolismus und Transport

Die intrazellulären Peptidasen sind weniger gut charakterisiert als die des Bürstensaums. Bis jetzt wurden drei verschiedene Peptidasen beschrieben: Prolidase, Di- und Tripeptidase, die bevorzugt und sehr rasch Di- und Tripeptide hydrolysieren und Aminosäuren freisetzen. Die Aktivität dieser intrazellulären Peptidasen ist im gesamten Darm gleichmäßig verteilt²⁶¹.

Aminosäuren werden in der Mucosazelle metabolisiert, wobei ein Gleichgewicht zwischen Abbau (Energie-Gewinnung: insbesondere aus Glutamin) und Resynthese besteht. Die Aminosäuren werden ineinander überführt und in Proteine integriert (Hormone, Neurotransmitter, Glykocalixproteine, Apolipoproteine u. a.), die einerseits ins Darmlumen und andererseits in die Blut- und Lymphbahnen sezerniert werden. Nach derzeitigen Erkenntnissen werden hauptsächlich Aminosäuren (ca. 70 %) und weniger Di-, Tripeptide (ca. 25 %) ins Pfortaderblut transportiert. Ein Grund für diesen niedrigen bekannten Transportlevel könnte allerdings in technischen Problemen der Peptidanalyse liegen.

²⁵³ Meredith, D. & Boyd, C.A.R., 1995

²⁵⁴ Pauletti, G. M. et al., 1996

²⁵⁵ Saito, H. & Inui, K.-I., 1993

²⁵⁶ Tsuji, A. & Tamai, I., 1997, Chang, Ch. Y. et al., 1999

²⁵⁷ Katsura, T. & Inui, K., 2003

²⁵⁸ Groneberg, D. et al., 2001, Knütter, I. et al., 2001

²⁵⁹ Anderson, C. M. H. 2003

²⁶⁰ Pauletti, G. M., 1997, Kerb, R. et al., 1997

²⁶¹ Van Dyke, R. W., 1989

2.2.4.2.3 Transport durch die basolaterale Membran

Aminosäuren werden hauptsächlich durch passive Diffusion und mittels L-Transporter aus der Zelle heraus in die Blutbahn transportiert. In umgekehrter Richtung werden Aminosäuren insbesondere durch A- und ASC-Transporter aufgenommen. Die in der basolateralen Enterozytenmembran vorhandenen Aminosäuren-Transportsysteme sind in Tabelle 2-25 aufgelistet.

Tabelle 2-25: Aminosäuren-Transportsysteme der basolateralen Enterozytenmembran

(Darstellung modifiziert nach VANDYKE bzw. HOPFER²⁶²).

Transport-systeme	Substrate (Aminosäuren: AS)	Na ⁺ - Abhängigkeit	Anmerkungen
y ⁺	basische AS, Cys	nein	Aktivitätshemmung durch neutrale AS
L	neutrale AS, Leu, Phe	nein	breite Selektivität, kein β-Ala Transport
A	kurzkettige AS	ja	breite Selektivität
ASC	Ala, Ser, Cys, neutrale AS	ja	selektiv für L-Isomere
asc	Ala, Ser, Cys, neutrale AS	nein	selektiv für L-Isomere
N	Gln, His, Asn	ja	wahrscheinlich auch im Intestinum vorhanden

Diese Carriersysteme werden außerdem in Membranen anderer Zelltypen beobachtet. Sie vermitteln den Aminosäurenefflux meist entlang eines Konzentrationsgradienten (erleichterte Diffusion) und ermöglichen so die Versorgung der Enterozyten mit Aminosäuren, die insbesondere in den Phasen zwischen zwei Mahlzeiten Glutamin verstoffwechseln²⁶².

Es liegen noch wenige Kenntnisse bezüglich eines Oligopeptid-Transports durch die basolaterale Membran vor. Das Vorhandensein eines H⁺-gekoppelten, Na⁺-unabhängigen Di-, Tripeptid-Transporters wird postuliert²⁶³. Es wird außerdem vermutet, dass Peptide, die in die Blutbahn gelangen, von Peptidasen sofort hydrolysiert werden. Allerdings wurde für die Dipeptide Gly-Gly und Gly-Leu eine Hydrolyse-Resistenz nachgewiesen. Da in verschiedenen Zelltypen peripherer Gewebe Peptidasen vorliegen, die diese Dipeptide hydrolysieren, gilt ein intakter transmembraner Peptidtransport als wahrscheinlich²⁶⁴.

2.2.4.3 Biosynthese von Proteinen

Die resorbierten Aminosäuren werden über die Pfortader zur Leber transportiert und größtenteils (ca. 70 %) dort retiniert und metabolisiert. Die restlichen 30 % werden über die Blutbahn transportiert und gelangen unter Energieaufwand über sieben verschiedene Transportsysteme (mit überlappender Spezifität) in die Zellen. Im intrazellulären Stoffwechsel findet eine Übertragung der Aminogruppe auf vorhandene α-Ketokarbonsäuren statt, unter Bildung neuer Aminosäuren. Beim Abbau wird die abgespaltene Aminogruppe in Form von Ammoniak und Harnstoff über die Niere ausgeschieden. Die verbliebene α-Ketokarbonsäure fließt

²⁶² Van Dyke, R. W., 1989, Hopfer, U., 1987

²⁶³ Tsuji, A. & Tamai, I., 1996

²⁶⁴ Webb, K. E., 1990

in den Kohlenhydrat- bzw. Fettstoffwechsel ein oder wird gespalten zu Kohlenstoffdioxid und Wasser unter gleichzeitiger Energiefreisetzung (22 – 44 ATP-Äquivalente). Prinzipiell stellt der Aminosäuren-Abbau die Umkehrung der Biosynthese dar (verschiedene Enzymsysteme), mit Ausnahme der (bedingt) essentiellen Aminosäuren.

In welchen Anteilen die Aminosäuren in die jeweiligen Prozesse einfließen, hängt vom Alter der Probanden, dem Proteingehalt der Nahrung und dem endokrinen Status ab, da auch der Aminosäuren-Stoffwechsel hormonell (u. a. Insulin, Glukagon, Somatotropin) geregelt ist.

Die Biosynthese der körpereigenen Proteine sowie anderer stickstoffhaltiger Substanzen (u. a. Purine, Pyrimidine, Porphyrine sowie Neurotransmitter) erfolgt intrazellulär und beginnt mit der Gentranskription im Zellkern. Die Translation (Initiation, Elongation und Termination) erfolgt an Ribosomen (im Zytosol, am endoplasmatischen Reticulum). Zunächst erfolgt wiederholt die Verknüpfung der Aminogruppe der einen und der Carboxylgruppe einer anderen Aminosäure, unter Wasserabspaltung (Peptidbindung). Anschließend werden Sekundär- (α -Helix, β -Faltblattstruktur, Schleifen oder Wendeknicks) und globuläre bzw. fibrilliäre Tertiärstrukturen (z. B. Caseine bzw. Kollagene) ausgebildet. Quartärstrukturen entstehen durch Assoziation verschiedener Peptidketten zu einer funktionellen Einheit (z. B. Hämoglobin). Die Proteinfaltung und -modifikation finden im endoplasmatischen Reticulum und Golgi-Apparat statt. Dort erfolgt außerdem der Anbau von Adressierungssequenzen, so dass das intakte Protein zu seinem Bestimmungsort transportiert werden kann (Glykoproteine werden beispielsweise in die Bürstensaummembran integriert).

2.2.4.4 Unverdaute Proteine im Dickdarm

Die Verdauung und Resorption der Nährstoffe ist im Ileum größtenteils abgeschlossen, so dass im Dickdarm normalerweise eine (Rück-) Resorption von Wasser und Elektrolyten der Verdauungssäfte erfolgt sowie ein Transport der unverdaulichen Nahrungsbestandteile (insbesondere komplexe Kohlenhydrate und Ballaststoffe). Diese dienen dem Wachstum der Darmflora und ihre ausreichende Zufuhr begünstigt ein gewünschtes Verhältnis der einzelnen Mikroorganismen-Spezies (gesundheitsfördernde zu pathogenen Mikroorganismen). Die Funktion der Darmflora ist vielfältig, u. a.:

- Kontrolle der intestinalen Motilität sowie Transitzeit,
- Kontrolle der intestinalen Ionenkonzentration und des pH-Wertes,
- Immunstimulation und –abwehr,
- Kontrolle von Proliferation, Wachstum, Differenzierung des Darmepithels,
- Bereitstellung von Energie²⁶⁵.

Die unverdauten und nicht-resorbierten Proteinreste werden im Dickdarm größtenteils von Mikroorganismen verstoffwechselt.

²⁶⁵ Müller, M. J., 1998

Entstehung eines Colonkarzinoms

Die Colonkarzinogenese wird durch eine genetische Predisposition und ein zunehmendes Lebensalter begünstigt. Die Inzidenz ist in Industrienationen mit 25 bis 40 pro 100000 Einwohner 5 bis 8mal höher als in Entwicklungsländern. Durch epidemiologische Studien ist bekannt, dass diese Unterschiede auf verschiedene Umweltfaktoren, u. a. die Ernährung, zurückzuführen sind. Das Erkrankungsrisiko ist erhöht, bei einer hohen Zufuhr an tierischen Fetten, Proteinen bzw. zu geringen Zufuhr an komplexen Kohlenhydraten, Ballaststoffen, Mineralien, Vitaminen oder verschiedenen sekundären Pflanzenstoffe u. a. aus Gemüse²⁶⁶.

Das Darmepithel zeichnet sich durch eine rasche und regelmäßige Erneuerung seiner Zellen aus, wobei Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Apoptose in einem Fließgleichgewicht stehen. Die Karzinogenese (s. Abbildung 2-9) wird durch ein Ungleichgewicht initiiert, bei dem die Proliferation deutlich überwiegt (Hyperproliferation). In Abhängigkeit von der Zeit entstehen zunächst Adenome (gutartige Tumore), mit einer zunehmenden Anzahl an Genmutationen (in Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen) und später das Colonkarzinom (maligner Tumor). Für die bisher seltener beobachteten Tumore des Dünndarms wird eine vergleichbare Karzinogenese vermutet, die jedoch erst durch intensivere Beobachtungen und Studien zu bestätigen ist. Dazu wurde 1991 das Heidelberger Poyposis-Register eröffnet²⁶⁷.

Die Hyperproliferation ist eine Ausgleichsreaktion auf die Wirkung zytotoxischer Substanzen, die mit der Nahrung aufgenommen werden oder intraluminal entstehen und in den Dickdarm gelangen. Dazu gehören unverdaute langkettige Fettsäuren, sekundäre Gallensäuren sowie mikrobielle Metaboliten aus Hämoglobin, die eine lysierende Wirkung auf Epithelzellen haben. Diese Substanzen werden durch vorliegendes Calciumphosphat (CaP_i, u. a. aus Milch, -produkten) präzipitiert, wodurch die zytotoxische Wirkung aufgehoben wird. Ein weiteres Zellgift ist Ammonium, welches im Dickdarm durch mikrobielle Enzyme aus unverdauten Nahrungsproteinen, -peptiden oder Harnstoff entsteht und nachfolgend zur mikrobiellen Proteinsynthese (Zellvermehrung) genutzt wird. Dazu müssen genügend komplexe Kohlenhydrate oder lösliche Ballaststoffen vorliegen, welche die Mikroorganismen zur Energiegewinnung nutzen, wobei kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat) freigesetzt werden. Diese dienen zur Ernährung der Epithelzellen und senken den pH, wodurch das Wachstum gesundheitsfördernder Mikroorganismen unterstützt wird. Butyrat hemmt die Proliferation vorhandener Tumorzellen, erhöht deren Differenzierungsgrad und induziert Apoptose. Eine langfristige Zufuhr von Probiotika mit *L. acidophilus* und *L. bifidum* hat bei Patienten mit Colonadenomen zur Normalisierung der Hyperproliferation geführt²⁶⁸. RIEGER ET AL.²⁶⁹ zeigten durch Kombination einer Human- und Zellkulturstudie (HT-29 Zellen) mit

²⁶⁶ Hoffmann, L., 2003

²⁶⁷ Timmermanns, G. et al., 1994

²⁶⁸ Unger, S., 1999

²⁶⁹ Rieger, M. A. et al., 1999

Fäkalwasser, das eine Ernährung reich an Fett, Fleisch, Zucker und ohne Vollkornprodukte bzw. mit wenig Gemüse genotoxisch wirkt²⁶⁹.

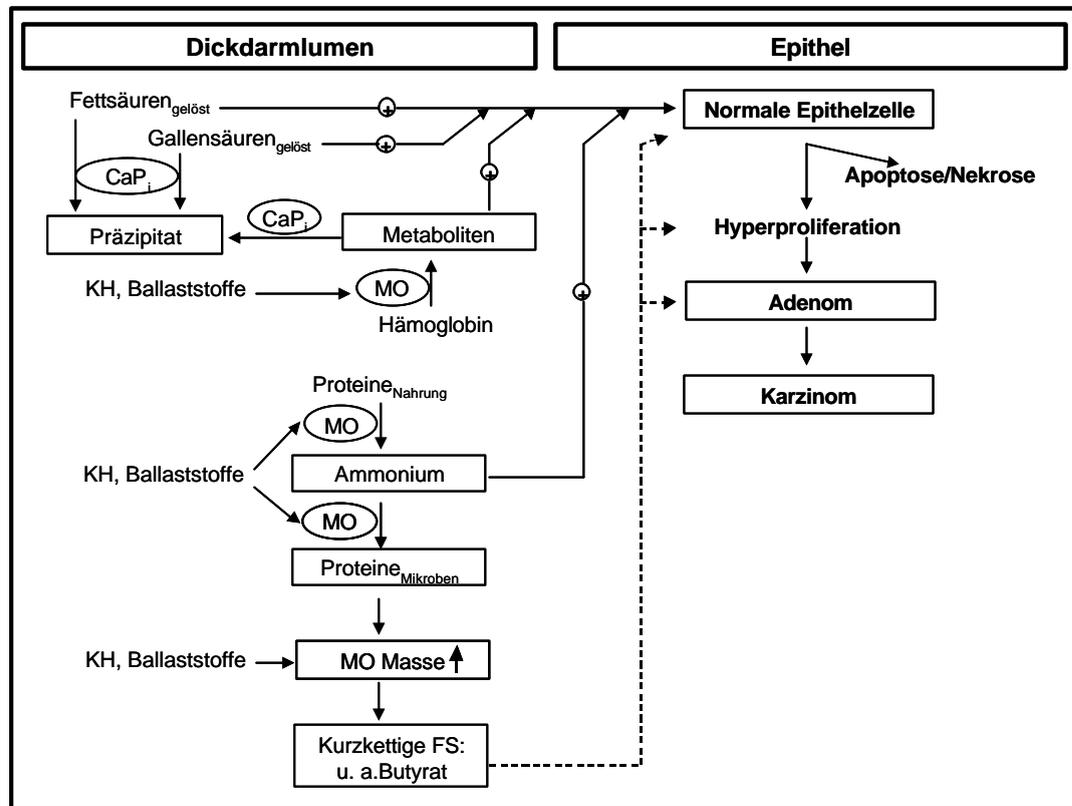


Abbildung 2-9: Colonkarzinogenese – unter Einbeziehung Ernährungs-abhängiger Promotoren (+) und Inhibitoren (–)

(Darstellung modifiziert nach JANSSEN unter Einbeziehung von VAN DER MEER bzw. PARODI²⁷⁰.)
 Abkürzungen: CaPi: Calciumphosphat, MO: Mikroorganismen, KH: Kohlenhydrate, FS: Fettsäuren

²⁷⁰ Van der Meer, R. et al., 1998, Parodi, P. W., 2003, Janssen, K.-P., 2004

2.3 Leukozyten – Zellen des Immunsystems

Das Immunsystem ist ein multizelluläres System, welches in verschiedenen Geweben zur Abwehr von Krankheitserregern aktiv ist. Immunzellen werden im roten Knochenmark (primäres Immunorgan) gebildet und über Blut- und Lymphbahnen zum Wirk- bzw. Aufenthaltsort transportiert. Makrophagen (Lymphknoten, Leber, Milz, Lunge, Niere) und polymorphkernige Granulozyten (Blut, Lymphe) bilden die erste Barriere für infektiöse Erreger (unspezifische Abwehr). B- und T-Lymphozyten (Lymphknoten, Milz, Wurmfortsatz, Mandeln bzw. Thymus) sind für die spezifische Immunabwehr verantwortlich, durch Sezernierung von spezifischen Antikörper bzw. Zellzerstörung (humorale bzw. zelluläre Immunantwort).

Im roten Knochenmark liegen Hämoytoblasten vor, aus deren Mitose jeweils zwei verschiedene Zellen hervorgehen: ein weiterer, pluripotenter Hämoytoblast und eine unipotente Vorläuferzelle. Aus dieser Stammzelle gehen die verschiedenen blutbildenden Zellen hervor. Die Differenzierung zu Mono-, Granulo- oder Lymphozyten (Immunabwehr) oder Erythrozyten (Gastransport) oder Thrombozyten (Blutgerinnung) findet aufgrund lokaler Faktoren und humoralen Einflüssen statt. Die reifen Zellen gelangen ins Blut bzw. in die Lymphe, zirkulieren oder werden in die sekundären Immunorgane transportiert.

Die Immunzellen (Mono-, Granulo- oder Lymphozyten) wurden im Vergleich zu den roten Blutkörperchen (Erythrozyten) als weiße Blutkörperchen (Leukozyten) bezeichnet. Diese Zellen bestehen aus einem Zellkern (u. U. mit sichtbarem Kernkörperchen) und umgebenden Zytoplasma, welches verschiedene Granulationen und Vakuolen enthalten kann. Die Granulozyten lassen sich u. a. nach Färbung unterscheiden in:

- Neutrophile Granulozyten zur Abwehr von Bakterien durch Phagozytose,
- Eosinophile Granulozyten zur Abwehr von Parasiten,
- Basophile Granulozyten, die Kreislauf-regulierende Substanzen (Histamin, Serotonin, Heparin) sezernieren.

Im Verlauf des Granulozyten-Reifungsprozesses verändert sich die Zellkernmorphologie: die der Stammzelle, des Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten sind rund, die der Metamyelozyten sind länglich. Aus diesen Zellen entwickeln sich die stab- und segmentkernigen (polymorphkernigen) Granulozyten, deren Zellkerne drei bis vier Segmente aufweisen, die fadenförmig miteinander verbunden sind. Mit dem Alter der Zellen nimmt der Zellkern-Durchmesser ab, von 12 – 16 µm (Myelozyt) auf 9 – 13 µm (polymorphkerniger Granulozyt).

Als polymorphkernige Leukozyten (PML) werden segmentkernige, neutrophile Granulozyten bezeichnet. Diese im Blut zirkulierenden Zellen gelangen zu ihrem Wirkort aufgrund einer geregelten Migration: entzündetes Gewebe sendet verschiedene Botenstoffe (Zytokine) aus, die u.a. an der Glykokalix der apikalen Membran von Endothelzellen (Kapillaren von Venen, Lymphbahnen) adhären und die Freisetzung weiterer Botenstoffe induzieren. Dies bewirkt

die Verlangsamung der im Blutstrom zirkulierenden PML, die anschließend über das Endothel rollen und nachfolgend an diesem Integrin-vermittelt adhäreren. Dabei flachen die runden PML innerhalb von Sekunden ab, passieren *tight junctions* sowie die Basalmembran des Endothels (Diapedesis) und migrieren in entzündete Gewebe²⁷¹ (u. a. ins Zahnfleisch bzw. die Zahnwurzelhaut bei Parodontitis bzw. Gingivitis). PML migrieren jedoch auch unabhängig vom Auftreten von Entzündungen in die Mundhöhle²⁷².

2.4 Einsatz von Zellkulturen zum Nachweis der Wirkung und des intestinalen Transports bioaktiver Substanzen

Biologische Testsysteme (Zell-, Gewebekulturen, Tierversuche oder Humanstudien) sind notwendig, um die Wirkung bioaktiver Substanzen in Bezug auf spezielle *in vivo*-Fragestellungen zu untersuchen. Zellkulturen weisen gegenüber Gewebekulturen bzw. Tierversuchen und Humanstudien u. a. folgende Vorteile auf:

- Unbegrenzte Verfügbarkeit des Zellmaterials.
- Gewährleistung kontrollierter, reproduzierbarer Versuchsbedingungen.
- Ausschaltung systemischer Einflüsse zum Nachweis einzelner Wirkmechanismen.
- Zeit-abhängige, wiederholte und/oder gleichzeitige Probenentnahmen sind möglich.
- Prüfung an einer großen Zahl von Testsystemen (Zelltypen) pro Dosis ist möglich.
- Kostenersparnis (schnelle Durchführung, geringer Verbrauch an Testchemikalien, geringe Versuchsrückstände etc.).
- Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen durch Studien mit Humanzellen verbessert.
- Keine ethischen Bedenken.
- Keine Genehmigungsverfahren.

Der Einsatz von Humanzellkulturen ist für bestimmte Fragestellungen eine Alternative zu Humanstudien, kann diese jedoch nicht vollständig ersetzen. Die Zellkultur-Ergebnisse ermöglichen jedoch ein effektives Design und eine Verkürzung klinischer Studien. In diesen werden u. a. die Interaktion (u. a. Synergismen) zwischen Organsystemen bzw. Geweben untersucht oder chronische Effekte erfasst. Die Reversibilität oder Heilung toxischer Effekte ist einzig *in vivo* zu beobachten²⁷³.

²⁷¹ Adams, D. H. & Shaw, S., 1994

²⁷² Ashkenazi, M. & Dennison, D. K., 1989

²⁷³ Kaiser, T., 1999, Gindorf et al., 2001

2.4.1 Zellisolierung und Kultivierung im Labor

Da Zellkulturen eine Alternative zu Humanstudien darstellen, ist die Einhaltung hoher Qualitäts- und Sicherheitsstandards erforderlich, die als *Good Cell Culture Practice* zusammengefasst werden²⁷⁴. Dadurch wird die Arbeit mit Zellkulturen u. a. an räumliche und technische Voraussetzungen gebunden, die durch verschiedene Vorschriften (zur Sicherheit, Reinigung, Entsorgung, u. a.) geregelt sind. Diese dienen zum Schutz des Menschen und der Umwelt vor der tatsächlichen oder potenziellen Gefahr durch Zellkulturen (Personenschutz) sowie zum Schutz der Zellkulturen vor unerwünschter Kontamination (Produktschutz)²⁷⁵.

2.4.1.1 Ableitung von Zell-Linien

Eine Primärkultur entsteht durch Isolierung gewünschter (gesunder oder kranker) Zellen aus einem Gewebe, u. a. durch enzymatische Dissoziation und Trennung verschiedener Zelltypen, u. a. durch Gradientenzentrifugation. Zur Kultivierung erfolgt die Zellaussaat in inerte Kulturflaschen: Blutzellen und Mikroorganismen leben in Suspensionen, andere Zellen (z. B. Caco-2 Zellen) adhären am Untergrund. Zellvermehrung und –wachstum finden überwiegend in der proliferativen Phase statt. Die Zelldifferenzierung ist ein Merkmal der stationären Phase, in die Zellen u. a. aufgrund von Zell-Zell-Kontakten überwechseln, die z. B. bei Ausbildung von Monolayern auftreten. Diese Kontakthemmung existiert in Tumorzellen i. d. R. nicht, so dass diese oftmals mehrere Zellschichten übereinander ausbilden.

Eine Zell-Linie entsteht durch wiederholte Subkultivierung (das Passagieren). Dazu werden adhären Zellen durch enzymatische Dissoziation (z. B. mit EDTA-Trypsin) vom Kulturboden gelöst, in Medium suspendiert und nach Zentrifugation wird das zellschädigende, enzymhaltige Medium durch frisches ersetzt. Natürlicherweise teilen sich Vertebratenzellen 30 bis 50-mal und unterliegen anschließend dem natürlichen Zelltod (der Apoptose). Eine Immortalisierung der Zellen kann experimentell induziert werden oder tritt spontan auf, z. B. bei Tumorzellen. Dadurch entsteht eine unsterbliche Kultur (permanente Zell-Linie), deren Zellen die charakteristischen Merkmale des entsprechenden Zelltyps ausbilden. Diese Zellen sind unbeschränkt oft subkultivierbar, in flüssigem Stickstoff lager- und transportierbar und nach dem Auftauen erneut kultivierbar. Permanente Zell-Linien, wie z. B. Caco-2 Zellen (2.4.3), werden durch (inter)nationale Zellbanken vertrieben (z. B. durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, die American Type Culture Collection in den USA, die Riken Gene Bank in Japan oder die European Collection of Animal Cell Cultures in Großbritannien).

²⁷⁴ Haltner, E., 2001, Hartung, Th. et al., 2002

²⁷⁵ Lindl, T., 1994

2.4.1.2 Kulturbedingungen

Für die jeweilige gewählte Zellart ist eine Kultivierung unter optimalen Bedingungen zu gewährleisten. Dazu ist ein geeignetes Nährmedium auszuwählen, welches die zur Proliferation und Differenzierung (*in vitro*) notwendigen Substanzen enthält, die die Zellen nicht selbst synthetisieren können (z. B. Glucose, Aminosäuren, Vitamine, Natrium-Hydrogenkarbonat u. a. Salze). Da L-Glutamin für viele Zellen die wachstumsbegrenzende Aminosäure darstellt, wird diese ebenso supplementiert, wie Antibiotika (Streptomycin, Penicillin) zum Schutz der Kultur vor mikrobiellen Infektionen und Fötales Kälberserum, welches wichtige Wachstumsfaktoren enthält. Humanzellen werden im Brutschrank aufbewahrt, zur Gewährleistung einer Temperatur von 37 °C und einem Kohlenstoffdioxid-Partialdruck von 5 %. Dies sind zum menschlichen Organismus vergleichbare Bedingungen²⁷⁶.

Zur Durchführung von Tests erfolgt die Zellaussaat in einer definierten Dichte auf das entsprechende Kulturmaterial. Auch die Kulturdauer ist abhängig von der Fragestellung. Im Falle der Caco-2 Zellen kann die Wirkung bioaktiver Substanzen auf Tumor- bzw. Enterozyten-ähnliche Zellen untersucht werden. Dazu werden die Zellen kurzzeitig (0 – 3 Tage: proliferative Phase) bzw. längerfristig (mindestens 10 Tage: stationäre Phase) unter Standardbedingungen kultiviert. U. a. Transportstudien werden mit differenzierten Caco-2 Monolayern durchgeführt, so dass die notwendigen zellulären Merkmale (Bürstensaum-Enzyme, Transporter, *tight junctions*) nachweislich ausgebildet sind.

2.4.1.3 Kulturmaterial

Das inerte Kulturmaterial (u. a. PS: Polystyrol, PP: Polypropylen) wird entsprechend der Zielsetzung ausgewählt. Zur Subkultivierung werden die Zellen in Kulturflaschen unterschiedlicher Größe und zur Durchführung der verschiedenen Tests zumeist in Kavitäten (Wells) von Mikrotiterplatten (MTP: 6 – 365 Kavitäten; u. a. aus PS, PP) ausgesät. Zur nachfolgenden, automatisierten Detektion von Farbstoffen eignet sich das Ein-Kompartiment-System, wobei u. a. die Materialfarbe Einfluss auf das Ergebnis nimmt (z. B. schwarze/transparente MTP für Fluoreszenz-/Absorptions-Messungen). Zur Durchführung von Transportstudien, ist ein statisches oder dynamisches Zwei-Kompartiment-System zu wählen. In Systemen mit Inserts (z. B. Transwell[®], Millicell[®]) trennt eine Membran das apikale vom basolateralen Kompartiment. Diese Membranen weisen Porengrößen zwischen 0,1 bis 4 µm auf und sind aus unterschiedlichen Materialien gefertigt, z. B. Polyethylen (PE, translucent), Polycarbonat (PC, geringe Proteinbindung), Nitrocellulose (NC, hohe Bindung hydrophober Substanzen) oder Polytetrafluoroethylen (Teflon, verhindert Zelladhäsion). Die Membranen sollen eine möglichst freie Diffusion der jeweiligen Testsubstanz (u. a. hydrophile, hydrophobe, nieder- bzw. hochmolekulare Substanzen) gewähren und die Zelladhärenz und Ausbildung eines Monolayers

²⁷⁶ Audus, K. et al., 1990, Lindl, T., 1994

unterstützen. Letzteres ist bei Teflonmembranen bzw. Poren größer 0,4 µm nicht gewährleistet, so dass zumeist mit Kollagenbeschichtung gearbeitet wird²⁷⁷.

2.4.2 Zelluläre Ereignisse und Nachweismethoden

Die verschiedenen vorhandenen Zellkultursysteme werden zur Identifizierung und Charakterisierung bioaktiver Substanzen und zur Untersuchung ihrer Bioverfügbarkeit eingesetzt sowie zur Abschätzung möglicher unerwünschter Nebenwirkungen (u. a. akute, chronische Toxizität, Kanzerogenität, Mutagenität, Teratogenität bzw. antioxidative, antiinflammatorische Wirkungen). Die dazu angewendeten zellchemischen Nachweisverfahren basieren auf den grundlegenden zellulären Ereignissen: Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Zelltod (Apoptose und Nekrose). Die zellchemischen Forschungsergebnisse ermöglichen eine Reduzierung notwendiger Tierversuche sowie eine effiziente Durchführung von Humanstudien vor dem Einsatz identifizierter bioaktiver Substanzen in (funktionellen) Lebensmitteln.

2.4.2.1 Zytotoxizität und Antikanzerogenität

Der Begriff Zytotoxizität fasst alle unerwünschten Effekte zusammen, die eine Substanz auf die Viabilität gesunder Zellen ausübt und zum Zelltod führten, unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus (Apoptose oder Nekrose)²⁷⁸. Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigten auf, dass eine akute Zytotoxizität unabhängig vom Zelltyp nachweisbar ist, unter Einsatz der verschiedensten Methoden (z. B. WST-1 Test, Neutralrot-Färbung, Zellzählung oder Bestimmung des zellulären Gesamtproteins)²⁷⁹. Diese Erkenntnisse flossen in die europäischen Norm 30993-5 (DIN ISO 30993-5) ein, welche die Prüfung der Zytotoxizität mit *in vitro*-Methoden zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten regelt. Die Einhaltung der Norm wird durch Einsatz eines vorgegebenen Prüfverfahrens realisiert, unter Angabe der eingesetzten, mykoplasmenfreien Zellkultur (anerkannte Zelllinie), den Kulturbedingungen sowie der angewendeten Nachweismethode, des Prüfberichts und einer Ergebnisbeurteilung durch eine kompetente Person²⁸⁰. Aufgrund dessen sind die unten aufgeführten Methoden Norm-konform, wenn das vorgegebene Prüfverfahren eingehalten wurde.

Ein Spezialfall der Zytotoxizität ist die Antikanzerogenität, die dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Substanz auf Tumor- (Kanzer-) Zellen zytotoxisch wirkt und gleichzeitig keine negative Wirkung auf gesunde Zellen ausübt²⁸¹. Eine potenziell antikanzerogene Substanz

²⁷⁷ Audus, et al., 1990, Wilson, G. et al., 1990, Artursson, P., 1990, Informationen der Herstellerfirmen Corning, NY, USA bzw. Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.

²⁷⁸ Hartmann, R. & Meisel, H., 2000

²⁷⁹ Babich, H. et al., 1991, Martin, A. & Clynes, M., 1991, Kaiser, Th., 1999, v. Berridge, M. & Tan, A. S., 2000

²⁸⁰ Boehringer Mannheim, 1998, v. Berridge, M., 1996, Francoer, A., 1997, DIN EN 30993-5, 1994

²⁸¹ Debatin, K. – M., 2000

wird durch Nachweis von Apoptose (jedoch nicht Nekrose) in Tumorzellen identifiziert und zusätzlichem Nachweis der unbeeinflussten Vitalität gesunder Zellen.

2.4.2.2 Zellviabilität

Gesunde (viable) Zellen sind zur Aufrechterhaltung ihres physiologischen Metabolismus fähig, wodurch Zellproliferation, -wachstum und –differenzierung realisiert werden. Diese Stadien werden im Zellzyklus zusammengefasst, den gesunde Vertebratenzellen innerhalb von 15 bis 30 h durchlaufen. Tumorzellen hingegen beenden diesen nach 12 bis 20 h²⁸².

Zellviabilitäts-Nachweismethoden

Zelluläre Lebensprozesse sind mit unterschiedlichen Methoden nachweisbar und werden durch bioaktive Substanzen moduliert. Die verschiedenen Zellviabilitäts-Nachweismethoden geben u. a. Aufschluss über die Anzahl gesunder Zellen in einer Probe bzw. deren Veränderung im Zeitverlauf (Proliferation), die Integrität der Zellmembran oder den Differenzierungsgrad. Hierbei werden einerseits unspezifische Merkmale untersucht, die größtenteils unabhängig vom Zelltyp sind: Zelldimensionen (Volumen, Größe), metabolische Aktivität oder Permeabilität der Zellmembranen für spezifische Substanzen (z. B. Farbstoffe). Andererseits werden spezifische Merkmale nachgewiesen durch Einsatz u. a. der ELISA-Technik, Durchflusssytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie. Zum Nachweis von Zelldifferenzierung wird die Ausprägung Zellart-spezifischer Merkmale untersucht²⁸³.

Tabelle 2-26 gibt einen schematischen Überblick der Zellviabilitäts-Nachweismethoden, die einerseits nach Aussaat der unterschiedlichsten Zellarten durchgeführt werden können und andererseits typische Merkmale adhärent wachsender Caco-2 Zellen berücksichtigen, da diese Zellen das Hauptzellkultursystem dieser Arbeit sind.

Zur Überprüfung der Zellviabilität kann eine Zell(kolonie)zählung durchgeführt werden, unter Einsatz des Umkehrmikroskops oder durch Einzelzellzählung. Dazu ist es notwendig, dass adhärent wachsende Zellen (z. B. Caco-2) zuvor vom Kavitätenboden gelöst werden. Dieser Vorgang wirkt teilweise zellzerstörend und hat somit Einfluss auf das Zählergebnis. Anschließend wird die Zellzahl ermittelt, unter dem Mikroskop (Zählkammer ohne/mit Anfärbung, u. a. durch Trypanblau) oder im Zell-Counter (s. 3.3.3), u. a. durch ein „Strom-Ausschluss-Verfahren“. Diese Methoden sind hoch sensibel und reproduzierbar²⁸⁴. Durch mikroskopische Beobachtung lässt sich außerdem die Entwicklung des Zellrasens (Konfluenz, Ausbildung von *domes*) sowie die Morphologie der Einzelzellen bewerten²⁸⁵.

²⁸² Löffler, G. & Petrides, P. E., 1997, Rehner, G. & Daniel, H., 1999, Stevens, A., 1999

²⁸³ Hartmann, R. & Meisel, H., 2000

²⁸⁴ Schärfe, J., 2004

²⁸⁵ Lindl, T., 1994, Pinto, M. et al., 1983

Tabelle 2-26: Beispiele für Zellviabilitäts-Nachweismethoden, die sich zur Prüfung der Zytotoxizität entsprechend der EU Norm 30993-5 eignen.

(Eigene Darstellung; Quellenangaben s. im Text.)

Merkmale der Zellviabilität: der Proliferation / des Differenzierungsgrades	Beispiele für Nachweismethoden
Anzahl der Zellen (und Zelldimensionen)	Zellzählung u. a. per Mikroskop, Zell-Counter
Morphologie (Einzelzelle, Monolayer)	mikroskopische Beobachtung
DNA-Synthese	Testsysteme, zum Substanzeinbau in die DNA: <ul style="list-style-type: none"> ▪ [³H]-TdR (Thymidin) ▪ BrdU (Uridin)
Metabolische Aktivität:	
▪ Reduktase-Aktivität	Tetrazoliumsalze, u. a. WST-1
▪ Proteinsynthese	Färbemethoden, u. a. Coomassie-Brilliant-Blau
▪ Bildung/Funktion von <i>tight junctions</i>	▪ Messung des TEER, der Potenzialdifferenz
	▪ parazellulärer Transport von Referenz-Substanzen
▪ Bildung/Funktion von Transportern (z. B. PepT1)	▪ radioaktiv markierte Peptide
▪ Bildung spezifischer Enzymsysteme	▪ Peptid-Nachweis u. a. durch HPLC
	▪ Nachweis von: alkalischer bzw. saurer Phosphatase, Dipeptidyl-Amino-peptidase IV
Permeabilität der Zellmembran:	
▪ Extrazelluläre Lactat-Dehydrogenase (LDH)	▪ Enzymtests u. a. mit p-Nitrophenyl-Phosphat
▪ Intrazelluläre aufgenommene Farbstoffe	▪ Nachweis von Farbstoffen, z. B. Neutralrot

Die Zellproliferation wird außerdem anhand der zellulären DNA-Syntheseleistung durch Einsatz handelsüblicher Reagenzien-Kits quantifiziert. Dabei werden die Zellen u. a. mit radioaktiv markiertem Thymidin (³H]-TdR) oder mit Uridin (5'-Bromo-2'-Desoxyuridin: BrdU) inkubiert. Diese Basen werden ausschließlich von proliferierenden Zellen ins Genom eingebaut und verbleiben nach Waschschriffen in der Probe. Der Nachweis erfolgt anschließend im Szintillationszähler oder durch Einsatz Peroxidase-gekoppelter Antikörper und geeigneter Substrate im ELISA-Photometer. Anderen Phasen des Zellzyklus werden mit Hilfe von unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern untersucht, welche an zellkern-assoziierte Proteine binden. Diese Nachweise greifen jedoch nur auf Einzelzellebene (*in situ*) und beruhen auf immunozytochemischen und -histochemischen Techniken²⁸⁶.

Eine durch die Food and Drug Administration validierte Methode zur Bestimmung von Zytotoxizität ist die Untersuchung der zellulären Reduktase-Aktivität (metabolische Aktivität) durch Zugabe eines Tetrazoliumsalzes (MTT und dessen Derivate: u. a. XTT oder WST-1). MTT ist der Prototyp, der intrazellulär durch NAD(P)H-abhängige Enzyme der Glycolyse zum wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Die notwendige Solubilisierung des Reaktionsproduktes und die Abhängigkeit des Ergebnisses vom Glucosegehalt des Mediums sind entscheidende Nachteile, die durch Entwicklung weiterer Tetrazoliumsalze (XTT, WST-1) ausgeglichen wurden. WST-1 wird in einer gebrauchsfertigen NADH-haltigen Testlösung angeboten und von einer Vielzahl verschiedener Zellarten innerhalb kurzer Zeit (min) zum dunkelroten, wasserlöslichen Formazan reduziert. Dieses Reaktionsprodukt ist ohne weiteren

²⁸⁶ Unteregger, G., 1997, Boehringer Mannheim, 1998

Arbeitsschritt photometrisch detektierbar. Da WST-1 nicht zytotoxisch wirkt, sind Messungen an einer Zellkultur in Zeitabständen (Stunden bis Monate) möglich. Aufgrund dieser einfachen und schnellen Durchführung und Reproduzierbarkeit eignet sich diese Methode für Screening-Tests²⁸⁷ und stellt eine geeignete Alternative zum Draizetest²⁸⁸ dar²⁸⁹.

Der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings noch nicht genau bekannt. Da die Anwesenheit von Mitochondrien oder der Superoxiddismutase die Formazanbildung hemmt, wird angenommen, dass diese Reaktion Superoxid-abhängig ist und extrazellulär und/oder membrangebunden stattfindet²⁹⁰. VON BERRIDGE UND TAN²⁹¹ untersuchten den Mechanismus der WST-1 Reduzierung unter Einsatz von 15 verschiedenen Zellkulturen. Die Autoren wiesen zunächst darauf hin, dass die Zellmembranen in komplexer und ständiger Kommunikation mit dem Extra- und Intrazellularraum stehen, wozu eine ständige Reduzierung extrazellulär vorliegender Substanzen notwendig ist. Dazu existieren vermutlich verschiedene komplexe (trans-)membrane Enzymsysteme (Oxidoreduktasen), die interagieren. Die Autoren wiesen nach, dass auf den Zellmembranen gesunder, teilungsfähiger Zellen eine Oxidoreduktase existiert, die in Anwesenheit von NADH (oder anderen, in Körperflüssigkeiten natürlicherweise vorliegenden Cofaktoren) das WST-1 zu Formazan reduziert. Damit wurde nachgewiesen, dass WST-1 die Zellmembran nicht permeiert²⁹¹.

In weiteren Testsystemen wird das Vorhandensein der Cofaktoren NADH und ATP (Primärzellen und Zell-Linien) zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen ausgenutzt. Appliziertes Resazurin wird NAD⁺-abhängig zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resurin reduziert. Luciferin wird unter ATP-Aufwand und Verbrauch molekularen Sauerstoffs zu Oxyluciferin oxidiert, wobei CO₂ und Licht entstehen. Die jeweiligen Signale werden im Fluoreszenz-, Spektralphotometer bzw. Luminometer oder mit einer CCD-Kamera detektiert²⁹².

Für Zytotoxizitätsbestimmungen entsprechend der genannten Europäischen Norm wird „Alpha Tox“ angeboten. Dieser „Ready-to-use“-Testkit enthält viable Zellen (u. a. HeLa, Hep-G2, HL-60), die werkseitig in 96-Kavitäten-MTP ausgesät und vorkultiviert wurden, so dass die relativ aufwendigen Routine-Zellkultivierungsmaßnahmen für den Anwender entfallen. Die jeweiligen Testsubstanzen werden in die Kavitäten pipettiert und die Veränderung der Zellviabilität wird nachfolgend visuell oder photometrisch ermittelt. Als Nachweismethoden werden die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (Proteinfärbung) oder Neutralrot (Vitalitätstest) sowie der Einsatz einer fertigen Tetrazoliumsalzlösung angeboten²⁹³.

²⁸⁷ Wang, K. et al., 2002, Boehringer Mannheim, 1998

²⁸⁸ Draize-Test: dient der Identifizierung von Reizstoffen, nach deren Auftragen auf Kaninchen (Binde-) Haut

²⁸⁹ Huhtalla, A. et al., 2003

²⁹⁰ v. Berridge, M., 1996, Boehringer Mannheim, 1998

²⁹¹ v. Berridge, M. & Tan, A. S., 2000

²⁹² Promega GmbH, 2003, ("1 Proliferations assays")

²⁹³ Kaiser, T., 1999

Adhärenente Zellen (z. B. Caco-2 Zellen) bilden in Kultur innerhalb kurzer Zeit einen Monolayer. Die Anzahl und Funktionsfähigkeit (Dichtigkeit) der Zell-Zellkontakte (*tight junctions*) nimmt unter günstigen Kulturbedingungen Zeit-abhängig zu und ist durch Inkubation mit bioaktiven Substanzen modulierbar. Diese Wirkungen sind u. a. durch (wiederholte) Messung des trans-epithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) nachweisbar (s. 2.2.3.2.2 bzw. 3.7.3). Der Vorteil dieses Mess-Systems liegt darin, dass es keinen modulierenden Einfluss auf die Zellvitalität aufweist, so dass Verlaufsuntersuchungen über lange Zeiträume möglich sind. Liegt ein konfluenter Monolayer vor, so steigt der TEER mit der Anzahl und Funktionsfähigkeit der *tight junctions* an und die parazelluläre Durchlässigkeit für niedermolekulare, wasserlösliche Substanzen nimmt ab. Infolge dessen ist die Monolayer-Integrität zusätzlich durch Transportstudien nachweisbar, wobei niedermolekulare, wasserlösliche Referenzsubstanzen die *tight junctions* passieren: u. a. Mannitol, Phenolrot, Lucifer Yellow, [¹⁴C] Inulin oder Flourescein (Molekulargewichte: 192, 354, 475, 500). Die Substanzsignale werden mit Hilfe von Photometrie, Fluorometrie, Lumineszens- oder Radioaktivitätsmessungen detektiert.

Das Differenzierungsstadium von Enterozyten (z. B. Caco-2 Zellen) wird u. a. durch Messung der Aktivität unterschiedlicher Bürstensaumenzyme untersucht. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) kann durch Einsatz unterschiedlicher Substrate (Phenyl-Phosphat, p-Nitrophenyl-Phosphat oder Fluorophos[®]) untersucht werden. Als Bezugsgröße wird das Gesamtzellprotein ermittelt, z. B. mit Coomassie-Brilliant-Blau²⁹⁴. Der Nachteil des fehlenden Referenzproteins wird mit der derivativ-spektroskopischen Bestimmung des Tryptophan-gehaltes umgangen, der ein äquivalenter Parameter zum Proteingehalt der Probe ist²⁹⁵. Die Aktivitäten der sauren Phosphatase²⁹⁶ bzw. Dipeptidyl-Amino-peptidase IV²⁹⁷ sind u. a. durch Zugabe von Nitrophenylphosphat bzw. Dipeptidyl-β-Naphtylamid, Gly-Pro-7-Amido-4-Methylcoumarin oder Dipeptidyl-p-Nitroanilid photometrisch nachweisbar. Die jeweiligen Farbintensitäten korrelieren direkt mit der Zellzahl.

Eine Veränderung der Zellmembran-Permeabilität durch bioaktive Substanzen wird u. a. durch Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) untersucht. Dieses intrazelluläre Enzym ist ausschließlich nach Zerstörung von Zellmembranen im Kulturüberstand vorhanden und oxidiert Lactat zu Pyruvat, wobei NAD⁺ reduziert wird. In einer zweiten Reaktion wird ein Tetrazoliumsalz (INT) zum colorimetrisch messbaren Formazan reduziert²⁹⁸.

Die Neutralrot-Färbung ist eine validierte Referenzmethode für Zytotoxizitätsuntersuchungen (Europäisches Zentrum für Validierung von Alternativen Methoden), die außerdem eine Alternative zum Draizetest (s.²⁸⁸) darstellt²⁹⁹. Der Farbstoff Neutralrot permeiert Membranen viab-

²⁹⁴ Kaiser, T., 1999, Lowry, O. et al., 1951, Matsumoto, H. et al., 1990, Rocco, R. M., 1989

²⁹⁵ Meisel, H., 1995

²⁹⁶ Martin, A. & Clynes, M., 1991

²⁹⁷ Sanz, Y. & Toldrá, F., 2001, Gatti, M. et al., 1999, Harris, M. N. et al., 2001, Auricchio, S. et al., 1978

²⁹⁸ Roche Molecular Biochemicals, 2000 ("Tools for cell proliferation and cytotoxicity research")

²⁹⁹ Babich, H. & Borenfreund, E., 1990

ler Zellen und wird in Lysosomen akkumuliert. Nach Entfernen nicht transportierter Farbstoffreste werden die Zellen fixiert, lysiert und das Neutralrot freigesetzt. Dieses wird nachfolgend photometrisch detektiert (s. 3.7.1). Die Farbintensität korreliert direkt mit der Zellzahl.

2.4.2.3 Zelltod

Apoptose und Nekrose sind zwei verschiedene Mechanismen, die zum Zelltod führen. Nekrose tritt nach einer extremen Abweichung von physiologischen Bedingungen auf, durch Einwirkung physikalischer (starke Hitze, Strahlung), mechanischer (Schlag), chemischer bzw. biochemischer (metabolische Gifte, Sauerstoffmangel, Komplementfaktoren) Noxen auf die Zelle bzw. durch Pathogene (Viren). Die dadurch verursachten Schädigungen betreffen immer mehrere Zellen eines Gewebes. Diese Zellen schwellen aufgrund von Membranschädigungen und Störung des osmotischen Gleichgewichts zunächst an und platzen später. Der freigesetzte Zellinhalt verursacht Entzündungen und immunologische Reaktionen im Organismus. Eine dabei auftretende DNA-Fragmentierung erfolgt immer zufällig (unregelmäßig große DNA-Bruchstücke) und nachfolgend werden diese Fragmente im Organismus phagozytisch (ohne Energieverbrauch) eliminiert.

Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, der durch autonome Gene differenzierter (Apoptose-kompetenter) Zellen beeinflusst wird und nach einem festgelegten Programm abläuft. In einem gesunden Gewebe sind grundsätzlich nur bestimmte Zellen von Apoptose betroffen. Der Ablauf des programmierten Zelltodes ist insbesondere an der Nematode *Caenorhabditis elegans* studiert worden, deren Gene Ced-3 und Ced-4 Apoptose-induzierende Proteine codieren, während das Ced-9 Genprodukt die Apoptose unterdrückt. In Säugerzellen werden vergleichbare Gene und deren Produkte gefunden, z. B. die Bcl-2-Genfamilie, die vergleichbar mit Ced-9 ist. Als Genprodukte werden Proteine synthetisiert, welche Apoptose fördern (z. B. bad, bak, bax, bik, bcl_x, c-jun, hrk, p53) oder hemmen (z. B. brag-1, bcl-2, bcl-x_L, mcl-1, a1, bfl-1). Diese Proteine interagieren miteinander und bilden Dimere, wobei der überwiegende Proteinanteil darüber entscheidet, ob die Zelle überleben oder absterben wird. Diesen Mechanismus nutzen Viren (z. B. Epstein-Barr-Virus), indem sie die bcl-2 Synthese aktivieren und sich so vor der Immunabwehr des Wirts schützen. Eine Immortalisierung von Zellen erfolgt, wenn das Protein p53 codierende Gen fehlt oder mutiert ist (dies ist häufig in Tumorzellen der Fall). Ein anderes Apoptose-regulierendes Gen ist das c-myc Proto-Onkogen, welches im Beisein von Wachstumsförderern die Proliferation stimuliert und bei deren Fehlen mittels c-myc-Proteins Apoptose induziert³⁰⁰.

Apoptose wird einerseits genetisch und andererseits durch verschiedenste Signale (z. B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine) reguliert und dient im Organismus zur Eliminierung funktionslos gewordener Zellen, u. a. während der Ontogenese oder in der (laktierenden)

³⁰⁰ Boehringer Mannheim, 1998, Coulter-Immunotech Diagnostics, 1998, Fesus, L. et al., 1991

Milchdrüse. Die Darmschleimhaut wird durch Apoptose vor der permanenten mutagenen Gefahr aus der Nahrung geschützt³⁰¹.

Apoptose wird im Verlauf pathophysiologischer Vorgänge oder unter dem Einfluss zytotoxischer Substanzen induziert, z. B. durch UV- oder radioaktive Strahlung, Medikamente (Chemotherapeutika, Glucocorticoide, Retinolsäuren, Thyroxin), bioaktive Substanzen (u. a. modifizierte Ribonucleoside³⁰²) sowie durch Ca^{2+} -Ionophore oder durch Verletzungen, die einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verursachen³⁰³.

Der komplexe Ablauf des programmierten Zelltods ist zwar noch nicht vollständig aufgeklärt, es werden jedoch charakteristische morphologische und biochemische Merkmale während der Signal- (Reaktions-) Kaskade ausgebildet (Abbildung 2-10), die mit unterschiedlichen Methoden nachweisbar sind. Der Prozess der Apoptose ist innerhalb von ca. 4 h abgeschlossen³⁰⁴.

Morphologische Merkmale	Biochemische Merkmale	Zeitlicher Bezug
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zelloberflächenveränderung ▪ Kontaktverlust zur Nachbarzelle ▪ Zelle schrumpft ▪ Einschnürungen der Zellmembran ▪ Kondensation des Zellkerns, des zytosolischen Proteins 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ aktivierte Caspasen-Kaskade: Caspase 3 (CPP32) ▪ Translokation der Phosphatidylserinreste von der inneren zur äußeren Membranseite ▪ Veränderung der Mitochondrienmembran: AIF und Cytochrom - Freisetzung 	frühe apoptotische Phase
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bildung von <i>apoptotic bodies</i> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center; margin-right: 10px;"> </div> <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="text-align: center; margin-right: 5px;"> <p>phagozytotische Eliminierung</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>sekundäre Nekrose: Lyse mit Entzündungsreaktion</p> </div> </div> </div> </div>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vernetzung zytosolischer Proteine (Transglutaminase) ▪ Aktivierung der Endonucleasen: Fragmentation der DNA in 180 – 200 bp 	späte apoptotische Phase

Abbildung 2-10: Morphologische und biochemische Merkmale der Apoptose nach Induzierung durch das FAS-Rezeptor-Liganden-System

(Eigene Darstellung nach Informationen von BOEHRINGER MANNHEIM bzw. FESUS³⁰⁵).

Zu den morphologischen Merkmalen einer frühen apoptotischen Phase gehört der Verlust der Oberflächenspezialisierung einer oder weniger individueller Zellen eines Gewebes, welche dadurch den Kontakt zur Nachbarzelle verlieren. Gleichzeitig kondensieren zytosolische und Zellkern-Proteine, unter Bildung von peripheren Chromatinkappen sowie Zellkernfragmenten. Außerdem verringert sich das zytosolische Volumen, die Zelle schrumpft. Die Zellorganellen

³⁰¹ Unteregger, G. et al., 1997, Löffler, G. & Petrides, P. E., 1997, Rehner, G. & Daniel, H., 1999

³⁰² Meisel, H. et al., 1998, Hartmann, R. et al., 1999

³⁰³ Fesus, L. et al., 1991

³⁰⁴ Fesus, L. et al., 1991

³⁰⁵ Boehringer Mannheim, 1998, Fesus, L. et al., 1991

bleiben dabei allerdings intakt. Nachfolgend kommt es zur Abschnürung vesikelartiger *apoptotic bodies* (apoptotische Körperchen). Diese enthalten Zellkernfragmente, intakte Organellen und zytosolische Bestandteile und sind von einer intakten Zellmembran umgeben.

In der Endphase werden die *apoptotic bodies* aufgrund bestimmter Merkmale, z. B. exponiertes Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, von Nachbarzellen oder Makrophagen erkannt und durch Phagozytose eliminiert. Dabei kommt es im Unterschied zur Nekrose weder zu einer Entzündungs- oder Immunreaktion noch zur Narbenbildung. *In vitro* wird in einer spät-apoptotischen Phase eine als „sekundäre Nekrose“ bezeichnete Lyse apoptotischer Zellen und deren Fragmente beobachtet³⁰⁶.

Die charakteristischen biochemischen Apoptose-Merkmale werden oftmals begleitet von einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Ein Teil der Apoptose-induzierenden Signale wird von Effektorzellen, z. B. aktivierten T-Zellen, Natürlichen Killer-(NK) Zellen oder Zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), über unterschiedliche Oberflächenrezeptoren an der Zielzelle vermittelt. Ein Beispiel dafür ist das CD95-(Fas)-Rezeptor-Liganden-System. Der Fas-Ligand (exprimiert in aktiven T-, NK-Effektorzellen und teilweise solubilisiert durch Metalloproteasen) oder ein Agonist binden an den Fas-Rezeptor. Dadurch wird die intrazelluläre Caspasen-Kaskade aktiviert. Ähnlich agiert der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) (CTL oder NK sind Effektorzellen). Das *granzyme B* dagegen gelangt mit Hilfe von Perforin in die Zelle und aktiviert dort selbst die Kaskade. Zur Familie der Caspasen (Cysteinyln-aspartic-acid-proteases) werden zehn verschiedene Enzyme gezählt, die jeweils durch Zusatz einer Ziffer zwischen 1 und 10 gekennzeichnet werden. Die Caspase 1 (Interleukin-1 β -converting Enzyme: ICE) wurde zuerst identifiziert und ist am besten beschrieben. Die verschiedenen Caspasen liegen intrazellulär als inaktive Enzyme vor und interagieren nach ihrer Aktivierung teilweise miteinander. Ein Marker der frühen apoptotischen Phase ist die aktivierte Caspase 3 (CPP32), durch welche die Signalkaskade ausgelöst wird und in deren Verlauf die entscheidenden biochemischen Reaktionen ausgelöst werden, die letztendlich zum Zelltod führen³⁰⁷.

Ein weiteres Merkmal der frühen Apoptose ist der Verlust der Zellmembran-Asymmetrie. Dabei werden etwa zeitgleich mit der Chromatinkondensation Phosphatidylserinreste von der inneren zur äußeren Membranseite translokalisiert. Diese stellen ein Erkennungsepitop u. a. für Makrophagen dar, welche die Zellfragmente phagozytotisch eliminieren. Außerdem wird die Membran der Mitochondrien verändert. Bei Anwesenheit des bax-bax Dimers gelangt der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ins Zytosol. AIF aktiviert die Caspasen-Kaskade bzw. gelangt in den Zellkern und führt autonom zum Zelltod. Ebenso gelangt Zytocrom C (Apaf-2) ins Zytosol, welches die Caspase 9 (Apaf-3) unter Energieaufwand (ATP) aktiviert und u. a. zur Bildung von Apoptosomen führt³⁰⁷.

³⁰⁶ Boehringer Mannheim, 1998, Fesus, L. et al., 1991

³⁰⁷ Boehringer Mannheim, 1998, Coulter-Immunotech Diagnostics, 1998, Fesus, L. et al., 1991, Kühnel, W., 1999, Maravei, D. et al., 1997, Stevens, A., 1999, Unteregger, G. et al., 1997

Im Verlauf der Kaskade werden außerdem Ca^{2+} -abhängige Transglutaminasen aktiviert. Diese vernetzen Proteine des Zytoskeletts miteinander und stabilisieren dadurch u. a. die Membranen der Zellfragmente (*apoptotic bodies*)³⁰⁸. Am Ende der Kaskade werden Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Endonucleasen im Zellkern aktiviert, welche die Chromosomen ausschließlich an der Linker-DNA spalten. Dadurch entstehen Mono- und Oligonucleosomen-Fragmente (180 – 200 Basenpaare oder ein Vielfaches davon). UV- oder radioaktive Strahlen sowie Chemotherapeutika (z. B. Camptothecin) verursachen dagegen zufällige DNA-Strangbrüche³⁰⁹. Dadurch werden unterschiedliche DNA-Reparaturenzyme aktiviert, z. B. die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Dieses Enzym (113 kD) wird in apoptotischen Zellen durch die Caspasen 3 und 7 inaktiviert, indem es in ein 89 kD und ein 24 kD Fragment gespalten wird³¹⁰.

Nachweis von Apoptose und Nekrose

Der Apoptose-Nachweis kann mit Hilfe einer Vielzahl verschiedener zellchemischer Methoden geführt werden und basiert zumeist auf intrazellulären biochemischen Veränderungen, die im Verlauf des programmierten Zelltods auftreten. Zur Aufklärung des komplexen Mechanismus von Apoptose ist es notwendig, verschiedene Nachweisverfahren parallel durchzuführen, da nicht in jedem Zelltyp und auch nicht nach jedem bekannten Stimulus die Gesamtheit der genannten Apoptose-Merkmale ausgebildet wird. Für den Nachweis des zytotoxischen Potenzials einer Substanz genügt ein positives Ergebnis (Apoptose oder Nekrose), hingegen wird eine potenziell antikanzerogene Substanz erst dann nachgewiesen, wenn nachweislich Apoptose und nicht Nekrose zum Zelltod von Tumorzellen geführt hat. Für den möglichen Einsatz einer potenziell antikanzerogenen Substanz ist zusätzlich nachzuweisen, dass diese Substanz keine zytotoxischen Wirkungen auf gesunde Zellen ausübt.

In der nachfolgenden Tabelle 2-27 werden biochemische Apoptose-Merkmale beispielhaft genannt sowie deren mögliche Nachweismethoden.

Eine altbewährte, jedoch aufwendige Methode zum Nachweis einer DNA-Fragmentierung ist die Auftrennung der spezifischen Nucleosomenfragmente durch Elektrophorese. Hierbei werden Apoptose bzw. Nekrose durch ein charakteristisches bzw. ungleichmäßiges Muster im Agarose-Gel (sog. Leitermuster, engl.: ladder bzw. „Schmier“) nachgewiesen. Die DNA-Fragmentierung ist außerdem mit Hilfe des Tunel-Assays (Terminal Desoxynucleotidyl-Transferase mediated dUTP-X nick end labeling) im Durchflusszytometer oder mit Fluoreszenz- bzw. Lichtmikroskopie nachweisbar. Dabei werden lysierte apoptotische Zellen mit DNA-Doppelstrangbrüchen durch enzymatischen Einbau eines biotinylierten oder Fluorescein-markierten Nucleotids (dUTP) markiert. Der Nachweis nekrotischer Zellen hingegen erfolgt durch enzymatische Markierung von Einzelstrangbrüchen (In-Situ-Nick-Translation-Methode).

³⁰⁸ Fesus, L. et al., 1991

³⁰⁹ Traganos, F. et al., 1993

³¹⁰ D'Amours, D. et al., 1998

Tabelle 2-27: Biochemische Apoptose-Merkmale und deren möglicher Nachweis(Eigene Darstellung nach Informationen von BOEHRINGER MANNHEIM³¹¹)

Biochemisches Merkmal der Apoptose	Beispiele für Nachweismethoden
DNA-Fragmentierung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elektrophorese (DNA-Leiter)* ▪ Tunel-Assay* ▪ Cell-Death-Detection ELISA*
Translokation des Phosphatidylserins	Annexin-V-Assay*
Aktive Caspase 3	Caspase 3 Activity Assay*
Aktive Caspasen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Homogenous Caspases Assay* ▪ M30 CytoDeath Assay* ▪ Anti-PARP-Assay
Zelloberflächenrezeptor Fas	Anti-Fas-Assays
Bcl-2 Protein	Anti-Bcl-2 Onkoprotein-Assays
p53-Protein	Anti-p53-Protein Assays

* Diese Nachweisverfahren werden im Text erläutert.

Der Cell-Death-Detection-ELISA^{PLUS} (s. 3.7.9) eignet sich zur Unterscheidung zwischen beiden Formen des Zelltods, durch Nachweis vorhandener spezifischer DNA-Fragmentierungen (Nukleosomen) im Zellkulturüberstand und Lysat (Nekrose). Sind die Nukleosomen ausschließlich im Zell-Lysat nachweisbar, so liegt Apoptose vor³¹¹.

Die Translokalisierung der Phosphatidylserinreste von der inneren zur äußeren Membranschicht ist ein Merkmal der frühen apoptotischen Phase, die durch Ca²⁺-abhängig Bindung von Annexin-V (MG 35,836 kD) nachweisbar ist. Je nach eingesetzten Annexin-Konjugat erfolgt der Nachweis mit unterschiedlichen Detektionssystemen (u. a. Durchflusszytometer, Fluorometer, Mikroskop). Zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose ist eine Gegenfärbung mit DNA-Farbstoffen (Flouorchrom: Propidiumiodid; Lichtmikroskopie: Trypanblau) notwendig. Diese Farbstoffe können die intakte Zellmembran apoptotischer Zellen nicht passieren und binden somit ausschließlich an die DNA nekrotischer Zellen³¹¹.

Der Caspase-3-Activity-Assay ist ein *fluorometric immunosorbent enzyme assay* (FIENA). In apoptotischen Zellen wird das intrazellulär vorliegende Proenzym frühzeitig aktiviert, durch Zell-Lyse freigesetzt und nachfolgend in eine mit Anti-Caspase-3-beschichteten MTP pipettiert. Die aktivierte Caspase 3 bindet an die Beschichtung und spaltet das angebotene Substrat, z. B. Ac-DEVD-AFC. Dabei entsteht ein flourometrisch messbares Produkt, dessen Detektiosignal proportional zur Konzentration der aktivierten Caspase 3 ist³¹².

Mit dem Homogeneous Caspasen Assay ist ein schneller, automatisierbarer fluorometrischer Nachweis der Aktivität verschiedener Caspasen (2, 3, 7 sowie 6, 8, 9, 10) möglich. Hierbei werden die apoptotischen Zellen mit einem Substrat (DEVE-Rhodamin 110) der aktivierten Caspasen inkubiert und gleichzeitig lysiert. In apoptotischen Zellen entsteht dabei das

³¹¹ Boehringer Mannheim, 1998³¹² Boehringer Mannheim, 1998, Coulter-Immunotech-Diagnostics, 1998, Unteregger, G., 1997

fluoreszierende Rhodamin 110. Die Enzymaktivität wird mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt³¹³.

Dem M30 CytoDeath Assay liegt die Erkenntnis zugrunde, dass ausschließlich aktivierte Caspasen das intrazellulär vorliegende Cytokreatin 18 spalten und die im Testsystem enthaltenen speziellen Antikörper ausschließlich an dessen Spaltprodukte binden. Diese Bindung ist aufgrund der an den Antikörper gekoppelten Farbstoffe nachweisbar. Die Signaldetektion erfolgt an Einzelzellen oder Geweben, mit FACS oder mikroskopisch³¹⁴.

Durch den Einsatz unterschiedlicher Antikörper (gekoppelt u. a. an Farbstoffe) lassen sich Markerproteine der Apoptose nachweisen, z. B. Bcl-2, p35 oder PARP. Außerdem werden spezifische Caspase-Inhibitoren im Handel angeboten, die eine Aufklärung der Kaskade nach unterschiedlichen Stimuli ermöglichen³¹⁵.

2.4.3 Zellkultur-Modellsysteme

2.4.3.1 Caco-2 Zellen – ein Modellsystem für das Dünndarmepithel

Humane Enterozyten überleben *in vitro* nur kurzzeitig (2 – 20 Passagen, 2 – 10 Monate) und verlieren ihre Differenzierungsmerkmale während der Kultivierung. Vergleichbare Nachteile wurden nach Einsatz von intestinalen Gewebekulturen beobachtet³¹⁶. Charakteristische Enterozytenmerkmale wurden hingegen nach Isolierung und Etablierung verschiedener Dickdarm-Tumorzelllinien (z. B. Caco-2, HT-29, SW1116, LS174T) beobachtet.³¹⁷ Caco-2 Zellen weisen im Vergleich zu allen anderen humanen Tumorzelllinien den höchsten Grad der Differenzierung auf³¹⁸, wobei charakteristische Merkmale unterschiedlicher Entwicklungsstadien (fetale, adulte Enterozyten) bzw. von Tumoren ausgebildet werden³¹⁹.

Die Studien dieser Arbeit wurden an Caco-2 Zellen durchgeführt. Diese Zell-Linie wurde 1974 durch FOGH ET AL.³²⁰ nach Isolierung aus dem Dickdarmtumor (Colon-Adenocarcinom) eines 72-jährigen Kaukasiers etabliert³²⁰. PINTO ET AL.³²¹ wiesen 1983 nach, dass diese adhärent wachsenden Caco-2 Zellen in der stationären Phase (*in vitro*) spontan differenzieren und dabei morphologische, strukturelle und funktionelle Differenzierungsmerkmale reifer Enterozyten ausbilden³²¹. Caco-2 Zellen stellen aufgrund dessen ein geeignetes Modell für das

³¹³ Roche Molecular Biochemicals, „Info-Packet 2001“

³¹⁴ Leer, M. P. G. et al., 1999, Bantel, H. et al., 2000, Roche Molecular Biochemicals, „Info-Packet 2001“

³¹⁵ Sigma-Aldrich: Apoptosis, Promega: Apoptosis, 2002, Roche Molecular Biochemicals, „Info-Packet 2001“

³¹⁶ Audus, K. et al., 1990, Hidalgo, I. et al., 1989, Moyer, M. P., 1983

³¹⁷ Hidalgo, I. et al., 1989, Fogh, J. et al., 1977

³¹⁸ Wilson, G. et al., 1990

³¹⁹ Pinto, M. et al., 1983, Quaroni, A. et al., Hauri, H. P. et al., 1985, Engle, M. J. et al., 1998

³²⁰ Fogh, J. et al., 1977

³²¹ Pinto, M. et al., 1983

humane Dünndarmepithel (reife Enterozyten) dar und ermöglichen die Erforschung modulierender Effekte bioaktiver Substanzen (z. B. Nahrungspeptide) auf die Aktivität (u. a. Enzymaktivitäten, epithelialer Transport) reifer und entarteter Enterozyten (differenzierte und proliferierende Caco-2 Zellen)³²². Dieses Zellkulturmodell des humanen Dünndarms wird als Standard für Resorptionsstudien betrachtet³²³, die Permeabilitätsmethoden wurden validiert (Selektivität, Reproduzierbarkeit und Robustheit)³²⁴ und aufgrund dessen als Ersatz für Bioverfügbarkeits- und Bioäquivalenzstudien (*in vivo*) durch Behörden (u. a. FAO) akzeptiert³²⁵. Für diese Zwecke, stehen neuerdings automatisierte Systeme zur Verfügung, z. B. ADME-Screening-Tests (Absorption, Distribution, Metabolism, Exkretion and Toxicity)³²⁶.

2.4.3.1.1 Charakteristische Differenzierungsmerkmale

Caco-2 Zellpopulationen sind reine Kulturen, die nur einen Zelltyp enthalten (keine Becherzellen etc.)³²⁷. Die Ausprägung der charakteristischen Enterozyten-Merkmale ist heterogen und kann zwischen unterschiedlichen Versuchsansätzen variieren. Vermutlich findet der Wechsel zwischen dem Phänotyp der adulten Tumorzellen (proliferierende Caco-2 Zellen) zu fetalen Colonzellen bzw. reifen Enterozyten (differenzierte Caco-2 Zellen) nicht in allen Zellen einer Population gleichzeitig oder nicht vollständig statt³²⁸. Bestimmte Fragestellungen erfordern deshalb Zellklone³²⁹ oder transfektierte Zellen³³⁰, die ein spezifisches Merkmal besonders stark ausbilden.

Zu den Enterozyt-spezifischen Differenzierungsmerkmalen, die an intakten Caco-2 Monolayern beobachtet werden³³¹, gehören u. a.:

- Morphologische Merkmale:
 - * hochprismatische, polarisierte Zellen,
 - * Ausbildung intakter Monolayer (einschichtiger Zellrasen),
 - * *domes*: Halbkugel-förmige Cluster, die auf epitheliale Transportvorgänge hinweisen.
- Strukturelle Merkmale:
 - * Mikrovilli am apikalen Zellpol,
 - * Kontakte zwischen benachbarten Zellen und zum Kulturboden:
tight junctions (Porenradius: ca. 0,46 nm³³²),
adhaerence junctions, Desmosomen und Hemidesmosomen,
 - * Ausbildung und Organisation des Zytoskeletts³³³.

³²² Audus, K. et al., 1990, Hidalgo, I. et al., 1989, Pinto, M. et al., 1983, Rubio, L. A. & Seiquer, I., 2002

³²³ Delie, F. & Rubas, W., 1997

³²⁴ Haltner, E. et al. 2000

³²⁵ Gindorf, Ch. et al., 2001

³²⁶ Tecan Journal, Heft 1, 2001

³²⁷ Wilson, G. et al., 1990

³²⁸ Eagle, G. et al., 1998, Rousset, M., 1986

³²⁹ Peterson, M. & Mooseker, M., 1992, Grès, M.-C. et al., 1998, Vermeirssen, V. et al., 2002

³³⁰ Notarangelo, A. et al., 1997, Rindler, M. J. & Traber, M. 1988

³³¹ Delie, F. & Rubas, W., 1997, Hidalgo, I. et al., 1989, Pinto, M. et al., 1983, Shimizu, M., 1999, Wilson, G. et al., 1990

³³² Knipp, G. T. et al., 1997

- Funktionelle Merkmale:
 - * Expression und intrazelluläre, biogenetische (transzytotisch und vektorielle) Verteilungspfade³³⁴ von Enzymen der Bürstensaummembran, u. a.:
 - Disaccharidasen: Saccharase/Isomaltase, Lactase-Phlorizin-Hydrolase, Maltase-Glucoamylase, Trehalase,
 - Peptidasen: Aminopeptidasen N, P, W sowie ACE, Dipeptidyl-Aminopeptidase IV, Neutrale Endopeptidase, γ -Glutamyltranspeptidase³³⁵,
 - Oxidoreduktasen: Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase, Katalase³³⁶,
 - weitere Enzyme: u. a. alkalische Phosphatase.
 - * Expression von intrazellulären Enzymen: u. a. Peptidasen, Dehydrogenasen.
 - * Expression von Transportern u. a. für:
 - Aminosäuren³³⁷ und Taurin,
 - Di-, Tripeptide bzw. für Peptidstrukturanaloga (PepT1, HPT-1, PHT-1)³³⁸,
 - Gallensäuren³³⁹,
 - Glucose (SGLT1, GLUT2 und 5 sowie GLUT 1 und 3),
 - Oligosaccharide aus Humanmilch³⁴⁰,
 - Monokarbonsäuren sowie für Phenolsäuren³⁴¹,
 - Nucleoside.
 - * Expression von Bindungsproteinen u. a. für Vitamine: A (Retinol), B₁₂ (Cobalamin), B₂ (Riboflavin), H (Biotin)³⁴² und C (Ascorbinsäure).
 - * Expression von Rezeptoren u. a. für:
 - Interferon- γ , *insulin-like growth factor* I und II (IGF I, II), *epidermal growth factor* (EGF), Interleukin-1 (IL-1), Insulin³⁴³,
 - Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP)³⁴⁴,
 - Cobalamin-Intrinsic-Faktor-Komplexes (Rezeptor-vermittelte Endozytose)³⁴⁵,
 - Hämagglutinine (Lectine)³⁴⁶.
 - * Expression epithelialer Immunproteine zur Abwehr von Bakterien (β -Defensine)³⁴⁷.
 - * Fähigkeit zum Transport u. a. von:
 - Proteinen: z. B. Horseradish-Peroxidase (40 kD) durch unspezifisch Pinozytose³⁴⁸,

³³³ Gilbert, Th. et al., 1991, Peterson, M. & Mooseker, M., 1992

³³⁴ Le Bivic, A. et al., 1990, Rindler, M. J. & Traber, M., 1988

³³⁵ Ogawa, N et al., 1999, Howell, St. et al., 1992

³³⁶ Wingler, K. et al., 2000

³³⁷ Hidalgo, I. J. & Borchardt, R. T., 1990, Rubio, L. A. & Seiquer, I., 2002

³³⁸ Herrera-Ruiz, D. et al., 2001

³³⁹ Wilson, G. et al., 1990

³⁴⁰ Gnoth, M. J. et al., 2000, 2001, 2002

³⁴¹ Konishi, Y. & Shimizu, M., 2003, Konishi, Y. et al., 2002, 2003 a

³⁴² Ma, Th. Y. et al., 1994

³⁴³ Varilek, G. W. et al., 1994

³⁴⁴ Anderson, C. M. H. et al., 2003

³⁴⁵ Wilson, G. et al., 1990

³⁴⁶ Ryder, S. D. et al., 1994, Hendriks, H. G. C. J. et al., 1991

³⁴⁷ O'Neil, D. A. et al., 1999

³⁴⁸ Heymann, M. et al., 1990

(Pro-) Anthocyanen³⁴⁹ und Catechinen³⁵⁰ durch *tight junctions*, Mineralstoffen, u. a.: Eisen³⁵¹, Calcium³⁵², Zink³⁵³.

- * Expression von Transportern für Bakterien (*Escherichia coli*) oder Viren (HIV).
- * Synthese und basolaterale Sekretion u. a. von Lipoproteinen, Chylomikronen³⁵⁴ sowie Cholesterinresorption³⁵⁵ (Lipidmetabolismus).
- * Ablauf der Apoptose nach Induktion, z. B. durch Butyrat³⁵⁶.

GRES ET AL.³⁵⁷ wiesen im Vergleich zu humanen Enterozyten in differenzierten Caco-2 Zellen eine niedrigere Expression des PepT1-Transporters sowie eine vergleichbare bis höhere Expression des P-Glykoproteins (Effluxsystem) nach³⁵⁷.

2.4.3.1.2 Äußere Einflussfaktoren auf die Zelldifferenzierung

Fötale Kälberserum

Die Kultivierung von Caco-2 Zellen erfolgt traditionell mit DMEM, dem u. a. Fötale Kälberserum zugesetzt wird. FKS enthält verschiedene, z. T. noch unbekannte Wachstumsfaktoren, die nachweislich die Zelladhärenz, Ausbildung von *tight junctions* und verschiedenen Transportsystemen der Bürstensaummembran begünstigen. Zur Überprüfung der Wirkung spezieller Testsubstanzen auf die Caco-2 Kultur ist es wünschenswert, unbekannte Wirkstoffe zu entfernen. Deshalb wurde nach Ersatz für das FKS gesucht. HASHIMOTO ET AL.³⁵⁸ wiesen u. a. durch Messung des TEER nach, dass der Zusatz von humanen bzw. bovinen Molkenproteinen die Monolayerausbildung in gleicher Weise unterstützt wie FKS. Die Wirkung wurde nachweislich durch β -Lactoglobulin und Serumalbumin hervorgerufen. Allerdings ist es möglich, dass das Molkenprotein noch weitere Wachstumsförderer enthält. Hingegen war keine positive Wirkung feststellbar nach Inkubation mit natürlichen Bestandteilen des FKS: TGF- β_1 , Epidermaler-Wachstumsfaktor, Hydrokortison, Glukagon oder Trijodid³⁵⁸.

Kulturdauer

Ein weiteres Ziel ist die Reduzierung der Caco-2 Kulturdauer, zur effizienten Ermittlung von Bioverfügbarkeitsdaten (Screening). ASA ET AL.³⁵⁹ verglichen dazu die Caco-2 Differenzierungsmerkmale nach Durchführung eines traditionellen bzw. neu entwickelten 21- bzw. 3-Tage-Protokolls. Innerhalb des neuen Protokolls wurden die Zellen in serumfreien DMEM

³⁴⁹ Deprez, St. et al., 2001

³⁵⁰ Konishi, Y. et al., 2003 b

³⁵¹ Boato, F. et al., 2002

³⁵² Blais, A. et al., 1997, Ekmekcioglu, C. et al., 1999, Kennefick, S. & Cashman, K. D., 2000, Daengprok, W. et al., 2003

³⁵³ Finley, J. W. et al., 1994

³⁵⁴ Hughes, Th. E. et al. 1987

³⁵⁵ Nagaoka, S. et al., 1999

³⁵⁶ Green-Avivi, C. et al., 2002.

³⁵⁷ Grés, M.-C. et al., 1998

³⁵⁸ Hashimoto, K. et al., 1993, 1995

³⁵⁹ Asa, D. et al., 1997

ausgesät, welches MITO+™ Serum Extender enthielt und am nächsten Tag zusätzlich mit Butyrat supplementiert wurde. Die Ausprägung der verschiedenen Differenzierungsmarker (u. a. Enzymaktivität, Transportfunktion) war in beiden Kulturen vergleichbar³⁵⁹. YAMASHITA ET AL.³⁶⁰ optimierten dieses Protokoll durch Zusatz von 10 % FKS am Tag der Aussaat und eine Verlängerung der Kulturdauer auf 5 Tage. Dadurch war die Zelladhärenz, *tight junctions*- und Peptidtransporterausbildung besser an das 21-Tage-Protokoll angeglichen, so dass die Zuordnung verschiedenster Testsubstanzen in vorgegebene *in vitro*-Permeabilitätsklassen unproblematisch erfolgen konnte³⁶⁰.

Anzahl der Zellpassagen

BRISKE-ANDERSON ET AL.³⁶¹ untersuchten den Einfluss der Passagenanzahl (20 bis 109) auf die Caco-2 Zelldifferenzierung, wobei die Zellen jeweils ca. 28 Tage in DMEM (+ 10 % FKS) kultiviert wurden. Es zeigte sich, dass die Stärke der Ausprägung der Differenzierungsmerkmale (u. a. Zellzahl, Enzymaktivitäten und *tight junctions*) mit der Anzahl der Passagen zunächst zunahm und nachfolgend variierte oder wieder sank. Als diesbezüglich optimal erwiesen sich Caco-2 Zellen der 28. bis 65. Passage, die jeweils 15 bis 18 Tage kultiviert wurden³⁶¹. HALTNER ET AL.³⁶² identifizierten keine signifikanten Unterschiede nach Aussaat von Caco-2 Zellen der 22 bis 32. Passage bezüglich der Zellmorphologie, Entwicklung des TEER (vom Tag der Aussaat bis Testende: $d_0 - d_{20}/d_{30}$) und der Transportleistung differenzierter Monolayer für verschiedene Markersubstanzen³⁶².

2.4.3.1.3 Transport und Wirkung (*in vitro*) bioaktiver Peptide u. a. Substanzen

Zur Entfaltung der physiologischen Wirkung ist es notwendig, dass oral aufgenommene bioaktive Substanzen (u. a. Peptide) aus Lebensmitteln ihren Zielort (u. a. GIT, Leber, Gehirn, Muskulatur, Blutsystem) intakt erreichen. Dazu ist es notwendig, dass die (Vorläufer-) Substanz das intestinale Epithel intakt erreicht bzw. passiert und anschließend über die Pfortader und Leber in den systemischen Blutkreislauf gelangt.

Die Wirkung bioaktiver Substanzen, ihre Hydrolyse-Resistenz gegenüber Enzymen des Bürstensaums und der Transport durch die intestinale Barriere lassen sich durch Einsatz des Caco-2 Zellkulturmodells untersuchen. Die Methoden zur Durchführung dieser Studien, z. B. Transportstudien (s. Tabelle 2-28), variieren zwischen den Laboratorien. Die Zellen werden dabei zumeist in ein Zwei-Kompartiment-System ausgesät und grundsätzlich solange kultiviert, bis eine genügende Differenzierung (Ausbildung Enterozyten-ähnlicher Merkmale) nachweisbar ist. Eine grundlegende Voraussetzung ist die Ausbildung eines Monolayers, dessen Integrität u. a. durch Messung des TEER überprüft wird.

³⁶⁰ Yamashita, S. et al., 2002

³⁶¹ Briske-Anderson, M. J. et al., 1997

³⁶² Haltner, E. et al., 2000

Tabelle 2-28: Methodische Merkmale ausgewählter Transportstudien mit Caco-2 Zellen
(Eigene Darstellung nach ³⁶³).

Transportstudien-Merkmale	Shimizu 1997	Satake 2002	Vermeirssen, 2002	Ogawa 1999	Haltner 2001
Caco-2 Zellen/Klon	Zellen	Zellen	Bbe-Klon	Zellen	Zellen
Passagen-Nummer	38 – 70	40 – 70	95	64 – 78	11 – 46
Anfangszell-dichte	2×10^5 /mL	2×10^5 /mL	2×10^5 /mL	2×10^5 /mL	1×10^5 /mL
Kulturdauer [d]	14/15	14	23	15	16
Insertmembranen					
Material	Cellulose	PC	PC	PC	PE
Porengröße [μm]	0,45	0,40	k. A.	k. A.	0,4
Oberfläche [cm^2]	4,2	1,1	1,1	0,6	1,13
Beschichtung	Kollagen	Kollagen	ohne	ohne	ohne
Monolayer-Integrität ^A	A)	A)	B)	A)	A)
TEER [Ωcm^2]	> 200	100 – 150	300	715	350 – 450
Transportmedium	HBSS	HBSS	Krebs-P.	PBS	KRP
pH: apikal	7,4	6,0 ^B	7,4	7,4	7,4
basolateral	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
Testsubstanzen (TS)	Peptide: Bradykinin, Ovokinin u.a.	Peptid: Val-Pro-Pro	Ala-Leu-Pro- Met-His-Ile- Arg	Glucose	MaS: Flouores- cein u. a.
TS-Exposition [min]	60	60	10	5	k. A.
TS-Nachweis	HPLC	HPLC	MS	Szinti- graphie	HPLC

Abkürzungen: HBSS: Hanks bilanzierte Salzlösung, P.: Puffer, PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, k. A.: keine Angaben, KRP: Krebs-Ringer Puffer, MaS: Markersubstanzen, HPLC: Hochleistungschromatographie, MS: Massenspektroskopie, ^A Messgeräte: A) Volt-Ohm-Meter (Millipore ERS, World Precision Instruments), B) Impedanzmesser; ^B apikal: pH 6,0 simulierte optimale Bedingungen für Bürstensaumenzyme und Transportsysteme.

Der TEER steigt nach Aussaat der Caco-2 Zellen und Kultivierung unter Standardbedingungen zunächst an, erreicht nach 9 bis 19 Tagen ein Maximum und verharrt auf diesem bzw. einem geringfügig niedrigeren Niveau bis zum Testende (ca. 30 Tage)³⁶⁴. Auffällig ist, dass Angaben zur Höhe des TEER differenzierter Caco-2 Monolayer (ca. d_{14} bis d_{21}) in der Literatur zwischen 100 und $700 \Omega \text{cm}^2$ variieren. Hierbei ist zu beachten, dass die Messwerte u. a. von der Methode (hier: zumeist einheitliches Vorgehen: Volt-Ohm-Meter), vom Material der Trägermembran ($\text{TEER}_{\text{Polycarbonat}} > \text{TEER}_{\text{Polyethylen}}$)³⁶⁵ sowie der Messtemperatur³⁶⁶ (die in der Literatur zumeist nicht angegeben ist) beeinflusst wird.

Eine Variation des TEER-Messwerts ist außerdem aufgrund der in verschiedenen Laboratorien eingesetzten Caco-2 Zellkulturen zu erwarten, da diese eine heterogene Ausbildung von Differenzierungsmerkmalen aufweisen³⁶⁷. Deshalb ist es notwendig, durch eigene Vorversuche einen laborinternen Bereich des TEER zu definieren, der intakte Monolayer

³⁶³ Shimizu, M. et al., 1997, Ogawa, R. et al., 1999, Satake, M. et al., 2002, Vermeirssen, V. et al., 2002

³⁶⁴ Pinto, M. et al., 1983, Hidalgo, I. et al., 1989, Wilson, G. et al., 1990, Haltner, E. et al., 2001, Briske-Anderson, M. J. et al., 1997

³⁶⁵ Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A.-K., 2000

³⁶⁶ González-Mariscal, L. et al., 1984

³⁶⁷ Eagle, G. et al., 1998, Rousset, M., 1986

kennzeichnet. Damit Ergebnisse unterschiedlicher Tests vergleichbar sind, ist es notwendig den Widerstandsindex (WI_{TEER}) zu berechnen (s. 3.7.3).

Der Transportmechanismus von Peptiden wird durch die verschiedenen physikochemischen Eigenschaften (Hydro-, Lipophilie, Molekülgröße und –Ladung u. a.) determiniert und ist durch Einsatz von Markersubstanzen (s. 2.4.2.2) und/oder Inhibitoren nachweisbar. Der parazelluläre Transport wird außerdem durch reversible Öffnung von *tight junctions*-Poren (von 0,4 zu 1,2 nm)³⁶⁸ durch Ca^{2+} -Chelatoren, Cytochalasin D oder Palmitoyl-DL-Carnitin untersucht³⁶⁹. Zur Hemmung des PepT1-abhängigen Transports werden insbesondere kompetitive Inhibitoren (u. a. Cefadroxil, Captopril, δ -Aminolevulinsäure³⁷⁰) eingesetzt sowie Hydrolyse-resistente Substrate (z. B. Gly-Pro [10 mmol/L]). Ein endozytotischer Peptidtransport kann u. a. durch Einsatz von Phenylarsin Oxid, Wortmannin oder Colchizin untersucht werden. Die Unterscheidung zwischen aktiven und passiven Transportvorgängen ist durch Absenken der Temperatur von 37°C auf 4°C möglich, wodurch aktive Transportmechanismen vollständig gestoppt werden. Diese werden außerdem durch Einsatz u. a. von Natriumazid oder 2,4-Dinitrophenol gehemmt³⁷¹.

Transport von Modell- und bioaktiven Peptiden

Der Transportmechanismus unterschiedlicher Modellpeptide durch einen intakten Caco-2 Monolayer wurde von verschiedenen Forschergruppen untersucht. Mit Di-, Tri- und Tetrapeptiden wurde nachgewiesen, dass die parazelluläre Permeabilität metabolisch stabiler Zwitterionen ((D-Phe)_{1; 2}; 3-Gly) mit zunehmendem Molekülradius sinkt, wobei positiv geladene und neutrale Peptide schneller permeieren als negativ geladene Moleküle³⁷². Größere Moleküle, wie Penta-³⁷³ und Hexapeptide³⁷⁴ (Ac-Tyr-Pro-X-Asp-Ile-NH₂, X: Gly, Ile bzw. Ac-Trp-Ala-Gly-Gly-Y-Ala-NH₂, Y: Asp, Asn, Lys) permeieren den Caco-2 Monolayer in Abhängigkeit von ihrer Struktur (bei gleicher Molekülgröße): Kettenförmige Oligopeptide passieren *tight junctions* und zyklische³⁷⁵ bzw. methylierte oder alkylierte³⁷⁶ (lipophilere) Abkömmlinge durchqueren die Zellmembran passiv. Ein PepT1-vermittelter Transport wurde mit verschiedenen Dipeptiden nachgewiesen (s. 2.2.4.2.1).

Derzeit existieren nur wenige Studien (s. Tabelle 2-29), in denen der Transport (-mechanismus) bioaktiver Peptide aus Lebensmitteln untersucht wurde.

³⁶⁸ Knipp, G. T. et al., 1997

³⁶⁹ Shimizu, M. et al. 1997, Okumu, F. W. et al., 1997

³⁷⁰ Katsura, T. & Inui, K., 2003

³⁷¹ Shimizu, M. et al. 1997, Satake, M. et al., 2002

³⁷² Pauletti, G. M. et al., 1997

³⁷³ Knipp, G. T. et al., 1997

³⁷⁴ Okumu, F. W. et al., 1997

³⁷⁵ Knipp, G. T. et al., 1997, Okumu, F. W. et al., 1997

³⁷⁶ Conradi, R. A. et al., 1992

Tabelle 2-29: Transport bioaktiver Oligopeptide durch intakte Caco-2 Monolayer

(Eigene Darstellung, s. Spalte Literatur)

Aminosäuren-Sequenzen ^A der Oligopeptide (MG)	Bioaktivitäten	Transportwege			Literatur
		unbekannt	transzellulär Endozytose	para- zellulär	
Bradykinin (1060) RPPGFSPFR	Vasodilator		x		
GGYR (450)	Papain-Inhibitor			x	
Ovokinin (1127) FRADHPFL	ACE Inhibitor	x			377
b-Casomorphin-5 YPFPG (651)	Opioides Peptid	x			
PFGK (501)	unbekannt	x			
VPP (347)	ACE-Inhibitor			x	
IKP (392)	ACE-Inhibitor	x			378
IKW (481)	ACE-Inhibitor	x			
ALPMHIR (944)	ACE-Inhibitor	x			380

^A Angabe der Aminosäuren-Sequenzen der Peptide im Ein-Buchstaben-Code, ^B PepT1-vermittelter Transport.

SHIMIZU ET AL.³⁷⁷ beobachteten deutliche Unterschiede in der Peptid-Transportkapazität von differenzierten Caco-2 Zellen konfluenter Monolayer und nutzten in ihren Studien die Transportrate der Modellpeptide Bradykinin und GGYR als Bezugsgröße. Beide Peptide zeigten im Zellkulturversuch keine zytotoxische Wirkung und erwiesen sich gegenüber *brush border*-Enzymen als Hydrolyse-resistent. Der Transport von Bradykinin war Konzentrations-abhängig und unterlag keiner Sättigung (200 – 1200 µg/mL), bei einer Transportrate von 347 ng/h/cm². Antagonisten von humanen Bradykinin-Rezeptoren sowie Cytochalasin D zeigten keinen modulierenden Einfluss. Der Bradykinin-Transport war im Vergleich zu dem des Pinozytose-Markers DX-40 K erhöht und wurde durch Variation der Molekülstruktur mit gleichzeitiger Erhöhung der Lipophilie weiter gesteigert. Dieser Transport erwies sich als Energie-aufwendig und wurde durch Colchizin gehemmt. Die Autoren schlussfolgerten, dass Bradykinin die Zellmembran unspezifisch kontaktete und vorwiegend endozytotisch resorbiert wurde. Außerdem wurde der Transport weiterer Oligopeptide ins basolaterale Kompartiment nachgewiesen, der nach apikaler Exposition (30 min, 400 µg/mL) von Caco-2 Monolayern erfolgte. Die Aufzählung erfolgt hier entsprechend einer abnehmenden, wiedergefundenen Stoffmenge: GGYR > Bradykinin = PFGK > Ovokinin > β-Casomorphin-5. Ovokinin und β-Casomorphin-5 wurden von Bürstensaumenzymen teilweise hydrolysiert³⁷⁷.

SATAKE ET AL.³⁷⁸ wiesen nach, dass die antihypertensiven Tripeptide VPP, IKP und IKW (jedoch nicht LAP) durch einen intakten Caco-2 Monolayer transportiert wurden, wobei der Transport des hydrophoben VPP vorwiegend parazellulär erfolgte. Nach der Inkubation (30 min) der Caco-2 Monolayer mit 1 mmol/L VPP verblieben apikal ca. 85 % des intakten Tripeptids, basolateral wurden ca. 1,9 % wiedergefunden und in den Zell-Lysaten war VPP

³⁷⁷ Shimizu, M. et al., 1997

³⁷⁸ Satake, M. et al., 2002

nicht nachweisbar. Dort wurde jedoch Valin in einer Menge detektiert, die ca. 8 % des apikal aufgetragenen Tripeptids entsprach. Der VPP Transport wurde durch GP gehemmt und findet demnach PepT1-vermittelt statt, mit sofort nachfolgender, intrazellulärer Peptidhydrolyse. Valin wurde außerdem in den Medien beider Kompartimente detektiert, wobei die apikale Anwesenheit auf eine Spaltung des Tripeptids durch *brush border* Enzyme hindeutete und außerdem ein Valin-Transport aus der Zelle heraus denkbar war³⁷⁸.

Ein weiteres ACE-inhibitorisches Peptid (*in vitro*) ist das Heptapeptid ALPMHIR³⁷⁹, welches in so geringer Menge durch einen intakten Caco-2 Monolayer transportiert wurde, dass der Peptidnachweis durch Massenspektroskopie (MALDI-TOF), jedoch nicht per HPLC (C 18) möglich war³⁸⁰.

Wirkung bioaktiver Substanzen aus Lebensmitteln

Bioaktive Substanzen aus Lebensmittel zeigen unterschiedliche Wirkungen auf die durch Caco-2 Monolayer simulierte intestinale Barriere.

Tight junctions-modulierende Substanzen

Die Bildung und Funktion von *tight junctions* wird durch Molkenproteine (insbesondere β -Lactoglobulin, Serumalbumin) unterstützt³⁸¹.

Eine Weitung der *tight junctions-Poren* wurde nach Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen mit wässrigen Extrakten aus Gemüsepaprika, Pilzen (*Flammulina velutipes*) und Meerrettich beobachtet. Dadurch wurde der parazelluläre Transport von Lucifer Yellow (MG 457) deutlich und der von Dextran-Texas Rot (MG 3000) geringfügig erhöht. Demnach unterliegt die Porenweitung einer Restriktion, die möglicherweise vor dem Flux intestinal vorliegender Allergene (Proteine) schützt. Als wirksame Substanzen wurden Capsianoside (Diterpenester) aus Gemüsepaprika isoliert, die die *tight junctions*-modulierende Wirkung auch nach Behandlung mit Säure (pH 2), Base (pH 12), Hitze oder bei Anwesenheit einer hohen Calcium-Konzentration entfalteten. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Fähigkeit der reversiblen Öffnung von *tight junctions-Poren* zur Erhöhung eines gewünschten intestinalen Transports bioaktiver Substanzen (z. B. Peptide) genutzt werden könnte³⁸².

In verschiedenen Studien wurden pharmakologische Substanzen (u. a. Gallensäurederivate, s. 2.2.4.2.1) identifiziert, die eine gezielte, reversible Öffnung von *tight junctions-Poren* induzierten und dadurch den parazellulären Transport bioaktiver Peptide erhöhten. Diese Substanzen erwiesen sich als nicht zytotoxisch, u. a. ermittelt im WST-1 Test sowie durch die Tatsache, dass sich der TEER nach der Entfernung der *tight junctions*-modulierenden

³⁷⁹ Mullally, M. M. et al., 1997

³⁸⁰ Vermeirssen, V. et al., 2002

³⁸¹ Hashimoto, K. & Shimizu, M., 1993

³⁸² Hashimoto, K. et al., 1994, Shimizu, M., 1999

Substanz wieder normalisierte. MUKHERJEE ET AL.³⁸³ untersuchten die Wirkung einiger dieser Substanzen erneut (u. a. Natriumtaurocholat) und ermittelten mit der Literatur vergleichbare Veränderungen des TEER, wobei gleichzeitig (chronisch) zytotoxische Effekte (WST-1 Test: 2 Tage nach Zellaussaat, Trypanblau Färbung: nach Transportstudie, am 6. Tag) detektierten wurden. Die Autoren schlussfolgerten, dass die TEER-Messung deshalb keine geeignete Methode zum Nachweis der Caco-2 Monolayer-Integrität während einer Transportstudie u. a. mit Gallensäurederivaten ist. Dies läge darin begründet, dass diese Substanzen die Zellmembran teilweise zerstören, jedoch der Effekt so gering sei, dass er durch die Messung des TEER zunächst nicht erfasst werde³⁸³.

Hemmung der Funktion von Transportern der Bürstensaummembran

SHIMIZU³⁸⁴ berichtet von der Hemmung des Na⁺-abhängigen Glukose-Transports durch Inhaltsstoffe von *Gymnema silvestre* (die außerdem fähig sind die Rezeption des süßen Geschmacks für einige Stunden zu löschen³⁸⁵), Tannin, Chlorogensäure und Chatechine (u. a. aus Extrakten von grünem, schwarzem oder Oolong-Tee). Der Autor postulierte die Möglichkeit, diese Inhaltsstoffe zur Kontrolle des Blutglucosespiegels von Patienten mit Diabetes mellitus einzusetzen. Des Weiteren wurde eine Hemmung des Transports von Taurin durch Chatechine nachgewiesen³⁸⁴. Catechine (Tee) wurden in geringen Mengen parazellulär transportiert und hemmten außerdem die Resorption von Phenolsäuren (u. a. Ferulasäure) durch Bindung an Monokarbonsäure Transporter³⁸⁶.

Hemmung der Funktion von Enzymen der Bürstensaummembran

In Lebensmittel enthaltene sowie bei der Verdauung aus Kohlenhydraten freigesetzte Essigsäure (5 mmol/L) hemmte die Aktivität von Saccharase, Maltase, Trehalase und Lactase. Diese Menge an Essigsäure wurde nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit im GIT freigesetzt sowie durch Essig oder marinierte Lebensmittel aufgenommen. Die Autoren postulierten, dass Essigsäure zur Kontrolle des Blutglucosespiegels eingesetzt werden kann³⁸⁷.

Zytotoxische Substanzen

In verschiedensten Studien wurde die Wirkung hydrophober Testsubstanzen auf Zellkultursysteme untersucht. Diese Substanzen wurden u. a. in Dimethylsulphoxid (DMSO) oder Ethanol gelöst, die Konzentrations-abhängig zytotoxisch wirkten. WINKELMEIER ET AL.³⁸⁸ ermittelten für DMSO und Ethanol einen IC₅₀ von ca. 150 mmol/L³⁸⁸. In Studien mit Caco-2 Zellen wurde nachgewiesen, dass eine Konzentration von bis zu 2 % (v/v) DMSO keinen Einfluss auf die Integrität des Monolayers aufweist³⁸⁹.

³⁸³ Mukherjee, T. et al., 2004

³⁸⁴ Shimizu, M., 1999

³⁸⁵ Belitz, H.-D. & Grosch, W., 1992, S. 394

³⁸⁶ Konishi, Y. et al., 2003 b

³⁸⁷ Ogawa, N. et al., 1999

³⁸⁸ Winkelmeier, P. et al., 1993

³⁸⁹ Haltner, E. et al., 2001

In eigenen Untersuchungen wirkten 1mmol/l m6,2Ado bzw. ip6Ado zytotoxisch auf Caco-2 Zellen im proliferativen bzw. stationären Stadium und waren somit zum Einsatz als Referenzsubstanzen in Zytotoxizitätsuntersuchungen geeignet³⁹⁰.

HASHIMOTO ET AL.³⁹¹ wiesen zytotoxische Wirkung eines wässrigen Ingwer-Extrakts auf Caco-2 Monolayer durch Messung des TEER und Färbung mit Trypanblau nach³⁹¹.

GIOVANNINI ET AL.³⁹² untersuchten die Wirkung von Zöliakie-auslösenden Weizen-, Gerste-, Hafer- und Reisproteinen nach simulierter gastrointestinaler Verdauung (Pepsin, Trypsin). Diese Hydrolysate (1 mg/mL) hemmten die DNA-, mRNA- und Protein-Synthese in Caco-2 Zellen, wodurch auch die Koloniebildung (Proliferation nach Ernte differenzierter Zellen und erneute Aussaat) unterbunden wurde. Die metabolische Zellaktivität (Tetrazoliumsalz MTT) wurde durch eine kurzzeitige Inkubation allerdings nicht beeinflusst. Demnach wirkten diese Peptide nicht akut, sondern chronisch zytotoxisch. Als bioaktive Substanzen wurden die α -Gliadin Fragmente 31 – 43 und 44 – 55 identifiziert³⁹². SHAN ET AL.³⁹³ bestätigten, dass Gliadine eine Autoimmunantwort (Entzündung, Zerstörung von Mikrovilli, chronischer Durchfall) durch Stimulation von T-Zellen hervorrufen. In diesen Studien wurde nach simulierter gastrointestinaler und *brush border*-Verdauung von α -Gliadin (Weizen) ein 33 Aminosäuren enthaltenes Peptid (LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) isoliert, welches sich als potentes T-Zell Antigen erwies. Diese Sequenz wurde außerdem im Protein von Gerste und Reis, jedoch nicht von Hafer und Mais identifiziert³⁹³.

Eine Sonderform der Zytotoxizität ist die Induktion der Apoptose (s. 2.4.2.3), wobei verschiedene Merkmale der Zellviabilität (u. a. Zelldimension, Membranintegrität, metabolische Aktivität) im Vergleich zu Kontrollzellen zunächst nicht signifikant verändert sind. Allerdings sind u. a. die Zellproliferation reduziert, verschiedene intrazelluläre Enzymsysteme aktiviert und Änderungen in der Proteinsynthese oder am Zellkern nachweisbar. Zur Identifizierung potenzieller Antikancerogene untersuchten KUNTZ ET AL.³⁹⁴ die Wirkung von 36 verschiedenen Flavonoide auf die Proliferation (DNA-Neusynthese) u. a. von Caco-2 Zellen. Die untersuchten Testsubstanzen wirkten antiproliferativ (EC_{50} : 40 – 200 μ mol/L), jedoch nicht zytotoxisch. Bavachinin und Myricetin (150 μ mol/L) stimulierten die Aktivität der Caspase 3, einem Markerenzym für Apoptose³⁹⁴. Infolge dessen postulierten FRYDOONFAR ET AL.³⁹⁵ eine antikancerogene Wirkung für das Flavonoid Naringenin, welches die metabolische Aktivität (WST-1 Assay) von HT-29 Zellen hemmte³⁹⁵.

³⁹⁰ Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000

³⁹¹ Hashimoto, K. et al., 1994

³⁹² Giovannini, C. et al., 1995, 1996, 1997

³⁹³ Shan, L. et al., 2002

³⁹⁴ Kuntz, S. et al., 1999

³⁹⁵ Frydoonfar, H. R., 2002

In Studien mit 16 verschiedenen Ribonucleosiden wurde durch GÜNTHER³⁹⁶ nachgewiesen, das u. a. 1 mmol/L Guanosin (Guo) die DNA-Neusynthese von Caco-2 Zellen im proliferativen Stadium hemmte und die Aktivität der Caspase-3 stimulierte³⁹⁶. In eigenen Untersuchungen zeigte sich, das 1 mmol/L Guo auf proliferierende Caco-2 Zellen zytotoxisch wirkte. Hingegen wurden keine modulierenden Effekte auf differenzierte Caco-2 Monolayer detektiert. Es wurde geschlussfolgert, das Guo eine potenziell antikanzerogene Substanz ist, die u. a. in Milch enthalten ist³⁹⁷.

2.4.3.2 Polymorphkernige Leukozyten – ein Modell für Körperzellen

Zellen des peripheren Blutsystems gelten als Modell für alle anderen Körperzellen³⁹⁸. Deshalb wurden neben Caco-2 Zellen auch polymorphkernige Leukozyten (PML, Primärzellen) innerhalb der Zytotoxizitätsstudien dieser Arbeit eingesetzt, (s. 2.4.3.1).

2.4.3.2.1 Charakteristische Differenzierungsmerkmale

PML werden auch neutrophile, segmentkernige Granulozyten genannt und sind Zellen der unspezifischen Immunabwehr (s. 2.3), die im Blut (Normalwert für Erwachsene: 3650 Zellen pro μL Blut) und der Lymphe zirkulieren. Im Knochenmark existiert eine ständige Reserve, so dass bei Infektionen die Zahl der PML im Blut innerhalb kürzester Zeit stark ansteigt. PML sind zur gerichteten Migration fähig und gelangen so in entzündetes Gewebe.

PML sind zur Zellpolarisation, Chemotaxis, Zelladhäsion und Agglutination fähig sowie zur Phagozytose und werden deshalb auch Mikrophagen genannt. PML generieren verschiedene aktive Sauerstoffspezies (u. a. Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale) sowie Nitridoxid³⁹⁹.

KLINKHAMER⁴⁰⁰ nannte die PML Orogranulozyten und untersuchte deren Migrationsrate durch 12-malige Spülung der Mundhöhle für je 30 s, da eine so kurze Spülung die Gewinnung der Granulozyten aus ihrer physiologischen Umgebung, der mobilen mukösen Phase, erlaubt. Hierbei nahm die Zahl der migrierten PML von der ersten bis letzten Spülung ab, es wurde eine asymptotische hyperbole Kurve ermittelt. Durch Mittelwertwertberechnung wurde die Orogranulozyten-Migrationsrate ermittelt ($\text{OMG} = X \times 10^6 \text{ Zellen} / 30 \text{ s}$). Der OMR-Index ($\text{OMR} = \text{OMG} \times 32 / \text{Anzahl}_{\text{Zähne}}$) berücksichtigt die Anzahl der vorhandenen Zähne und dient zur Einschätzung der Gesundheit des Zahnapparats von Probanden. Zahngesunde Probanden wiesen einen OMR-Index von nahezu Null auf⁴⁰⁰. ASHKENAZI UND DENNISON⁴⁰¹ wiesen später PML im Speichel nach, unabhängig vom Auftreten einer Entzündung in der Mundhöhle. Da

³⁹⁶ Günther, S., 1998, Dissertation

³⁹⁷ Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000

³⁹⁸ Short, N., 1994

³⁹⁹ Yamamoto, M. et al., 1991, Eisuke, F. S. et al., 1996

⁴⁰⁰ Klinkhamer, J. M., 1968 a, b

⁴⁰¹ Ashkenazi, M. & Dennison, D. K., 1989

diese in großer Anzahl auftraten wurde geschlussfolgert, dass diese PML vor periodontalen Erkrankungen schützten⁴⁰¹.

In entzündetem Gewebe werden Kapillaren neu gebildet. Deshalb nimmt in diesen Geweben, z. B. dem Zahnfleisch, die Distanz zwischen der Oberfläche der Mundschleimhaut und den Blut-/Lymphgefäßen im Vergleich zum gesunden Gewebe ab, auf ca. 50 µm. Diese Strecke passieren PML innerhalb von 30 s. An der Epitheloberfläche angelangt, werden die PML zunächst durch die isotone, mobile mucöse Phase und nachfolgend im hypotonen Speichel aufgenommen, in dem die PML zumindest teilweise aufgrund einer exzessiven Wasseraufnahme zerplatzen⁴⁰⁰.

2.4.3.2.2 Methoden zur Isolierung aus der Mundhöhle

KLINKHAMER⁴⁰⁰ etablierte die Isolierung der PML aus der Mundhöhle unter Einsatz verschiedener hypertoner, gepufferter Salzlösungen: In den Expektoraten der Mundspülung gesunder Probanden wurden PML (ca. 90 %) nachgewiesen sowie Epithelzellen, verschiedene Mikroorganismen (u. a. Kokken, Bazillen, Spirochaeten), Protozoen und Nahrungsmittelreste⁴⁰⁰. SCALLY⁴⁰² untersucht die Viabilität der PML aus der Mundhöhle bzw. dem Blut und wies nach, dass deren Viabilität vergleichbar war. Diese Zellen waren zur Phagozytose fähig und wirkten u. a. auf kariogene Bakterien (Streptokokken) zytotoxisch⁴⁰².

ASHKENAZI UND DENNISON⁴⁰¹ führten zusätzlich die physikalische Trennung der durch Mundspülung isolierten Zellen ein, durch wiederholte Filtration (Porengröße: 20 und 10 µm) sowie durch Zelldichtegradienten-Zentrifugation. Es wurden PML-Kulturen mit einer Reinheit von 98 % und einer Viabilität von 85 % nachgewiesen⁴⁰¹. YAMAMOTO ET AL.⁴⁰³ wiesen nach Filtration der Expektorate 90 % PML sowie 10 % Monozyten in der Kultur nach. Die PML unterteilten sich in unreife bzw. juvenile (stabkernige) Zellen sowie in Granulozyten mit 2 bis 3 Zellkernsegmenten. Diese PML zeichneten sich durch eine hohe Vitalität aus⁴⁰³. Es wurden morphologische, zytochemische und biochemische Charakteristika der PML nachgewiesen, die vergleichbar zu denen der PML aus dem Blut waren, u. a. die Zellgröße, alkalische Phosphatase Aktivität, Bildung von Superoxid-Radikalen. Es wurde jedoch nach chemischer Stimulation keine Änderung des Membranpotenzials nachgewiesen und geschlussfolgert, dass die Membran der oralen PML nicht intakt ist⁴⁰⁴.

Zur Erhöhung der Zellausbeute wurden die Probanden von EISUKE ET AL.⁴⁰⁵ angewiesen 1 h vor der Zellisolierung die Zähne (ohne Zahnpasta) zu putzen⁴⁰⁵. Trotzdem bleibt die Zellzahl nicht vorhersagbar und variiert nach Isolierung aus der Mundhöhle verschiedener Probanden deutlich. Deshalb wird in der (Zahn-) medizinischen Forschung empfohlen die nicht-invasive

⁴⁰² Scully, C., 1982

⁴⁰³ Yamamoto, M. et al., 1991

⁴⁰⁴ Tsuda, I. et al., 1997

⁴⁰⁵ Eisuke, F. S. et al., 1996

Methode der Zellisolierung aus der Mundhöhle für DNA-, RNA-Analysen oder zur Geschlechter-Identifikation einzusetzen. Die invasive Methode der Blutentnahme wird eingesetzt, wenn eine hohe Zellzahl notwendig ist sowie für kontinuierliche Untersuchungen⁴⁰⁴.

Die Isolierung der PML aus dem Blut erfolgte zunächst durch Zelldichtegradienten-Zentrifugation. Später wurde eine immunologische Technik eingeführt, die Magnetische Antikörperzellseparierung (MACS). Durch diese Methode erfolgte die Zellisolierung innerhalb von 1 h (versus 2 h). Außerdem wurde eine reine Kultur mit 99 % PML generiert (versus 94 % + 6 % Eosinophile Granulozyten)⁴⁰⁶.

2.4.3.2.3 Wirkung bioaktiver Peptidpräparationen

HARTMANN ET AL.⁴⁰⁷ setzten PML aus der Mundhöhle erstmals in der Lebensmittelforschung ein. In diesen Studien wurde zunächst die Wirkung von Caseinophosphopeptid- (CPP-) Präparationen auf die Viabilität von PML durch Messung des Zelldurchmessers sowie der metabolischen Aktivität untersucht. Es wurde keine Veränderung des Zelldurchmessers bzw. keine zytochemisch relevante Reduzierung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test) der PML nach 24 bzw. 4 h Inkubation mit CPP nachgewiesen⁴⁰⁷.

⁴⁰⁶ Zahler, S. et al., 1997

⁴⁰⁷ Hartmann, R. et al., 2000, Hartmann, R. & Meisel, H., 2004

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien, Chemikalien und Medium

Die Versuche innerhalb dieser Arbeit wurden ausschließlich mit analysenreinen Chemikalien durchgeführt. Das verwendete Reinstwasser ist ein durch Ionenaustausch demineralisiertes Wasser, welches zur HPLC-Analyse geeignet ist (Gerät für den Ionenaustausch: Seralpur PRO 90 C, Fa. Seral).

Die Resultate von Vorversuchen zur Methodenentwicklung werden jeweils in den entsprechenden Abschnitten dieses Kapitels dargestellt.

Reagenzien und Chemikalien

Die Auflistung der Reagenzien und Chemikalien erfolgt alphabetisch, geordnet nach der Bezugsquelle und unter Angabe der Bestellnummer:

(1) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D:

Amino Acid Standard Solution (AA-S-18), L-Cysteinsäure-Monohydrat (C-7630), L-Methioninsulfon (M-0876), MES-HBSS: 1,5 g MES Monohydrate (8 mmol/L; 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure; M-2933), in 1 L MES-HBSS (pH 6,0), N-Acetyl-L-Tryptophan-Ethylester (A-2648), 0,5% BSA (Fraktion V, Nr. A-7638), 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA (T-3924), Cytochalasin D (C-8273), Dimethylsulfoxid (DMSO; D-8779), N⁶-(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado, D7036), Phenylalanin (P-2126), trans-4-OH-L-Prolin (H-5534), Tryptophan (P-0254), Tyrosin (T-3754).

(2) Merck KGaA, Darmstadt, D:

Essigsäure 100% p. A. (100063), Ethylenglycol p. A. (109621), Hanks Balanzierte Salzlösung (HBSS, pH 7,4; H-8264), HPLC-Laufmittel Gemisch: 0,1 % Trifluoressigsäure (1.08178), 30 % Acetonitril (1.00030) in Reinstwasser, Hydrindantin-Dihydrat p. A. (104510), Kalium-Acetat reinst. (104820), Methanol getrocknet (106012), Natriumacetat wasserfrei p. A. (106268), Natriumacetat-Trihydrat p. A. (106267), Natriumacid reinst. (106688), Natriumhydroxid-Plätzchen p. A. (106498), Ninhydrin p. A. (106762), Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 0,5 g (1,85 mmol/L) Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄; Nr. 4873), 17 g (0,145 mol/L) Natriumchlorid (NaCl; Nr. 6400) und 2,5 g (7 mmol/L) di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O; Nr. 6580) in 2 l Reinstwasser (pH 7,2 ± 0,02), PBS_{MACS}: PBS vermischt mit 0,5% BSA und 2 mmol/L EDTA (Titriplex III, Nr. 8415), 6 N Salzsäure: aus 37 % Salzsäure (1.00317.2500), Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) mit: 6,1 g (50 mmol/L) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (1.08382) in 1 l Reinstwasser; Einstellung des pH Wertes auf 7,5 ± 0,02 mit 4 N Salzsäure; 1-Propanol (997), 2-Propanol (1.09634.2500), 4-Dimethylaminobenzaldehyd (8.03057.0250), Chloramin T (Trihydrat) (1.02426.0250), Citronensäure-Monohydrat (244), Ethanol (analysenrein; 1.00983.1000), Natrium-Acetat, wasserfrei (1.06268.0250), Natriumhydroxyd-Plätzchen (1.06498.1006), Palmitoyl-DL-Carnitin Chlorid (P-4509), Perchlorsäure, 60 % (1.00518.1001).

(3) Andere Bezugsquellen:

Aqua clean acryl, Biocidal ZF (WAK Chemie Medical GmbH, Bad Soden, D), Stellisept, Sterillium (Bode Chemie, Hamburg, D), Flüssigstickstoff (Messer Griesheim GmbH, Krefeld, D), Phenol, verflüssigt (16018, Riedel-de Haën AG, Seelze, D), Lösungen zur Anwendung im Zell-Counter (Schärfe System GmbH, Reutlingen, D); Kapillarreiniger: Casy[®] Clean (Nr. 43008), Isotone Salzlösung: Casy[®] ton (Nr. 72200), Ala-Pro-p-Nitroanilid HCl (L-1115.0250, Bachem AG, Weil am Rhein, D).

Medien

Die Caco-2 Zellen wurden ausschließlich in **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D-5671**, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) kultiviert,

mit folgenden Zusätze von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D:

20 % Fötalem Kälberserum (FKS; F-7524, ab 10/2003: F-6178) ,

4 mmol/L L-Glutamin (bis 05/2003: G-7513), später

GlutaMAX[™] – I Supplement (0800 083 0902, Gibco[™] Invitrogen Corp., Karlsruhe, D),

100 000 U/I Penicillin, 100 mg/l Streptomycin (P-0906, P-0781).

Die Abkürzung DMEM steht nachfolgend für eine Mischung aus dem gleichnamigen Medium und allen oben genannten Zusätzen.

In Vorversuchen wurde das Zellwachstum nach Inkubation mit zwei verschiedenen Medien untersucht, die jeweils mit 10 % FKS und den anderen Zusätzen (s. o.) supplementiert wurden:

- DMEM (s. o.)
- OptiMEM[®] (mit/ohne Phenolrot: 31985/11058, Gibco[™] Invitrogen Corp., Karlsruhe, D).

Die polymorphkernigen Leukozyten (PML) wurden ausschließlich in HL-1 Medium (BioWhittaker, Nr. 77201, später: Cambrex Bio Science) kultiviert, welches mit folgenden Zusätzen supplementiert wurde:

0,5 % FKS (s. o.)

4 mmol/L L-Glutamin (s. o.) und später GlutaMAX[™] – I Supplement (s. o.),

100 000 U/I Penicillin, 100 mg/l Streptomycin (s. o.).

Dieses Gemisch aus Medium und Zusätzen wird nachfolgend kurz HL-1 Medium genannt.

Test-Kombinationen

Bestimmung der Zellproliferation:

- Cell Proliferation ELISA, BrdU (1 647 229, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D).

Bestimmung der zellulären Reduktase-Aktivität:

- Cell Proliferation Reagent WST -1 (1 644 807, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D).
- *In vitro* Toxicology Assay Kit, Neutral Red based (TOX-4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D).

Nachweis von Apoptose:

- Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (1 774 425, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D).

3.2 Geräte, Materialien und Software

Geräte

- Alpha Plus Amino Acid Analysator LKB 4151 (LKB Biochrom Ltd. Cambridge Science Park, GB)
- Acryl-Wasserbad mit Thermostat (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D)
- Alarm-Thermometer (testo AG, Lenzkirch, D)
- Analysenwaage, Skalenteilung 0,1 mg:
 - Mettler AE 240 (Mettler Waagen GmbH, Küsnacht, CH)
- Begasungsbrutschrank BB 16 (Heraeus Instruments, Hanau, D),
 Inkubationsbedingungen: 37 °C / 5 % CO₂
- ELISA-Photometer Anthos ht II (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, A) mit Drucker
- Gefrierbehälter 35 VHC (Taylor-Warton, Theodore, AL, USA)
- Glasampulle, 1 mL (Wheaton, Millville NJ, USA)
- Glasmesskolben mit Schliff und Stopfen: 5, 10, 100, 200 mL (Eydam, Kiel, D)
- Hamilton-Mikoliterspritzen: 25, 50, 500 µL, gasdicht (Nr. 1702, 1710, 1750, Hamilton Co., Nevada, USA)
- Hochvakuumpumpe Saskia (LABOVAC, Ilmenau, D)
- Horizontal-Schüttelgerät (Eydam, Kiel, D)
- HPLC-Anlagen:
 - (1) Anlage von BioTek Kontron mit:
 - Heliumbegasungsanlage
 - 2 Hochdruckpumpen (422 Master Pumpen)
 - Probenaufgabeeventil 7125 (Rheodyne)
 - Mischer (M 494)
 - Säulenofen (Eigenbau)
 - Säule: Superdex[®] Peptide PE 7,5/300 (17-503-01, Amersham Biosciences, Freiburg, D)
 - Diodenarraydetektor DAD 440
 - Fraktionssammler Foxy[®]200 (ISCO, Lincoln, NE, USA)
 - (2) Computergesteuerte Anlage von Thermo Quest (Egelsbach, D) mit:
 - Vakuumpumpe
 - Niederdruckpumpe: Pump Spectra System P 4000
 - Autosampler
 - Säulenofen Spectra System AS3000
 - Vorsäule und Säule (Merck KGaA, Darmstadt, D):
 - LiChroCART4-4 LiChrospher 100 RP-18 (1.50957.0001)
 - LiChroCART125-4 HPLC Cartidge Superspher 100 RP-18 endcapped (1.16855.0001)
 - Diodenarraydetektor SpectraSystem UV6000LP
 - Interface SpectraSystem SN4000
- Kolbenhub-Pipetten, variabel:
 - 10 µL (SL-Pette XE[®]; Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, D),
 - 20 µL, 100 µL und 200 µL, 2 x 1000 µL (Gilson Medical Electronics, Villiers-le Bel, F),
 - 5 mL (Eppendorf AG, Hamburg, D)

- Achtkanal-Pipetten, variabel:
 - 25 – 200 μL (2 x: SL-Pette[®], Micronic[®] systems; Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, D)
 - 5 – 50 μL (SL-Pette[®]; Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, D)
- Konzentrator: Speedvac Concentrator mit Vakuumpumpe Savant SVC 100 H (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA)
- Magnetrührer mit Heizplatte: IKA-Comitmag RCT (Janke & Kunkel KG, Staufen, D)
- Millicell ERS (Millipore Corporation, Billerica, Mass., USA)
- mobile Pipettierhilfe, netzunabhängig (Integra Biosciences, Walliselle, CH)
- mobiler Bunsenbrenner, netzunabhängig (Integra Biosciences, Walliselle, CH)
- pH-Meter pH 540 GLP (WTW, Weilheim, D)
- Polaroid „Micro Cam“-Kamera mit spezieller Mikroskophalterung (Polaroid Corporation, Bradfordshire, GB)
- Rotierapparat: MACs Mix (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D)
- Schüttelapparat: Minishaker MS 1 (IKA Labortechnik, Wilmington, NC, USA)
- Sterilwerkbänke: Airone LF-640 (Safelab System Ltd, Britstol, GB)
 - Hera Safe (Typ H, Klasse 2; Heraeus Instruments, Hanau, D)
- Tiefkühlschrank Premium No Frost, $-24 \pm 5^\circ\text{C}$ (GSNP 3326, Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, D)
- Tisch-Autoklav: Tuttnauer 2540 EL (121°C , 196 kPa, 20 min; Tuttnauer, Jerusalem, Israel)
- Trockenschrank (Heraeus Instruments, Hanau, D)
- Ultraschallbad: Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic GmbH, Berlin, D)
- Umkehr-Lichtmikroskop Wilovert[®] A mit Objektiv: SPL 20/0,25, Ph-p (Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D)
- UV/VIS Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer GmbH, Überling, D)
- Vakuumpumpe (Microgon Inc., Laguna Hills, CA, USA)
- Zentrifuge Labofuge 400 und Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Hanau, D)
- Zell-Counter CASY1 / TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen, D)

Materialien

- Cryoröhrchen, steril, 2 mL (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D)
- Einmalfilter:
 - steril, 0,2 μm , Polypropylen (Nr. 431219, Nr. 431215, Corning[®], Corning, NY, USA)
- Einmalkanülen: steril, Sterican, Gr. 14 (Nr. 04657640, Braun, Melsungen, D)
- Einmalspritzen: steril, 2 mL (Nr. 04606027, Braun, Melsungen, D)
- Halbmikro-Küvetten 104-QS/10 Quarzglas SUPRASIL (Hellma GmbH & Co KG, Mühlheim, D)
- Kulturflaschen: 25 cm^2 , 75 cm^2 , steril (Nr. 430372, 430725, Corning[®], Corning, NY, USA)
- MACS-Zubehör (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D):
 - CD15 MicroBeads (Nr. 130-046-601)
 - MACS-Säule LS⁺ (Nr. 424-01)
 - MidiMACS-Magnet (Nr. 423-02)
 - Zellsuspensionsfilter: Nylon, 30 μm Maschenweite (Nr. 414-07)
- Membran-Insert-Kits (steril; 0,4 μm Poreng röße; Costar[®], Corning, NY, USA):

- Transwell®-Clear Polyester- (PE-) Membran, transparent, 12 Kavitäten (1,1 cm² Kulturfläche) pro MTP (Nr. 3460)
- Transwell® Polycarbonat- (PC-) Membran 12 Kavitäten (1,1 cm² Kulturfläche) pro MTP (Nr. 3401), 6 Kavitäten (4,7 cm² Kulturfläche) pro MTP (Nr. 3412),
- Mikrotiterplatten, steril, Polystyrol (PS): 6 Kavitäten (Nr. 3516)
12 Kavitäten (Nr. 3513)
24 Kavitäten (Nr. 3526)
96 Kavitäten (Nr. 430247)
- Parafilm „M“ (American National Can, Chicago, IL, USA)
- Pasteurpipetten (Glas), steril (S -6018, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
- Polaroid-Farbaufsichtsfilm, ISO 649/29 DIN (Nr. PO 339, Polaroid, Waltham, MA, USA)
- Reagenzgläser mit Schraubverschluss, hitzebeständig, 8 mL (Eydam, Kiel, D)
- Reaktionsgefäße 3810, 1,5 mL (Nr. 0030102.002, Eppendorf AG, Hamburg, D)
- Sterile Plastikpipetten, 10 mL (LP Italiana Spa, Code 161010)
- Untersuchungshandschuhe Rotiprotect® (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D)
- Weithalsflaschen mit Schraubverschluss aus Polypropylen (Eydam, Kiel, D)
- Zentrifugen-Röhrchen, 15 und 50 mL, steril, Polypropylen (PP) (Nr. 430766, 430291, Corning, Corning, NY, USA)

Software

- Software des Alpha Plus Amino Acid Analysator LKB 4151: EZChrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 (Scientific Software, Inc., Pleasanton, CA, USA)
- Chromatographie-Software: A) KromaSystem 200
B) ChromQuest 2.51 (Thermo Quest, Egelsbach, D)
- StatMost (Data Most Corporation, Salt Lake City, UT, USA)
- UV Win-Lab Version 2,0 (1994/6, The Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT USA)
- Valoo® analytic software (analytic software, Dr. Stella Wintermann, Bremen, D).

3.3 Zellmaterial, Zellzahlbestimmung, Mikroskopie

Das Hauptzellkultursystem dieser Arbeit war die Zelllinie Caco-2, außerdem wurden humane polymorphkernige Leukozyten (PML) eingesetzt. Die Zellen wurden unter aseptischen, standardisierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert, unter Einsatz vortemperierter Medien, Puffer u. a. Lösungen. Zu Beginn eines jeden Tests wurde die Zellzahl mittels Zell-Counter bestimmt und auf die gewünschte Anzahl eingestellt. Die Ausbildung der Caco-2 Monolayer wurde teilweise unter dem Umkehrmikroskop beobachtet.

3.3.1 Caco-2 Zellen

Die Caco-2 Zellen wurden von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ) in Braunschweig (DSM ACC 169) bezogen, in 2 mL Cryoröhrchen und in flüssigem Stickstoff (- 196 °C) gelagert.

Auftauen

Die in Cryoröhrchen gelagerten Caco-2 Zellen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen, im Wasserbad aufgetaut (37 °C, 1-2 min). Nachfolgend wurde unter aseptischen Bedingungen (Sterilbank) weitergearbeitet. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 mL DMEM übergeführt und zur Entfernung des enthaltenen, zytotoxischen Frostschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) zweimal gewaschen: Zentrifugation (10 min, 194 x g), absaugen des Überstandes und Resuspension in 10 mL DMEM. Nachfolgend wurde die Zellzahl im Zell-Counter bestimmt und die gewünschte Zelldichte durch Verdünnung mit DMEM eingestellt. Die Aussaat und Kultivierung erfolgte auf dem Boden von Kulturflaschen (25 cm² bzw. 75 cm², 10 mL bzw. 30 mL DMEM) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂).

Passagieren (subkultivieren) von Caco-2 Zellen

Die Zellen wurden kurz vor Ausbildung eines konfluenten Caco-2 Monolayers (ca. nach 5 – 7 Tagen) passagiert. Dazu wurde das DMEM und anschließend das zum Spülen des Zellrasens eingesetzte PBS (8 mL) entfernt (Pasteurpipette, Vakuumpumpe). Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung (3 mL, 7-10 min, 37 °C) geerntet und nachfolgend rasch in 10 mL DMEM (20 % FKS) resuspendiert. Das zellschädigende Trypsin wurde nach Zentrifugation (5 min, 194 x g) entfernt und das Zellpellet erneut in 10 mL DMEM resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl im Zell-Counter Casy-1/TT (3.3.3) bestimmt und die benötigte Zelldichte (1,0 – 1,5 x 10⁴ Zellen/cm²) durch Verdünnung mit DMEM eingestellt. Diese Zellsuspension wurde entweder in eine Kulturflasche (Zellvorrat) oder in verschiedene MTP pipettiert und entsprechend der jeweiligen Testvorschriften weiter behandelt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂).

Die zellchemischen Untersuchungen wurden mit Caco-2 Zellen der 10. bis 81. Passage durchgeführt.

3.3.2 Humane polymorphkernige Leukozyten

Die polymorphkernigen Leukozyten (PML) wurden vor jedem Test aus der Mundhöhle eines gesunden Probanden isoliert und durch magnetische Zellseparierung (MACS) angereichert (s. Abbildung 3-1). Zunächst wurde die Mundhöhle 2 min mit 90 mL (4 x ca. 22 mL/30 s) Reinstwasser (steril) gespült und die Lösung in ein steriles Becherglas expektoriert. Eine Stunde später wurde die Mundhöhle erneut gespült, 2,5 min mit 100 mL PBS (5x20 mL/30 s). Auch diese Expekorate wurden im Becherglas gesammelt, durch vorsichtiges Schütteln vermischt und in vier Zentrifugenröhrchen (50 mL) übergeführt und zentrifugiert (280 x g, 10 min, RT, mit Bremse). Die Überstände wurde abgesaugt und verworfen. Die Zellpellets wurden jeweils in 2,5 mL PBS resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen (50 mL) vereinigt. Aus dieser Suspension wurden durch Filtration (ca. 2 h, Nylonfilter, Maschenweite: 30 µm) Kontaminanten (Mikroben, Essensreste, Epithelzellen etc.) entfernt. Anschließend wurde im Zell-Counter (s. 3.3.3) die im Filtrat vorliegenden Zellzahl ermittelt.

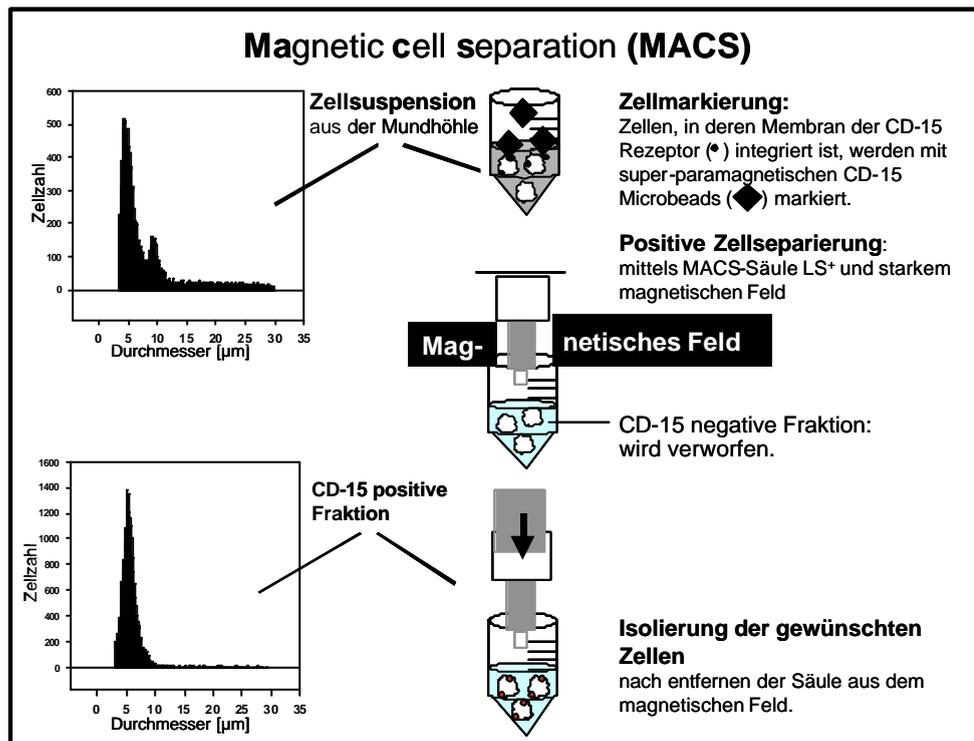


Abbildung 3-1: Isolierung und Anreicherung polymorphkerniger Leukozyten nach Spülung der Mundhöhle gesunder Probanden

(Darstellung modifiziert nach HARTMANN ET AL¹).

Das Filtrat wurde zentrifugiert (280 x g, 10 min, RT, ohne Bremse), der Überstand durch Absaugen entfernt und das Zellpellet in mindestens 80 µL PBS_{MACS} resuspendiert (80 µL

¹ Verändert nach Hartmann, R. et al., 2000

PBS_{MACS} pro 10⁷ Zellen). In diese Zellsuspension wurden mindestens 20 µL CD-15 Micro-Beads (20 µL pro 10⁷ Zellen) zur Markierung der gewünschten Zellen hinzugefügt, vorsichtig vermischt und 15 min bei 6 bis 12 °C inkubiert (s. Abbildung 3-1). Die überschüssigen Micro-Beads wurden durch waschen (400 µL PBS_{MACS}) und nach Zentrifugation (280 x g, 5 min, RT, ohne Bremse) entfernt. Das Zellpellet wurden in mindestens 500 µL PBS_{MACS} (500 µL pro 10⁸ Zellen) resuspendiert und auf eine vorgespülte MACS-Säule LS⁺ (3 mL entgasten PBS_{MACS}) aufgetragen, die in ein starkes magnetisches Feld gestellt wurde. In diesem wurden die CD-15 positiven Zellen retiniert und gleichzeitig wurden die CD-15 negativen Zellen eluiert. Nachdem wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt. Durch Spülung mit 5 mL PBS_{MACS} wurden die CD-15 positive Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) eluiert. Nach einer Zellzählung wurde das PBS_{MACS} durch Zentrifugation (280 x g, 5 min, RT, mit Bremse) entfernt und die Zellen in 30 mL HL-1 Medium resuspendiert, in eine Kultruf Flasche (75 cm²) übergeführt und 72 h im Brutschrank unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert.

3.3.3 Zellzahlbestimmung im Zell-Counter und Mikroskopische Beobachtung von Zellen

Messmethode der Zellzahlbestimmung

Die nach der Zellernte vorliegende Zellsuspension wird in einem schwachen Elektrolyten (Casy[®]ton) 1:100 verdünnt. Aus dieser Probe werden automatisch 4 x 100 µL entnommen (Unterdruck) und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messkapillare definierter Geometrie (Ø 150 µm) gesaugt, über welcher ein mit 1 MHz getaktetes elektrisches Niederspannungsfeld angelegt ist. Die Verdrängung des elektrisch leitenden Elektrolyten beim Durchgang einer Zelle durch die Messkapillare wird vom Sensor erfasst, wobei vitale bzw. zerstörte Zellen ein ihrem Zellvolumen bzw. dem Zellkern entsprechendes Signal generieren. Die resultierende Veränderung des elektrischen Widerstands wird automatisch ermittelt und digitalisiert (Analog-Digital-Wandler). Die Signalauswertung (Breite, Fläche, Zeitverlauf) erfolgt mittels der Pulsflächenanalyse und des Vielkanal-Analysators, so dass eine Darstellung der Messdaten als Größenverteilung (Histogramm) oder Zahlenwert möglich ist. Es werden Angaben zur Zellzahl (Zellen/mL Suspension), zum Durchmesser und zum Volumen ausgegeben. Nachfolgend kann die Gesamtzellzahl um die Zahl der toten Zellen (kleiner als die definierte Skalierungsgrenze) korrigiert werden.

Mikroskopische Beobachtung von Zellen

Die Beobachtung der Veränderung der Zellmorphologie, insbesondere von Caco-2 Zellen, erfolgte nach der Aussaat und während der Kultivierung auf PP-Kavitätenböden bzw. PE-Membranen, direkt vor dem Medium-Austausch, unter dem Umkehrmikroskop (Wilovert[®]) mit 100 bzw. 200-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse wurden verbal dokumentiert.

3.4 Vorversuche: Zellkultivierung

Ziel dieser Kultivierungsvorversuche war die Reduzierung des Zusatzes an FKS. Dazu wurden Zellen der 13. Passage in drei Kulturflaschen ausgesät, in DMEM mit 20 % (I: Negativ-Kontrolle) bzw. in DMEM mit 10 % FKS (II) sowie in OptiMEM® mit 10 % FKS (III). Die geernteten Caco-2 Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät, proliferierten und bildeten innerhalb der nächsten 7 bzw. 8 Kulturtage konfluente Monolayer aus. Nachfolgend wurden die Zellen erneut passagiert und in drei Kulturflaschen ausgesät sowie in je eine 12-Kavitäten-Transwell®-MTP und 96-Kavitäten-MTP zur Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands bei RT (TEER, s. 3.7.3) und der metabolischen Aktivität mittels WST-1 Tests (s. 3.7.1.1). In dieser Zeit ($d_0 - d_{17}$) wurden keine Unterschiede in der Zellmorphologie und Ausbildung intakter Monolayer beobachtet. In den Monolayern der Kulturflaschen I und III wurden mehr *domes* gezählt als in dem der Kulturflasche II. Dies deutet auf Unterschiede in der Transportleistung der Monolayer hin². Unabhängig vom Medium wurde innerhalb der ersten 10 Kulturtage ein ansteigender TEER ermittelt. Eine längere Kultivierung in DMEM mit 10 % FKS führte zu einer Senkung des TEER (s. Abbildung 3-2, Tabelle A2). Gleichzeitig wurden intakte Monolayer unter dem Mikroskop beobachtet. Die Entwicklung des TEER war nach Zellkultivierung in OptiMEM® (10 % FKS) vergleichbar zur Kontrolle. Hingegen wurde eine signifikant niedrigere metabolische Aktivität (d_{10}) ermittelt (s. Tabelle A3). Infolge dessen wurde die im Labor etablierte Kultivierung der Caco-2 Zellen in DMEM mit 20 % FKS³ weiterhin fortgeführt.

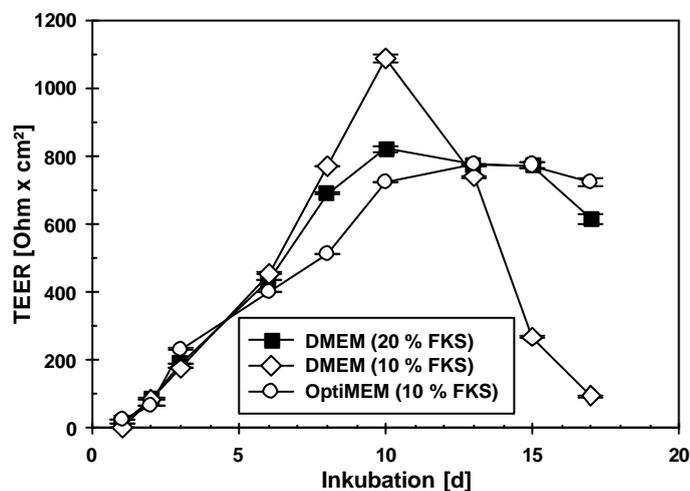


Abbildung 3-2: Effekte einer Kultivierung von Caco-2 Zellen in unterschiedlichen Medien auf den TEER

Zellaussaat (14. Passage, 2×10^4 /Kavität) in 96-Kavitäten-MTP und Kultivierung in verschiedenen Medien unter Standardbedingungen sowie Messung des TEER (bei RT, s. 3.7.3) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Messergebnisse s. Tabelle A-2.

² Pinto, M. et al., 1983

³ Meisel, H. et al., 1998

3.5 Probenmaterial

Als Testsubstanzen wurden 178 Hydrolysate, hergestellt aus drei Milchproteinfraktionen, 36 synthetische Peptide, zwei handelsübliche Milchproteinpräparate, ein Magermilchpulver (zertifiziertes Referenzmaterial) sowie fünf Kollagenhydrolysate eingesetzt. Außerdem sollte N⁶-(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado: D 7036, Sigma) als Positiv-Kontrolle in den Zytotoxizitätsstudien eingesetzt werden und deshalb wurde in Vorversuchen dessen Wirkung auf differenzierter Caco-2 Zellen untersucht.

3.5.1 ACE-inhibitorische Hydrolysate von Milchproteinfraktionen

Die *in vitro* ACE-inhibitorischen Milchproteinhydrolysate und deren Ausgangssubstanzen (Milchproteinfraktionen) β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein (β -Lactoglobulin bzw. β -Lg.), das Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) und Natrium-Caseinat wurden von Partnern des EU-Projektes „HTMProt“⁴ im Labormaßstab (0,5 L) hergestellt. Dazu wurden die Milchproteinfraktionen (Substrate) in Puffer (0,2 und 0,5 mmol/L NaH₂PO₄, Na₂HPO₄) gelöst und 79 verschiedene Hydrolysate durch Einsatz von sieben verschiedenen Enzymen (Alcalase, Corolase 7089, Corolase L 10, Corolase PNL, Corolase PP, Protamex, TPCK-Trypsin) produziert. Zusätzlich wurden diese Hydrolysate einer simulierten gastrointestinalen Verdauung (sGIV) unterzogen. Infolge dessen wurden 158 verschiedene Hydrolysate, deren Hydrolysegrad (HG [%]) durch die pH-stat Methode ermittelt worden war, und jeweils vier verschiedene Ansätze der zugehörigen Substrate β -Lactoglobulin, WPC 75 und Natrium-Caseinat als Testsubstanzen eingesetzt (s. Tabelle 3-1). Diese wurden als Flüssigkeit zur Verfügung gestellt⁴ und in Zentrifugenröhrchen bei -24 °C gelagert.

Tabelle 3-1: Probenmaterial: ACE-inhibitorische Hydrolysate (79/79: mit / ohne simulierter gastrointestinaler Verdauung) aus drei verschiedenen Milchproteinfraktionen

Die aufgeführten Hydrolysate (79) wurden zusätzlich einer simulierten gastrointestinalen Verdauung (sGIV) unterzogen, so dass insgesamt 158 Hydrolysate als flüssige Proben zur Verfügung gestellt wurden. Diese waren gelöst in A) 0,5 mol/L, B) 0,2 mol/L HPLC-Analysenpuffer⁴.

Enzyme	Hydrolysegrad [%] der Hydrolysate aus den Milchproteinfraktionen:		
	β -Lactoglobulin	WPC 75	Natrium-Caseinat
Alcalase	A) 1/2/3/4/5/7/10/12,85	B) 4/8/10/12/14/16/18/20	
Corolase 7089	B) 1/4/6/8/9/10		B) 1/4/6/10/12/16,78
Corolase L 10			B) 1/2/3/4,095
Corolase PNL		B) 3/5/7/10/12/15	B) 1/4/6/8/10/12
Corolase PP		B) 3/5/7/10/12/14/16/18/22	
Protamex	B) 1/4/6/8/9/10		B) 1/4/6/10/12/15
TPCK-Trypsin	A) 1/2/3/4/5/6/6,8	B) 1/2/3/4/5/6/8	
Anzahl Hydrolysate	27	30	22

⁴Dr. Walsh, D. J., s. Anhang Tabelle A-1

Der Proteingehalt dieser Proben wurde unter Einsatz der Makro-Kjehldahl Methode bestimmt und lag bei ca. 1 g Protein pro 100 mL Hydrolysat (s. Tabelle 3-2 bis Tabelle 3-4).

Tabelle 3-2: Proteingehalte der Proben aus b-Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (s. Tabelle 3-1)

Substrat Enzym sGIV HG [%]	Milchproteinfraktion: b-Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein							
	Alcalase		Corolase 7089		Protamex		TPCK-Trypsin	
	Mit	Ohne	Mit	Ohne	Mit	Ohne	Mit	Ohne
	Proteingehalt [mg / 100 µL Probe]							
0	0,8625	0,8984	0,8070	0,8070	0,9684	0,9600	0,8808	0,9001
1	0,8957	0,8781	0,7597	0,7173	0,8279	0,8597	0,8822	0,8669
2	0,8536	0,8651					0,8607	0,8609
3	0,8368	0,8856					0,8715	0,8525
4	0,8535	0,8815	0,7418	0,7674	0,8323	0,8587	0,8650	0,8682
5	0,8615	0,8682					0,8729	0,8646
6			0,6614	0,6373	0,8360	0,8453	0,8480	0,8749
6,69							0,8595	0,8473
7	0,8709	0,8731						
8			0,7478	0,7433	0,8358	0,8705		
9			0,7618	0,7569	0,8380	0,8481		
10	0,8485	0,8971	0,6197	0,6042	0,8512	0,6624		
12,85	0,8688	0,8965						

Tabelle 3-3: Proteingehalte der Proben aus WPC 75 (s. Tabelle 3-1)

Substrat Enzym sGIV HG [%]	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75)							
	Alcalase		Corolase PNL		Corolase PP		TPCK-Trypsin	
	Mit	Ohne	Mit	Ohne	Mit	Ohne	Mit	Ohne
	Proteingehalt [mg / 100 µL Probe]							
0	0,9340	0,8330	0,8770	0,7110	1,0010	0,8960	1,0120	0,6670
1	0,9460	0,9340					0,9290	0,8740
2							0,9100	0,9350
3			0,7880	0,9330	0,9900	0,8880	1,0870	0,7790
4	0,8790	0,8800					0,9130	0,9570
5			0,8740	0,9170	0,9600	0,9020	0,8960	0,9380
7							1,0300	0,8850
8			1,0040	0,7350	0,9510	0,8780		
10							0,8920	0,9090
12	0,9250	0,9280	0,8700	0,8810	0,9280	0,9010		
14	0,8910	0,8890	0,8790	0,8680	0,9320	0,8840		
15	0,8990	0,8850			0,8910	0,8960		
16			0,9230	0,8900				
18	0,9150	0,8410			0,8880	0,8400		
20	0,9080	0,8950			0,8960	0,9950		
22	0,9250	0,8860						

Tabelle 3-4: Proteingehalte der Proben aus Natrium-Caseinat (s. Tabelle 3-1)

Substrat Enzym sGIV	Natrium-Caseinat							
	Corolase 7089		Corolase L 10		Corolase PNL		Protamex	
HG [%]	Mit	Ohne	Mit	Ohne	Mit	Ohne	Mit	Ohne
0	1,0649	0,8828	0,7746	0,9993	0,8678	1,0399	1,1383	0,7655
1	1,0059	0,8960	0,8800	0,9250	0,9943	0,6340	0,9450	0,7129
2			0,8868	0,9767				
3			0,8732	0,9859				
4	1,0129	0,8948			0,7641	0,7291	0,9667	0,7724
4,095			0,8910	0,9836				
6	1,0288	0,9157			0,7835	0,7290	0,9630	0,7880
8					0,9239	0,8949		
10	0,9887	1,0124			0,9793	0,9032	0,9204	0,8913
12	1,0205	1,0499			0,9886	0,9166	0,9441	0,9327
15							0,9429	0,9294
16,78	1,0226	1,0612						

Des Weiteren wurden *in vitro* ACE-inhibitorische Hydrolysate von Milchproteinfraktionen im industriellen Technikmaßstab (50 L) angefertigt. Dazu wurden β -Lactoglobulin und WPC 75 durch Alcalase und Natrium-Caseinat durch Corolase 7089 hydrolysiert und auf einen Hydrolysegrad von 18 % eingestellt. Diese Hydrolysate wurden ultrafiltriert (MG < 500 Da) und nachfolgend getrocknet. Diese Testsubstanzen (β -Lactoglobulin, WPC 75, Natrium-Caseinat sowie die zugehörigen Ultrafiltrate sowie das WPC 75-Hydrolysate) wurden vom EU-Projektpartner pulverförmig zur Verfügung gestellt⁵.

3.5.2 Synthetische Peptide, Milchproteinpräparate und Magermilchpulver

Die als Testsubstanzen eingesetzten synthetischen Peptide sind in Tabelle 3-5 aufgeführt und wurden bei -24 °C gelagert.

Die in den Tabellen aufgeführten Di- und Tripeptide sind in der Primärstruktur des Milchproteins enthalten. Deshalb wurde in den Zytotoxizitätstests (WST-1, Neutralrot) und zum Nachweis der DPP IV-Aktivität zusätzlich die Wirkung handelsüblicher Milchprodukte (Lebensmittel) untersucht: pulverisierte Milchproteinpräparate Lactalbumin 70 und Ultra-lact 35 von der Firma MILEI GmbH (Stuttgart, D). Außerdem wurde ein Magermilchpulver (zertifiziertes Referenzmaterial CRM 063 R) von der Firma LGC Promochem GmbH (Wesel, D) käuflich erworben und eingesetzt. Diese Testsubstanzen wurden bei + 4 °C gelagert.

⁵ Paodonovan, P., s. Anhang Tabelle A-1

Tabelle 3-5: Probenmaterial: Synthetische Peptide

Peptid	Händler	Bestell- Nummer	Molekulare Masse	Summen- formel	Reinheit [%]
Ala-Leu	Sigma	A - 1878	202,30	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₃	> 99
Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg	Sigma – Genosys		837,06	C ₃₇ H ₇₆ N ₁₂ O ₁₄ S	
Ala-Pro	Bachem AG	G - 1350	186,20	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃	> 99
Ala-Pro-Leu	Bachem AG	H - 8280	299,37	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₄	> 99
Ala-Trp	Bachem AG	G - 1395	275,31	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	97
Ala-Tyr*	Sigma	A - 4003	252,30	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄	> 99
Ala-Val	Bachem AG	G - 1420	188,23	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	> 99
Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg*	Sigma	B-3259	1060,24	C ₅₀ H ₈₉ N ₁₅ O ₁₉	
Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu *	Eurogentec, **		1227,32	C ₅₃ H ₁₀₆ N ₁₂ O ₃₁	> 95
Gly-Gly-Tyr-Arg	Bachem AG	N - 1080	451,48	C ₁₉ H ₂₉ N ₇ O ₆	> 99
Gly-Pro	Sigma	G - 3002	172,20	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃	> 99
Gly-Tyr	Bachem AG	G - 2235	238,24	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄	> 99
His-Leu	Sigma	H - 2504	268,30	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₃	> 99
Ile-Arg	Bachem AG	G - 2375	287,36	C ₁₂ H ₂₅ N ₅ O ₃	> 96
Ile-Pro	Sigma	G - 2425	228,29	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	k. A.
Ile-Pro-Ile	Sigma	I - 9759	341,40	C ₁₇ H ₃₁ N ₃ O ₄	> 99
Leu-Gly	Sigma	L - 9500	188,20	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	> 99
Leu-Pro	Sigma	L - 8753	264,80	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	> 99
Leu-Trp	Sigma	L - 0503	317,40	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₃	> 99
Leu-Val	Sigma	L - 1377	230,30	C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	> 99
Leu-Lys-Pro*	**		356,46	C ₁₇ H ₃₆ N ₄ O ₆	k. A.
Lys-Phe*	Bachem AG	G - 2685	293,36	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₃	> 99
Met-His	Bachem AG	G - 2750	286,36	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₃ S	> 98
Phe-Tyr	Bachem AG	G - 2955	328,37	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₄	k. A.
Pro-Hyp	Bachem AG	G - 3025	228,25	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄	> 99
Pro-Leu	Bachem AG	G - 3035	231,90	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	> 99
Pro-Pro	Bachem AG	G - 3060	248,71	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃	> 99
Pro-Val	Bachem AG	G - 3085	214,27	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	?
Ser-Phe	Bachem AG	G - 3220	252,27	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄	> 99
Ser-Tyr	Bachem AG	G - 3240	268,27	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₅	> 99
Tyr-Gly	Bachem AG	G - 3405	238,24	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄	> 99
Tyr-Ile	Bachem AG	G - 3425	294,35	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₄	> 99
Ile-Pro	Sigma	G - 2425	228,29	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	k. A.
Ile-Pro-Ile	Sigma	I - 9759	341,40	C ₁₇ H ₃₁ N ₃ O ₄	> 99
Tyr-Pro	Bachem AG	G - 3625	278,30	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	k. A.
Val-Ala	Bachem AG	G - 3500	188,23	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	> 99
Val-Phe*	Bachem AG	G - 3565	264,32	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	> 99
Val-Pro	Sigma	V - 7878	250,70	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	> 99
Val-Trp	Sigma	V - 2000	303,40	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₃	> 99
Val-Tyr*	Sigma	V - 5626	280,30	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₄	> 99
Val-Tyr-Val	Sigma	V - 8376	379,50	C ₁₉ H ₂₉ N ₃ O ₅	> 99

Abkürzung: k. A.: keine Angaben, * Peptide, die in Transportstudien eingesetzt wurden, ** Peptide, die vom französischen Partner des EU-Projektes (s. Tabelle A-1) synthetisiert wurden.

3.5.3 Kollagenhydrolysate

Die fünf verschiedenen Kollagenhydrolysate (s. Tabelle 3-6) wurden von der Gelita AG (Eberbach, D) zur Verfügung gestellt⁶. Die getrockneten, pulverförmigen Rohstoffe wurde in Propylenflaschen bei + 4 °C gelagert.

Tabelle 3-6: Probenmaterial: Kollagenhydrolysate der Gelita AG⁶

Bezeichnung	Partie-Nr.	Rohstoff	Mittlere Molare Masse [kD]
Sol D	L 831412	Rinderspalten	2,9
Sol DA	L 890915	Schweineschwarten	6,3
Collagel A	L 890211	Schweineschwarten	15,1
Collagel BS	L 830197	Rinderspalten	9,7
Collagel BS-GA	L 895015	Rinderspalten	10,5

3.6 Testansätze für zellchemische Untersuchungen

3.6.1 Ansetzen der Stammlösungen

Die getrockneten, pulverförmigen Testsubstanzen (synthetische Peptide, Milchproteinfraktionen, -präparate, -permeate, WPC 75-Hydrolysat, Magermilchpulver (zertifiziertes Referenzmaterial) sowie ip6Ado wurden jeweils in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen (Mettler AE 240). Zur Herstellung der Stammlösungen wurde das Probenmaterial entsprechend der gewünschten Konzentrationen in einem Puffer (37 °C warm) gelöst (s. Tabelle 3-7, ip6Ado: 20 mmol/L in PBS), unter kurzzeitigem rütteln (Minishaker MS 1, MACs Mix) und teilweise auch unter kurzfristiger Behandlung im Ultraschallbad. Die in PBS unlöslichen synthetischen Peptide wurden zunächst in 1 mmol/L Salzsäure bzw. in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und anschließend mit PBS zur Endkonzentration von 2 mmol/L verdünnt (Tabelle 3-8). Teilweise war eine zusätzliche, kurzfristige Behandlung im Ultraschallbad notwendig. Zur Überprüfung der Effekte von DMSO auf die Vitalität der untersuchten Humanzellen wurde eine 6 %-ige Stammlösung (7,679 mol/L) hergestellt. Die flüssigen Milchproteinfraktionen (Substrate: β -Lactoglobulin, WPC 75 und Natrium-Caseinat) und daraus hergestellte Hydrolysate (158) wurden hingegen in Zentrifugenröhrchen pipettiert: Da jedes Substrat bzw. Hydrolysat ca. 1 g Protein / 100 mL \sim 6 mg Protein / 600 μ L enthält, wurden 600 μ L Substrat bzw. Hydrolysat entnommen und ad 1 mL mit PBS aufgefüllt.

Die Milchproteinpräparate bzw. -fraktionen sowie das WPC 75-Hydrolysat (Pulver) waren nicht vollständig löslich und wurden deshalb zentrifugiert (3000 U/min, 30 min). Der jeweilige Überstand der Stammlösungen wurde nachfolgend als Testsubstanz eingesetzt.

⁶ B. Eggensglüß, Gelita AG, Eberbach, D., s. Tabelle A-1

Tabelle 3-7: Konzentrationen der Stammlösungen unter Angabe des Lösemittels

Testsubstanzen	Stammlösung	
	Konzentration	Lösemittel
Synthetische Peptide		
Di- und Tripeptide	20* bzw. 2** mmol/L	PBS, HBSS (Transportstudien)
Hepta- bis Undecapeptide	2 mmol/L	HBSS (Transportstudien)
Lösemittel DMSO	6 %	PBS
Milchproteinpräparate		
Lactalbumin 70	20 mg/mL = 14 mg Protein/mL	PBS
Ultralact 35	20 mg/mL = 7 mg Protein/mL	PBS
Magermilchpulver	30 % (w/v)	PBS
Milchproteinfraktionen[#]/ -hydrolysate/ -permeate:		
flüssig ^{##}	600 µL/mL ~ 6 mg Protein/mL	PBS
pulverförmig ^{###}	80 mg/mL	DMEM/HL-1
Kollagenhydrolysate	200 mg/mL	PBS, HBSS (Transportstudien)

Peptidlösemittel: * PBS, ** DMSO bzw. HCl, [#] Substrate, ^{##} Herstellung der Testsubstanzen im Labormaßstab bzw. ^{###} im Technikummaßstab.

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm, Polypropylenfilter), entsprechend den Testbedingungen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 24 °C gelagert.

Tabelle 3-8: Synthetische Peptide und deren Lösemittel

Synthetische Peptide und die entsprechenden Lösemittel		DMSO-Konzentration in der Peptid-Stammlösung [mmol/L]
1 mmol/L HCl	DMSO	
Gly-Tyr	Ala-Tyr	589,6
Tyr-Gly	Ala-Val	214,2
	His-Leu	757,0
	Ile-Pro	196,1
	Leu-Trp	375,3
	Phe-Tyr	583,7
	Val-Ala	300,4
	Val-Pro	105,2
	Val-Trp	596,4

3.6.2 Zellinkubationen und Ansetzen der Testverdünnungen

Die Humanzellen wurden als Suspension in die jeweilige Mikrotiterplatte (MTP) pipettiert. Dazu wurden drei verschiedene Vorgehensweisen gewählt: Zur Untersuchung der Testsubstanzwirkung auf proliferierende (entartete) Caco-2 Zellen bzw. PML wurde die gewünschte Zelldichte im jeweiligen Endvolumen bzw. der Hälfte des Endvolumens in die Kavitäten pipettiert. Die PML wurden sofort mit Testsubstanz inkubiert, die zweifach konzentriert in der Hälfte des Endvolumens zugesetzt wurde. Die Caco-2 Zellen hingegen wurden zunächst 4 h unter Standardbedingungen (DMEM, 37 °C, 5 % CO₂) kultiviert und nachfolgend wurde die

Hälfte des Endvolumens gegen eine zweifachkonzentrierte Testlösung ausgetauscht. Die Kultivierung erfolgte anschließend entsprechend der jeweiligen Testvorschriften.

Sollten die Untersuchungen an differenzierten Caco-2 (Enterozyten-ähnlichen) Zellen durchgeführt werden, so erfolgte die Zellaussaat in der gewünschten Zelldichte entsprechend dem jeweiligen Kavitätenvolumen. Die Caco-2 Zellen wurden 10 bis 21 Tage (d_0 bis d_{10}/d_{21}) unter Standardbedingungen (DMEM, 37 °C, 5 % CO₂) kultiviert und der DMEM-Austausch (jeweils die Hälfte des Kavitätenvolumens) erfolgte jeden zweiten, dritten Tag. In dieser Zeit proliferierten und differenzierten die Zellen, so dass sich intakte Caco-2 Monolayer ausbildeten. Zu Beginn der jeweiligen Tests, nach 10, 14 bzw. 21 Tagen (d_{10} , d_{14} bzw. d_{21}), wurde die Hälfte des Kavitätenvolumens durch zweifachkonzentrierte Testlösungen ersetzt. Die Kultivierung erfolgte entsprechend der jeweiligen Testvorschriften. Die Durchführung der Transportstudien jedoch erfolgte nach restloser Entleerung der Kavitäten und Zugabe der einfachkonzentrierten Testsubstanz, im entsprechenden Kavitätenvolumen.

In jeder Versuchsreihe wurden Leerwerte (BLANK: Kavität ohne Zellen, mit DMEM) sowie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, die im Folgenden kurz Kontrolle (K_N) genannt wird: Humanzellen in Medium bzw. in HBSS (Transportstudien) kultiviert (ohne Testsubstanz-zusatz). Die Kultivierung erfolgte grundsätzlich im Brutschrank, da Humanzellen eine dem menschlichen Organismus angepasste Temperatur von 37 °C sowie 5 % CO₂ in der Atmosphäre benötigen. Aufgrund der Verstoffwechslung von Medium-Bestandteilen und Testsubstanzen war der (Teil-) Austausch des Testsubstanz-haltigen bzw. -freien Mediums bei einer Testdauer von mehr als 3 Tagen jeden 2. bis 3. Kultivierungstag notwendig.

Zellinkubation in 96-Kavitäten-MTP

In 96-Kavitäten-MTP wurde die Wirkung der Testsubstanzen auf die extra- und intrazelluläre metabolische Aktivität (WST-1 und Neutralrot-Färbung), die DPP IV-Aktivität, die Zellproliferation (BrdU-Test) bzw. die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung an Caco-2 Zellen (proliferierende bzw. differenzierte) bzw. PML untersucht. Dazu wurden die Humanzellen in einer Anfangsdichte von 2×10^4 Zellen pro Kavität (200 µL Caco-2 Zell- bzw. 100 µL PML-Suspension) ausgesät (Acht-Kanalpipette) und kultiviert. Anschließend wurden je 100 µL DMEM (Caco-2 Zellen) aus jeder Kavität entnommen. Das Endvolumen wurde durch Zugabe von zweifachkonzentrierter Testlösung erreicht. In allen Ansätzen wurden Leerwerte (BLANK), Negativ-Kontrollen (K_N) sowie eine Positiv-Kontrolle (K_P : 1 mmol/L ip6Ado) mitgeführt. Die Humanzellen wurden 4, 24 sowie teilweise 72, 96 h mit Testsubstanz bzw. Medium inkubiert und anschließend entsprechend der Testvorschriften mit verschiedenen Reagenzien versetzt (s. 3.7.1.1, 3.7.1.2, 3.7.2, 3.7.8, 3.7.9).

Zellinkubation in Transwell®-Kits zur TEER-Messung und für Transportstudien

Die Wirkung der Testsubstanzen auf einen intakten Caco-2 Monolayer im Zeitverlauf (ab d_{10} – d_{21} – d_{30}) wurde durch wiederholte Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) untersucht und erfolgten ebenso wie die Transportstudien (an d_{14}) in Transwell®-Kits mit Insertmembranen unterschiedlichen Materials (Polyethylen: PE, Polycarbonat: PC). Die Caco-2 Zellen wurden mit einer Anfangsdichte von $1,1 \times 10^5$ Zellen/cm² auf die jeweilige Membran (Porengröße: 0,4 μ m) eines Inserts ausgesät und 10 bzw. 14 Tage unter Standardbedingungen (DMEM, 37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. In dieser Zeit (d_0 – d_{10} sowie d_0 – d_{14}) bildeten die Zellen intakte Monolayer und weitere Differenzierungsmerkmale aus. Die Membranen und die darauf adhärenzte Caco-2 Monolayer unterteilten jede Kavität in ein apikales (AP) und ein basolaterales (BL) Kompartiment, die *in vivo* der luminalen und seralen Seite des Dünndarmepithels entsprechen. Es wurden 12- bzw. 6-Kavitäten-MTP eingesetzt, die ein Endvolumen von 0,5 bzw. 1,5 mL im AP und von 1,5 bzw. 2,6 mL BL aufwiesen. Die Testsubstanzen wurden erstmalig am 10. bzw. 14. Tag der Kultivierung auf den intakten Caco-2 Monolayer gegeben und nachfolgend jeden 2. bzw. 3. Tag ausgetauscht (s. 3.7.3, 3.7.4).

Vorversuche

In Vorversuchen wurde die Wirkung des Peptidlösemittels DMSO (0,01 bis 3,2 mol/L) auf die Zellviabilität (WST-1 Test, TEER-Messung) der eingesetzten Zellkulturen untersucht. Dazu wurden aus der Stammlösung (6 % v/v) 12 Verdünnungen mit Medium hergestellt (s. Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Verdünnungsschema des Peptidlösemittels DMSO

Verdünnungsstufe	Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration	Konzentration der Testlösung (2-fach konz.) [mol/L]	Konzentration der Testlösung im Ansatz (1-fach konz.)	
			[mol/L]	[%]
1	1 : 1,20	6,400	3,200	2,50
2	1 : 0,63	5,120	2,560	2,00
3	1 : 0,67	3,840	1,920	1,50
4	1 : 0,75	2,560	1,280	1,00
5	1 : 0,63	2,048	1,024	0,80
6	1 : 1,00	1,024	0,512	0,40
7	1 : 1,00	0,512	0,256	0,20
8	1 : 1,00	0,256	0,128	0,10
9	1 : 0,63	0,204	0,102	0,08
10	1 : 1,00	0,102	0,051	0,04
11	1 : 0,98	0,052	0,026	0,02
12	1 : 1,00	0,026	0,013	0,01

Da ein Teil der ACE-inhibitorischen Hydrolysate und deren Ausgangssubstanzen in Analysenpuffer gelöst zur Verfügung gestellt wurden, war es notwendig, die Wirkung dieses Puffers (1, 2, 5, 10 μ L / Kavität) auf die Zellviabilität zu untersuchen.

In den Zytotoxizitätsstudien sollte das auf proliferierende Caco-2 Zellen in einer Konzentration von 1 mmol/L zytotoxisch wirkende N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado) eingesetzt werden⁷. Aufgrund dessen wurde die Wirkung von ip6Ado auf die Zellviabilität (WST-1 Test, TEER-Messung) differenzierter Caco-2 Monolayer untersucht, in Abhängigkeit von der Kulturdauer und Konzentration (s. Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: Verdünnungsschema von N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado)

Verdünnungsstufe	Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration	Konzentration der Testlösung (2-fach konz.) [mmol/L]	Konzentration der Testlösung im Ansatz (1-fach konz.) [mmol/L]
0		20,0000	
1	1 : 10	2,0000	1,0000
2	1 : 2	1,0000	0,5000
3	1 : 5	0,2000	0,1000
4	1 : 2	0,1000	0,0500
5	1 : 5	0,0200	0,0100
6	1 : 10	0,0020	0,0010
7	1 : 10	0,0002	0,0001

In weiteren Vorversuchen zur Bestimmung der DPP IV-Aktivität wurde die Eigenabsorption des Substrats und Puffers (Tris HCl) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (s. Tabelle 3-11) und Inkubationsdauer (10 bis 120 min) ermittelt.

Tabelle 3-11: Verdünnungsschema von Ala-Pro-p-Nitroanilid

Verdünnungsstufe	Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration	Konzentration der Testlösung im Ansatz [mmol/L]
0		
1	1 : 2,0	1,000
2	1 : 2,0	0,500
3	1 : 2,0	0,250
4	1 : 2,5	0,100
5	1 : 2,0	0,050
6	1 : 2,0	0,025
7	1 : 2,5	0,001

⁷ Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A.-K., 2000

Testansätze und Testsubstanzverdünnungen

Die Stammlösungen der Testsubstanzen wurden aufgetaut und als solche im Test eingesetzt sowie durch Verdünnung mit Medium (DMEM bzw. HL-1) auf die gewünschten Verdünnungsstufen eingestellt.

Die Wirkung der 178 verschiedenen ACE-inhibitorischen Hydrolysate (79/79: mit/ohne simulierter gastrointestinaler Verdauung, s. Tabelle 3-1) und deren Substrate (Milchproteinfraktionen) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von Humanzellen (proliferierende und differenzierte Caco-2 Zellen bzw. PML) wurde in einem Screening-Test nach 72 h Inkubation untersucht (s. Tabelle 3-12). Zusätzlich wurden ausgewählte Hydrolysate sowie die Milchproteinfraktionen in diesen Konzentrationen im Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Test (Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung) eingesetzt.

Tabelle 3-12: Verdünnungsschema ACE-inhibitorischer Hydrolysate (79/79: mit/ohne simulierter gastrointestinaler Verdauung) und deren Ausgangssubstanzen (3 Milchproteinfraktionen)

Verdünnungsstufe	Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration	Konzentration der Testlösung (2-fach)	Konzentration im Ansatz	
		[$\mu\text{L}/\text{mL}$]	[$\mu\text{L}/\text{mL}$]	[mg Protein/mL] [#]
0		600		
1	1 : 03	200	100	1,0
2	1 : 10	020	10	0,1

[#] Dies sind angenährte Konzentrationsangaben, die Proteingehalte der verschiedenen Testsubstanzen lagen zwischen 0,6042 und 1,1383 mg Protein pro 100 μL Hydrolysat (s. Tabelle 3-2 bis Tabelle 3-4).

Die im Technikummaßstab angefertigten ACE-inhibitorischen Hydrolysat-Permeate (Ultrafiltration) waren innerhalb des EU-Projektes „HTMProt“ zum Einsatz in Humanstudien bestimmt und wurden zuvor in den Zytotoxizitätsstudien (WST-1 Test und TEER-Messung) zellchemisch charakterisiert. In diesen Tests wurden auch die Ausgangssubstanzen (β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75 und Natrium-Caseinat sowie das WPC 75-Hydrolysat) untersucht. Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden in Abhängigkeit vom geplanten Humanstudiendesign ausgewählt: 200 mg Testsubstanz pro Person und Tag in 250 mL Flüssigkeit. Es wurde ein durchschnittliches Körpergewicht von 70 kg und eine 3 bis 5-fache Verdünnung (s. 2.2) der Testsubstanz im Darm zu Grunde gelegt. Aufgrund der ungenügenden Löslichkeit der Ausgangssubstanzen wurden ausschließlich einfachkonzentrierte Testverdünnungen hergestellt (s. Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13: Verdünnungsschema ACE-inhibitorischer Hydrolysat-Permeate und deren Ausgangssubstanzen (Milchproteinfraktionen und WPC 75-Hydrolysat)

Verdünnungsstufe	Konzentration der Testlösung [mg/mL]	Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration
0	80	
1	50	1 : 1,60
2	40	1 : 1,25
3	30	1 : 1,33
4	10	1 : 3,00

Die Stammlösungen (20 mmol/L) der synthetischen Peptide wurden zunächst mit Medium 10-fach verdünnt. Im Screening-Test wurde die Wirkung der synthetischen Peptide auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von Caco-2 Zellen bzw. PML und die Veränderung des TEER differenzierter Caco-2 Zellen in einer Konzentration im Ansatz von 1,0 und 0,1 mmol/L nach einer Inkubationsdauer von 4, 24 bis 168 h untersucht. Dazu wurden zweifachkonzentrierte Testlösungen hergestellt, durch zunächst 10-fache und nachfolgend 100-fache Verdünnung der Stammlösungen.

Die Wirkung von Aa-Pro, Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Phe, Val-Tyr und Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg sowie der handelsüblichen Milchproteinpräparate Lactalbumin 70 (La 70) und Ultralact 35 (U 35) auf die metabolische Aktivität (WST-1 und Neutralrot-Färbung) der Humanzellen bzw. die DPP IV-Aktivität und den TEER differenzierter Caco-2 Zellen wurde zusätzlich nach Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen (Tabelle 3-14, Tabelle 3-15) und einer Inkubationsdauer von mindestens 4 und 24 h untersucht. Da die Wirkung auf den TEER in Abhängigkeit von der Kulturdauer ($d_{10} - d_{21}$) untersucht wurde, waren für den regelmäßigen Austausch auch einfachkonzentrierte Testlösung notwendig.

Tabelle 3-14: Verdünnungsschema der synthetischen Peptide

Verdünnungsstufe	Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration		Konzentration der Testlösung (2-fach) [mmol/L]	Konzentration der Testlösung (1-fach) und im Ansatz [mmol/L]
	zweifach konzentriert	einfach konzentriert		
0		1 : 20,00	2,00	1,000
1	1 : 1,33	1 : 26,67	1,50	0,750
2	1 : 1,50	1 : 40,00	1,00	0,500
3	1 : 2,00	1 : 80,00	0,50	0,250
4	1 : 2,50	1 : 200,00	0,20	0,100
5	1 : 1,33	1 : 266,67	0,15	0,075
6	1 : 1,50	1 : 400,00	0,10	0,050
7	1 : 2,00	1 : 800,00	0,05	0,025
8	1 : 2,50	1 : 2000,00	0,02	0,010

Tabelle 3-15: Verdünnungsschema der handelsüblichen Milchproteinpräparate

Verdünnungsstufe		Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration		Konzentration der Stamm-, Testlösung (2-fach) [mmol/L]		Konzentration im Ansatz [mmol/L]	
LA 70	U 35	LA 70	U 35	LA 70	U 35	LA 70	U 35
0	0			14,0	7,0	7,0	
1	1	1 : 2,3	1,17	6,0	6,0	3,0	3,0
2	2	1 : 3,0	3,00	2,0	2,0	1,0	1,0
3	3	1 : 2,0	2,00	1,0	1,0	0,5	0,5
4	4	1 : 5,0	5,00	0,2	0,2	0,1	0,1

Da die Verdünnungen des rekonstituierten Magermilchpulvers die photometrischen Messungen störten, wurde die Wirkung dieser Testsubstanz ausschließlich durch Messung des TEER differenzierter Caco-2 Zellen untersucht (s. Tabelle 3-16).

Tabelle 3-16: Verdünnungsschema des Magermilchpulvers (zertifiziertes Referenzmaterial)

Verdünnungsstufe	Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration	Konzentration der Testlösung (2-fach) [% w/v]	Konzentration im Ansatz [% w/v]
0		30	15
1	1 : 1,25	24	12
2	1 : 1,33	18	9
3	1 : 1,80	10	5
4	1 : 1,67	6	3
5	1 : 3,00	2	1

Außerdem wurde die Wirkung (24 h) von Ala-Pro, Ala-Trp, Val-Phe, Val-Tyr und Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung untersucht. Dazu wurden die Peptide zum einen in Konzentrationen von 0,01 und 1,00 mmol/L eingesetzt (als zweifachkonzentrierte Testlösungen) und zum anderen in der jeweiligen Konzentration des IC₅₀ (ACE-inhibitorische Aktivität) eingesetzt (s. Tabelle 3-17).

Tabelle 3-17: Verdünnungsschema ausgewählter Dipeptide

Dipeptid	Konzentration im Ansatz bzw. IC ₅₀ [mmol/L]	Konzentration der Testlösung (2-fach) [mmol/L]	Verdünnungsverhältnis nächst höheren Konzentration [2 mmol/L]
Ala-Pro	0,0367	0,0734	1 : 27
Ala-Trp	0,0065	0,0130	1 : 154
Val-Phe	0,0510	0,1020	1 : 20
Val-Tyr	0,0122	0,0244	1 : 8
Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg	0,0426	0,0852	1 : 24

In Transportstudien wurden Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Phe, Val-Tyr bzw. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg, Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu und Leu-Lys-Pro in einer Konzentration von 4 bzw. 1 mmol/L im Ansatz eingesetzt. Dazu wurde die Stammlösung der Dipeptide 2,5-fach bzw. die des Tri- und Undecapeptids 2-fach mit HBSS verdünnt (zweifachkonzentrierte Testlösung). Aufgrund der geringen vorhandenen Menge des Tripeptids (Leu-Lys-Pro) wurde die eingesetzte Konzentration mittels OPA-Test⁸ überprüft und bestätigt.

Die Wirkung der Kollagenhydrolysate unterschiedlicher Konzentration (s. Tabelle 3-18) auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen wurde in Abhängigkeit von der Kulturdauer untersucht, so dass zwei- und einfachkonzentrierte Testlösungen notwendig waren. Die Transportstudien erfolgten mit 100 mg/mL Kollagenhydrolysaten. Dazu wurde die Stammlösung 1 zu 2 mit DMEM verdünnt (s. Tabelle 3-19). Die höher konzentrierte Stammlösung von 240 mg/mL und 5 Verdünnungsstufen wurden für den Test 1 hergestellt, der zur

⁸ Photometrische Bestimmung freier Aminosäuren mit o-Phthaldialdehyd (OPA)

Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer durchgeführt wurde.

Tabelle 3-18: Verdünnungsschema der Kollagenhydrolysate (I)

Verdünnungs- stufe	Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration (Konz.)		Konzentration der Testlösung [mg/mL]	
	2-fache Konz.	1-fache Konz.	An d ₁₀ : 2-fache Konz.	Im Ansatz 1-fache Konz.
0			200	
1	1 : 1,25	1 : 2,00	160	100
2	1 : 2,00	1 : 1,00	80	80
3	1 : 2,00	1 : 1,25	40	40
4	1 : 2,00	1 : 2,00	20	20
5		1 : 2,00		10

Tabelle 3-19: Verdünnungsschema der Kollagenhydrolysate (II)

Verdünnungs- stufe	2-fach konzentrierte Testlösungen Verdünnungsverhältnis zur nächst höheren Konzentration	Konzentration der Testlösung im Ansatz [mg/mL]
0	-	120
1	1 : 1,20	100
2	1 : 1,25	80
3	1 : 2,00	40
4	1 : 2,00	20
6	1 : 2,00	10

3.7 Zellchemische und analytische Methoden zum Nachweis von Testsubstanzen

3.7.1 Bestimmung der metabolischen Aktivität

3.7.1.1 WST-1 Test

Messmethode

Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird durch extrazelluläre Enzyme viabler Zellen (z. B. Caco-2) zum dunkelroten Formazan reduziert. Die Bildung dieses Farbstoffs korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen und wird über die Extinktion im ELISA-Photometer ermittelt.

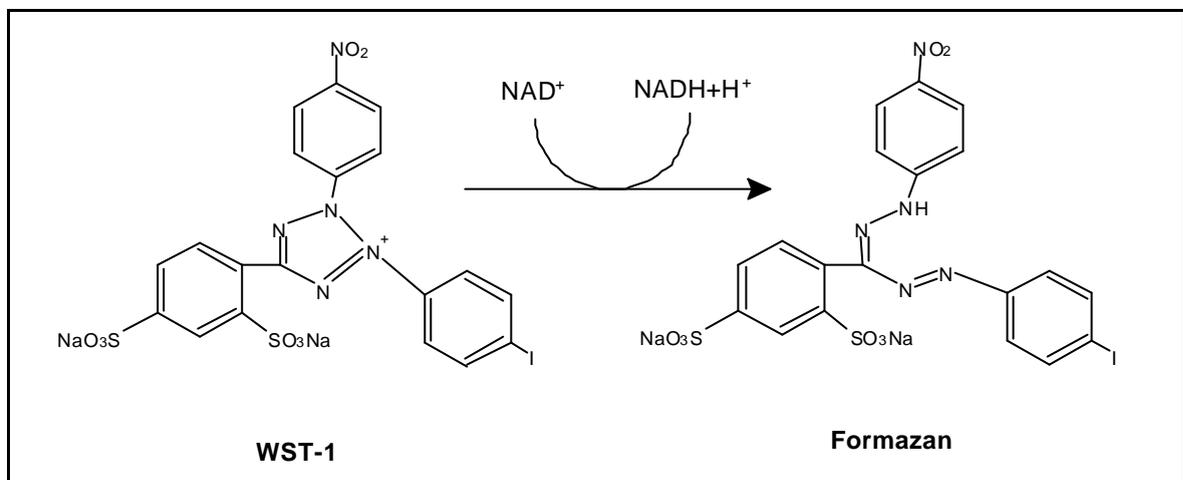


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der NAD^+ -abhängigen Reaktion von WST-1 (Substrat) zu Formazan (Produkt: rot)⁹

Der WST-1 Test wurde innerhalb dieser Arbeit als Screening-Test zur Identifizierung zytotoxischer Substanzeigenschaften eingesetzt. Die in 96-Kavitäten-MTP ausgesäten Humanzellen (proliferierenden bzw. differenzierten Caco-2 Zellen sowie PML) wurden zunächst mit Testsubstanz für 4, 24, (48) und 72 h und nachfolgend 30 min mit Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics GmbH) inkubiert. Der Test wurde entsprechend dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt. Eine Modifizierung dieses Protokolls fand bei Einsatz der ACE-inhibitorischen Hydrolysat-Permeate und ihrer Ausgangsubstanzen statt, indem diese am 10. Tag der Caco-2 Zellkultivierung nach vollständiger Entleerung der Kavitäten (durch Dekantieren) appliziert wurden (jeweils 200 μL einfachkonzentrierte Testlösung pro Kavität).

⁹ Produktinformation von Roche Diagnostics GmbH

Standardprotokoll: WST-1 Test¹⁰• **Zellaussaat (d₀) und Kultivierung:**

- 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten (MTP) mit flachen Böden.
- Caco-2 Zellen der 10. bis 13. Passage bzw. PML (Primärkulturen).
- Zellaussaat:
 - Caco-2 Zellen: 1 x 10⁴ Zellen / Kavität (200 µL Zellsuspension in DMEM).
 - PML: 2 x 10⁴ Zellen / Kavität (100 µL Zellsuspension in HL-1 Medium).
- Leerwert (Blank): 200 µL Medium / Kavität (keine Zellen).
- Kultivierung: Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂);
 - A) proliferierende Caco-2 Zellen bzw. PML : d₀ – d₃
 - B) vorkultivierte, differenzierte Caco-2 Zellen: d₀-d₁₀-d₁₃
- DMEM Austausch – nur bei vorkultivierten Caco-2 Zellen, jeden 2. – 3. Tag (d₂ - d₁₀): 100 µL durch 100 µL DMEM ersetzen.

• **Testbedingungen:**

- Zugabe der zweifachkonzentrierten Testsubstanzen
 - A) proliferierende Caco-2 Zellen: am Tag der Aussaat (d₀)
 - B) differenzierte Caco-2 Zellen: am 10. Kulturtag (d₁₀)
- Jede Kavität: Entnahme von 100 µL Überstand.
- Test-Kavitäten: Zugabe von 100 µL 2-fach konzentrierter Testlösung.
- Kontrolle und BLANK: Zugabe von 100 µL frischem DMEM.
- Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) mit Testsubstanz: 4, 24, (48) und 72 h.

• **WST-1 Assay:**

- Zugabe von 20 µL Cell Proliferation Reagent WST-1 pro Kavität.
- 30 min Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) mit WST-1.
- Messung der Extinktion im ELISA-Photometer,
 - nach 1 min Schütteln und 0,5 min Standzeit,
 - bei einer Wellenlänge von 450 nm, (Referenzwellenlänge: 690 nm),
 - gegen den Leerwert (Blank),
 - jede Substanz in mind. dreifacher Wiederholung.

• **Auswertung:**

- Automatische Subtraktion des Leerwertes (Blank) von der Extinktion in Testkavitäten.
- Bildung des Mittelwerts (MW) der Ergebnisse von mind. drei verschiedenen Kavitäten.
- Berechnung des Standardfehlers (± S. E. M.) durch Bildung des Quotienten: MW durch Standardabweichung, korrigiert um die Anzahl der Messwiederholungen: \sqrt{n} .
- Durchführung des Tukey-Tests (3.8): zur Identifizierung statistisch signifikanter Versuchsergebnisse.
- Berechnung des Aktivitäts-Index AI_{WST-1} durch Bildung des Quotienten MW Extinktion_{Test} durch MW Extinktion_{Kontrolle} (Test/Kontrolle).

¹⁰ modifiziert nach Arbeitsvorschrift von Roche Diagnostics GmbH

- Berechnung des Relativen-Zytotoxizitäts-Index (RZI) durch Bildung des Quotienten $AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})$ (s. 4.1.2).

Der Aktivitäts-Index AI_{WST-1} kennzeichnete eine mögliche Veränderung der metabolischen Aktivität in Humanzellen durch die Einwirkung der jeweiligen Testsubstanz. Hierbei galt:

$AI_{WST-1} > 1,0$: Zunahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{WST-1} < 1,0$: Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{WST-1} = 1,0$: Die metabolische Aktivität unterliegt keiner Veränderung.

Es wurde festgelegt, dass ein $AI_{WST-1} = 0,500$ auf eine potenziell zytotoxische Substanz hinwies.

3.7.1.2 Neutralrot-Färbung

Messmethode

Der Farbstoff Neutralrot wird von viablen Zellen aktiv aufgenommen und intrazellulär, in Lysosomen akkumuliert. Nach einer definierten Inkubationszeit ist der überschüssige, nicht aufgenommene Farbstoff durch Waschen zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit einer angesäuerten, Ethanol-haltigen Lösung lysiert, wodurch der im ELISA-Photometer detektierbare Farbstoff aus den Zellen wieder freigesetzt wird. Die Farbstoffmenge korreliert direkt mit der Anzahl viabler Zellen.

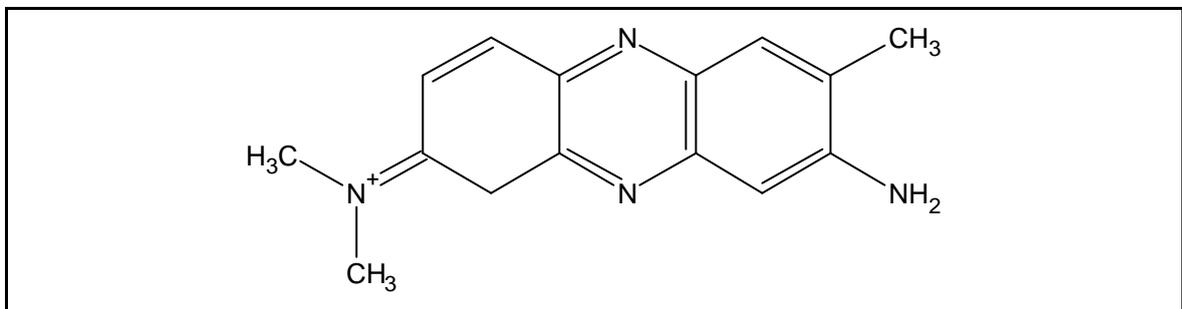


Abbildung 3-4: Neutralrot (Strukturformel)¹¹

Der Neutralrot-Test wurde zur Verifizierung der Ergebnisse des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1) eingesetzt. Aufgrund dessen wurde die Zellaussaat und Kultivierung in gleicher Weise durchgeführt. Anschließend wurde der *In vitro* Toxicology Assay Kit, Neutral Red based (TOX-4, Sigma) durchgeführt, entsprechend dem folgenden Standardprotokoll.

¹¹ Produktinformation von Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Standardprotokoll: Neutralrot-Färbung¹²**• Zellaussaat (d₀) und Kultivierung:**

- 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten (MTP) mit flachen Böden.
- Caco-2 Zellen der 10. bis 13. Passage bzw. PML (Primärkulturen).
- Zellaussaat:
 - Caco-2 Zellen: 1 x 10⁴ Zellen / Kavität (200 µL Zellsuspension in DMEM).
 - PML: 2 x 10⁴ Zellen / Kavität (100 µL Zellsuspension in HL-1 Medium).
- Leerwert (Blank): 200 µL Medium / Kavität (keine Zellen).
- Kultivierung: Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂);
 - A) proliferierende Caco-2 Zellen bzw. PML: d₀ – d₃.
 - B) vorkultivierte, differenzierte Caco-2 Zellen: d₀-d₁₀-d₁₃.
- DMEM Austausch – nur bei vorkultivierten Caco-2 Zellen, jeden 2. – 3. Tag (d₂ - d₁₀):
 - 100 µL durch 100 µL DMEM ersetzen.

• Testbedingungen:

- Zugabe der zweifachkonzentrierten Testsubstanzen
 - A) proliferierende Caco-2 Zellen: am Tag der Aussaat (d₀), nach Zentrifugation der MTP (194 x g, 5 min):
 - B) differenzierte Caco-2 Zellen: am 10. Kulturtag (d₁₀)
 - Jede Kavität: Entnahme von 100 µL Überstand.
 - Test-Kavitäten: Zugabe von 100 µL 2-fach konzentrierter Testlösung.
 - Kontrolle und BLANK: Zugabe von 100 µL frischen DMEM.
- Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) mit Testsubstanz: 4, 24, (48) und 72 h.

• Neutralrot-Färbung:

- Zugabe von 20 µL Neutralrot-Reagenzlösung pro Kavität (10 % des Gesamtvolumens).
- Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) mit Neutralrot: 2 h.
- Fixierung mit Neutral Red Assay Fixative (N 4270):
 - Zentrifugation der MTP: 194 x g, 5 min, ohne Bremse,
 - Dekantieren des Mediums und der Testsubstanz,
 - Zugabe von 100 µL Fixierlösung in jede Kavität,
 - Inkubation mit Fixierlösung: 5 min,
 - Dekantieren der Fixierlösung,
 - Waschen durch Zugabe von 200 µL PBS, kurzzeitige Inkubation, Dekantieren
- Zell-Lyse mit Neutral Red Assay Solubilization Solution (N 4395):
 - Zugabe von 100 µL dieser Lösung,
 - vorsichtiges Schütteln der MTP: 10 min bei Raumtemperatur.
- Messung der Extinktion im ELISA-Photometer,
 - nach 1 min Schütteln und 0,5 min Standzeit,
 - bei einer Wellenlänge von 540 nm, (Referenzwellenlänge: 690 nm),
 - gegen den Leerwert (Blank).

¹² modifiziert nach Arbeitsvorschrift von Sigma-Aldrich Chemie GmbH

- **Auswertung:**

- Automatische Subtraktion des Leerwertes (Blank) von der Extinktion in Testkavitäten.
- Mittelwert (MW) - Bildung aus den Ergebnissen von mindestens drei Kavitäten.
- Berechnung des Standardfehlers (\pm S. E. M.) durch Bildung des Quotienten: MW durch Standardabweichung, korrigiert um die Anzahl der Messwiederholungen: \sqrt{n} .
- Durchführung des Tukey-Tests (3.8): zur Identifizierung statistisch signifikanter Versuchsergebnisse.
- Berechnung des Aktivitäts-Index $AI_{\text{Neutralrot}}$ durch Bildung des Quotienten $MW_{\text{Extinktion}_{\text{Test}}} / MW_{\text{Extinktion}_{\text{Kontrolle}}}$ (Test/Kontrolle).

Der Aktivitäts-Index $AI_{\text{Neutralrot}}$ kennzeichnete eine mögliche Veränderung der intrazellulären, metabolischen Aktivität durch die Einwirkung der jeweiligen Testsubstanz. Hierbei galt:

$AI_{\text{Neutralrot}} > 1,0$: Zunahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{\text{Neutralrot}} < 1,0$: Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{\text{Neutralrot}} = 1,0$: Die metabolische Aktivität unterliegt keiner Veränderung.

Es wurde festgelegt, dass ein $AI_{\text{Neutralrot}} = 0,5$ auf eine potenziell zytotoxische Substanz hinwies.

3.7.2 Bestimmung der Dipeptidyl-Amino-peptidase IV-Aktivität

Messmethode

Die Dipeptidyl-Amino-peptidase IV (DPP IV, EC 3.4.14.5; CD 26) ist ein spezifischer Marker reifer Enterozyten bzw. differenzierter Caco-2 Zellen. Diese Peptidase wird intrazellulär als dimeres Glykoprotein synthetisiert und anschließend in die apikale Zellmembran (Bürstensaum) integriert, wobei das aktive Zentrum ins Darmlumen ragt¹³. Der Nachweis der DPP IV-Aktivität kann deshalb ohne vorherige Caco-2 Zellyse erfolgen, durch Zugabe eines spezifischen Substrats, z. B. Ala-Pro-p-Nitroanilid. Die in den differenzierten Caco-2 Zellen exprimierte DPP IV spaltet das Dipeptid (Ala-Pro) ab, wodurch das gelbgefärbte p-Nitroanilin entsteht, welches colorimetrisch messbar ist. Die Farbintensität korreliert direkt mit der Zellzahl.

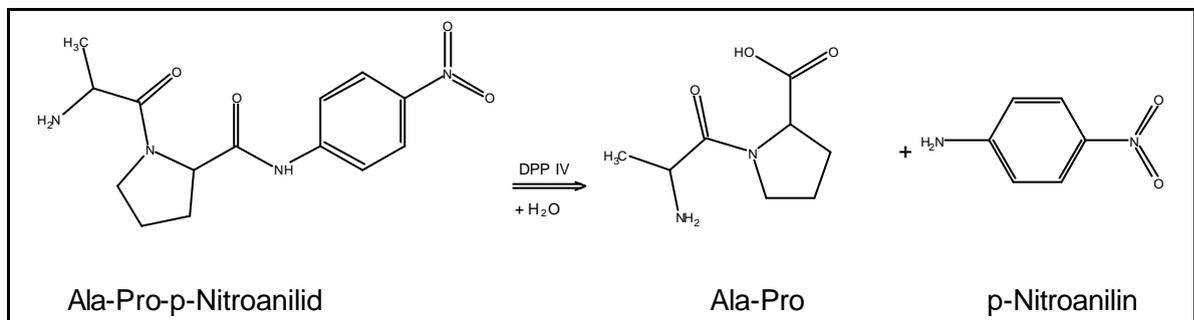


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Reaktion von Ala-Pro-p-Nitroanilid zu Ala-Pro und p-Nitroanilin (gelb)

Diese Methode wurde erstmals im Humanzellkulturversuch eingesetzt. Als Grundlage wurde das Protokoll von SANZ UND TOLDRÁ¹⁴ zum Nachweis der DPP IV-Aktivität in *Lactobacillus sakei* herangezogen und nachfolgend für die eigene Fragestellung optimiert¹⁴.

Methodenentwicklung und Optimierung des Protokolls zur Bestimmung der DPP IV-Aktivität

Zunächst wurde die Eigenabsorption des Substrats (0,01 – 1,00 mmol/L, s. Tabelle 3-11), des Tris-HCl-Puffers und der Caco-2 Zellen (Monolayer) sowie der Substratumsatz differenzierter Caco-2 Monolayer in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Dazu wurden Caco-2 Zellen (2×10^4 /Kavität/200 μ L, je n = 5) in 96-Kavitäten-MTP ausgesät und 15 Tage unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, DMEM-Austausch jeden 2./3. Tag) kultiviert. Die Kavitäten zur Bestimmung der Leerwerte (A: Tris-HCl-Puffer bzw. B: Tris-HCl-Puffer mit Substratverdünnungen, je n = 5) enthielten keine Zellen. Am 15 Kulturtag wurde das Medium durch Dekantieren aus den Kavitäten entfernt. In die Kavitäten der Leerwerte A und Negativkontrollen wurden jeweils 200 μ L Tris-HCl-Puffer und in alle anderen Kavitäten wurden 200 μ L der jeweiligen Substratverdünnung pipettiert. Die Zellen wurden nachfolgend 10, 15, 30, 45, 60 bzw. 120 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen im

¹³ Alpers, D. H., 1987, Stevens, B. R. et al., 1988, Abbott, C. A., 1999 & 2000

¹⁴ Sanz, Y. & Toldrá F., 2001

ELISA-Photometer ($\lambda = 405 \text{ nm}$) ermittelt. In Abhängigkeit von der Zeit wurden für den Tris-HCl-Puffer Extinktionen von 0,05 bis 0,06 OD ermittelt. Diese Werte entsprachen den Leerwerten, die nachfolgend von den Testergebnissen abgezogen wurden. Für die Kavitäten, die Tris-HCl-Puffer mit Substratverdünnungen bzw. ausschließlich die jeweilig Substratverdünnung enthielten wurden Extinktionen zwischen 0,00 bis 0,07 OD bzw. 0,00 bis 0,05 OD in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt. Nach Messung der Caco-2 Monolayer (K_N) wurden Zeit-abhängig Extinktionen zwischen 0,05 bis 0,06 OD ermittelt. Infolge dieser Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass weder das Kulturmaterial, der Puffer, das Substrat noch die Caco-2 Zellmonolayer diese photometrische Messung störten.

Nach Inkubation differenzierter Caco-2 Monolayer (d_{15}) mit Ala-Pro-p-Nitroanilid wurden Zeit- und Konzentrations-abhängig zunehmende Extinktionswerte ermittelt (s. Abbildung 3-6).

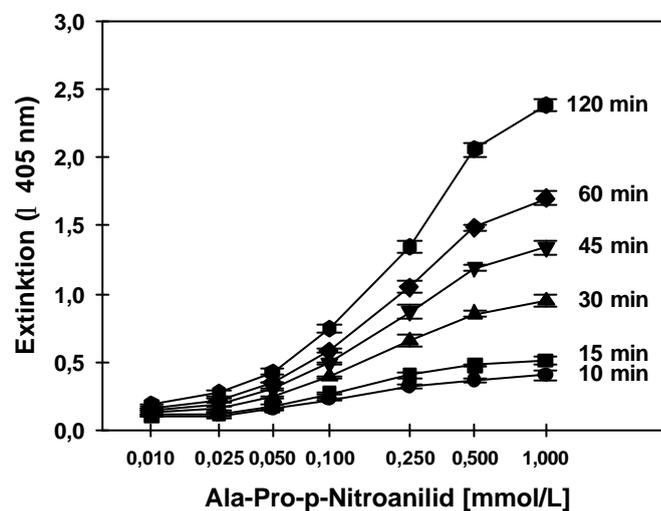


Abbildung 3-6: Veränderung der Extinktion in Testkavitäten nach Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) mit Ala-Pro-p-Nitroanilid

Zellaussaat (2×10^4 /Kavität, 30. Passage) in 96-Kavitäten-MTP und 15 d Kultivierung in DMEM, unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 10 – 120 min Exposition mit 0,01 bis 1,00 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid und photometrischer Nachweis von p-Nitroanilid (s. 3.7.2).

Im nachfolgenden Test wurde das Substrat in einer Konzentration von 0,5 mmol/L (linearer Bereich) eingesetzt und dessen Umsatz in Abhängigkeit von der Caco-2 Zellkulturdauer (Grad der Zelldifferenzierung) untersucht. Die Bildung von Ala-Pro und p-Anilin korrelierte positiv mit der Dauer der Kultivierung von Caco-2 Zellen unter Standardbedingungen. Außerdem wurde eine zunehmende Produktkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Caco-2 Zellen mit Substrat ermittelt (s. Abbildung 3-7).

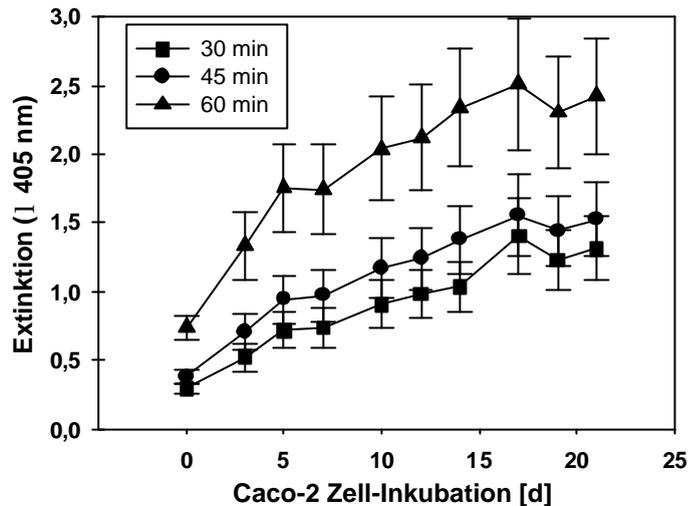


Abbildung 3-7: Veränderung der Extinktion von Testkavitäten nach Inkubation proliferierender und differenzierter Caco-2 Zellen mit 0,5 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid

Zellaussaat (2×10^4 /Kavität, 30. Passage) in 96-Kavitäten-MTP und Kultivierung in DMEM, unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 30 – 60 min Exposition mit 0,5 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid und photometrischer Nachweis von p-Nitroanilid (s. 3.7.2).

Außerdem erfolgte eine 4 h Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen (an d_0) mit Dipeptiden (0,01 bis 1,0 mmol/L) bzw. Lactalbumin 70 (0,1 bis 7,0 mg Protein/mL), der eine 30, 45 bzw. 60 min Inkubation mit 0,5 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid folgte (s. Abbildung 3-8, Abbildung 3-9, s. Tabelle A-4 bis A-6). In diesem Versuch zeigte sich, dass der Stoffumsatz zu allen untersuchten Zeiten annähernd vergleichbar war. Aufgrund dessen wurde in nachfolgenden Versuchen eine Substratinkubation der Zellen von 30 min gewählt.

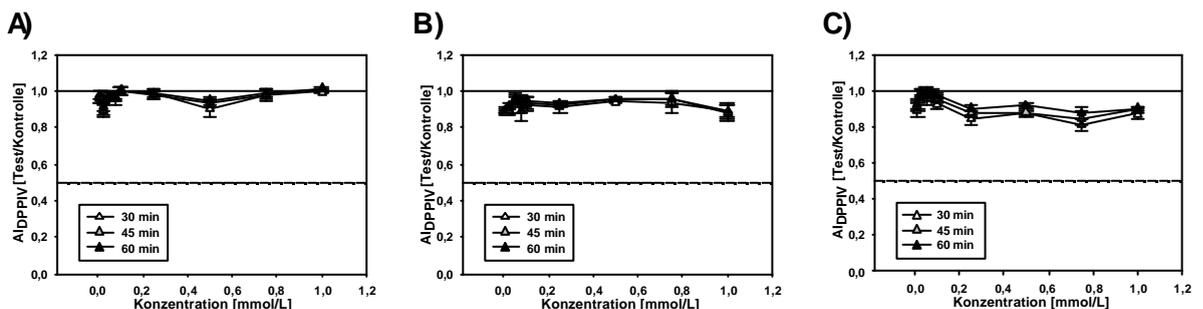


Abbildung 3-8: Effekte ($A_{DPP IV}$) einer Inkubation mit 0,01 bis 1,0 mmol/L A) Ala-Pro, B) Ala-Trp und C) Lys-Phe auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (2×10^4 /Kavität, 30. Passage) in 96-Kavitäten-MTP und 14 d Kultivierung in DMEM, unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 4 h Inkubation mit 0,01 bis 1,0 mmol/L Dipeptid, nachfolgend 30 bis 60 min Exposition mit 0,5 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid, photometrischer Nachweis von p-Nitroanilid (Messergebnisse s. Tabelle A-4 bis A-6) und Berechnung des $A_{DPP IV}$ (s. 3.7.2).

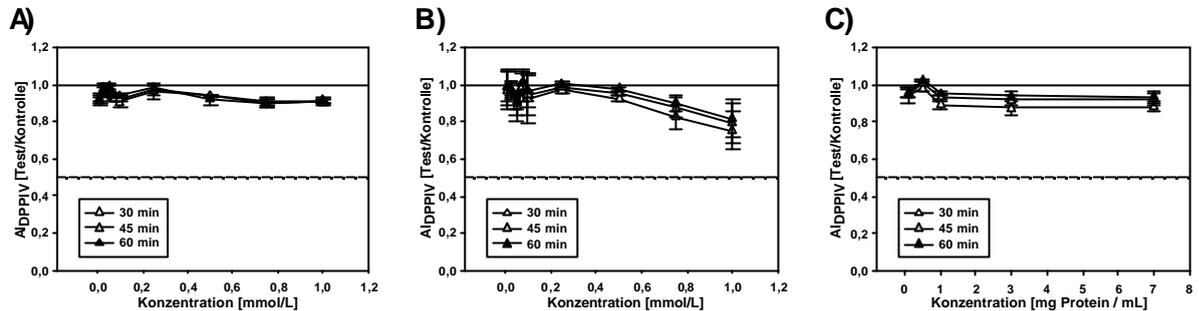


Abbildung 3-9: Effekte ($Al_{DPP\ IV}$) einer Inkubation mit 0,01 bis 1,0 mmol/L A) Val-Phe, B) Val-Tyr und C) Lactalbumin 70 (0,1 bis 7,0 mg Protein/mL) auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 3-8 und Messergebnisse s. Tabellen A-4 bis A-6.

Die DPP IV-Aktivität ist ein spezifischer Differenzierungsmarker humaner Darmepithelzellen (u. a. Caco-2 Zellen). Die Bestimmung der DPP IV-Aktivität erfolgte zur Verifizierung der Ergebnisse des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1). Aufgrund dessen wurde die Zellaussaat und Kultivierung in gleicher Weise durchgeführt. Anschließend wurde die Bestimmung der DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen entsprechend folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

Standardprotokoll: Bestimmung der DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen¹⁵

- **Zellaussaat (d_0) und Kultivierung:**

- 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten mit flachen Böden.
- Caco-2 Zellen der 34. Passage.
- Zellaussaat: 10^4 Zellen / Kavität (200 μ L Zellsuspension in DMEM).
- Leerwert (Blank): 200 μ L DMEM / Kavität (keine Zellen).
- Kultivierung (d_0 - d_{14}) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2).
- DMEM Austausch, jeden 2. – 3. Tag (d_2 - d_{12}): 100 μ L durch 100 μ L DMEM ersetzen.

- **Testbedingungen:**

- Exposition der Caco-2 Monolayer (ab d_{14}) mit Testsubstanzen:
 - Jede Kavität: Entnahme von 100 μ L Überstand.
 - Test-Kavitäten: Zugabe von 100 μ L 2-fach konzentrierter Testlösung.
 - Kontrolle und BLANK: Zugabe von 100 μ L frischen DMEM.
- Inkubation (37 °C, 5 % CO_2) mit Testsubstanz: 4, 24 und 72 h.

- **Bestimmung der DPP IV-Aktivität:**

- Dekantieren der Kulturüberstände einer jeden MTP.
- Waschen der Kavitäten durch Zugabe von 200 μ L Tris-HCl-Puffer (50 mmol/L) und erneutem Dekantieren der MTP.
- Zugabe von 200 μ L Ala-Pro-p-Nitroanilid (0,5 mmol/L) gelöst in Tris-HCl-Puffer.
- Inkubation (37 °C, 5 % CO_2) mit Substrat: 30 min.

¹⁵ modifiziert nach Sanz, Y. & Toldrá F., 2001

- Messung der Extinktion im ELISA-Photometer,
nach 1 min Schütteln und 0,5 min Standzeit,
bei einer Wellenlänge von 405 nm,
gegen den Leerwert (Blank).
- **Auswertung:**
 - Automatische Subtraktion des Leerwertes (Blank) von der Extinktion in Testkavitäten.
 - Mittelwert (MW) - Bildung aus den Ergebnissen von mindestens drei Kavitäten.
 - Berechnung des Standardfehlers (\pm S. E. M.) durch Bildung des Quotienten: MW durch Standardabweichung, korrigiert um die Anzahl der Messwiederholungen: \sqrt{n} .
 - Durchführung des Tukey-Tests (3.8): zur Identifizierung statistisch signifikanter Versuchsergebnisse.
 - Berechnung des Aktivitäts-Index $AI_{DPP\ IV}$ durch Bildung des Quotienten $MW_{Extinktion_{Test}} / MW_{Extinktion_{Kontrolle}}$ (Test/Kontrolle).

Der Aktivitäts-Index $AI_{DPP\ IV}$ kennzeichnete eine mögliche Veränderung der DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen durch die Einwirkung der jeweiligen Testsubstanz. Hierbei galt:

$AI_{DPP\ IV} > 1,0$: Zunahme der DPP IV-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{DPP\ IV} < 1,0$: Abnahme der DPP IV-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{DPP\ IV} = 1,0$: Die DPP IV-Aktivität unterliegt keiner Veränderung.

3.7.3 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Messmethode

Die Caco-2 Zellen werden auf einer Insert-Membran eines Zwei-Kompartiment-Systems (apikal, basolateral) kultiviert. An die beiderseits der Membran ins Medium eingetauchten Elektroden (Ag/AgCl) wird durch das Messgerät (Millicell ERS) ein Wechselstrom (20 μ A, 12,5 Hz) angelegt. Geräteintern wird aus der Veränderung der Stromstärke der elektrische Widerstand berechnet und automatisch angezeigt (Abbildung 3-10). Der Messwert der Kontroll- bzw. Testansätze ist nach der Messung um den Leerwert (Blank) und die Kulturfläche zu korrigieren. Der TEER wird in der Dimension $\Omega \times \text{cm}^2$ angegeben.

$$\text{TEER} [\Omega \times \text{cm}^2] = (\text{TEER}_{\text{Probe}} [\Omega] - \text{TEER}_{\text{Blank}} [\Omega]) \times \text{Kulturfläche} [\text{cm}^2]$$

Die Höhe des TEER Wertes korreliert negativ mit der parazellulären Durchlässigkeit von Caco-2-Monolayern und ist ein Maß für die Existenz und Permeabilität von *tight junctions*.

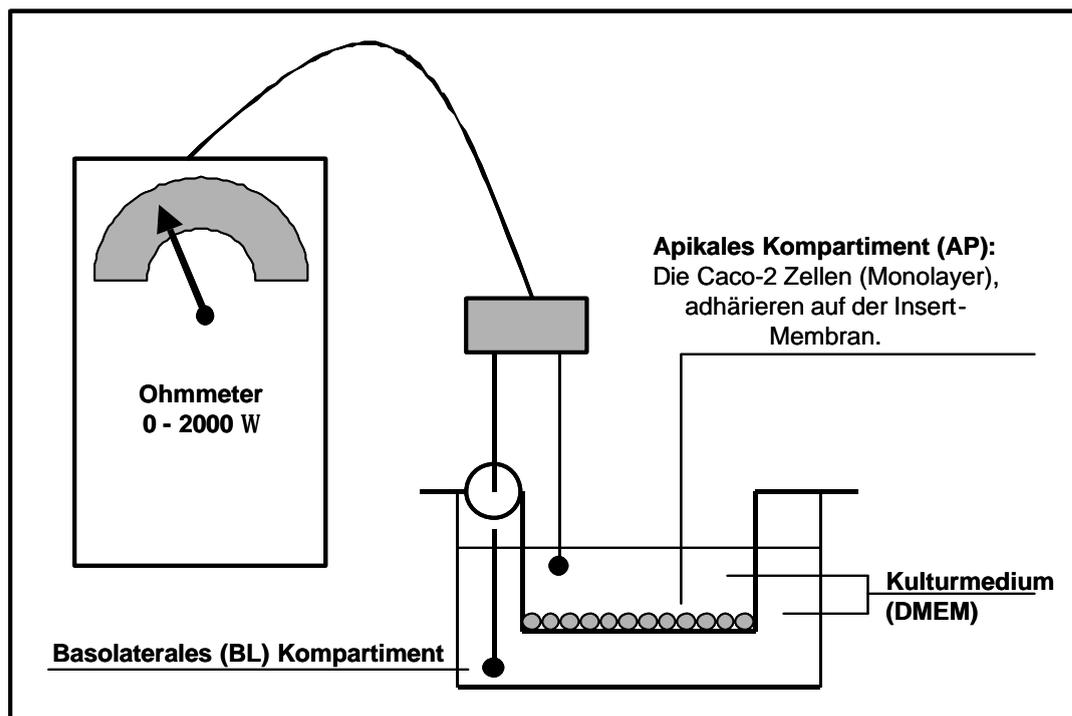


Abbildung 3-10: Versuchsanordnung zur Messung des TEER

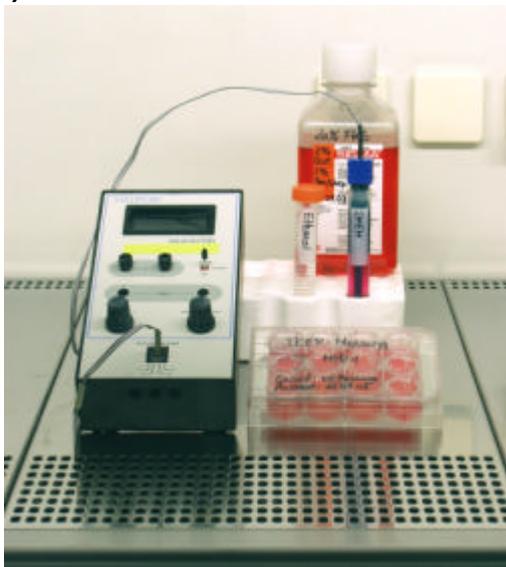
(Eigene Darstellung nach Bedienungsanleitung des Messgeräts (Millicell ERS)).

Die Messungen des TEER erfolgten aufgrund zweier unterschiedlicher Zielsetzungen. Einerseits wurde damit die Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf die *tight junctions* Funktion differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) (ab d_{10}) untersucht. In diesem Falle

erfolgte die TEER-Messung entsprechend der etablierten Methode, bei Raumtemperatur¹⁶ (s. Abbildung 3-11 A). Da die Caco-2 Zellen in diesen Studien auf Polyethylen-(PE) Membranen ausgesät wurden, war eine mikroskopische Beobachtung der Monolayerentwicklung möglich.

Andererseits wurde die TEER-Messung zum notwendigen Nachweis der Caco-2 Monolayer-Integrität direkt vor bzw. zu verschiedenen Zeiten nach Transportstudien genutzt. Die Aussaat der Zellen erfolgte auf PC-Membranen, die keine mikroskopische Beobachtung der Monolayerentwicklung erlaubten. Diese TEER-Messungen wurden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt (s. Abbildung 3-11 B).

A)



B)



Abbildung 3-11: Versuchsanordnung zur Messung des TEER A) bei Raumtemperatur und B) bei 37 °C

Optimierung des Protokolls zur TEER-Messung bei 37 °C

In einem Vorversuch wurden das Erreichen und die Konstanz einer Temperatur von 37 °C (36,5 – 37,5 °C) in den einzelnen Kavitäten jeder MTP während der TEER-Messung untersucht. Dazu wurden die MTP und ein mit DMEM (40 mL) befülltes Becherglas zur Lagerung der Elektroden auf eine Wärmeplatte (50 °C) gestellt und die Temperaturveränderungen im Zeitverlauf (0 – 60 min) gemessen. Dabei wurde innerhalb der Kavitäten ein konstanter Temperaturbereich zwischen 36,5 und 37,3 °C ermittelt. Zur Regulation der Temperatur des Mediums im Becherglas wurde dieses zeitweilig von der Wärmequelle entfernt. Zur Aufrechterhaltung dieser Bedingungen war eine Raumtemperatur von 23 – 25 °C zu gewährleisten.

¹⁶Hartmann, R. et al., 2000

Durchführung der TEER-Messungen

Die Messungen des TEER wurden grundsätzlich an vorkultivierten Caco-2 Monolayern (ab d_{10}/d_{14} bis Testende) durchgeführt, wobei allerdings die Ausbildung und Entwicklung eines Monolayers jeder MTP (K_N) auch innerhalb der ersten 10 Kulturstage überprüft wurde. Die Wirkung der Testsubstanzen auf die *tight junctions* Funktion wurden nach Aussaat von Caco-2 Zellen der 10. bis 27. Passage durch Messung des TEER bei RT untersucht. Die Transportstudien (37 °C) wurden mit Caco-2 Zellen der 29. bis 84. Passage durchgeführt.

Standardprotokoll der Messung des TEER bei Raumtemperatur:

- **Zellaussaat (10^5 Zellen/cm²) und Kultivierung ($d_0 - d_{10}$):**
 - auf PE-Membranen in Transwell[®]-Insert-Kits (12 Kavitäten pro MTP).
 - Beschickung der apikalen Kompartimente (AP):

Leerwert (Blank):	0,50 mL DMEM (ohne Zellen).
Kontrolle und Testansätze:	0,50 mL Zellsuspension in DMEM.
 - Beschickung der basolateralen Kompartimente (BL):

Leerwert (Blank):	1,50 mL DMEM.
Kontrolle und Testansätze:	1,50 mL DMEM
- **Applikation der Testsubstanzen (d_{10}) ausschließlich ins AP-Kompartiment:**
 - AP: Testansätze: 0,25 mL durch 0,25 mL 2-fach konz. Testlösung ersetzen.
außer bei Einsatz ACE-inhibitorischer Hydrolysat-Permeate und deren Ausgangssubstanzen:

	0,50 mL durch 0,50 mL 1-fach konz. Testlösung ersetzen.
--	---

 weitere Kompartimente: s. u. .
- **Medium- und Testsubstanzaustausch ($d_{2/3}$ bis Testende):**
 - Durchführung: jeden 2./3. Tag, direkt nach der TEER-Messung:
 - $d_0 - d_{10}$:

AP: alle Kavitäten:	0,25 mL durch 0,30 mL DMEM ersetzen.
BL: alle Kavitäten:	0,75 mL durch 0,80 mL DMEM ersetzen.
 - d_{10} :

AP: Leerwert (BLANK):	0,25 mL durch 0,25 mL DMEM ersetzen.
Kontrolle:	0,25 mL durch 0,25 mL DMEM ersetzen.
Testansätze:	0,25 mL durch 0,25 mL 2-fach konz. Testlösung ersetzen.

 BL: analog $d_0 - d_{10}$
 - $d_{12/13}$ bis Testende:

AP: Leerwert (BLANK):	0,25 mL durch 0,30 mL DMEM ersetzen.
Kontrolle:	0,25 mL durch 0,30 mL DMEM ersetzen.
Testansätze:	0,25 mL durch 0,30 mL 1-fach konz. Testlösung ersetzen.

 BL: analog $d_0 - d_{10}$
- **TEER-Messung bei Raumtemperatur ($d_{2/3}/d_{10}$ bis Testende)**
 - jeden 2./3. Tag:

ab d_0 :	Leerwert und Kontrolle,
ab d_{10} :	zusätzlich alle Testkavitäten.

- Messbedingungen (s. Abbildung 3-11 A):
 - Elektroden-Desinfektion mit 70 % Ethanol: 15 min.
 - Equilibrierung der Elektroden in DMEM und der MTP: 30 min auf Sterilbank.
 - TEER-Messung: 0,5 min je Kavität in 3-facher Messwiederholung.
 - Berechnung des TEER (Korrektur um Leerwert und Kulturfläche).
- **Auswertung**
 - Mittelwert (MW) - Bildung aus drei Messwiederholungen jeder Kavität.
 - Berechnung des TEER [$\Omega \times \text{cm}^2$] aus drei Messwerten jeder Kavität.
 - Berechnung des Standardfehlers (\pm S. E. M.) durch Bildung des Quotienten: MW durch Standardabweichung, korrigiert um die Anzahl der Messwiederholungen: \sqrt{n}).
 - Durchführung des Tukey-Tests (3.8): zur Identifizierung signifikanter Versuchsergebnisse.
 - Berechnung des Widerstands-Index WI_{TEER} durch Bildung des Quotienten $MW_{\text{TEER}_{\text{Test}}} / MW_{\text{TEER}_{\text{Kontrolle}}}$ (Test/Kontrolle).

Der Widerstands-Index WI_{TEER} wies auf das Vorhandensein eines Monolayers hin und gab an, ob sich die *tight junctions* Dichtigkeit unter dem Einfluss der jeweiligen Testsubstanz veränderte.

Hierbei galt: $WI_{\text{TEER}} > 1$: Zunahme der *tight junctions* Dichtigkeit im Vergleich zur Kontrolle.
 $WI_{\text{TEER}} < 1$: Abnahme der *tight junctions* Dichtigkeit im Vergleich zur Kontrolle.
 $WI_{\text{TEER}} = 1$: Die *tight junctions* Dichtigkeit unterliegen keiner Veränderung.

Standardprotokoll der Messung des TEER bei 37° C (vor/nach Transportstudien):

- **Zellaussaat (10^5 Zellen/cm²) und Kultivierung ($d_0 - d_{14}/d_{21}$):**
 - auf PC-Membranen in Transwell[®]-Insert-Kits.
 - in MTP mit
 - A) 12 Kavitäten: Kollagenhydrolysate.
 - B) 6 Kavitäten: synthetische Peptide.
 - Beschickung der apikalen Kompartimente (AP):
 - Leerwert (Blank): A) 0,50 mL B) 1,50 mL DMEM (ohne Zellen).
 - Kontrolle und Testansätze: A) 0,50 mL B) 1,50 mL Zellsuspension in DMEM
 - Beschickung der basolateralen Kompartimente (BL):
 - Leerwert (Blank): A) 1,50 mL B) 2,60 mL DMEM
 - Kontrolle und Testansätze: A) 1,50 mL B) 2,60 mL DMEM.
- **Applikation der Testsubstanzen (d_{14}/d_{21}) im Rahmen der Transportstudie (s. u.)**
- **Mediumaustausch ($d_{2/3} - \text{Testende}$):**
 - jeden 2./3. Tag, direkt nach der TEER-Messung:
 - AP: alle Kavitäten:
 - A) 0,25 mL durch 0,30 mL DMEM ersetzen.
 - B) 0,75 mL durch 0,80 mL DMEM ersetzen.
 - BL: alle Kavitäten:
 - A) 0,75 mL durch 0,80 mL DMEM ersetzen.
 - B) 1,30 mL durch 1,50 mL DMEM ersetzen.
 - d_{14}/d_{21} , direkt nach der Transportstudie:

- AP: alle Kavitäten: A) 0,50 mL DMEM.
B) 1,50 mL DMEM.
- BL: alle Kavitäten: A) 1,50 mL DMEM.
B) 2,60 mL DMEM.
- TEER-Messung bei 37 °C ($d_{2/3}/d_{10}$ – Testende)
 - jeden 2./3. Tag: ab d_0 : Leerwert und Kontrolle,
ab d_{14}/d_{21} : zusätzlich alle Testkavitäten
 - Messbedingungen:
 - Elektroden-Desinfektion mit 70 % Ethanol: 15 min.
 - Equilibrierung der Elektroden in 37 °C warmen DMEM: 30 min auf Sterilbank.
 - Lagerung der MTP und Elektroden auf Wärmeplatte (50 °C; s. Abbildung 3-11, B).
 - TEER-Messung: 0,5 min je Kavität in 3-facher Messwiederholung.
 - Berechnung des TEER (Korrektur um Leerwert und Kulturfläche).
 - Auswertung
 - Analog zur TEER-Messung bei RT (s. S. 128).

3.7.4 Untersuchung des Peptidtransports durch Caco-2 Monolayer

Methode

Die Barrierefunktion des Dünndarmepithels wird durch Aussaat von Caco-2 Zellen in Transwell®-Inserts und nachfolgender Kultivierung ($d_0 - d_{14}/d_{21}$) unter Standardbedingungen (DMEM, 37 °C, 5 % CO₂) simuliert. Hierbei bilden Caco-2 Zellen einen intakten Monolayer aus sowie charakteristische Merkmale reifer Enterozyten (s. 2.4.3.1): u. a. *tight junctions*, Peptidtransporter (z. B. PepT1) und verschiedene *brush border*-Enzyme. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Caco-2 Zellen zur Hydrolyse sowie zur Resorption verschiedenster applizierter Substanzen, z. B. synthetischer Peptide sowie Kollagen- oder Molkenproteinhydrolysate, fähig. Die Testsubstanzen bzw. Fragmente werden para- bzw. transzellulär transportiert (s. 2.2.3.3.) und gelangen so vom apikalen ins basolaterale Kompartiment (*vice versa*). Der Nachweis eines Substanztransports wird mit spezifische Methoden geführt: Zur Detektion von Peptiden bzw. aromatischen Aminosäuren (mögliche Abbauprodukte) eignet sich die HPLC-Analyse der Probe (s. 3.7.5). Die Kollagen-spezifischen Aminosäure Hydroxyprolin ist photometrisch nachweisbar (s. 3.7.7).

3.7.4.1 Optimierung der Methode

Zur Optimierung der in diesem Labor erstmals durchgeführten Peptidresorptionsstudien wurde Sol D (Kollagenhydrolysate) sowie Bradykinin (synthetisches Peptid) eingesetzt.

Auswahl des geeigneten Membran-Materials

Im Vorversuch 1 wurde die Diffusion (ohne Caco-2 Zellen) von 10 mg/mL Sol D durch Polyethylen- (PE-) bzw. Polycarbonat- (PC-) Membranen von Transwell®-Inserts (12 Kavitäten pro MTP) untersucht. Dazu wurde Sol D auf die Membranen appliziert. Es folgte eine 10, 30 und 60 min Inkubation im Brutschrank. Anschließend erfolgte eine HPLC-Analyse der Testsubstanz Sol D (20 µL) sowie der Proben (20 µL) aus den apikalen und basolateralen Kompartimenten jeder Kavität (je n= 1). Für die Testsubstanz Sol D wurde eine Peakfläche von 4859,2 mAbs x min ermittelt. Die nachfolgenden Berechnungen (s. Tabelle 3-20) ergaben, dass PC- im Vergleich zu PE-Membranen für Sol D durchlässiger waren.

Tabelle 3-20: Diffusionsstudie mit Sol D

Inku- bation [min]	Peakflächen [mAbs x min]							
	Analyse		Berechnungen**		Analyse		Berechnungen**	
	AP*	BL*	Kavität	WF* [%]	AP*	BL*	Kavität	WF* [%]
10	7596,5	502,5	3641,6	75	-	-	-	-
30	7049,5	983,6	4000,1	82	6898,8	1440,5	4488,0	92
60	7274,5	1075,5	4200,3	86	5519,5	1939,4	4535,1	93
Membran	Polyethylen				Polycarbonat			

* Abkürzung: AP apikales Kompartiment, BL basolaterales Kompartiment, PF Peakfläche, PF_{Kavität} PF der Proben aus einer Kavität, PF_{Sol D} PF von 100 mg/mL Sol D, WF Wiederfindung.

** Formeln: $PF_{Kavität} = PF_{AP} + PF_{BL} \times 3$
 $WF^* [\%] = (PF_{Kavität} \times 100) / PF_{Sol D}^{***}$

*** PF_{Sol D} (100 mg/mL) = 4859,2 mAbs x min

Im Vorversuch 2 wurden Caco-2 Zellen auf PE-Membranen ausgesät und 14 d unter Standardbedingungen kultiviert. Die intakten Monolayer wurden nachfolgend (an d₄) 60 min mit 200, 400 und 800 µg/mL Bradykinin inkubiert. Im Gegensatz zur Literatur¹ war kein Transport dieses Peptids nachweisbar. Aufgrund dessen wurden in nachfolgenden Peptidtransportstudien ausschließlich PC-Membranen (Porengröße von 0,4 µm) eingesetzt, da diese außerdem eine gute Caco-2 Zelladhäsion gewährten².

Auswahl der notwendigen Membrangröße (Kulturfläche)

Im Vorversuch 3 wurden Caco-2 Zellen auf PC-Membranen mit einer Kulturfläche von 1,1 cm² (12 Kavitäten MTP) ausgesät und 14 d unter Standardbedingungen kultiviert. Nachfolgend wurden Transportstudien unter Einsatz von 100 mg/mL Sol D bzw. 1 mmol/L Bradykinin durchgeführt. Die Proben aus den basolateralen Kompartimenten wurden mit der jeweils geeigneten Methode analysiert (Sol D: HPLC-Analyse, s. 3.7.5.2 bzw. Hydroxyprolin-Bestim-

¹ Shimizu, M. et al., 1997

² Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A.-K., 2000

mung, s. 3.7.7; Bradykinin: HPLC-Analyse, s. 3.7.5.1). Dabei erwies sich die transportierte Sol D-Menge als genügend groß, so dass auswertbare Signale detektierbar waren. Aufgrund dessen wurden alle weiteren Tests mit Kollagenhydrolysat in MTP mit 12 Kavitäten durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Literatur³ wurden die Tests mit synthetischen Peptiden in MTP mit 6 Kavitäten durchgeführt, auf PC-Membranen mit einer Kulturfläche von 4,7 cm².

Optimaler pH-Bereich im apikalen Kompartiment

Im Vorversuch 4 wurde die Transportleistung intakter Caco-2 Monolayer für 80 mg/mL Sol D in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (15 – 90 min) und nach Verdünnung in HBSS (pH 7,4) sowie in MES-HBSS (pH 6,0) untersucht. Dieser pH-Bereich von 6 bis 7 wird für die Bürstensaummembran als optimal angesehen, wobei der Peptidtransport durch einen transmembranen pH-Gradienten begünstigt wird. In diesem Vorversuch wurden Zeit- und pH-abhängige Unterschiede des Sol D-Transports nachgewiesen (s. Abbildungen A-1, A2). Aufgrund dessen wurden in nachfolgenden Tests die Caco-2 Monolayer mindestens 60 bis 90 min mit Kollagenhydrolysat inkubiert. Außerdem wurden die verschiedenen Tests der Transportstudie zur Simulation der Situation im Darm mit HBSS unterschiedlicher pH-Werte durchgeführt: pH 7,4 im basolateralen und pH 6,0 im apikalen Kompartiment.

3.7.4.2 Durchführung der Peptidtransportstudien

Entsprechend den Ergebnisse von PINTO ET AL.⁴ wurde davon ausgegangen, dass auf PC-Membranen kultivierte Caco-2 Zellen innerhalb von 6 Tagen konfluente Monolayer ausbilden und nach 9 Kulturtagen in die Stationäre Phase übergehen, so dass die überwiegende Anzahl der Zellen differenziert ist⁴.

Zur Durchführung der Transportstudien wurden die Caco-2 Zellen in einer Dichte von 10⁵/cm² auf PC-Membranen (6- bzw. 12-Kavitäten-MTP) ausgesät und 14 (bzw. 21) Tage unter Standardbedingungen (DMEM, 37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. In den Kavitäten der Kontrollzellen (K_N) wurde der TEER (37 °C; s. 3.7.3) innerhalb dieser Zeit (d₃-d₁₄) gemessen. Da alle Monolayer nach 9/10 tägiger Kultivierung einen TEER größer 90 Ω cm² aufwiesen, wurde dieser Wert als Grenze festgelegt, durch die konfluente Monolayer nachgewiesen wurden, die in den Transportstudien eingesetzt wurden. Dadurch wurde gewährleistet, dass eine im basolateralen Kompartiment detektierte Testsubstanz die simulierte intestinale Barriere passiert hatte. Auch nach der Transportstudie wurde die Integrität der Monolayer durch Messung des TEER untersucht sowie gleichzeitig eventuelle Testsubstanzwirkungen auf Caco-2 Monolayer nachgewiesen.

Die Transportstudien wurden in 6- bzw. 12-Kavitäten-MTP mit synthetisierten Peptiden (Ala-Trp, Val-Phe, Val-Tyr, Lys-Phe, Gly-Pro, Leu-Lys-Pro, Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg, Arg-Pro-

³ Shimizu, M. et al., 1997, Satake, M. et al., 2002

⁴ Pinto, M. et al., 1983

Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg und Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu) bzw. Kollagenhydrolysaten entsprechend dem nachfolgenden Standardprotokoll durchgeführt. Die Kavitäten der 6- bzw. 12-Kavitäten-MTP wiesen im apikalen Kompartiment ein Volumen von 0,5 bzw. 1,5 mL und im basolateralen Kompartiment von 1,5 bzw. 2,6 mL auf. In Tabelle 3-21 ist die Kennzeichnung der verschiedenen Tests dieser Transportstudien aufgeführt.

Tabelle 3-21: Kennzeichnung der verschiedenen Tests der Transportstudien

Test Nr.	Anzahl je		Zell-Passagen Nr.	Testsubstanz	Nachweismethoden
	Test bzw. MTP	Kavitäten			
1	1	6	58	1 mmol/L Bradykinin	HPLC
2	1	6	32	1 mmol/L Bradykinin	HPLC
3	1	6	34	4 mmol/L Dipeptide	HPLC
4	1	6	35	1 mmol/L Leu-Lys-Pro	HPLC
5	2	6	38	1 mmol/L ELKPTPEGDLE ^A	HPLC
6	1	6	40	4 mmol/L Val-Phe	HPLC
1	4	12	63	Sol D	HPLC, Photometrie
2	2	12	73	Sol D	Photometrie
3	2	12	75	Sol D	HPLC, Photometrie
4	6	12	80	Kollagenhydrolysate	HPLC, Photometrie
5	2	12	81	Sol D und	HPLC, Photometrie
6	1	12	83	<i>tight junctions</i> -Modulatoren	Photometrie
7	2	12	84	Sol D	Photometrie

^A Angabe der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code.

Standardprotokoll für Transportstudien (6- bzw. 12-Kavitäten-MTP)

- **Zell-Aussaat, Kultivierung und TEER-Messungen** (s. 3.7.3)

Besonderheit der Transportstudie mit Kollagen-Hydrolysat: Auf jeder MTP (Caco-2 Zellen einer Passage) wurden Kavitäten zur Entnahme von Proben für beide Nachweismethoden (Photometrie, HPLC) integriert.

- **Transportstudie an d₁₄ bei 37 °C** (Wärmeplatte bzw. Brutschrank):

- Waschen der Caco-2 Monolayer (jeweils eine MTP pro Zeiteinheit):

- MTP II: neue MTP, noch ohne Inserts:

HBSS (pH 7,4) in jede Kavität einfüllen (Volumina der BL), MTP auf der Wärmeplatte lagern.

- MTP I: MTP, in der die Caco-2 Zellen 14 Tage kultiviert wurden, auf der Wärmeplatte lagern,

die Inserts (AP) nacheinander vorsichtig und vollständig entleeren und der Reihe nach in die Kavitäten der

- MTP II einsetzen und mit MES-HBSS (pH 6,0) füllen (Volumina der AP), nachfolgend 1 x mit HBSS (BL: pH 7,4, AP: pH 6,0) waschen, 30 min Equilibrierung im Brutschrank.

- Applikation der zweifachkonzentrierten Testsubstanz ins AP, durch Austausch des halben Insertvolumens.

- Inkubation der Caco-2 Monolayer mit Testsubstanz: (10 -) 60, 90 min im Brutschrank

- nachfolgend: Lagerung der MTP I und II auf der Wärmeplatte,

- MTP II: zügige Probenentnahme aus AP und Aliquotierung bzw. zügige, vollständige Entleerung des AP und Einsetzen dieser Inserts in die
- MTP I: AP: Zugabe von DMEM entsprechend der Endvolumina, BL: Austausch der Hälfte des Kavitätenvolumens an DMEM, erneute Inkubation der Caco-2 Monolayer im Brutschrank, TEER-Messungen nach 2 - 48 h.
- MTP II: Probenentnahme aus den BL (AP) jeder Kavität, Aliquotierung in Reaktionsgefäße 3810 (s. Tabelle 3-25, Tabelle 3-26), Probenbezeichnung (s. Tabelle 3-24) Probenlagerung bei – 24° C.
- **Auswertung:** s. HPLC-Analyse (3.7.5) sowie photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung (3.7.7).

3.7.4.3 Untersuchung des Transportmechanismus

Zur Untersuchung des Transportmechanismus von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer wurden zusätzliche Tests nach Modifizierung des Standardprotokolls durchgeführt.

Endozytose

Tests 3 B: Da die vollständige Ausbildung der für die Endozytose notwendigen Membran- und intrazellulären Proteine nach langanhaltender Kultivierung erfolgt⁵, wurden die Caco-2 Zellen 21 Tage (7 Tage länger als in anderen Tests) unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend (an d_{21}) erfolgte eine 90 min Exposition der Monolayer mit 100 mg/mL Sol D. Die weitere Testdurchführung erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll.

Parazellulärer Peptidtransport

Ein parazellulärer Transport entspricht einer Diffusion (*solvent drag*) der Testsubstanz durch *tight junctions*. Hierbei ist die Transportrichtung abhängig vom Konzentrationsgradienten zwischen zwei Kompartimenten. Durch Zugabe der Peptide ins apikale bzw. basolaterale Kompartiment ist bei sonst gleichen Bedingungen der jeweilige Testsubstanzstrom ins BL bzw. AP theoretisch gleich groß. Eine Erhöhung der parazellulär transportierten Peptidmenge wird dann erreicht, wenn die *tight junctions* intakter Caco-2 Monolayer u. a. durch Zusatz von Cytochalasin D oder Palmitoyl-DL-Carnitin Chlorid reversibel geöffnet werden. Diese reversible Öffnung der *tight junctions* ist durch Messung des TEER überprüfbar.

Test 4: Zur Überprüfung eines möglichen parazellulären Transports wurde Sol D in die apikalen bzw. basolateralen Kompartimente zweier MTP (A bzw. F) appliziert. Die Durchführung dieses Tests erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll (Probenvolumina s. Tabelle 3-25). In den beiden nachfolgenden Tests 5 und 6 wurde die Wirkung der *tight*

⁵ Ma, Th. Y. et al., 1995

junctions modulierenden Substanzen Cytochalasin D und Palmitoyl-DL-Carnitin auf den Sol D-Transport untersucht. Dazu wurde das Standardprotokoll folgendermaßen geändert: Die Equilibrierung (30 min) in HBSS und die nachfolgende Inkubation (90 min) der Caco-2 Monolayer mit 100 mg/mL Sol D erfolgte unter gleichzeitigem Zusatz (AP und BL) von 0,5 µg/mL Cytochalasin D (MTP 1) bzw. 0,1 mmol/L Palmitoyl-DL-Carnitin Chlorid (MTP 2).

Hydroxyprolin-Transport als freie Aminosäure bzw. Peptid-gebunden

In Test 7 wurden die Caco-2 Monolayer zweier MTP (an d_4) mit 100 mg/mL Sol D 90 min inkubiert. Die Transportstudie wie auch die Hydroxyprolin-Bestimmung erfolgten entsprechend dem Standardprotokoll. Allerdings variierte die Vorbereitung der Proben der 1. MTP, indem die Hydrolyse nicht erfolgte (s. 3.7.7).

3.7.5 HPLC-analytische Bestimmung

Die Testsubstanzen für Transportstudien (synthetische Peptide, Kollagen-Hydrolysate) und deren mögliche Abbauprodukte, u. a. freie Aminosäuren (Phe, Trp, Tyr) wurden mit Hilfe der Hochleistungs-Säulen-Flüssig-Chromatographie (HPLC) nachgewiesen. Dazu wurden zwei unterschiedliche Trennprinzipien genutzt.

Im Vorversuch wurde die Trennungsleistung der beiden zur Verfügung stehenden Trennprinzipien für das komplexe Peptidgemisch Sol D [10 mg/mL Reinstwasser] untersucht (s. Abbildung 3-12).

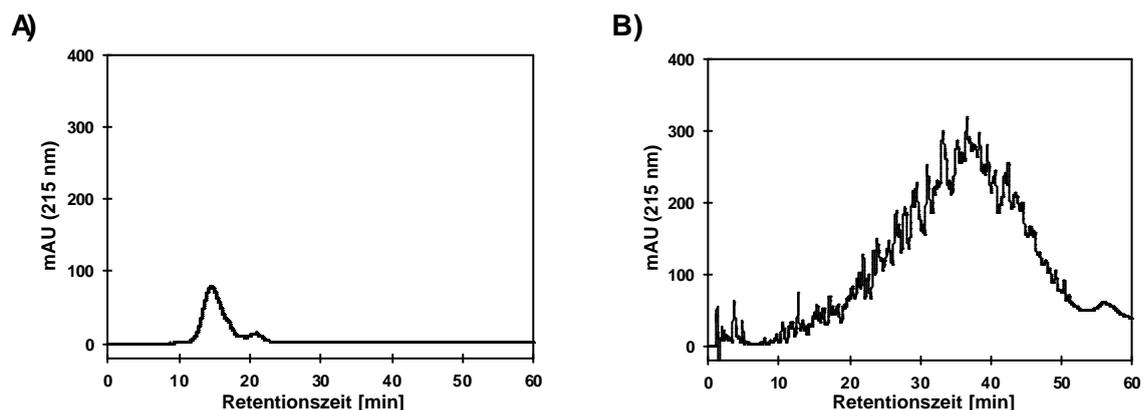


Abbildung 3-12: Chromatogramme von Sol D nach A) Ausschluss-Chromatographie (Ausschlussgrenze M_r 20000) und B) Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC (C 18))

Für nachfolgende Analysen von Proben der Transportstudien mit Kollagen-Hydrolysatproben bzw. synthetischen Peptiden wurden die Ausschluss- bzw. Umkehrphasenchromatographie

eingesetzt. Letztere wurde außerdem zum Nachweis der Reinheit synthetischer Peptide (2 mg/mL) erfolgreich eingesetzt (s. Abbildung 3-13)⁶.

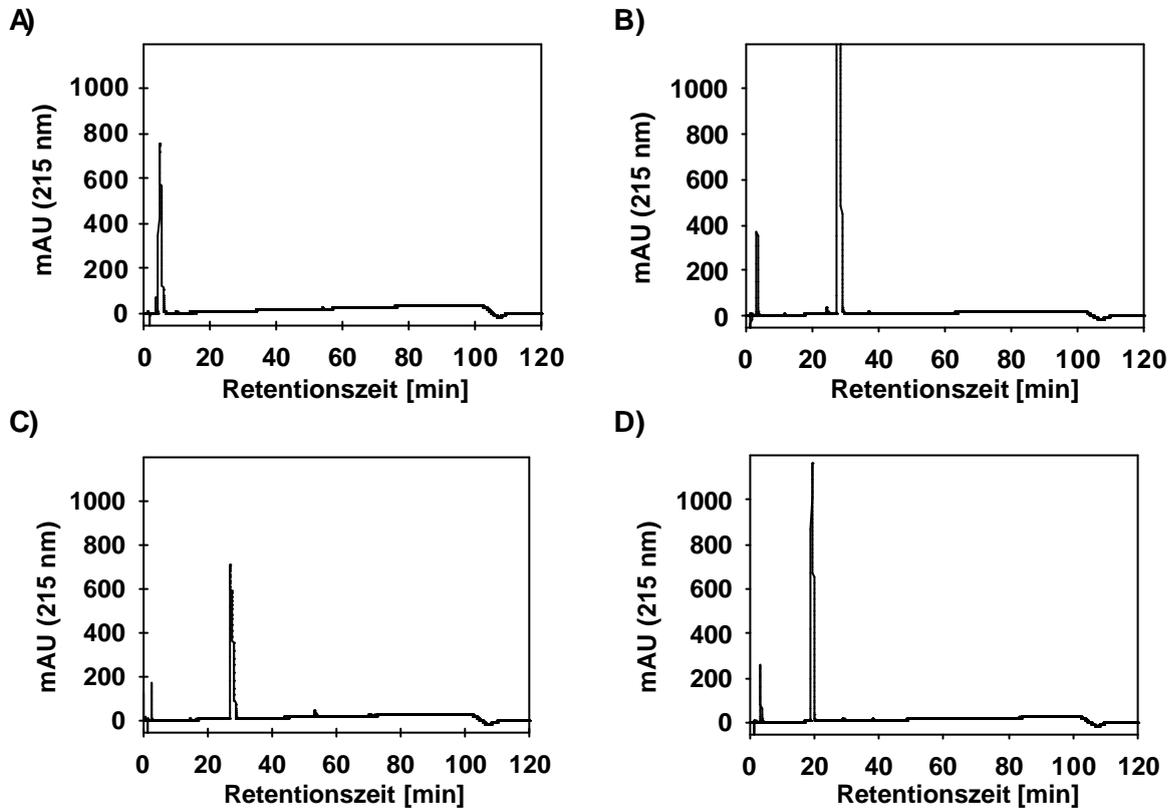


Abbildung 3-13: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) synthetischer Dipeptide: A) Ala-Pro, B) Ala-Trp, C) Val-Phe, D) Val-Tyr

Außerdem wurden die Chromatogramme der in der Peptidtransportstudie eingesetzten Puffer (MES-HBSS pH 6,0 und HBSS pH 7,4, auch nach Inkubation einer Insert-Membran) bzw. der *tight junctions*-Modulatoren Cytochalasin D und Palmitoyl-DL-Carnitin aufgezeichnet. Dabei wurden keine Begleitsubstanzen ermittelt, die die Identifizierung der nachzuweisenden Substanzen stören könnten. Die Chromatogramme von DMEM sind charakteristisch, so dass dieses, sollte es in den Proben der Transportstudie enthalten sein, gut identifizierbar sein würde (s. Abbildung A-3).

⁶ Unveröffentlichte Ergebnisse, Meisel, H., 2003

3.7.5.1 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssig-Chromatographie (RP-HPLC) zum Peptidnachweis

Die eingesetzten synthetischen Di- und Oligopeptide bzw. Aminosäuren unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Molekülgröße, weisen jedoch in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz und dem pH-Bereich des Lösemittels eine unterschiedliche Polarität auf. Diese Substanzeigenschaft wurde zur Trennung der Peptidfraktionen durch RP-HPLC genutzt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe einer computergesteuerten HPLC-Anlage von Thermo Quest. Hierbei wurden die durch Vakuum entgasten und nachfolgend gemischten Laufmittel durch eine Niederdruckpumpe (Pump Spectra System P 4000) bewegt. Als Laufmittel wurden Reinstwasser (mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA); A) sowie ein Gemisch bestehend aus 50 % Reinstwasser und 50 % Acetonitril (mit 0,1 % TFA; B) eingesetzt, wobei die Laufmittelzusammensetzung Zeit-abhängig verändert wurde (Laufmittel B: 5 %: 0 – 5 min, Anstieg auf 90 %: 5 – 90 min, 90 %: 90 – 100 min, Abfall auf 5 %: 100 – 105 min, 5 %: 105 – 120 min sowie „flacher Gradient“ (zur Analyse von Proben des Tests 4, s. Abbildung 3-15, B) 5 %: 0 – 5 min, Anstieg auf 45 %: 5 – 90 min, 90 %: 90 – 100 min, Abfall auf 5 %: 100 – 105 min, 5 %: 105 – 120 min). Die aufbereiteten Proben (150 µL) wurden durch die Nadel des Autosamplers aufgenommen. Anschließend erfolgte die Trennung auf der im Säulenofen (SpectraSystems AS3000) auf 30 °C erwärmten Säule LiChroCART 125-4 HPLC Cartridge Superspher 100 RP-18 endcapped Säule (Merck) mit aufgesetzter Vorsäule LiChroCART 4-4 LiChrospher 100 RP-18 (Merck). Die eluierten Probenfraktionen passierten nacheinander die Flusszelle des Diodenarraydetektors SpectraSystems UV6000LP (UV-Licht: Messungen bei Wellenlängen von 205, 215 und 280 nm) und wurden anschließend ordnungsgemäß entsorgt. Ein Probendurchlauf und die Säulenkonditionierung dauerten 120 min. Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte Computer-unterstützt mit Hilfe des Interface SpectraSystems SN4000 und der Chromatographiesoftware ChromQuest 2.51.

Trennprinzip I: Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC)

Die Trennung der Di- und Oligopeptidproben erfolgte mit Hilfe der Reversed-Phase 18 (RP 18) Chromatographie, bei der das Phasensystem aus einer unpolaren stationären Phase (poröse Kieselgele mit gekoppelten n-Octadecylgruppen) und einer polaren mobilen Phase (Laufmittel) besteht. Die auf eine konditionierte RP 18-Säule aufgetragene Probe wird getrennt, indem hydrophobe Peptide an die stationäre Phase adsorbieren und hydrophile Peptide im Laufmittel schneller eluiert werden. Die Stärke der reversiblen Adsorption (Verzögerung der Elution) nimmt bei niedrigen pH-Werten im Allgemeinen mit der Hydrophobizität der Peptide zu. Für die notwendige fraktionierte Peptiddesorption wird die Zusammensetzung des Laufmittels Zeit-abhängig verändert, wodurch dieses zunehmend unpolarer wird.

Optimierung der Methode

Zunächst wurden die Retentionszeiten der synthetischen Peptide sowie der darin enthaltenen, aromatischen Aminosäuren Phe, Trp und Tyr ermittelt (s. Tabelle 3-22, Abbildung 3-14 bis Abbildung 3-17), da diese Aminosäuren während der Transportstudie durch Enzyme des

Caco-2 Monolayer aus den Peptiden freigesetzt werden können und im Gegensatz zu anderen Aminosäuren nicht im Ausschlussvolumen (Fraktion 1-2) eluiert werden.

Tabelle 3-22: Retentionszeiten ausgewählter Aminosäuren und synthetischer Peptide

Synthetische Peptide / Aminosäuren	Konzentration [mmol/L]	Lösemittel	Retentionszeit [min]
Ala-Trp	0,025	HBSS/Laufmittel	23,39
Lys-Phe	0,25	HBSS/Laufmittel	17,91
Val-Phe	0,2	HBSS/Laufmittel	23,95
Val-Tyr	0,1	HBSS/Laufmittel	13,45
Leu-Lys-Pro	0,2	HBSS/Laufmittel	17,60 bzw. 23,46 [#]
Bradykinin: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	0,25	HBSS/Laufmittel	42,94
Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu	1,00	HBSS/Laufmittel	31,18
Phe	0,5	Laufmittel	11,43
	0,5	HBSS/Laufmittel	11,67
Trp	0,025	Laufmittel	20,42
	0,025	HBSS/Laufmittel	20,11
Tyr	0,05	Laufmittel	6,00
	0,05	HBSS/Laufmittel	6,01

[#] Das Standardprotokoll der HPLC Analyse wurde verändert, durch Einsatz eines flachen Laufmittelgradienten.

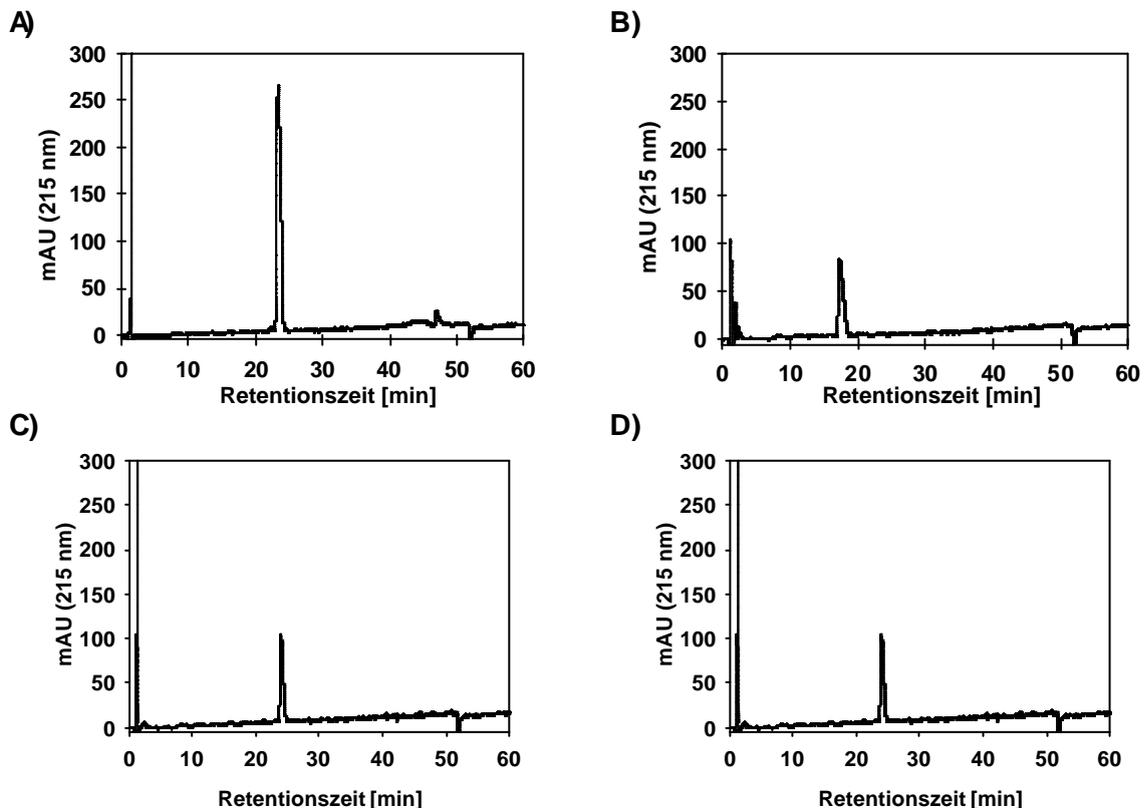


Abbildung 3-14: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) von Dipeptiden: A) 0,05 mmol/L Ala-Trp, B) 0,50 mmol/L Lys-Phe, C) 0,25 mmol/L Val-Tyr, D) 0,20 mmol/L Val-Phe

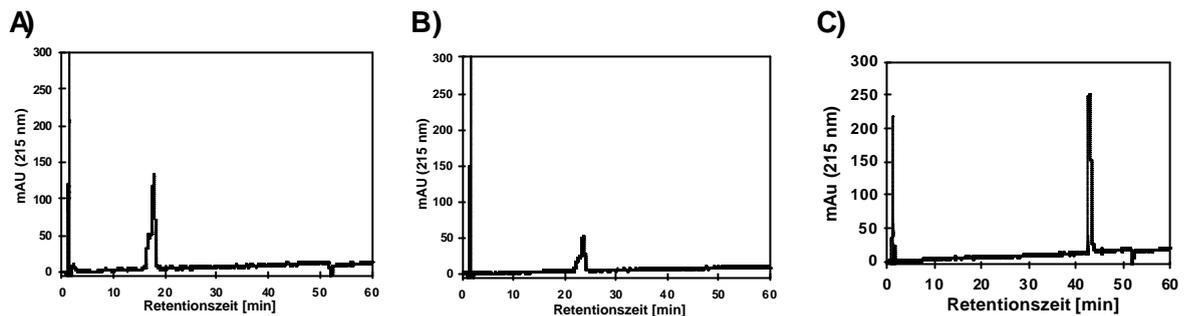


Abbildung 3-15: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) A) und B) von 0,2 mmol/L Leu-Lys-Pro – nach Analysen mit unterschiedlichen Laufmittelgradienten A) entsprechend dem Standardprotokoll, B) nach Einsatz eines flachen Gradienten - sowie C) von 1,0 mmol/L Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg).

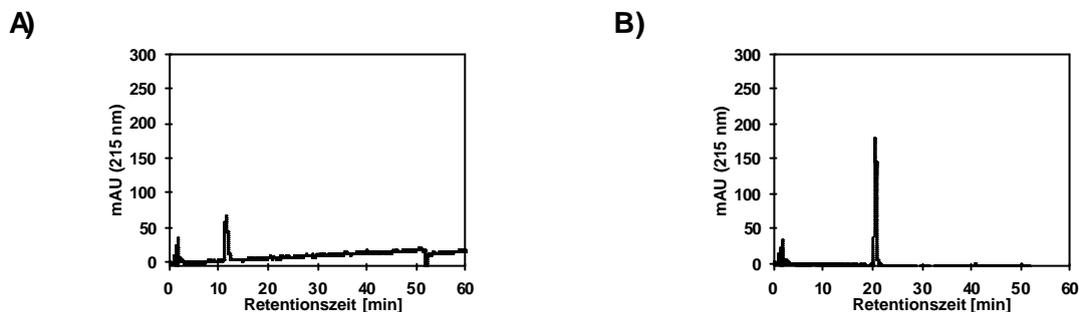


Abbildung 3-16: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) von Aminosäuren: A) 0,5 mmol/L Phe und B) 0,025 mmol/L Trp

Die Peptide (s. Abbildung 3-14) und Aminosäuren (Abbildung 3-16, Abbildung 3-17) wurden in HPLC-Laufmittel (pH 1,5) bzw. in MES-HBSS (pH 6,0) gelöst und anschließend in Laufmittel verdünnt und auf die Säule (150 μ L) aufgetragen. Dies war notwendig, da sich die Retentionszeit der Dipeptide mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen veränderte. Deshalb war das Ziel der Verdünnungen, ein niedriges Detektionssignal zwischen 50 bis 200 mAbs zu erreichen, welches nach Transportstudien theoretisch zu erwarten ist und nachfolgend zum Aufstocken der Proben eingesetzt werden sollte.

Das Lösen der Proben in MES-HBSS (pH 6,0) und stufenweise Verdünnen mit Laufmittel (pH 1,5) führte zunächst zu einer Erhöhung des pH-Wertes der auf die Säule aufzutragenden Probe von 1,5 auf 4,5 und erreicht nachfolgend erneut den Ausgangswert. Diese pH-Wert Erhöhung zeigte ausschließlich bei Tyrosin einen Einfluss auf die Peakfläche, nicht jedoch auf die Retentionszeit (s. Abbildung 3-17).

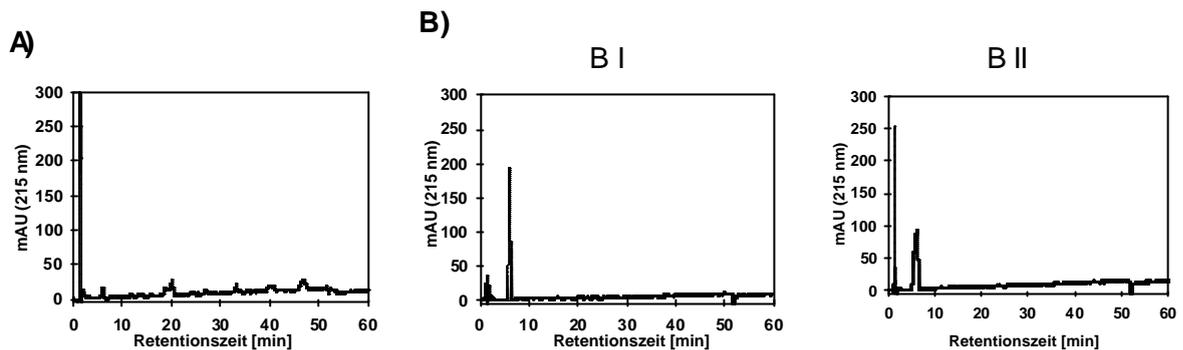


Abbildung 3-17: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) von A) MES-HBSS und B) Tyrosin

A) 2,5 mL HBSS (pH 6,0) wurde getrocknet und in Laufmittel der HPLC-Analyse (pH 1,5) aufgenommen; es wurde ein pH von 4,5 ermittelt. B) 0,005 mmol/L Tyr wurde in Laufmittel (pH 1,5) aufgenommen (B I) bzw. in MES-HBSS gelöst und anschließend in Laufmittel aufgenommen (B II). Daraus resultierten ein pH von 4,5 und eine Veränderung des Chromatogramms im Vergleich zu (B I).

Zunächst wurden Chromatogramme (RP-HPLC (C 18): 150 μ L Injektionsvolumen) der Verdünnungsreihen von 0,001 – 0,01 mmol/L Ala-Trp, 0,01 – 1,0 mmol/L Lys-Phe, 0,008 – 4 mmol/L Val-Phe und 0,01 – 4,0 mmol/L Val-Tyr aufgezeichnet, zur Bestimmung der HPLC-analytischen Nachweisgrenze. Die Kalibrierfunktionen und Nachweisgrenzen wurden unter Einsatz der Software Valoo[®] (basierend auf DIN 32645) berechnet und der lineare Bereich bestimmt (s. Tabelle 3-23, Tabellen A7 bis A10).

Tabelle 3-23: RP-HPLC (C 18) und Software Valoo[®]: Kalibrierfunktionen und Nachweisgrenzen ausgewählter Dipeptide

Dipeptid	Kalibrierfunktion	r	Nachweisgrenze [mmol/L]
Ala-Trp	$y = 136148,8206 + 185970471,2182 x$	0,9955	0,0042
Lys-Phe	$y = 148247,3569 + 8413207,3918 x$	0,9997	0,0155
Val-Phe	$y = 117757,8435 + 15256520,7003 x$	0,9996	0,0216
Val-Tyr	$y = 35950,9927 + 22872363,7118 x$	0,9997	0,0284

Die HPLC Analyse der synthetischen Peptide wurde entsprechend dem nachfolgenden Standardprotokoll durchgeführt. Die Probenbezeichnung basierte auf Merkmalen der Caco-2 Zellkultivierung und der Transportstudie (s. Tabelle 3-24).

Tabelle 3-24: Probenbezeichnung

Probenbezeichnung		zu Grunde liegende Merkmale	
		Caco-2 Zellkultivierung (d ₀ -d _{14/21})	Transportstudie (d _{14/21})
Diffusionskontrolle	K _D	BLANK (ohne Zellen)	HBSS mit Testsubstanz
Negativ-Kontrolle	K _N	Caco-2 Monolayer	HBSS ohne Testsubstanz
Probe _{rest}	P _T	Caco-2 Monolayer	HBSS mit Testsubstanz
	P _{T-AP} [#]		P _T aus apikalen Kompartimenten
	P _{T-BL} [#]		P _T aus basolateralen Kompartimenten
Positiv-Kontrolle	K _P	Testsubstanz ohne Kontakt zu Zellen, gelöst in HBSS	

[#] Die Indizes AP und BL sind außerdem für Proben aus Kontroll-Kavitäten möglich, z. B.: K_{D-AP}, K_{D-BL}.

Standardprotokoll: HPLC-Analyse synthetischer Peptide

• Probenaufbereitung und HPLC-analytische Bedingungen:

- Auftauen der in Reaktionsgefäßen 3810 aliquotierten Proben (s. 3.7.4).
- Trocknung im Vakuum-Konzentrator: ca. 8 – 12 h.
- Lösen der getrockneten Proben in Laufmittel (s. Tabelle 3-25) und aufstocken bestimmter Proben mit der jeweiligen Testsubstanz,
- Zentrifugation (13000 g, 3 min),
- Konditionierung der RP 18-Säule,
- 150 µL Proben-Auftragsvolumen, 120 min Laufzeit, Angaben zum Laufmittelgradient s. 136.
- Sammeln der Eluenten A, B (Undecapeptid) bzw. A bis D (Bradykinin).

Tabelle 3-25: Probenvolumina (l) nach Transportstudie und zur HPLC-Analyse

Probenbezeichnung	Volumina [µL]	
	Transportstudie: Aliquote entnommen aus den basolateralen Kompartimenten	HPLC-Analyse: Proben der Transportstudie wurden getrocknet, in Laufmittel gelöst
K _D	1400	1400
K _N	2500	200
P _T	2500	200

• Auswertung

- Vergleich der Retentionszeiten (Peakflächen) der Substanzen aus den Proben (P_{T-AP}, P_{T-BL}) mit denen der jeweiligen Reinsubstanz (Positiv-Kontrolle).
- Berechnung der Peptid – Menge [µg], die in jeder Probe (P_{T-BL}) enthalten war, mittels der entsprechenden Kalibrierfunktion (s. Tabelle 3-23):
 - Eingabe der Peakflächen (mAbs x min) ins Programm Valoo[®], automatische Ergebnis-Ausgabe: Peptid [mmol/L].
 - Berechnungen unter Einsatz von Excel:
 - I) Peptid-Menge [µg] je basolateralem Kompartiment unter Berücksichtigung des Peptid-Molekulargewichts und Korrekturfaktor 2,6.
 - II) Peptid-Anteil [%], der aus dem apikalen ins basolaterale Kompartiment, durch Caco-2 Monolayer hindurch transportiert wurde, unter Einsatz folgender Formel: Peptid-Anteil [%] = (a / b) * 100

- a) Peptid-Konzentration [$\mu\text{mol}/1,5 \text{ mL}$] im apikalen Kompartiment,
- b) Peptid-Konzentration [$\mu\text{mol}/2,6 \text{ mL}$] aus basolateralen Kompartimenten (s. I).

3.7.5.2 Ausschlusschromatographie zum Nachweis von Kollagenhydrolysaten

Die eingesetzten Kollagenhydrolysate weisen mittlere molare Massen zwischen 3000 bis 15000 (lt. Herstellerangaben) auf und wurden mit Hilfe der Ausschluss-Chromatographie unter isokratischen Trennbedingungen in einer BIO-TEK Kontron Anlage nachgewiesen. Die mittels Helium entgasten Laufmittel wurden mit Hilfe von zwei Hochdruckpumpen (422 Master Pumpen) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min durch das System bewegt und direkt vor dem Probenaufgabeventil 7125 (Rheodyne) gemischt (Mischer M 494). Die aufbereitete Probe (50 μL) wurde mit einer Hamiltonspritze in das Laufmittelgemisch aus Reinstwasser (mit 0,1 % Trifluoressigsäure: TFA) und 30 % Acetonitril (mit 0,1 % TFA) eingebracht und passierte anschließend eine im Säulenofen (Eigenbau) auf 30°C erwärmte, equilibrierte Säule mit der Bezeichnung Superdex[®] Peptide PE 7,5/300 (Amersham Pharmacia Biotech), die eine Ausschlussgrenze von M_r 20000 und einen idealen Bereich von M_r 100 bis 7000 aufweist. Die Fraktionen der Probe wurden nacheinander eluiert und passierten eine Flusszelle, in der die Absorption durch einen Diodenarraydetektor DAD 440 (UV-Licht: Messungen bei Wellenlängen von 205, 215 und 280 nm) erfasst wurde. Die fraktionierten Proben passierten anschließend den vorhandenen Fraktionssammler Foxy200 (ISCO) und wurden den Bestimmungen entsprechend entsorgt. Ein Probendurchlauf und die Säulenconditionierung dauerten 60 min. Die Datenauswertung erfolgte mit der Chromatographie-Software KromaSystem 200.

Trennprinzip II: Ausschlusschromatographie

Die Ausschlusschromatographie wird zur Trennung von Peptiden nach Molekülgröße und -gestalt eingesetzt. Die Superdex[®] Peptide PE Säule (\varnothing : 7,5 mm, l: 300 mm) ist mit porösen Agarose-quervernetzten Dextrankügelchen (\varnothing 13–15 μm) gefüllt. Das Fließmittel fungiert ausschließlich als Lösemittel für die Probe, wodurch eine Moleküladsorption an das Packungsmaterial verhindert wird. Die Durchdringung des Porenvolumens ist dadurch allein von der Molekülgestalt (-größe) abhängig, wobei kleine bzw. mittlere Moleküle dieses selektiv bzw. vollständig durchdringen und große Moleküle davon ausgeschlossen sind. Dabei wird die Elution der kleinen Moleküle am stärksten verzögert und erfolgt mit abnehmender Größe.

Zunächst wurden Chromatogramme (Ausschluss-Chromatographie: 50 μL Injektionsvolumen) einer Sol D Verdünnungsreihe aufgezeichnet, zur Bestimmung der HPLC-analytischen Nachweisgrenze von Kollagenhydrolysaten. Dazu wurden 1,25 – 500 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ (0,025 bis 10,0 mg/mL) Sol D eingesetzt, so dass die erwarteten Konzentrationsbereiche der Proben aus basolateralen Kompartimenten von Testkavitäten bzw. der Diffusionskontrolle abgedeckt wurden. Nachfolgend wurden die Kalibrierfunktion und die Nachweisgrenze (basierend auf DIN 32645) unter Einsatz der Software Valoo[®] berechnet. Die Kalibrierkurve ($y = 19,806 + 11,2029 x$; $r = 0,9998$) war im Konzentrationsbereich zwischen 1,25 und 125 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ Sol D

linear (Tabelle A-11 und Abbildung A-4) und als Nachweisgrenze wurde 3,9859 µg/50µL Sol D berechnet.

Der Nachweis der Kollagenhydrolysate wurde entsprechend dem nachfolgenden Standardprotokoll durchgeführt. Die Probenbezeichnung entspricht den Angaben der Tabelle 3-24.

Standardprotokoll: HPLC-Analyse der Kollagen-Hydrolysate

- **Probenaufbereitung und HPLC-analytische Bedingungen:**

- Auftauen der in Reaktionsgefäße 3810 aliquotierten Proben.
- Trocknung im Vakuum-Konzentrator: ca. 8 – 12 h.
- Lösen der getrockneten Proben in Laufmittel (s. Tabelle 3-26) sowie Verdünnungen.
- Konditionierung der Superdex[®] Peptide PE Säule.
- 50 µL Proben-Auftragsvolumen und 60 min Laufzeit.

Tabelle 3-26: Probenvolumina (II) nach Transportstudie und zur HPLC-Analyse

Probenbezeichnung	Volumina [µL]			
	Transportstudie:		HPLC-Analyse:	
	Aliquote entnommen aus basolateralen Kompartimenten		Proben der Transportstudie wurden getrocknet, in Laufmittel gelöst	
	AP	BL	AP	BL
K_D	200	200	1000	1000
K_N	200	1400	1000	350
P_T	200	1400	1000	350
K_P	400	400	1000	1000

- **Auswertung:**

- Die Chromatogramme der Proben (K_D, K_N und P_T) wurden mit denen der jeweiligen Testsubstanzen (Reinsubstanz : K_P) verglichen.
- Berechnung der Sol D – Menge [µg], die in jeder Probe (P_{T-BL}) enthalten war, mittels Sol D Kalibrierfunktion (nach Berechnung mit der Software Valoo[®]):
 - Eingabe der Peakflächen (mAbs x min) ins entsprechende Programm,
 - automatische Ergebnis-Ausgabe: Sol D [µg / 50 µL].
 - Berechnungen unter Einsatz von Excel:
 - I) Sol D-Menge [µg] je basolateralem Kompartiment mittels Korrekturfaktor 7,5.
 - II) Sol D-Anteil [%], der aus dem apikalen ins basolaterale Kompartiment, durch Caco-2 Monolayer hindurch transportiert wurde, unter Einsatz folgender Formel: Sol D [%] = (a / b) * 100
 - a) Sol D-Menge [µg] die ins apikale Kompartiment appliziert wurde,
 - b) Sol D-Menge [µg] aus basolateralen Kompartimenten (s. I)).

3.7.6 Aminosäurenanalyse mittels Kationenaustausch-Chromatographie

Messmethode

Dem LKB 4151 ALPHA PLUS Aminosäurenanalysator liegt ein Flüssigkeits-Chromatographie-Verfahren zugrunde⁷, wobei alle wesentlichen Funktionen automatisiert werden. Die wesentlichen Elemente des Analysators zur Trennung und zum Nachweis von Aminosäuren sind in Abbildung 3-18 aufgeführt.

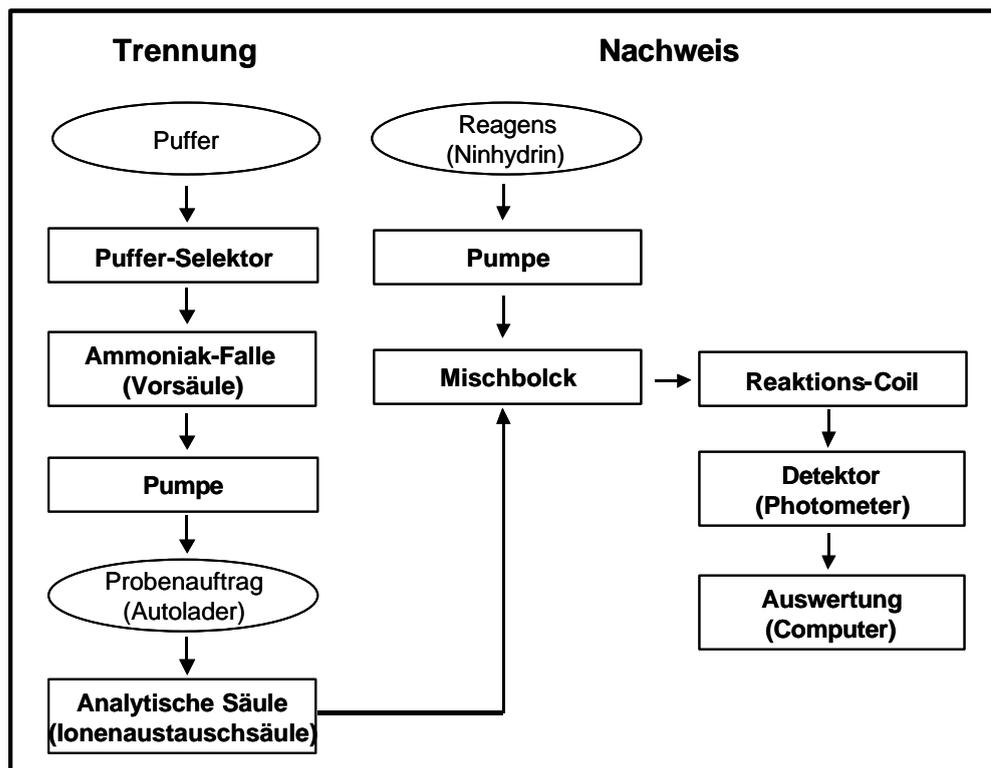


Abbildung 3-18: Elemente des Aminosäurenanalysators LKB 4151 ALPHA PLUS

Darstellung modifiziert nach Informationen von PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY⁸

Die in Puffer (P_{AS} , Tabelle 3-27) gelösten Aminosäuren werden auf die Säule (Ultrapac 8-Ionenaustauschharz) aufgetragen und binden aufgrund der unterschiedlichen Nettoladungen unterschiedlich stark an die funktionellen Gruppen der Matrix. Nachfolgend werden die Ladungen durch sequenzielle Selektion der Puffer neutralisiert (Isoelektrischer Punkt), wodurch die Abtrennung und gleichzeitige Auftrennung der Aminosäuren stattfindet. Vor einer erneuten Analyse wird die Säule mit 0,4 mol/L NaOH (Puffer 6) regeneriert und mit Puffer 1 equilibriert (Pufferfließrate: 35 mL/h).

⁷ Schirmer, Ch. & Meisel, H., 2004

⁸ Pharmacia LKB Biotechnology, 1987

Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgt mit Hilfe der Retentionszeiten (s. Abbildungen A-5 und A-6, Tabelle A-12). Die Aminosäuren-Quantifizierung erfolgt mittels Ninhydrin-Nachweis, dazu werden die eluierten Aminosäuren im Mischblock mit Ninhydrin-Reagens (Fließrate: 25 mL/h) vermischt. Die Farbreaktion erfolgt im hochtemperierten Coil (einem 0,3 mm dicken, 10 m langen Schlauch, der in einem 50 mL Siliconbad liegt, auf einem Heizkern, Temperaturbereich: 50 – 149 °C, Soll: 135 °C), wobei die Reaktionsgeschwindigkeit mit ansteigender Temperatur zunimmt. Die Intensität des purpurnen Farbkomplexes ist proportional zur Menge der Aminosäure und wird photometrisch ermittelt, bei Wellenlängen von 570 nm bzw. 440 nm (Prolin). Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt automatisch durch das Programm EZChrom™ Chromatography Data System, durch Berechnung der Peakflächen- und Aminosäuren-Konzentration. Zur Konzentrationsberechnung ist eine Kalibrierung mit Hilfe eines Standards notwendig, da jede Aminosäure eine unterschiedliche Farbausbeute bei der Reaktion mit Ninhydrin aufweist. Die Berechnung der Farbkonstante K, die wiederum zur Berechnung der Aminosäurenkonzentration dient, erfolgt mit den nachstehenden Formeln⁹:

$K = \text{Peakfläche}_{\text{Standard}} / C_{\text{Standard}} [\text{nmol/mg}]$	$C_{\text{Aminosäure}} [\text{nmol/mg}] = \text{Peakfläche}_{\text{Probe}} / K$
--	---

Die Aminosäurenanalyse wurde entsprechend folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

Standardprotokoll zur Durchführung der Aminosäurenanalyse¹⁰:

- **Proben aus Test 2 und 5** (s. Tabelle 3-21):

Die Proben des Tests 2 (P_{T-AP}, K_{N-AP}) und Tests 5 (P_{T-BL}) wurden mittels Umkehrphasen-Chromatographie (C 18) analysiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden getrennt gesammelt und nachfolgend als Proben zur Aminosäurenanalyse eingesetzt.

- **Probenaufbereitung:**

- Auftauen der in Reaktionsgefäße 3810 aliquotierten Proben.
- Trocknung im Vakuum-Konzentrator: ca. 8 – 12 h.
- Probenhydrolyse mit 1 mL 6 N HCl (enthält 1 % Phenol), 24 h, bei 110 °C.
- Entfernung der HCl durch Trocknung im Vakuum-Konzentrator (ca. 8 h) und 2 x Waschen mit je 1 mL Reinstwasser;
- erneute Trocknung im Vakuum-Konzentrator (ca. 12 h).
- Lösen der getrockneten Proben in 1000 µL P_{AS},
davon 100 µL entnehmen ad 1000 µL P_{AS}.

- **Bereitstellung der notwendigen Puffer (s. Tabelle 3-27).**

- **Bereitstellung der Ninhydrin-Reagens**

- Getrennte Einwaage von 10 g Ninhydrin und 0,8 g Hydrindantin-Dihydrat,
- Herstellen des Acetat-Puffers:
920 g Kalium-Acetat (wasserfrei),

⁹ Pharmacia LKB Biotechnology, 1987; Pharmacia Biotech Europe GmbH

¹⁰ Verändert nach Pharmacia LKB Biotechnology, 1987; Pharmacia Biotech Europe GmbH

425 g Natrium-Acetat (Tri-Hydrat),
12,5 g Tri-Kaliumcitrat-Monohydrat und
625 mL Essigsäure (100%).

Lösen dieser Substanzen in Reinstwasser und auf 2,5 L auffüllen.

- Herstellen des Acetat-Ethylenglycol-Gemischs:
700 mL Ethylenglycol + 300 mL Acetat-Puffers.
- Lösen des Ninhydrin und Hydrindantin-Dihydrat (3 : 7) unter Stickstoffeinleitung in
1 L Acetat-Ethylenglycol-Gemisch.

• **Aminosäuren Analyse**

- Säulen-Regenerierung (Puffer 6) und Equilibrierung (Puffer 1).
- Auftragen der Probe bzw. des Standards: 40 µL.
- Automatisierte Probenanalyse und Auswertung.

Tabelle 3-27: Puffer-Rezepturen für die Analyse nicht oxidierten Proteinhydrolysate⁹

	PVP	Puffer 1*	Puffer 2*	Puffer 5*	NaOH
pH	2,2	3,2	4,25	6,45	-
Molarität (Na ⁺)	0,2	0,2	0,2	1,2	0,4
Tri-Natriumcitrat 2H ₂ O (g)	19,6	19,6	19,6	19,6	-
HCl-Konzentration (mL)	16,5	12,5	8,5	0,5	-
Natriumhydroxid (g)	-	-	-	-	16,0
Natriumchlorid wasserfrei (g)	-	-	-	53,3	-
Thiodiglycol (mL)	20,0	8,0	-	-	-
Phenol, 80% v/v Lösung (mL)	1,2	1,2	1,2	1,2	-
Propan-2-ol	-	20,0	-	-	-
Reinstwasser (L)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

* Hinweis in welchem Puffer-Reservoir welcher Puffer platziert werden sollte.

3.7.7 Photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung

Messmethode

Hydroxyprolin wird durch saure Hydrolyse aus Kollagenhydrolysaten freigesetzt und unter Verwendung von Chloramin T oxidiert (s. Abbildung 3-19, I). Das Oxidationsprodukt bildet mit p-Dimethylaminobenzaldehyd rot gefärbte Kondensationsprodukte, die bei einer Wellenlänge von 561 nm photometrisch nachweisbar sind und für deren Farbe ein mesomerie-stabilisiertes Kation verantwortlich ist (s. Abbildung 3-19, II). Die Extinktion ist direkt proportional zur Hydroxyprolin (HyPro) Konzentration.

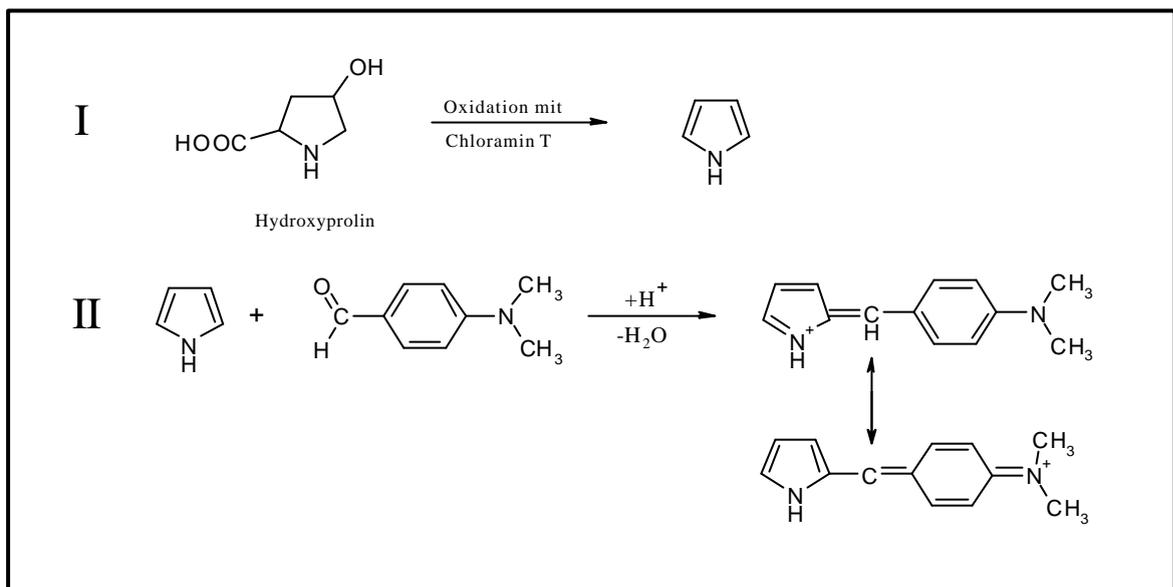


Abbildung 3-19: Reaktionsprinzip zum Nachweis von Hydroxyprolin¹¹

Optimierung der Methode

Die Methode der Hydroxyprolin-Bestimmung ist in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG¹² enthalten und wird in der Fleischwirtschaft als Routineverfahren eingesetzt. Innerhalb dieser Arbeit wurde diese Methode erstmals im Humanzellkulturversuch eingesetzt und zum Nachweis des Transports von Peptiden aus Kollagenhydrolysaten (Sol D, Sol DA, Collagel A, -BS und -BS-GA) durch intakte Caco-2 Monolayer optimiert.

Zunächst wurde die in der Methodenvorschrift angegebene notwendige Hydrolysedauer von 8 h überprüft, da als Testsubstanz hydrolysiertes Kollagen eingesetzt wurde. Dazu wurden eine Sol D-Stammlösung (100,64 mg/10 mL) und Verdünnungen (1 zu 20) mit Reinstwasser

¹¹ Matissek et al., 1992

¹² Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG L 06.00 8, September 1980

hergestellt. Nachfolgend wurde die Hydroxyprolin-Bestimmung entsprechend der Methodenvorschrift durchgeführt, wobei die Dauer der Probenhydrolyse variierte: 4, 8, 24, 36 bzw. 72 h ($n = 2$). Es zeigte sich, dass die Probenhydrolyse nach 4 h abgeschlossen war und eine längere Hydrolysedauer das Hydroxyprolin nicht zerstörte (s. Tabelle A-13). Deshalb wurde für alle nachfolgenden Tests eine Hydrolysedauer von 24 h ausgewählt, die aus arbeits-technischen Gründen am günstigsten war.

Die Probenhydrolyse hat laut Vorschrift in Glassampullen stattzufinden. Zur Kostenreduzierung wurde untersucht, welchen Einfluss der Einsatz von Reaktionsgefäße 3810 auf das Ergebnis hat. Dazu wurden jeweils 450 μL Sol D (20 mg/mL) in je 4 Glasampullen bzw. Reaktionsgefäße 3810 pipettiert. Die Probenvorbereitung und Hydroxyprolin-Bestimmung erfolgte nach dem Standardprotokoll (Anmerkung: Die Glasampullen wurden nach Zugabe von 6 N Salzsäure unter Wärmeeinfluss (Bunsenbrenner) verschlossen und nachfolgend gezielt gebrochen). Da die Hydroxyprolin-Gehalte in beiderlei Gefäßen wie erwartet gleich groß waren ($2,51 \pm 0,01$ versus $2,55 \pm 0,01$ mg/mL; s. Tabelle A-14), wurde die Probenhydrolyse aller nachfolgenden Tests in Reaktionsgefäßen 3810 durchgeführt.

Das in den Transportstudien eingesetzte HBSS (pH 7,4) bzw. MES-HBSS (pH 6,0) wurde bei einer Wellenlänge von 561 nm absorbiert und ergab einen theoretischen Anteil an HyPro von ca. 2 bzw. 5 μg . Diese Werte wurden jedoch nicht berücksichtigt, da der Fehler in allen Proben gleich groß war.

Die photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung erfolgte entsprechend dem nachfolgenden Standardprotokoll mit Proben, die in Transportstudien mit Kollagenhydrolysaten gewonnen wurden (s. 3.7.4). Diese Proben wurden aus den basolateralen Kompartimenten (BL: 1,5 mL) sowie im Test 4 (MTP F) aus den apikalen Kompartimenten (AP: 0,5 mL) entnommen und mit K_D , K_N , und P_T (s. Tabelle 3-24) gekennzeichnet. Außerdem wurden als Positiv-Kontrollen (K_P) 100 mg/mL Kollagenhydrolysat mitgeführt. Diese K_P sowie die K_D wurden nachfolgend verdünnt, so dass die zu erwartenden photometrischen Messergebnisse im Bereich der jeweiligen Kalibrierfunktion (s. Tabelle A-106) lagen. Die Kalibrierfunktion ($y = 0,0237 + 0,0102 x$) und Nachweisgrenze (4,5617 $\mu\text{g/mL}$) wurden unter Einsatz der Software Valoo[®], basierend auf DIN 32645 (Anzahl der Analysenmessung: 5) berechnet.

Standardprotokoll zur Durchführung der Hydroxyprolin-Bestimmung:• **Probenaufbereitung:**

- Auftauen der in Reaktionsgefäße 3810 aliquotierten Proben: K_D , K_N , P_T und K_P .
- Trocknung im Vakuum-Konzentrator: ca. 8 – 12 h.
- Probenhydrolyse mit 1 mL 6 N HCl, 24 h, bei 110 °C.
- Entfernung der HCl durch Trocknung im Vakuum-Konzentrator (ca. 8 h) und 1 x Waschen mit je 1 mL Reinstwasser;
- erneute Trocknung im Vakuum-Konzentrator (ca. 12 h).
- Lösen der getrockneten Proben in Reinstwasser (s. Tabelle 3-28).
- K_D , K_P : 100-fache Verdünnung in Reinstwasser (zweimal: 0,1 mL ad 1,00 mL).

Tabelle 3-28: Probenvolumina (III) nach Transportstudie und zur HyPro-Bestimmung

Proben- bezeichnung	Volumina [μ L]			
	Transportstudie:		HyPro-Bestimmung:	
	Aliquote entnommen aus basolateralen (BL) bzw. apikalen Kompartimenten (AP)		Proben der Transportstudie wurden getrocknet, in Reinstwasser gelöst	
	BL	AP (Test 4 F)	BL	AP (Test 4 F)
K_D	1,00	0,45	0,25	0,25
K_N	1,40	0,45	0,25	0,25
P_T	1,40	0,45	0,25	0,25
K_P	0,50	0,50	1,00	1,00

• **Hydroxyprolin-Nachweis:**

- Ansetzen verschiedener Lösungen und der Farbreagenz:
 - Hydroxyprolin-Stammlösung und Verdünnungen mit folgenden Konzentrationen: 1,5 / 3 / 6 / 12 / 24 / 48 / 60 / 120 μ g/mL (Standardreihe).
 - Oxidationslösung:
 - 1,4 g Chloramin T wird in 100 mL Puffer gelöst und mit 200 mL Reinstwasser verdünnt.
 - Farbreagenz: 10,0 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 35 mL Perchlorsäure lösen, mit 65 mL 2-Propanol vermischen.
- Probenanalyse:
 - 0,2 mL Probenlösung oder Reinstwasser (Blindwert) oder Standardlösung mit 5,0 mL Oxidationsreagenz im Reagenzglas vermischen, 20 min bei Raumtemperatur stehen lassen,
 - mit 2 mL Farbreagenz versetzen, Reagenzglas verschließen u. gründlich durchmischen,
 - im Wasserbad (60 °C) 15 min erwärmen,
 - anschließend unter fließendem, kaltem Wasser rasch abkühlen (3 min) und
 - 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
 - UV-Messung: Quarzglas-Küvetten (3 mL) mit 1 cm Schichtdicke, Wellenlänge des Lichts: 561 nm,

Messung gegen einen Blindwert (Reinstwasser),
mit Spectrometer Lambda 40 (Perkin Elmer) und
Software UV Win-Lab

- **Auswertung:**

- Berechnung der Kalibrierfunktion und Erstellen der Kalibriergeraden mit Hilfe der Software Valoo[®].
- Berechnung der HyPro-Menge [μg] in 1 mL Messlösung (Valoo Ergebnis: $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Berechnung der HyPro-Menge [μg] je basolateralem Kompartiment (BL: 1,5 mL) bzw. je 0,5 mL Kollagenhydrolysat (K_P),

unter Berücksichtigung der Aufkonzentrierung bzw. Verdünnung:
Korrekturfaktoren der Proben aus BL:

K_N :	0,268
K_D :	37,500 (außer Test 7: 7,653)
P_T :	0,268
K_P :	100,000

Korrekturfaktoren der Proben aus AP:

P_T :	0,28
---------	------

- Angabe der HyPro-Menge [μg] je basolateralem Kompartiment (1,5 mL), nach Abzug der Menge, die von unbehandelten Caco-2 Zellen (K_N) gebildet wurde.
- Mittelwertbildung aus 3 bzw. 5-10 Messergebnissen, dies entspricht derselben Anzahl an Caco-2 Monolayern während der Transportstudie.
- Berechnung der Standardfehler (\pm S. E. bzw. \pm S. E. M.).
- Berechnung des Anteils an HyPro [%] der von den Caco-2 Monolayer aus dem AP ins BL transportiert wurde,
unter der Annahme, dass die Menge im apikalen Kompartiment derjenigen in 0,5 mL Originalsubstanz (K_P : s. Tabelle A-108, Test 4) entspricht.
Grundlage dieser Annahme: Die Reduzierung der HyPro-Menge im AP nach einer Transportstudie ist so gering, dass sie im Schwankungsbereich der Methode liegt.
- Berechnung der Kollagenhydrolysat-Menge [mg] je BL unter Berücksichtigung des im jeweiligen Test ermittelten durchschnittlichen HyPro Anteils [%] der Positiv-Kontrolle.

3.7.8 Bestimmung der Zellproliferation (BrdU-Test)

Messmethode

Proliferierende Zellen bauen das Pyrimidin-Analoga 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in ihre DNA ein. Nach einer Zellfixierung und Denaturierung der DNA binden zugefügte Antikörper (Anti-BrdU-Peroxidase) an das BrdU. Die ebenfalls gebundene Peroxidase (POD) spaltet das nachfolgend zugefügte Substrat in ein colorimetrisch messbares Produkt (s. Abbildung 3-20). Die Farbintensität korreliert direkt mit der DNA-Synthese proliferierender Zellen.

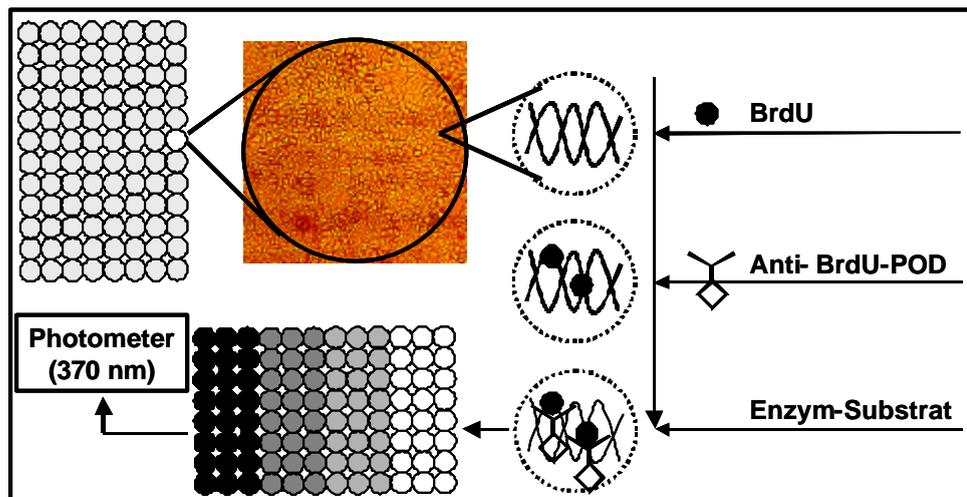


Abbildung 3-20: Sandwich-ELISA zum Nachweis proliferierender Zellen

(Eigene Darstellung nach Informationen des Testherstellers Roche Diagnostics GmbH¹³).

Dieser Sandwich ELISA wurde innerhalb der Zytotoxizitätsstudien zum Nachweis der Viabilität polymorphkerniger Leukozyten (PML) eingesetzt. Dazu wurden die PML aus der Mundhöhle gesunder Probanden gewonnen (Primärkultur, s. 3.3.2), isoliert, in 96-Kavitäten-MTP ausgesät und nachfolgend 4 bis 48 h mit der jeweiligen Testsubstanz inkubiert. Der Cell Proliferation ELISA wurde entsprechend dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt.

Standardprotokoll zur Durchführung des BrdU-Tests¹³:

- **Zellaussaat und Kultivierung:**
 - 96-Kavitäten-MTP mit flachen Böden.
 - PML unterschiedlicher Chargen.
 - Zellaussaat: 2×10^4 Zellen/100 μ L/Kavität (außer Leerwert).
 - Kultivierung unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂).
- **Testbedingungen:**
 - Zugabe der zweifachkonzentrierten Testlösungen (100 μ L) am Tag der Aussaat,

¹³ Modifiziert nach der Arbeitsvorschrift von Roche Diagnostics GmbH

- außer Leerwert, Negativ- und Hintergrund-Kontrolle,
- Inkubationsdauer: 4, (24, 48) h.
 - **Cell Proliferations ELISA (BrdU-Test):**
 - BrdU-Markierung:
 - 20 μ L BrdU-Markierungslösung je Kavität (außer Hintergrundkontrolle),
 - Inkubation: 24 h, unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂).
 - Entfernung der Markierungslösung:
 - Zentrifugation der MTP: 380 x g, 10 min, mit Bremse,
 - Dekantieren und Verwerfen des Zellkulturüberstands,
 - Trocknung des Zellsediments: 1 h, 60 °C.
 - Zellfixierung und DNA-Denaturierung:
 - 200 μ L FixDenat je Kavität,
 - Inkubation: 30 min, RT,
 - Entfernen der Lösung durch dekantieren.
 - Antikörperreaktion:
 - 100 μ L Anti-BrdU-Peroxidase je Kavität,
 - Inkubation: 90 min, RT,
 - Entfernen der überschüssigen Antikörper: 3 x Waschen mit 200 μ L Puffer.
 - Substratreaktion:
 - 100 μ L Substrat je Kavität
 - Inkubation: 2 bis 5 min, RT (Farbentwicklung).
 - Messung der Extinktion im ELISA-Photometer,
 - bei einer Wellenlänge von 370 nm (Referenzwellenlänge 492 nm),
 - gegen den Leerwert.
 - **Auswertung:**
 - Automatische Subtraktion des Leerwertes (Blank) von der Extinktion in Testkavitäten.
 - Bildung des Mittelwerts (MW) der Ergebnisse von mind. drei verschiedenen Kavitäten.
 - Berechnung des Standardfehlers (\pm S. E. M.) durch Bildung des Quotienten: MW durch Standardabweichung, korrigiert um die Anzahl der Messwiederholungen: \sqrt{n} .
 - Durchführung des Tukey-Tests (3.8): zur Identifizierung statistisch signifikanter Versuchsergebnisse.
 - Berechnung des Aktivitäts-Index AI_{BrdU} durch Bildung des Quotienten $MW_{\text{Extinktion}_{\text{Test}}} / MW_{\text{Extinktion}_{\text{Kontrolle}}}$ (Test/Kontrolle).

Der Aktivitäts-Index AI_{BrdU} kennzeichnet eine mögliche Veränderung der Zellproliferation durch Einwirkung der jeweiligen Testsubstanz. Hierbei gilt:

$AI_{\text{BrdU}} > 1,0$: Zunahme der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{\text{BrdU}} < 1,0$: Abnahme der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{\text{BrdU}} = 1,0$: Zur Kontrolle vergleichbare Zellproliferation.

3.7.9 Nachweis von Apoptose

Messmethode

Wird durch Inkubation viabler Caco-2 Zellen mit einer Testsubstanz Apoptose induziert, so entstehen intrazellulär charakteristische DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen). Diese werden durch chemische Zell-Lyse freigesetzt und nach Zentrifugation mit dem Kulturüberstand in eine streptavidinbeschichtete MTP übergeführt. Nachfolgend wird ein Gemisch aus zwei Antikörpern hinzugefügt. Das Anti-Histon-Biotin bindet einerseits an Streptavidin und andererseits an die Histone der DNA-Fragmente. Zusätzlich bindet die Anti-DNA-Peroxidase an diese DNA-Fragmente. Nachfolgend werden zunächst überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt und ein Substrat zugegeben, welches durch die Peroxidase in ein colorimetrisch messbares Produkt umgesetzt wird. Die Extinktion des ELISA-Photometers korreliert direkt mit dem Ausmaß der Apoptose-spezifischen DNA-Fragmentierung (s. Abbildung 3-21).

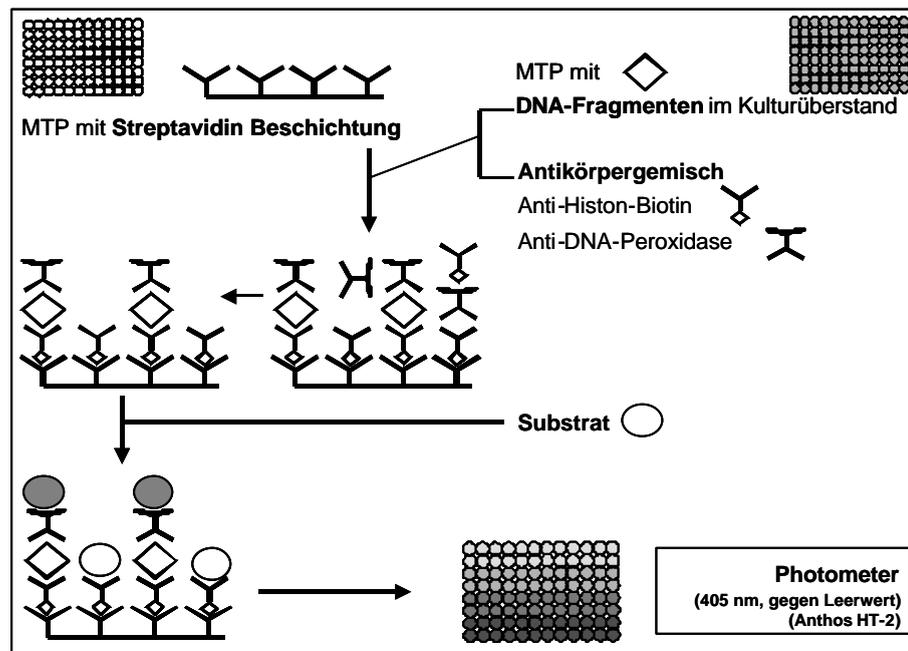


Abbildung 3-21: Sandwich-ELISA zum Nachweis von Apoptose

(Eigene Darstellung nach Informationen des Testherstellers Roche Diagnostics GmbH¹⁴).

Diese Methode ist zur Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose geeignet, in dem die Zellkulturüberstände der betreffenden Kavitäten vor (I) und nach (II) chemischer Zell-Lyse entnommen und im Sandwich-ELISA-Verfahren untersucht werden. Nekrose liegt vor, wenn das Detektionssignal der Probe I signifikant größer ist als das der Probe II einer Kavität.

Der Test wurde entsprechend dem nachfolgenden Standardprotokoll durchgeführt.

Standardprotokoll zum Nachweis von Apoptose¹⁴:• **Zellaussaat (d₀) und Kultivierung:**

- in 96-Kavitäten-MTP (I) mit flachen Böden,
- Zelldichte: Caco-2 Zellen: 1 x 10⁴ Zellen/200 µL (Kavität),
PML: 2 x 10⁴ Zellen/100 µL (Kavität).
- Leerwert: 200 µL Medium (keine Zellen).
- Kultivierung unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂):
A) proliferierende Caco-2 Zellen: 4 h.
B) differenzierte Caco-2 Monolayer: 10 Tage (d₀-d₁₀) mit
100 µL DMEM Austausch pro Kavität, jeden 2./3. Tag.
C) PML: direkt nach Aussaat Zugabe der Testsubstanzen, s. u..

• **Testbedingungen:**

- Zugabe der zweifachkonzentrierten Testsubstanzen
A) proliferierende Caco-2 Zellen: am Tag der Aussaat (d₀ + 4 h),
B) differenzierte Caco-2 Monolayer: am 10. Kulturtag (d₁₀):
Alle Kavitäten: Entnahme von 100 µL Überstand je Kavität.
Test-Kavitäten: Zugabe von 100 µL 2-fach konzentrierter Testlösung.
Kontrolle (K_N) u. BLANK: Zugabe von 100 µL Medium.
C) PML: direkt nach Zellaussaat (d₀):
Test-Kavitäten: Zugabe von 100 µL 2-fach konzentrierter Testlösung.
- Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) mit Testsubstanz: 24 h.

• **Apoptosetest (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}):**

- Entfernung des Zellkulturüberstandes:
 - Zentrifugation der MTP I (200 x g, 10 min).
 - Zellkulturüberstand verwerfen (dekantieren) bzw.
jeweils 100 µL in eine neue MTP II pipettieren, diese bei -24 °C lagern*,
MTP I erneut zentrifugieren und restlichen Überstand dekantieren.
- Chemische Zell-Lyse:
 - Zugabe von 200 µL Lysispuffer pro Kavität (MTP I) und 30 min inkubieren (RT).
 - Zentrifugation der MTP I (200 x g, 10 min).
- Antikörperreaktion:
 - 20 µL Überstand/Kavität (MTP I) in eine streptavidinbeschichtete MTP III überführen,
 - zusätzlich: Positiv-Kontrolle: 20 µL/Kavität DNA-Histon-Komplex,
 - 80 µL/Kavität Antikörpergemisch (Anti-Histon-Biotin, Anti-DNA-Peroxidase),
 - MTP III mit Klebefolie verschließen,
2 h inkubieren (RT) unter ständigem Rütteln (300 rpm).
- Substratreaktion:
 - Überstände aus MTP III durch vorsichtiges dekantieren und ausklopfen entfernen,
 - Waschen: 4 x 200 µL/Kavität mit Puffer,

¹⁴ Modifiziert nach Arbeitsvorschrift von Roche Diagnostics GmbH

- Waschlösung durch dekantieren sorgfältig entfernen,
- Zugabe von 100 µL/Kavität Substratlösung (ABTS[#]) und
ca. 2 – 5 min Inkubation (RT) unter ständigem Rütteln (200 rpm).
[#] (2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
- Messung der Extinktion im ELISA-Photometer:
nach 0,5 min Standzeit,
bei einer Wellenlänge von 450 nm, (Referenzwellenlänge: 690 nm),
gegen den Leerwert (BLANK),
jede Substanz in mind. 3-facher Wiederholung.
- **Auswertung:**
 - Automatische Subtraktion des Leerwertes (Blank) von der Extinktion in Testkavitäten.
 - Bildung des Mittelwerts (MW) der Ergebnisse von mind. drei verschiedenen Kavitäten.
 - Berechnung des Standardfehlers (± S. E. M.) durch Bildung des Quotienten: MW durch Standardabweichung, korrigiert um die Anzahl der Messwiederholungen: \sqrt{n} .
 - Durchführung des Tukey-Tests (3.8): zur Identifizierung statistisch signifikanter Versuchsergebnisse.
 - Berechnung des Apoptose-Index AI_{Apoptose} durch Bildung des Quotienten
 $MW_{\text{Extinktion}_{\text{Test}}} / MW_{\text{Extinktion}_{\text{Kontrolle}}}$ (Test/Kontrolle).

Durch Berechnung des Apoptose-Index AI_{Apoptose} wurden Substanzen identifiziert, die in Humanzellen Apoptose induzieren. Hierbei galt:

$AI_{\text{Apoptose}} > 1,0$: Zunahme apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{\text{Apoptose}} < 1,0$: Abnahme apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

$AI_{\text{Apoptose}} = 1,0$: Vergleichbare Anzahl apoptotischer Zellen in Test- u. Kontrollkavitäten.

* Zur Unterscheidung zwischen den beiden Extremen Apoptose und Nekrose wurden Proben ausgewählt, die einen $AI_{\text{Apoptose}} > 1,0$ (mit signifikanten Unterschied zur Kontrolle) aufwiesen. Dazu wurde die MTP II (s. o.) aufgetaut und der Kulturüberstand (vor Zell-Lyse) der ausgewählten Proben, der Kontrolle und der Leerwerte unter Einsatz des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} untersucht. Nach Auswertung der Ergebnisse wurden die zwei AI_{Apoptose} einer jeden Probe mit einander verglichen: AI_{Apoptose} (I) vor und AI_{Apoptose} (II) nach Zell-Lyse. Beim Nachweis signifikanter Unterschiede galt:

AI_{Apoptose} (I) > AI_{Apoptose} (II): Es liegt Nekrose vor.

AI_{Apoptose} (I) < AI_{Apoptose} (II): Es liegt Apoptose vor.

AI_{Apoptose} (I) = AI_{Apoptose} (II): Eine Unterscheidung zwischen den extremen Formen des Zelltods kann nicht vorgenommen werden.

3.8 Statistische Auswertung

3.8.1 Identifizierung von statistischen Ausreißern

Zur Identifizierung von statistischen Ausreißern wurde ein Arbeitsblatt genutzt, in welchem die Untersuchungen nach Graf/Henning, Dixon, Grubbs, Nalimov und Shapiro-Wilks integriert waren¹⁵. In diesen Tests wurden die Werte von drei, fünf oder sieben unabhängigen Messergebnissen untersucht und als statistischen Ausreißer angesehen, wenn diese in mindestens einem der Tests als solche identifiziert wurden.

3.8.2 Identifizierung von statistisch signifikanten Versuchsergebnissen

Die Ergebnisse wurden aus mindestens drei Messwiederholungen als Mittelwerte \pm S. E. M. berechnet. Anschließend wurde zur Identifizierung statistisch signifikanter Versuchsergebnisse der Tukey-Test durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle angegeben. Die Ergebnisse wurden nach Signifikanzniveaus von * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ unterschieden. Die Berechnungen und die statistische Analyse erfolgten mit Hilfe der Software StatMost (DataMost Corporation, Salt Lake City, USA).

¹⁵ Gottwald, W., 2001

4 Ergebnisse

Das Hauptzellkultursystem dieser Arbeit waren Caco-2 Zellen (s. 3.3.1). Außerdem wurden in den Zytotoxizitätsstudien polymorphkernige Leukozyten (PML, Primärkultur) eingesetzt (s. 3.3.2). Die Ergebnisse der verschiedenen Tests (3.7) wurden bevorzugt als Indizes angegeben. Dazu wurden zunächst die Mittelwerte der Einzelergebnisse (\pm S. E. M.) berechnet (s. Anhang) und nachfolgend die Quotienten aus Testergebnis und Ergebnis der Negativ-Kontrolle (Test/Kontrolle). Dabei galt:

Quotient > 1: stimulierender Effekt

Quotient = 1: kein Effekt

Quotient < 1: inhibierender Effekt.

Statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle wurden mittels Tukey-Test (3.8) identifiziert und durch Sternchen (*) gekennzeichnet, wobei galt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.1 Zytotoxizitätsstudien

Innerhalb der Zytotoxizitätsstudie wurden zwei Screening-Tests (s. 4.1.2, 4.1.5) durchgeführt. Hierbei wurden als Probenmaterial Milchproteinfraktionen (gelöst in HPLC-Analysenpuffer) und daraus hergestellte Hydrolysate (s. 3.5.1) bzw. synthetische Peptide (s. 3.5.2) eingesetzt. Außerdem wurde mit weiteren zellchemischen Methoden die Wirkung ausgewählter Hydrolysate (s. 4.1.3) und synthetischer Peptide (s. 4.1.6) auf Humanzellen untersucht.

4.1.1 Vorversuche: Wirkung von DMSO, HPLC-Analysenpuffer und N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin

Zunächst wurde die Wirkung der Testsubstanz-Lösemittel auf Humanzellen untersucht und die Eignung von N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado) als Positiv-Kontrolle für Zytotoxizitätsstudien an differenzierten Caco-2 Monolayern überprüft.

DMSO

Die Wirkung von DMSO auf Humanzellen wurde in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und Konzentration untersucht. DMSO reduzierte die metabolische Aktivität differenzierter Caco-2 Monolayer im Vergleich zur Negativ-Kontrolle Konzentrations-abhängig (1,9 bis 3,2 mol/L), veränderte den TEER in Abhängigkeit von der Kulturdauer und reduzierte nach 24 h Inkubation die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung (s. Abbildung 4-1, Abbildung 4-2).

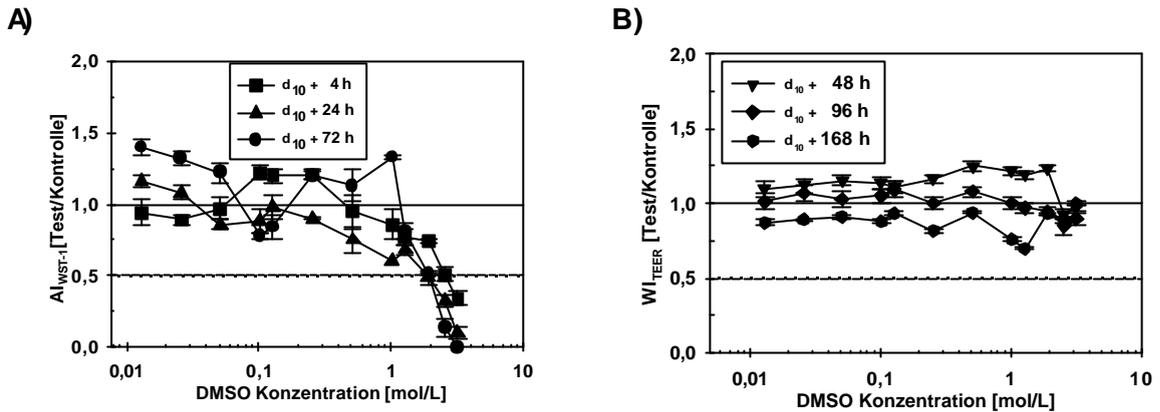


Abbildung 4-1: Effekte (AI_{WST-1} , WI_{TEER}) einer Inkubation mit DMSO auf A) die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und B) den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (10., 13. Passage) in A) 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) bzw. B) Transwell® Clear MTP (12 Inserts je $1 \times 10^5/cm^2$), 10 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 4 – 168 h Inkubation mit 0,01 bis 3,2 mol/L DMSO, nachfolgend Durchführung A) des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.) bzw. B) der TEER-Messung (bei RT, s. 3.7.3). Messergebnisse s. Tabelle A-15 und Tabelle A-16.

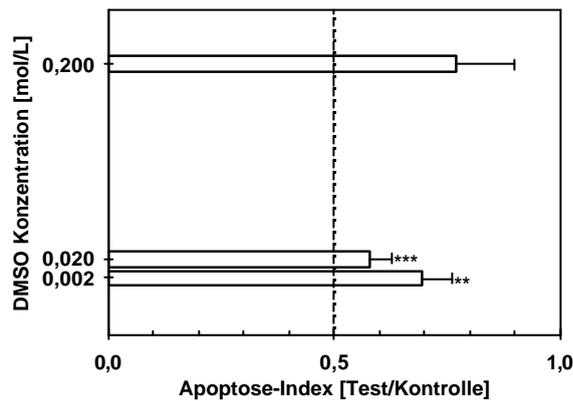


Abbildung 4-2: Effekte ($AI_{Apoptose}$) einer Inkubation mit DMSO auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (13. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), 10 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 24 h Inkubation mit 0,002 bis 0,2 mol/L DMSO, nachfolgend Durchführung des Nachweis von Apoptose (s. 3.7.8). Messergebnisse s. Tabelle A-17.

0,01 bis 3,2 mol/L DMSO hemmte nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen und von PML. Die DNA-Biosynthese von PML wurde Konzentrations-abhängig (1,9 – 3,2 mol/L) gehemmt. Die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung wurde durch DMSO im Vergleich zur Negativ-Kontrolle in PML nicht moduliert und in proliferierenden Caco-2 Zellen reduziert (s. Abbildung 4-3).

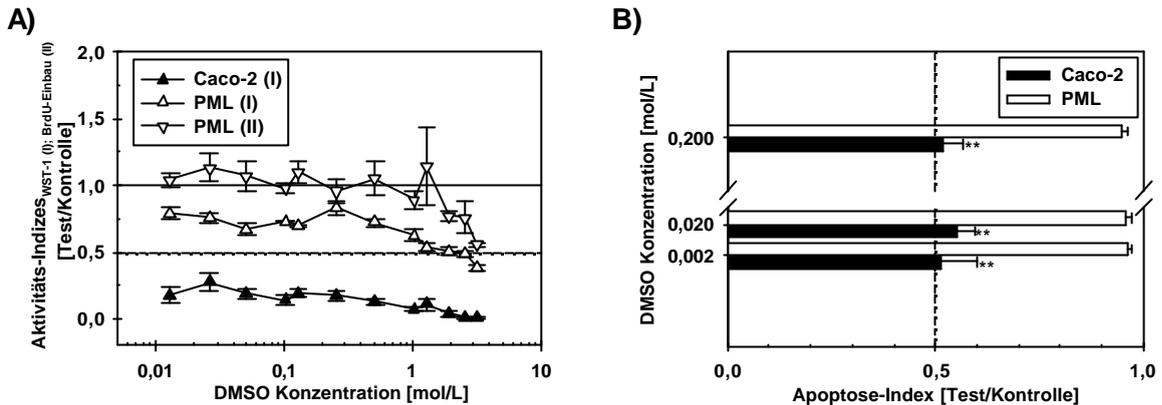


Abbildung 4-3: Effekte (AI_{WST-1} , $AI_{BrdU-Einbau}$, $AI_{Apoptose}$) einer Inkubation mit DMSO auf A) die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und Proliferation (BrdU-Test) und B) die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender Caco-2 Zellen und PML

Zellaussaat (Caco-2 Zellen: 13. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und 24 h Exposition mit 0,01 bis 3,2 mol/L DMSO, nachfolgend Durchführung A) (I) des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.) und (II) des BrdU-Tests (s. 3.7.7) bzw. B) des Nachweis von Apoptose (s. 3.7.8). Messergebnisse A) s. Tabellen A-18, A-19 bzw. B) s. Tabelle A-17.

HPLC-Analysenpuffer

Der HPLC-Analysenpuffer (0,2 bzw. 0,5 mmol/L, Lösemittel der Milchproteinhydrolysate), wurden in einem Volumen von 1 bis 10 μ L pro Kavität eingesetzt. Die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen wurde durch diese Puffer moduliert. AI_{WST-1} kleiner 0,5 wurden ausschließlich nach Inkubation mit 0,5 mol/L Puffer ermittelt (s. Abbildung 4-4).

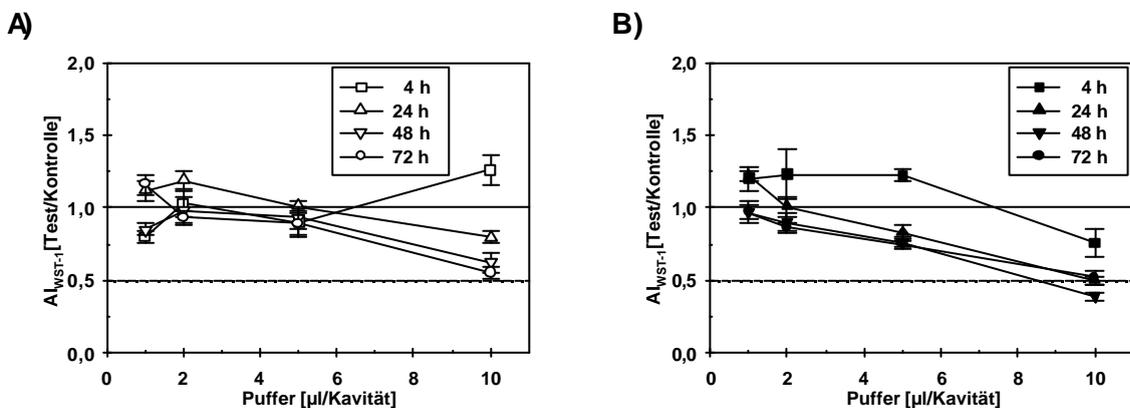


Abbildung 4-4: Effekte einer Inkubation mit A) 0,2 mol/L und B) 0,5 mol/L HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

Zellaussaat (11. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und 4 – 72 h Exposition mit A) 0,2 bzw. B) 0,5 mol/L Puffer (1 bis 10 μ L/Kavität), nachfolgend Durchführung des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.). Messergebnisse s. Tabelle A-20.

Die metabolische Aktivität differenzierter Caco-2 Monolayer wurde durch den HPLC-Analysenpuffer in Abhängigkeit von der Kulturdauer vorwiegend gehemmt. Es wurden ausschließlich AI_{WST-1} größer 0,5 ermittelt (s. Abbildung 4-5).

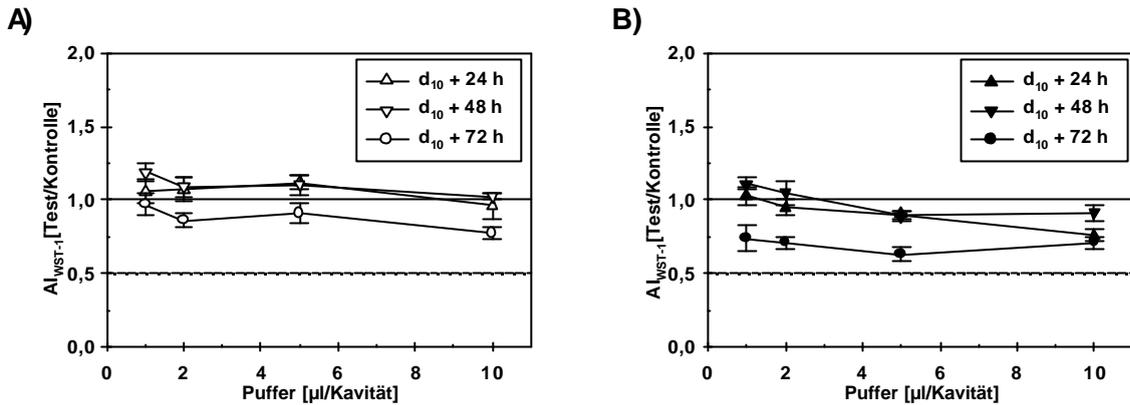


Abbildung 4-5: Effekte einer Inkubation mit A) 0,2 mol/L und B) 0,5 mol/L HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (13. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 24 – 72 h Exposition mit A) 0,2 bzw. B) 0,5 mol/L Puffer (1 bis 10 µl/Kavität), nachfolgend Durchführung des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.). Messergebnisse s. Tabelle A-21.

Der HPLC-Analysenpuffer hemmte die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, in Abhängigkeit von der Kulturdauer (s. Abbildung 4-6; A). Die DNA-Neusynthese wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle stimuliert, außer nach 24 h Inkubation mit 0,2 mol/L Puffer (s. Abbildung 4-6; B).

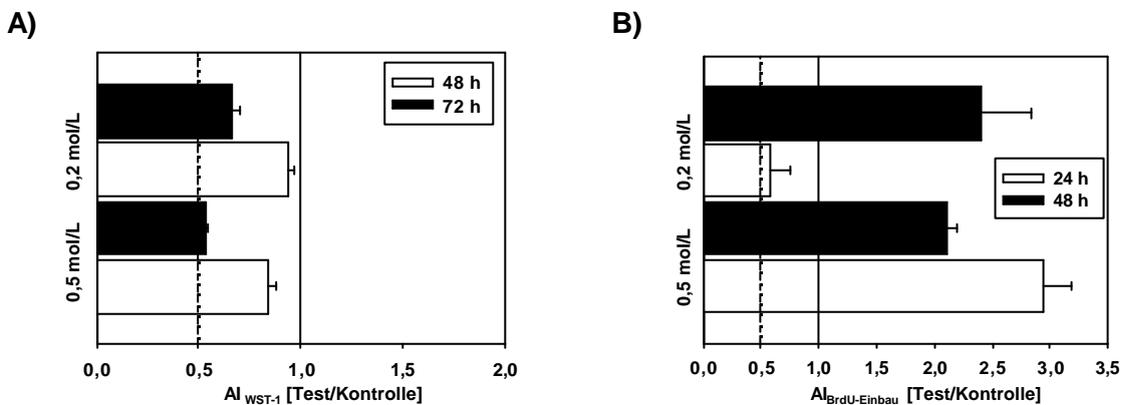


Abbildung 4-6: Effekte einer Inkubation mit HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und DNA-Neusynthese (BrdU-Test) von PML

Zellaussaat in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und 24 – 72 h Exposition mit 0,2 bzw. 0,5 mol/L Puffer (10 µl/Kavität), nachfolgend Durchführung A) des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.) und B) der Bestimmung der Zellproliferation (s. 3.7.7). Messergebnisse s. Tabelle A-22.

N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado)

Ip6Ado zeigte eine Zeit- und Konzentrations-abhängige Wirkung auf die Viabilität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer): 1 mmol/L ip6Ado zerstörte nach ca. 24 h Inkubation den zuvor nachweislich intakten Monolayer (mikroskopische Beobachtung). Der TEER sowie die metabolische Aktivität wurden nach Inkubation mit 0,5 bis 1 mmol/L ip6Ado im Vergleich zur Negativ-Kontrolle signifikant ($p < 0,001$) reduziert (s. Abbildung 4-7). Nachfolgend wurde 1 mmol/L ip6Ado in den Zytotoxizitätsstudien als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

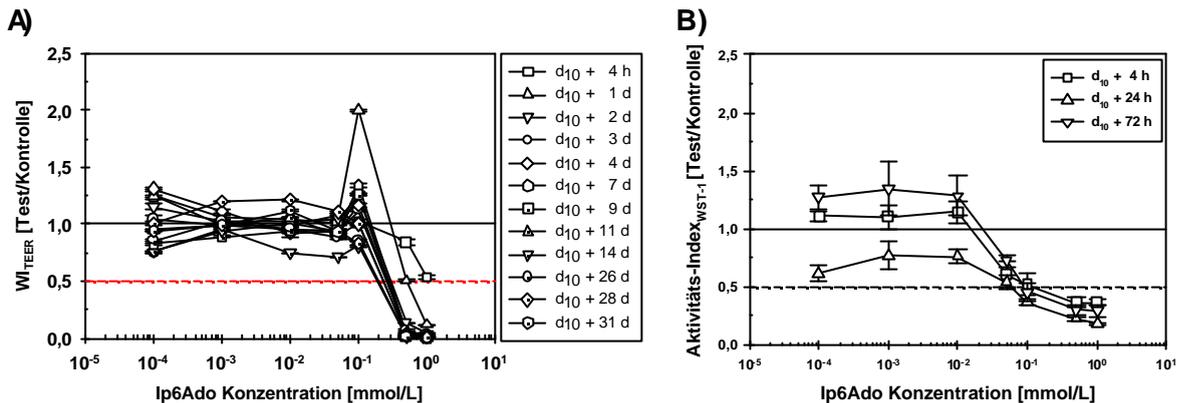


Abbildung 4-7: Effekte einer Inkubation mit ip6Ado auf die Zeit-abhängige Veränderung des TEER bzw. der metabolischen Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (39. Passage) in A) Transwell®-Clear-Kit ($10^5/\text{cm}^2$) und B) in 96-Kavitäten-MTP ($2 \times 10^4/\text{Kavität}$), 10 d Zellkultivierung in DMEM, unter Standardbedingungen (s. 3.6) und anschließend Exposition mit 0,0001 bis 1,0 mmol/L ip6Ado, nachfolgend Durchführung A) der TEER-Messung (bei RT, s. 3.7.3) und B) des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.). Messergebnisse s. Tabelle A-23 bis Tabelle A-27.

4.1.2 Screening ACE-inhibitorischer Hydrolysate von Milchproteinfraktionen

In diesem Screening-Test wurde die Wirkung der in HPLC-Analysenpuffer gelösten Milchproteinfraktionen und daraus hergestellten Hydrolysate unterschiedlichen Hydrolysegrades (HG [%]) (79/79: ohne/mit simulierter gastrointestinaler Verdauung (sGIV), s. 3.5.1) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen, differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) und PML nach 72 h Inkubation untersucht. Dazu wurden unter Einsatz des jeweiligen Mediums die Verdünnungsstufen (VS) 1 und 2 hergestellt (s. Tabelle 3-12). Der Proteingehalt der höher konzentrierten Testlösungen (VS 1) lag zwischen 0,6 bis 1,1 mg/mL (s. Tabellen 3-2 bis 3-4). Diese Testlösungen wurden nachfolgend 10-fach verdünnt (VS 2).

Die vom Projektpartner bereitgestellten Milchproteinfraktionen (Substrate) entstammten unterschiedlichen Ansätzen, weshalb jeweils vier voneinander abweichende Ergebnisse derselben Testsubstanz ermittelt wurden (s. Tabelle 4-1, Tabelle 4-2). Diese Unterschiede

waren durch den Einsatz der Lösemittel (0,5 bzw. 0,2 mol/L HPLC-Analysenpuffer, s. 4.1.1) bzw. unterschiedlicher Zellpassagen begründet.

Tabelle 4-1: Effekte (Al_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

Proliferierende Caco-2 Zellen wurden 72 h inkubiert mit Milchproteinfraktionen, die z. T. einer simulierten gastrointestinalen Verdauung (mit / ohne sGIV) unterzogen wurden. Diese Testsubstanzen wurden in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen (VS) eingesetzt (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen. Die Proteingehalte sind in Tabellen 3-2 bis 3-4 aufgeführt. In dieser Tabelle werden die berechneten Mittelwerte der Al_{WST-1} aufgeführt, die nachfolgend zur Berechnung der RZI eingesetzt wurden (s. Tabelle 4-3 bis Tabelle 4-8). Berechnungsgrundlage dieser Al_{WST-1} sind die Messergebnisse der Tabellen A-28, A-29. Statistisch signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle (Tukey-Test, 3,8) wurden mit *** $p < 0,001$ gekennzeichnet. Abkürzungen: sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen, β -Lg.: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75, Na-CN: Natrium-Caseinat.

		Mit sGIV				Ohne sGIV			
		VS 2		VS 1		VS 2		VS 1	
		Al_{WST-1} MW \pm S.E.M.							
MTP 1	b-Lg.	0,764***	$\pm 0,024$	0,134***	$\pm 0,015$	0,977***	$\pm 0,015$	0,196***	$\pm 0,013$
MTP 2	b-Lg.	0,611***	$\pm 0,029$	0,126***	$\pm 0,004$	0,335***	$\pm 0,030$	0,174***	$\pm 0,011$
MTP 3	WPC 75	1,101***	$\pm 0,069$	0,779***	$\pm 0,010$	-	-	-	-
MTP 4	WPC 75	0,969***	$\pm 0,048$	0,413***	$\pm 0,046$	0,982***	$\pm 0,012$	0,582***	$\pm 0,031$
MTP 5	WPC 75	-	-	-	-	0,985***	$\pm 0,040$	0,479***	$\pm 0,055$
MTP 6	WPC 75	0,795***	$\pm 0,058$	0,590***	$\pm 0,077$	0,842***	$\pm 0,077$	0,201***	$\pm 0,010$
MTP 7	WPC 75	0,752***	$\pm 0,038$	0,345***	$\pm 0,034$	0,775***	$\pm 0,030$	0,559***	$\pm 0,065$
MTP 8	WPC 75	-	-	-	-	-	-	-	-
MTP 9	b-Lg.	0,691***	$\pm 0,034$	0,164***	$\pm 0,008$	0,692***	$\pm 0,095$	0,174***	$\pm 0,006$
MTP 10	b-Lg.	0,918***	$\pm 0,001$	0,431***	$\pm 0,030$	0,777***	$\pm 0,039$	0,442***	$\pm 0,010$
MTP 11	Na-CN	1,002***	$\pm 0,052$	0,585***	$\pm 0,025$	1,139***	$\pm 0,012$	0,779***	$\pm 0,065$
MTP 12	Na-CN	1,149***	$\pm 0,062$	0,656***	$\pm 0,102$	0,588***	$\pm 0,050$	0,851***	$\pm 0,095$
MTP 13	Na-CN	1,218***	$\pm 0,035$	0,631***	$\pm 0,068$	1,502***	$\pm 0,081$	0,960***	$\pm 0,043$
MTP 14	Na-CN	0,796***	$\pm 0,062$	0,656***	$\pm 0,091$	1,354***	$\pm 0,052$	0,796***	$\pm 0,100$

Tabelle 4-2: Effekte (Al_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen auf die metabolische Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) bzw. polymorphkerniger Leukozyten

Differenzierte Caco-2 Zellen bzw. polymorphkernige Leukozyten wurden 72 h inkubiert mit Milchproteinfraktionen, die z. T. einer simulierten gastrointestinalen Verdauung (mit / ohne sGIV) unterzogen wurden. Diese Testsubstanzen wurden in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen (VS) eingesetzt (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen. Die Proteingehalte sind in Tabellen 32 bis 34 aufgeführt. In dieser Tabelle werden die berechneten Mittelwerte der Al_{WST-1} aufgeführt, die nachfolgend zur Berechnung der RZI eingesetzt wurden (s. Tabelle 4-9 bis Tabelle 4-14 bzw. Tabelle 4-15 bis Tabelle 4-20). Berechnungsgrundlage dieser Al_{WST-1} sind die Messergebnisse der Tabellen A-30, A-31 bzw. A-32, A-33. Statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3,8) wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gekennzeichnet. Abkürzungen: VS: Verdünnungsstufen, β -Lg.: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75, Na-CN: Natrium-Caseinat.

		Mit sGIV				Ohne sGIV			
		VS 2		VS 1		VS 2		VS 1	
		Differenzierte Caco-2 Zellen							
		Al_{WST-1} MW \pm S.E.M.							
MTP 1	b-Lg.	0,914	$\pm 0,041$	0,623	$\pm 0,044$	0,910**	$\pm 0,016$	0,789***	$\pm 0,022$
MTP 2	b-Lg.	0,609***	$\pm 0,072$	0,627***	$\pm 0,027$	0,718	$\pm 0,095$	0,373***	$\pm 0,075$
MTP 3	WPC 75	1,055	$\pm 0,085$	0,750**	$\pm 0,053$	-	-	-	-
MTP 4	WPC 75	0,873***	$\pm 0,043$	0,688**	$\pm 0,065$	0,907	$\pm 0,016$	0,599***	$\pm 0,045$
MTP 5	WPC 75	-	-	-	-	0,931	$\pm 0,098$	0,669**	$\pm 0,053$
MTP 6	WPC 75	0,736*	$\pm 0,070$	0,534***	$\pm 0,064$	0,784	$\pm 0,063$	0,313***	$\pm 0,015$
MTP 7	WPC 75	0,734	$\pm 0,066$	0,538***	$\pm 0,015$	0,997	$\pm 0,113$	0,392***	$\pm 0,012$
MTP 8	WPC 75	-	-	-	-	-	-	-	-
MTP 9	b-Lg.	0,854**	$\pm 0,033$	0,588***	$\pm 0,014$	0,774***	$\pm 0,009$	0,519**	$\pm 0,078$
MTP 10	b-Lg.	0,764	$\pm 0,065$	0,453***	$\pm 0,075$	0,773**	$\pm 0,044$	0,575***	$\pm 0,048$
MTP 11	Na-CN	0,924	$\pm 0,088$	0,746	$\pm 0,102$	0,821	$\pm 0,057$	0,674**	$\pm 0,047$
MTP 12	Na-CN	1,086	$\pm 0,057$	0,625**	$\pm 0,064$	0,512***	$\pm 0,028$	0,652***	$\pm 0,046$
MTP 13	Na-CN	0,551**	$\pm 0,067$	0,670***	$\pm 0,020$	0,973	$\pm 0,051$	0,701	$\pm 0,142$
MTP 14	Na-CN	0,430***	$\pm 0,027$	0,472***	$\pm 0,044$	0,868**	$\pm 0,025$	0,490**	$\pm 0,074$
		Polymorphkernige Leukozyten							
		Al_{WST-1} MW \pm S.E.M.							
MTP 1	b-Lg.	0,930	$\pm 0,031$	0,848	$\pm 0,041$	0,839	$\pm 0,066$	0,698***	$\pm 0,019$
MTP 2	b-Lg.	0,931	$\pm 0,053$	0,916	$\pm 0,032$	0,829	$\pm 0,071$	0,712***	$\pm 0,029$
MTP 3	WPC 75	0,829	$\pm 0,061$	0,783**	$\pm 0,042$	-	-	-	-
MTP 4	WPC 75	0,727***	$\pm 0,011$	0,777***	$\pm 0,023$	0,750**	$\pm 0,046$	0,936	$\pm 0,039$
MTP 5	WPC 75	-	-	-	-	0,713***	$\pm 0,027$	0,643***	$\pm 0,016$
MTP 6	WPC 75	0,808**	$\pm 0,031$	0,834	$\pm 0,004$	0,728***	$\pm 0,038$	0,774***	$\pm 0,027$
MTP 7	WPC 75	0,798***	$\pm 0,014$	0,883***	$\pm 0,052$	0,713**	$\pm 0,046$	0,564**	$\pm 0,066$
MTP 8	WPC 75	-	-	-	-	-	-	-	-
MTP 9	b-Lg.	0,995	$\pm 0,025$	0,930	$\pm 0,065$	1,004	$\pm 0,060$	0,864	$\pm 0,035$
MTP 10	b-Lg.	1,226	$\pm 0,080$	1,239	$\pm 0,082$	0,903**	$\pm 0,018$	1,019	$\pm 0,092$
MTP 11	Na-CN	1,088	$\pm 0,038$	0,952	$\pm 0,044$	0,281	$\pm 0,241$	0,859*	$\pm 0,043$
MTP 12	Na-CN	1,073	$\pm 0,048$	1,011	$\pm 0,024$	0,055***	$\pm 0,022$	1,240*	$\pm 0,071$
MTP 13	Na-CN	1,013	$\pm 0,036$	0,933	$\pm 0,148$	1,012	$\pm 0,054$	1,148	$\pm 0,088$
MTP 14	Na-CN	0,894	$\pm 0,041$	1,070	$\pm 0,091$	0,821***	$\pm 0,012$	0,909	$\pm 0,086$

Die untersuchten Milchproteinfraktionen wiesen überwiegend eine hemmende Wirkung auf die metabolische Aktivität der Humanzellen auf; es wurden Al_{WST-1} kleiner 1 ermittelt (s. Tabellen A28 bis A-33). Da diese Milchproteinfraktionen Lebensmittel sind, von denen keine zytotoxischen Effekte in vivo bekannt sind, war es notwendig, eine Grenze zwischen

zytochemisch irrelevanten *in vitro* hemmenden Effekten und einem zytotoxischen Potenzial festzulegen. Als solche wurden AI_{50} -Werte ($AI_{WST-1} = 0,5$) definiert, die nach Einsatz von Testsubstanzen in physiologisch relevanten Konzentrationen und Inkubationszeiten ermittelt wurden.

Auch nach Berücksichtigung des AI_{50} wurden *in vitro* zytotoxische Effekte der Milchproteinfraktionen auf jeweils mindestens eins der eingesetzten Humanzellkultursysteme ermittelt. Diese nach Durchführung des WST-1 Tests erhaltenen Ergebnisse wurden als falsch positiv angesehen, da Milchproteine Lebensmittel sind, die nachweislich nicht toxisch sind. Deshalb wurde nachfolgend die Wirkung der Milchproteinfraktionen (Substrate: s. Tabellen A-28 bis A-33) bei der Beurteilung der Wirkung der entsprechenden Hydrolysate (s. Tabellen A-34 bis A-51) auf Humanzellen berücksichtigt, indem der Relative Zytotoxizitäts-Index (RZI) [$AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})$] eingeführt wurde. Gleichzeitig wurde festgelegt, dass analog dem AI_{50} der RZI_{50} die Grenze zwischen zytochemisch irrelevanten *in vitro* hemmenden Effekten und einem zytotoxischen Potenzial markiert. Demnach weisen RZI kleiner bzw. gleich 0,5 auf ein potenziell zytotoxisches Hydrolysat (*in vitro*) hin.

Die Mehrzahl der untersuchten Hydrolysate wiesen unter Berücksichtigung des RZI_{50} keine zytotoxischen Effekte auf proliferierende bzw. differenzierte Caco-2 Zellen sowie PML auf (s. Tabelle 4-3 bis Tabelle 4-20), wobei die Anwendung des WST-1 Tests kritisch gesehen werden muss. Eine potenziell zytotoxische Wirkung auf Humanzellen wurde für die in Tabelle 4-21 aufgeführten Hydrolysate nachgewiesen.

Tabelle 4-3: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-1. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4).

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase 7089			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,08	1,05	2,11	0,65	0,97	0,51	1,15	0,70
2	0,97	1,23	1,45	1,20				
3	1,05	1,08	1,88	1,13				
4	1,02	1,01	1,91	1,25	0,98	0,58	1,25	1,07
5	1,17	1,25	1,67	1,35				
6					0,84	0,84	1,01	0,80
7	1,00	1,06	2,93	1,34				
8					1,09	1,29	1,00	0,60
9					1,31	1,16	0,87	0,72
10	0,86	1,10	2,05	1,20	1,11	1,00	0,94	0,91
12,85	1,28	1,09	2,05	1,28				
	Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) [$AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})$]							

Tabelle 4-4: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-1. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4).

HG [%]	Enzym Protamex				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,19	1,69	1,05	1,07	1,08	2,23	0,89	1,54
2					1,12	1,87	0,98	2,04
3					1,23	1,69	0,76	1,07
4	0,77	2,01	1,09	1,58	1,13	1,45	0,84	0,96
5					1,27	1,40	0,97	1,54
6	1,31	1,48	1,05	1,15	1,27	1,69	0,91	0,86
6,69					1,07	1,43	0,79	1,09
8	1,04	0,91	1,06	1,09				
9	0,93	2,26	0,80	1,19				
10	1,04	0,83	0,67	1,10				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-5: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten, auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-1. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4), ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase PNL			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
3					1,05	0,83	0,92	0,35
4	1,12	1,12	1,06	1,62				
5					1,15	0,70	0,92	2,16
7					1,24	1,03	0,91	1,23
8	0,90	0,78	1,10	1,59				
10	0,89	0,91	1,21	1,47	1,26	0,95	1,02	2,25
12	0,71	0,88	1,29	1,52	1,43	0,79	0,92	2,76
14	1,10	0,71	0,95	1,25				
15					1,01	0,47***	0,77	1,00
16	1,00	0,94	1,36	1,17				
18	1,40	0,62	1,28	1,13				
20	1,42	1,07	1,23	1,03				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-6: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten, auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-1. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Corolase PP				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1					1,03	0,81	1,13	1,12
2					0,81	0,77	1,04	1,39
3	1,19	0,98	1,30	0,62	0,93	0,57	1,07	1,14
4					0,93	0,61	0,94	1,05
5	0,97	1,85	0,97	0,83	0,88	0,52	0,87	0,75
6					0,81	0,47***	0,79	1,04
7	1,37	1,37	1,43	1,29				
8					1,03	0,81	1,08	1,23
10	0,91	0,86	1,30	0,67				
12	1,29	1,44	1,03	1,13				
14	1,12	0,78	1,05	0,68				
16	1,33	1,08	1,31	1,08				
18	1,12	0,88	1,47	0,76				
22	1,03	0,72	1,50	0,38**				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) [AI_{WST-1}(Hydrolysat)/AI_{WST-1}(Substrat)]

Tabelle 4-7: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-1. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Corolase 7089				Enzym Corolase L 10			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,06	0,79	0,84	0,52	0,73	0,68	0,84	0,28***
2					1,10	0,65	0,78	0,22***
3					0,78	0,52	0,90	0,25***
4	0,85	0,75	0,88	0,47***				
4,095					1,43	0,82	0,75	0,47
6	1,03	0,69	0,77	0,57				
10	0,45***	0,72	0,78	0,68				
12	1,06	0,79	0,71	0,55				
16,78	0,82	0,38***	0,83	0,77				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) [AI_{WST-1}(Hydrolysat)/AI_{WST-1}(Substrat)]

Tabelle 4-8: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) –hydrolysaten, auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-1. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3,8).

HG [%]	Enzym Corolase PNL				Enzym Protamex			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,03	0,67	1,16	0,85	1,13	0,89	1,96	0,97
4	1,08	1,26	1,05	0,71	0,15	1,02	1,69	0,54
6	1,08	1,12	0,96	0,53	1,10	1,21	1,31	0,01***
8	1,31	1,49	0,89	0,28***				
10	1,05	0,92	1,11	0,42***	1,05	0,58	1,46	0,20***
12	1,00	1,33	0,86	0,51	1,10	0,61	1,92	0,22***
15					0,04	1,07	1,97	0,31***

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-9: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3,8).

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase 7089			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,34	0,99	1,08	1,18	1,06	0,82	1,25	1,06
2	1,75	1,01	1,05	1,19				
3	1,86	0,63	1,28	1,08				
4	0,88	1,12	0,81	1,84	0,86	1,24	0,94	0,38**
5	1,27	1,10	1,47	1,53				
6					1,18	1,26	1,09	0,94
7	1,54	0,83	1,39	2,31				
8					1,25	1,46	1,20	0,56
9					1,01	0,96	1,20	0,75
10	1,77	0,71	1,41	1,84	0,89	1,16	1,04	0,29***
12.85	1,07	0,53	0,75	1,81				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-10: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Protamex				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,97	0,63	1,08	1,09	1,18	1,14	1,40	1,17
2					1,26	0,91	1,11	0,74
3					0,91	1,08	0,61	0,68
4	0,62	0,93	0,91	0,89	0,86	1,29	0,90	0,85
5					1,11	1,16	1,21	0,68
6	0,94	0,83	0,99	1,00	1,38	1,07	0,77	0,86
6,69					0,79	0,93	0,95	0,49***
8	0,88	1,01	1,03	1,04				
9	0,90	0,62	0,98	0,90				
10	0,73	1,00	1,02	0,83				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[Al_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/Al_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-11: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ermittelt (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase PNL			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
3					0,83	0,71	0,83	1,37
4	0,99	1,00	1,18	0,65				
5					0,95	0,97	0,88	0,96
7					0,86	0,89	0,77	1,25
8	1,08	1,10	0,61	0,95				
10	1,03	0,92	1,05	0,88	1,01	0,76	0,96	1,16
12	1,14	0,89	1,01	0,73	0,63	0,76	0,95	1,43
14	0,85	0,64	1,03	0,80				
15					0,70	0,83	1,03	1,06
16	1,04	0,77	0,91	0,86				
18	0,86	0,91	0,91	0,87				
20	1,17	0,86	1,02	0,88				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[Al_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/Al_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-12: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle ermittelt (Tukey-Test, 3,8).

HG [%]	Enzym Corolase PP				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1					0,95	0,98	0,94	1,24
2					0,76	0,82	1,22	1,32
3	0,93	0,82	0,74	1,34	0,59	0,62	1,12	1,34
4					0,71	0,82	0,99	1,21
5	1,00	1,09	0,87	1,12	0,80	0,85	0,93	1,12
6					0,86	0,83	0,97	1,16
7	1,17	1,11	0,94	1,35				
8					0,96	1,01	1,11	1,49
10	1,04	0,95	0,91	1,38				
12	0,98	0,76	0,96	1,23				
14	0,75	0,78	0,62	1,39				
16	0,97	0,72	0,99	1,44				
18	0,94	1,13	1,00	1,36				
22	0,95	0,90	0,88	0,99				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-13: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle (Tukey-Test, 3,8).

HG [%]	Enzym Corolase 7089				Enzym Corolase L 10			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,13	0,55	1,09	1,05	0,48***	0,85	0,65	1,28
2					1,12	1,37	0,96	1,15
3					1,26	1,27	1,05	1,16
4	1,58	1,21	1,04	0,78				
4,095					1,20	1,35	0,98	0,79
6	1,59	0,62	0,98	1,10				
10	0,89	0,54	1,01	0,88				
12	1,72	0,46***	0,58	0,80				
16,78	1,43	0,81	0,77	0,78				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-14: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Corolase PNL				Enzym Protamex			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,96	0,76	0,69	0,94	0,93	0,74	1,29	1,05
4	0,71	1,06	1,03	0,65	0,64	1,08	1,35	0,54
6	0,88	0,88	0,94	0,71	1,00	1,18	1,94	1,09
8	0,95	0,82	0,93	0,91				
10	0,94	0,51	0,99	0,98	0,86	1,28	1,93	1,23
12	0,68	0,91	0,96	0,27***	1,06	0,97	2,20	1,02
15					0,69	1,16	2,24	0,87

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-15: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ermittelt (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase 7089			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,93	1,08	1,01	1,14	0,76	0,89	1,09	0,97
2	0,99	1,23	1,27	1,11				
3	0,89	0,95	1,01	1,20				
4	0,89	1,11	1,06	1,15	0,87	0,86	1,13	0,95
5	1,00	1,11	1,00	1,12				
6					0,89	0,86	1,20	1,07
7	0,92	1,08	1,02	1,24				
8					0,84	0,82	1,07	0,96
9					0,87	0,82	1,16	1,20
10	0,90	1,13	1,05	1,19	0,90	0,84	1,20	1,29
12,85	0,88	1,11	1,14	1,07				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-16: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Protamex				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,92	1,16	1,31	1,29	1,06	0,95	1,00	1,26
2					0,92	0,87	1,00	1,01
3					0,84	1,02	1,06	1,05
4	0,97	0,97	1,13	1,45	0,84	0,90	1,11	0,86
5					0,92	1,02	1,10	1,16
6	0,96	0,98	1,08	1,47	0,94	1,00	0,99	1,15
6,69					0,85	0,97	0,98	1,11
8	1,16	1,04	0,99	1,13				
9	0,98	1,05	1,06	1,21				
10	0,90	0,79	1,01	1,13				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-17: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase PNL			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
3					1,07	1,00	0,97	1,19
4	0,93	0,83	1,05	1,36				
5					1,00	0,96	1,03	0,94
7					1,08	0,99	1,14	0,93
8	1,01	0,79	1,13	1,40				
10	1,04	0,77	1,02	1,29	1,00	1,03	1,03	1,18
12	0,94	0,83	1,02	1,26	1,03	0,97	1,04	1,16
14	1,13	1,09	1,00	1,42				
15					0,90	0,96	1,13	1,38
16	0,97	0,92	1,08	1,22				
18	1,10	0,87	1,09	1,16				
20	1,04	0,86	0,96	1,23				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-18: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Corolase PP				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1					1,03	0,87	1,00	0,96
2					1,08	1,06	0,93	0,97
3	0,83	1,02	0,98	1,26	1,02	0,95	1,05	0,74
4					1,02	0,95	0,99	0,73
5	0,91	0,81	0,97	1,44	1,00	1,05	0,92	0,93
6					0,99	1,09	0,92	0,88
7	0,97	0,88	0,95	1,58				
8					1,13	1,16	0,91	0,78
10	0,93	0,91	1,27	1,86				
12	0,86	1,03	1,16	2,06				
14	0,94	0,86	1,37	1,93				
16	0,88	0,91	1,28	1,55				
18	0,91	0,88	1,20	1,66				
22	0,93	0,94	1,18	1,70				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-19: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Corolase 7089				Enzym Corolase L 10			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,03	1,20	0,16***	0,00	1,12	1,00	1,12	0,94
2					1,06	0,00***	0,02***	1,16
3					1,03	0,84	0,04	1,13
4	0,88	1,03	1,03	1,00				
4,095					1,11	0,76	1,23	0,80
6	0,88	1,01	1,39	0,98				
10	1,04	1,12	0,04***	1,01				
12	1,06	1,25	0,03***	0,01***				
16,78	1,04	1,14	0,02***	1,07				

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-20: Effekte (RZI) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) PML (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-2. Abkürzungen: HG: Hydrolysegrad, Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufen der Testsubstanzen (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen (Proteingehalte s. Tabellen 3-2 bis 3-4). ***p < 0,001 kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8).

HG [%]	Enzym Corolase PNL				Enzym Protamex			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,89	1,09	4,29	1,23	0,97	1,15	16,77	0,82
4	0,97	1,10	4,13	1,19	1,01	0,97	19,40	0,81
6	1,22	1,19	3,89	1,14	0,96	1,13	23,34	0,83
8	0,02***	1,23	3,80	1,14				
10	1,01	1,10		1,21	0,95	0,99	24,68	0,88
12	0,90	0,86	3,57	1,34	1,05	1,07	22,43	0,79
15					1,01	1,08	19,34	0,79

Relativer-Zytotoxizitäts-Index (RZI) $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysats})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$

Tabelle 4-21: Übersicht der Hydrolysate von Milchproteinen mit potenziell zytotoxischen Effekten (RZI) auf proliferierende bzw. differenzierte Caco-2 Zellen bzw. PML

Ergebnis-Zusammenfassung der Tabelle 4-3 bis Tabelle 4-20. Fettgedruckte Ergebnisse markieren die Testsubstanzen, deren Wirkung auf die DNA-Fragmentierung (s. 4.1.4) proliferierender Caco2 Zellen untersucht wurde. * p < 0,01 kennzeichnet signifikanterer Unterschiede zur Negativ-Kontrolle. Abkürzungen: S: Substrat, E: Bezeichnung der Enzyme, welche die eingesetzten Hydrolysate produzierten, HG: Hydrolysegrad [%], Alca: Alcalase, Co: Corolase, Tryp: TPCK-Trypsin, Prot: Protamex

Zellart	Caco-2 Zellen								PML					
	Proliferierende				Differenzierte				Mit		Ohne			
	Mit		Ohne		Mit		Ohne		2	1	2	1		
S	E	HG	Relativer-Zytotoxizitäts-Index $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysats})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$											
b-Lg.	Alca	13	0,53											
	Co 7089	1	0,51											
		4							0,38*					
	Tryp	7							0,29*		0,49*			
WPC 75	Co PNL	3			0,35									
		15			0,47*									
	CoPP	22			0,38*									
	Tryp [#]	5	0,52											
		6	0,47*											
Na-CN	Co 7089	1			0,52						0,16*		0,00	
		4			0,47*									
		10	0,45*				0,54				0,04*			
		12					0,46*				0,03*		0,01*	
		17	0,38*								0,02*			
	Co L10	1			0,28*		0,48*							
		2			0,22*									
		3	0,52		0,25*						0,00*		0,02*	
	CoPNL	5			0,47									
		8			0,28*				0,02*					
		10			0,42*									
	Prota	12					0,27*							
	4	0,15												
	6			0,01*										
	10			0,20*										
	12			0,22*										
	15	0,04		0,31*										

4.1.3 Milchproteinfraktionen und ACE-inhibitorische Hydrolysat-Permeate

Diese Tests der Zytotoxizitätsstudie waren notwendige Vorversuche für von Projektpartnern geplante und nachfolgend durchgeführte Humanstudien. Die pulverförmigen Testsubstanzen (β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein (β -Lactoglobulin), WPC 75, Natrium-Caseinat und daraus hergestellte Hydrolysate bzw. Permeate) wurden in DMEM gelöst (Stammlösung: 8 % Protein (W/V), s. 3.6) und verdünnt. Die Wirkung dieser Testsubstanzen auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, s. 3.7.1.1), Zelldifferenzierung (TEER-Messung: s. 3.7.3, mikroskopische Beobachtung der Caco-2 Monolayerentwicklung: s. 3.3.3, Bestimmung der DPP IV-Aktivität: s. 3.7.2 und Proliferation von PML (BrdU-Test): s. 3.7.8) wurde Konzentrations- und Zeit-abhängig untersucht. WPC 75 und dessen Hydrolysat waren trübe Lösungen und wurden deshalb nicht als Testsubstanzen eingesetzt.

Die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen war im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nach Inkubation mit β -Lactoglobulin und Natrium-Caseinat je nach Konzentration höher (4 h), unverändert oder gehemmt ($AI_{WST-1} < 1$). Die untersuchten Hydrolysat-Permeate hingegen wiesen ausschließlich Zellaktivitäts-hemmende Effekte auf (s. Abbildung 4-8, Abbildung 4-9).

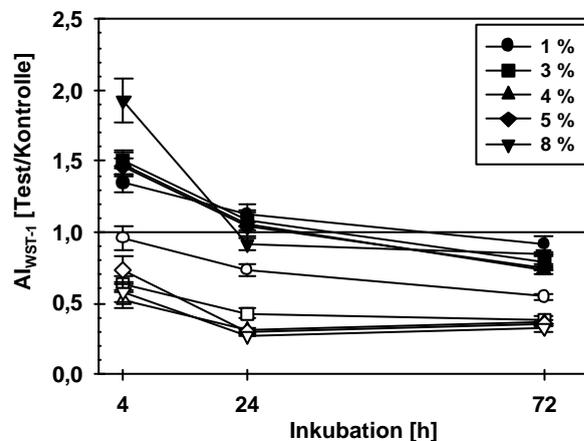
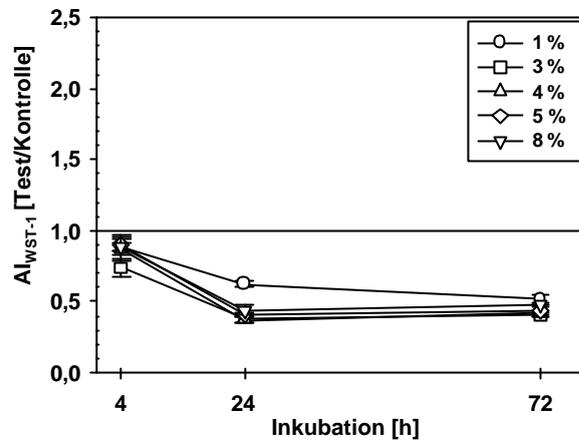


Abbildung 4-8: Effekte (AI_{WST-1}) einer Inkubation mit β -Lactoglobulin bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

Zellaussaat (26. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und Exposition (ab d₀) mit 1, 3, 4, 5 und 8% β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (schwarze Symbole) bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten (offene Symbole), nachfolgend Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test) und Berechnung der AI_{WST-1} (s. 3.7.1.1.). Messergebnisse der Negativ-Kontrollen s. Tabelle A-52.

A)



B)

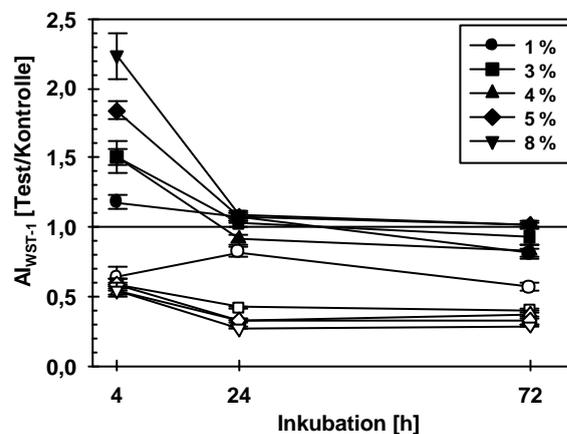


Abbildung 4-9: Effekte (AI_{WST-1}) einer Inkubation mit A) WPC 75 und B) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

Zell-Exposition (ab d_0) mit 1, 3, 4, 5 und 8 % WPC 75 und Natrium-Caseinat (schwarze Symbole) bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten (offene Symbole). Weitere Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-8.

Nachfolgend wurden die RZI berechnet. Werte kleiner 0,5 wurden nach Zellinkubation mit Testsubstanzen aus β -Lactoglobulin und Natrium-Caseinat (3 bis 8%) ermittelt (s. Tabelle 4-22).

Tabelle 4-22: Effekte (RZI) einer Inkubation mit β -Lactoglobulin bzw. Natrium-Caseinat Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

Berechnung der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (S.E.M.) aus jeweils drei Messwiederholungen.

Hydrolysat-Permeate aus:	Konzentration (w/v) [%]	Relativer-Zytotoxizitäts-Index MW \pm S. E. M.					
β-Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein	1	0,713	$\pm 0,061$	0,653	$\pm 0,034$	0,597	$\pm 0,027$
	3	0,424	$\pm 0,031$	0,394	$\pm 0,032$	0,486	$\pm 0,038$
	4	0,354	$\pm 0,035$	0,292	$\pm 0,017$	0,505	$\pm 0,016$
	5	0,500	$\pm 0,065$	0,284	$\pm 0,010$	0,462	$\pm 0,005$
	8	0,299	$\pm 0,034$	0,299	$\pm 0,011$	0,378	$\pm 0,028$
Natrium-Caseinat	1	0,547	$\pm 0,053$	0,767	$\pm 0,031$	0,697	$\pm 0,036$
	3	0,393	$\pm 0,024$	0,411	$\pm 0,005$	0,424	$\pm 0,016$
	4	0,355	$\pm 0,019$	0,361	$\pm 0,009$	0,451	$\pm 0,020$
	5	0,317	$\pm 0,024$	0,301	$\pm 0,011$	0,317	$\pm 0,020$
	8	0,245	$\pm 0,021$	0,250	$\pm 0,006$	0,283	$\pm 0,005$
Inkubationsdauer [h]		4		24		72	

Zur Überprüfung der Testsubstanzwirkung auf differenzierte Caco-2 Monolayer wurden die Zellen zunächst 10 Tage unter Standardbedingungen (DMEM, 37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. In dieser Zeit war die Entwicklung der Caco-2 Monolayer in allen Kavitäten vergleichbar (mikroskopische Beobachtung). Die auf PE-Membranen gewachsenen Caco-2 Monolayer wiesen vor Testbeginn (d_{10}) einen mittleren TEER von $288 \pm 1,5 \Omega \text{ cm}^2$ auf. Nachfolgend wurde dieser durch Testsubstanz-Exposition (4 bis 168 h, alle Konzentrationen) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle zumeist moduliert (Abbildung 4-11), wobei gleichzeitig intakte Monolayer unter dem Mikroskop beobachtet wurden, außer nach 168 h Inkubation mit 5 % Hydrolysat-Permeat aus β -Lactoglobulin.

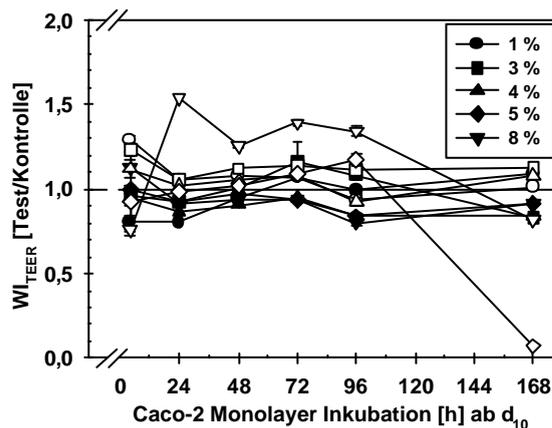
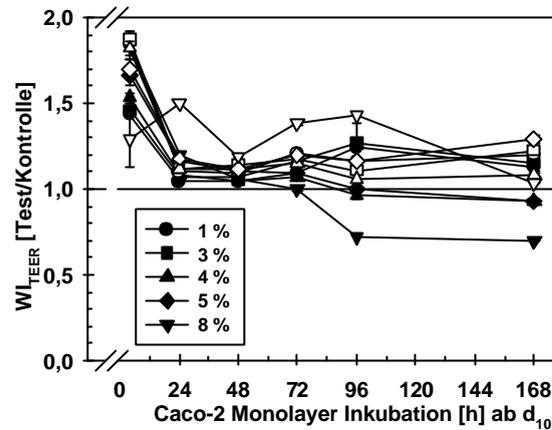


Abbildung 4-10: Effekte (WI_{TEER}) einer Inkubation mit β -Lactoglobulin bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellexposition mit 1, 3, 4, 5 und 8 % β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein (schwarze Symbole) bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten (offene Symbole); weitere Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-11.

A)



B)

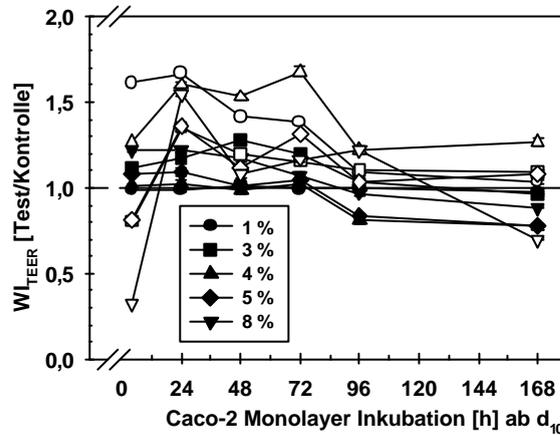
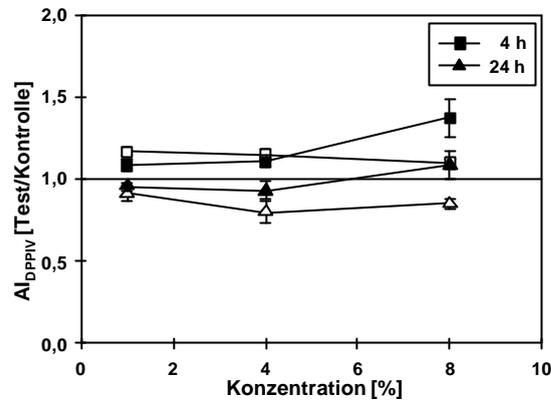


Abbildung 4-11: Effekte (WI_{TEER}) einer Inkubation mit A) WPC 75 und B) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

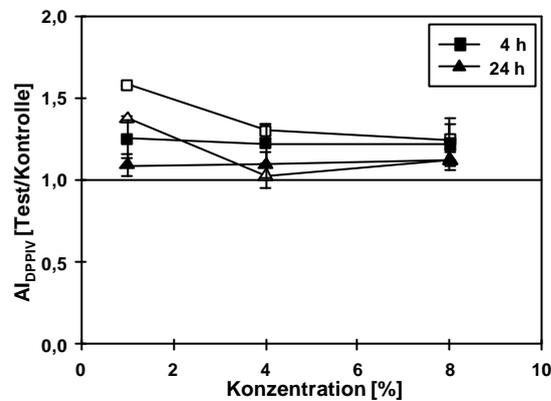
Zellaussaat (12. Passage) in 12-Kavitäten-MTP auf PE-Membranen ($10^5/cm^2$), Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und Exposition (ab d_{10}) mit 1, 3, 4, 5 und 8 % β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein (s. Abbildung 4-10), WPC 75, Natrium-Caseinat (schwarze Symbole) bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten (offene Symbole), nachfolgend Durchführung der TEER-Messung bei RT (s. 3.7.3) und Berechnung des (WI_{TEER}). Messergebnisse der Negativ-Kontrollen s. Tabelle A-53.

Die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen wurde durch diese Testsubstanzen moduliert, wobei im Vergleich zur Negativ-Kontrolle vorwiegend stimulierende Effekte nachweisbar waren (s. Abbildung 4-12).

A)



B)



C)

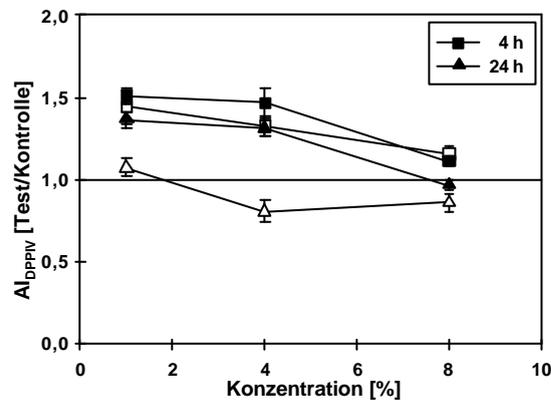


Abbildung 4-12: Effekte ($AI_{DPP IV}$) einer Inkubation mit A) β -Lactoglobulin, B) WPC 75 und C) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Monolayer

Zellaussaat (34. Passage) in 96-Kavitäten-MTP in einer Dichte von 2×10^4 /Kavität, Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und 4 bzw. 24 h Exposition (ab d_{14}) mit 1, 3, 4, 5 und 8 % β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein, WPC 75, Natrium-Caseinat (schwarze Symbole) bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten (offene Symbole), nachfolgend Bestimmung der DPP IV-Aktivität (s. 3.7.2) und Berechnung des ($AI_{DPP IV}$). Messergebnisse der Negativ-Kontrollen - MW der Extinktionen \pm S.E.M.: $0,743 \pm 0,113$ (4 h) und $0,844 \pm 0,116$ (24 h).

Die metabolische Aktivität der Caco-2 Monolayer wurde durch Inkubation mit Milchproteinfraktionen bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten im Vergleich zur Negativkontrolle überwiegend gehemmt ($Al_{WST-1} < 1$, s. Abbildung 4-13, A). Die Wirkung der Hydrolysat-Permeate war zumeist stärker als die ihrer Ausgangsstoffe ($Al_{WST-1} < 0,5$).

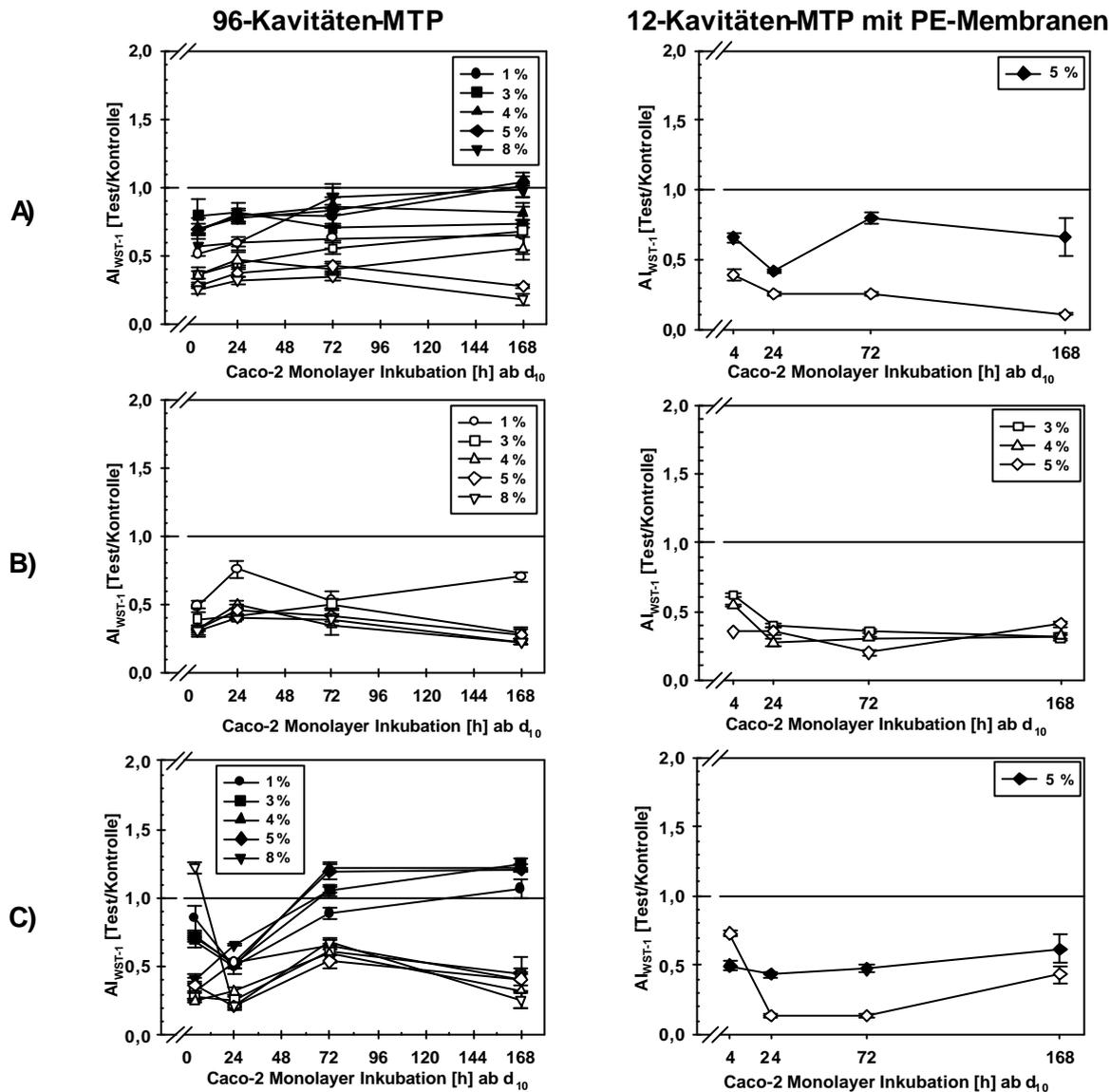


Abbildung 4-13: Effekte (Al_{WST-1}) einer Inkubation mit A) β -Lactoglobulin, B) WPC 75 und C) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (12., 13. Passage) in 96- bzw. 12-Kavitäten-MTP, auf PP bzw. PE-Membranen in einer Dichte von 2×10^4 /Kavität bzw. 10^5 /cm², Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und Exposition (ab d_{10}) mit 1, 3, 4, 5 und 8% β -Lactoglobulin angereicherterem Molkenprotein (A), WPC 75 (B), Natrium-Caseinat (C) (schwarze Symbole) bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten (offene Symbole), nachfolgend Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test) und Berechnung der Al_{WST-1} (s. 3.7.1.1.). Messergebnisse der Negativkontrollen s. Tabelle A-54.

Diese deutlich hemmende Wirkung der Testsubstanzen auf die metabolische Zellaktivität (WST-1 Test) steht im scheinbaren Widerspruch zu den durch mikroskopische Beobachtung sowie TEER-Messung nachweislich intakten Monolayern. Ein bedeutender Unterschied in der Zellkultivierung beider Testsysteme ist die Zellaussaat in Ein- bzw. Zwei-Kompartiment-Systeme (96-Kavitäten-MTP aus Polypropylen bzw. 12-Kavitäten-MTP mit PE-Membran Einsätzen). Letzteres ist das bessere Modellsystem zur Simulation des Dünndarms. Deshalb wurde nachfolgend der Einfluss des Kulturmaterials auf die Ergebnisse des WST-1 Tests untersucht. Dazu wurden die Zellen auf PE-Membranen ausgesät, 10 Tage unter Standardbedingungen kultiviert und nach entsprechender Testsubstanz-Exposition wurde der WST-1 Test durchgeführt. Auch unter diesen Kulturbedingungen wurde die metabolische Aktivität im Vergleich zur Negativ-Kontrolle gehemmt (s. Abbildung 4-13, B), wobei die Wirkung der Hydrolysat-Permeate stärker war (Al_{WST-1} kleiner 0,5) als die der Milchproteinfraktionen (Substrate). Gleichzeitig wurden unter dem Mikroskop intakte Caco-2 Monolayer beobachtet. Die Ergebnisse beider Kultursysteme sind somit vergleichbar.

Nachfolgend wurden überwiegend RZI kleiner 0,5 berechnet (s. Tabelle 4-23).

Tabelle 4-23: Effekte (RZI) einer Inkubation mit A) β -Lactoglobulin und B) Natrium-Caseinat und daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) und PML

Zellaussaat (12. Passage, 2×10^4 /Kavität) in 96-Kavitäten-MTP, Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und Exposition (ab d_0) mit 1, 3, 4, 5 und 8 % (w/v) A) β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, B) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten, nachfolgend Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test, s. 3.7.1.1.) und Berechnung der Al_{WST-1} sowie RZI als Mittelwerte ($n = 3$) \pm S.E.M.. Abkürzungen: I.: Inkubationsdauer, TS: Testsubstanzen.

Zellen I.	Differenzierte Caco-2 Zellen (Monolayer)						PML								
	$d_{10} + 4$ h		$d_{10} + 24$ h		$d_{10} + 72$ h		4 h		24 h		72 h				
TS %	RZI MW \pm S.E.M.														
A)	1	0,754 \pm 0,007	0,739 \pm 0,067	0,795 \pm 0,097	1,118 \pm 0,027	0,656 \pm 0,027	0,570 \pm 0,055	3	0,512 \pm 0,063	0,536 \pm 0,016	0,789 \pm 0,058	1,074 \pm 0,023	0,467 \pm 0,015	0,444 \pm 0,026	
	4	0,514 \pm 0,036	0,594 \pm 0,070	0,497 \pm 0,054	0,868 \pm 0,082	0,492 \pm 0,029	0,478 \pm 0,019	5	0,397 \pm 0,017	0,517 \pm 0,011	0,511 \pm 0,049	1,888 \pm 1,059	0,412 \pm 0,026	0,518 \pm 0,022	
	8	0,441 \pm 0,052	0,538 \pm 0,039	0,368 \pm 0,027	0,459 \pm 0,163	0,413 \pm 0,044	0,464 \pm 0,014	B)	1	0,460 \pm 0,011	1,067 \pm 0,025	0,739 \pm 0,037	1,219 \pm 0,024	0,878 \pm 0,040	0,506 \pm 0,053
	3	0,392 \pm 0,045	0,509 \pm 0,042	0,581 \pm 0,031	1,347 \pm 0,013	0,598 \pm 0,032	0,551 \pm 0,035	4	0,367 \pm 0,021	0,624 \pm 0,054	0,542 \pm 0,019	1,328 \pm 0,013	0,418 \pm 0,020	0,555 \pm 0,041	
	5	0,508 \pm 0,079	0,439 \pm 0,044	0,469 \pm 0,052	1,020 \pm 0,031	0,358 \pm 0,025	0,510 \pm 0,068	8	2,971 \pm 0,086	0,324 \pm 0,015	0,638 \pm 0,034	0,606 \pm 0,023	0,369 \pm 0,025	0,405 \pm 0,045	

β -Lactoglobulin, WPC 75, Natrium-Caseinat und die daraus hergestellten Hydrolysat-Permeate hemmten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten ($Al_{WST-1} < 1$, s. Abbildung 4-14).

Es wurden überwiegend RZI größer 0,500 berechnet. RZI-Werte kleiner 0,5 wurden nach (24 und) 72 h Zellinkubation mit 3 – 8 % β -Lactoglobulin und 4 – 8 % Natrium-Caseinat ermittelt (s. Tabelle 4-23).

Die DNS-Neusynthese von PML wurde durch diese Testsubstanzen moduliert. Die Milchproteinfraktionen (insbesondere β -Lactoglobulin) bzw. Hydrolysat-Permeate wirkten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle vorwiegend stimulierend bzw. hemmend auf den Einbau von BrdU in die DNA (s. Abbildung 4-14).

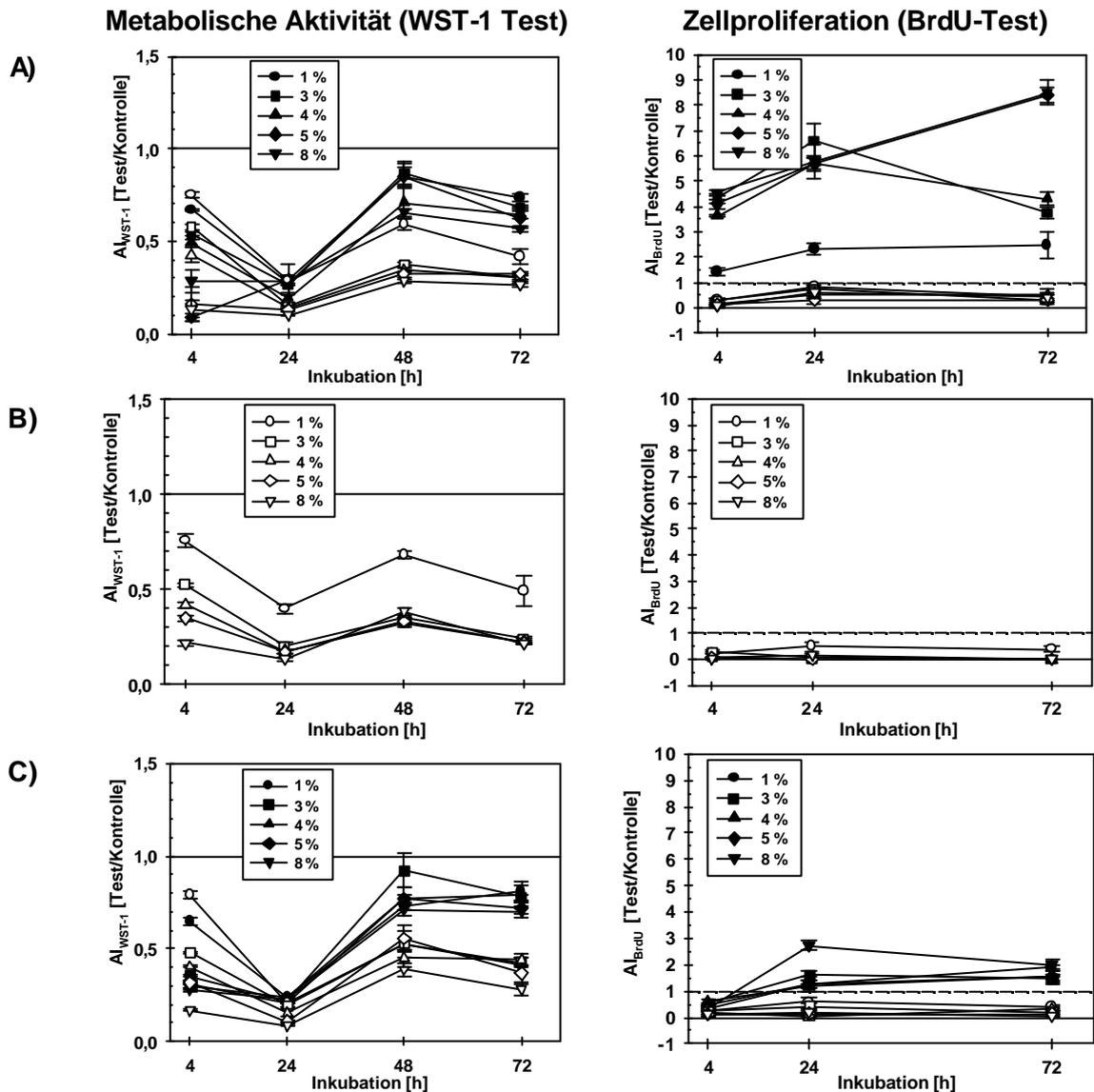


Abbildung 4-14: Effekte (AI_{WST-1} , AI_{BrdU}) einer Inkubation mit A) β -Lactoglobulin, B) WPC 75 und C) Natrium-Caseinat bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) bzw. Proliferation (BrdU-Test) von PML

Zellaussaat (2×10^4 /Kavität) in 96-Kavitäten-MTP, Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6), Exposition mit 1, 3, 4, 5 und 8 % β -Lactoglobulin angereichertem Molkenprotein, WPC 75 und Natrium-Caseinat (schwarze Symbole) bzw. daraus hergestellten Hydrolysat-Permeaten (offene Symbole), nachfolgend Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test, s. 3.7.1.1.) und der Zellproliferation (BrdU-Tests, s. 3.7.7). Berechnung der AI_{WST-1} bzw. AI_{BrdU} als Mittelwerte \pm S.E.M. aus je vier Messwiederholungen (s. Tabelle A-55).

4.1.4 Identifizierung potenziell anticancerogener Hydrolysate von Milchprotein

Durch Auswertung der Ergebnisse der Zytotoxizitätsstudie wurden 17 Hydrolysate (RZI = 0,500, s. Tabelle 4-21, fettgedruckte Ergebnisse) identifiziert, die potenziell zytotoxisch auf proliferierende Caco-2 Zellen (Tumorzellen) wirkten, nicht jedoch auf differenzierte Caco-2 Zellen und PML. Von diesen Testsubstanzen induzierten 14 eine zur Negativ-Kontrolle signifikant erhöhte Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung in proliferierenden Caco-2 Zell-Lysaten (s. Tabelle 4-24). Von diesen wurden 3 Hydrolysate ausgewählt und in weiteren Tests eingesetzt.

Tabelle 4-24: Effekte (AI_{Apoptose}) einer 24 h Inkubation mit WPC 75, Natrium-Caseinat und daraus hergestellten Hydrolysaten auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender Caco-2 Zellen

Berechnung des AI_{Apoptose} als Mittelwerte \pm Standardfehler (S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen, unter Berücksichtigung der Negativ-Kontrolle K_N : MW: $0,913 \pm 0,080$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ * kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur K_N . Die fettgedruckten Ergebnisse markieren die Testsubstanzen, deren Wirkung in weiteren Tests untersucht wurde.

Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate produzierte, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, HG: Hydrolysegrad, Co: Corolase, Na-CN: Natrium-Caseinat.

sGIV			Mit		Ohne	
Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21)			2	1	1	
S	E	HG [%]	$AI_{\text{Apoptose}} \pm \text{S.E.M}$	$AI_{\text{Apoptose}} \pm \text{S.E.M}$	$AI_{\text{Apoptose}} \pm \text{S.E.M}$	
		0			1,083	$\pm 0,074$
	Co PNL	3			1,475**	$\pm 0,106$
WPC 75		0		1,091	$\pm 0,206$	
		15		1,265	$\pm 0,240$	
	Co PP	0				1,353** $\pm 0,076$
		22				2,342** $\pm 0,139$
	TPCK-Trypsin	0		1,433*	$\pm 0,119$	
		6		1,327**	$\pm 0,058$	
		0			1,055	$\pm 0,045$
		4			1,801***	$\pm 0,096$
	Co 7089	0	1,045	$\pm 0,017$		
		10	1,080	$\pm 0,040$		
		0			1,084*	$\pm 0,024$
		17			1,304***	$\pm 0,035$
		0			1,053	$\pm 0,072$
	Co L10	1			2,249***	$\pm 0,094$
		2			1,919***	$\pm 0,018$
		3			1,774***	$\pm 0,057$
		5			1,842***	$\pm 0,045$
Na-CN		0			1,126*	$\pm 0,045$
	Co PNL	8			1,708***	$\pm 0,041$
		10			2,189***	$\pm 0,076$
		0	1,744***	$\pm 0,074$		
	Protamex	4	1,283	$\pm 0,127$		
		15	1,273	$\pm 0,108$		
		0			1,589**	$\pm 0,135$
		6			1,679**	$\pm 0,114$
		15			1,951**	$\pm 0,205$

Diese drei ausgewählten Hydrolysate (I, II, III) reduzierten in Kulturen differenzierter Caco-2 Zellen (s. Abbildung 4-15) und PML (s. Tabelle A-56) die Bildung Apoptose-spezifischer DNA-Fragmente im Vergleich zur Negativ-Kontrolle signifikant bzw. veränderten diese nicht. Eine vergleichbare Wirkung zeigte Natrium-Caseinat (Substrat) auf alle drei Zellkultursysteme.

Hingegen wurden nach Inkubation proliferierender Caco-2 Zellen mit den Hydrolysaten I, II und III AI_{Apoptose} größer 1 ermittelt (s. Abbildung 4-15). Die Menge dieser Apoptose-spezifischer DNA-Fragmente war nach Inkubation mit Hydrolysat I und II in den Zellkulturüberständen größer als in den zugehörigen Lysaten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Nekrose überwiegt. Hingegen induzierte Hydrolysat III Apoptose, da im Lysat eine größere Menge dieser DNA-Fragmente detektiert wurde als im Kulturüberstand.

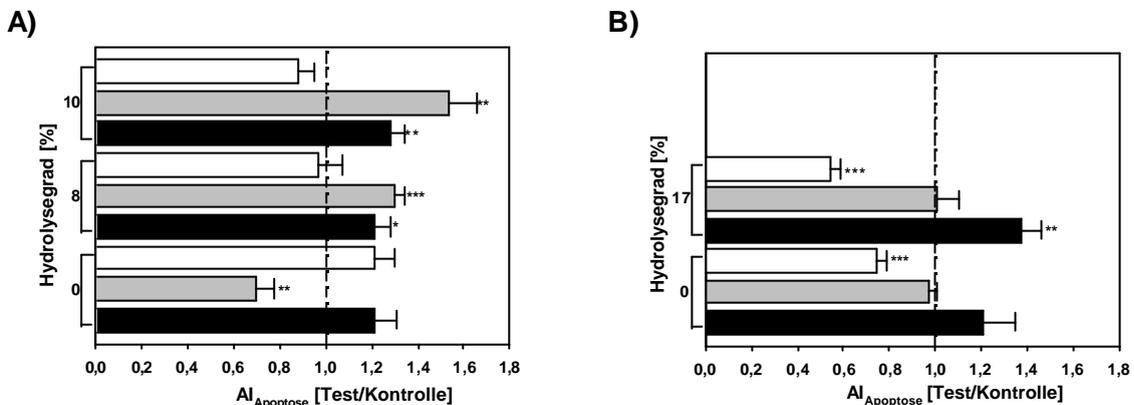


Abbildung 4-15: Effekte (AI_{Apoptose}) einer Inkubation mit Natrium-Caseinat und daraus hergestellten Hydrolysaten auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender und differenzierter Caco-2 Zellen

Zellaussaat (62. Passage, 2×10^4 /Kavität) in 96-Kavitäten-MTP, Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6) und 24 h Exposition ab d_0 bzw. ab d_{10} mit Natrium-Caseinat Hydrolysaten (VS 1, s. Tabelle 3-21) produziert durch A) Corolase PNL, eines Hydrolysegrades von 8 bzw. 10 % (Hydrolysat I bzw. II) sowie B) Corolase 7089, eines Hydrolysegrades von 17 % (Hydrolysat III). Die Hydrolysate I und II wurden nach ihrer Herstellung einer simulierten gastrointestinalen Verdauung unterzogen. Nachfolgend wurde der Apoptose-Nachweis (s. 3.7.8) durchgeführt mit Zell-Lysaten differenzierter bzw. proliferierender Caco-2 Zellen (offene bzw. schwarze Balken) sowie mit den Zellkulturüberständen (graue Balken) proliferierender Caco-2 Zellen. Berechnung der AI_{Apoptose} als Mittelwerte aus je sechs Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-56).

4.1.5 Screening ACE-inhibitorischer, synthetischer Peptide

In einem weiteren Screening wurden 30 synthetische *in vitro* ACE-inhibitorische Peptide, die in der Aminosäuresequenz des Milchproteins (s. Tabelle 2-8) enthalten sind, als Testsubstanzen eingesetzt (s. Tabelle 3-5). Die Wirkung dieser Peptide auf die Veränderung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test) und die Monolayer-Integrität (TEER-Messung und mikroskopische Beobachtung) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) wurde Zeit- und Konzentrations-abhängig untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Berücksichtigung des AI_{50} ($AI_{WST-1} = 0,5$), der auf eine potenziell zytotoxische Testsubstanz hinweist (s. 4.1.2).

Die Mehrzahl der eingesetzten Peptide (29) zeigte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle keinen bzw. einen TEER erhöhenden Einfluss nach Inkubation differenzierter Caco-2 Monolayer (s. Tabelle 4-25). Gleichzeitig wurden intakte und mit der Negativ-Kontrolle vergleichbare Caco-2 Monolayer unter dem Umkehrmikroskop beobachtet. 1 mmol/L Ala-Trp, Ile-Pro-Ile, Val-Phe, Val-Tyr, Val-Tyr-Val sowie Val-Ala und Val-Trp (gelöst in DMSO) reduzierten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle den TEER signifikant ($WI_{TEER} < 1$), nach 168 h Inkubation. 0,1 mmol/L Phe-Tyr (gelöst in DMSO) reduzierte den TEER im Vergleich zur Negativ-Kontrolle ($p < 0,001$) nach 4 bis 168 h Inkubation (s. Tabelle 4-25).

Die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) wurden nach Inkubation mit 0,1 mmol/L Peptiden im Vergleich zur Negativ-Kontrolle zumeist stimuliert, aber auch nicht moduliert bzw. gehemmt. $AI_{WST-1} < 0,5$ wurden nach Inkubation der in DMSO gelösten 0,1 mmol/L Dipeptide Gly-Tyr (24 h) und Val-Trp (96 h) ermittelt (s. Tabelle 4-26). In einer Konzentration von 1 mmol/L hemmten die eingesetzten Peptide die metabolische Zellaktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle signifikant. Es wurden AI_{WST-1} kleiner 0,5 ermittelt. Einzig 1 mmol/L Lys-Phe bewirkte eine im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nicht signifikante Hemmung des WST-1 Umsatzes (s. Tabelle 4-26).

Tabelle 4-25: Effekte (WI_{TEER}) einer Inkubation mit 0,01 und 1 mmol/L synthetischer Peptide auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (12. Passage) in 12-Kavitäten-MTP auf PE-Membranen ($10^5/cm^2$) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 2 – 7 d Exposition (ab d_0) mit 0,01 bzw. 1,00 mmol/L Peptid, nachfolgend Durchführung der TEER-Messung (bei RT, s. 3.7.3). Berechnung der WI_{TEER} aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (S. E. M._{max}: 0,09, s. Tabellen A-57). Messergebnisse der Negativkontrollen (s. Tabelle A-58). Statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8) werden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gekennzeichnet. * Kennzeichnet in DMSO gelöste Peptide (s. Tabelle 3-8).

Synthetische Peptide Konzentration Inkubation [$d_{10} + d$]	Widerstands-Index _{TEER} [Test/Kontrolle]					
	0,01 mmol/L			1,00 mmol/L		
	$d_{10} + 2$	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 7$	$d_{10} + 2$	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 7$
Ala-Leu	1,14*	1,17**	1,25***	1,16***	1,24***	1,18***
Ala-Pro	1,25***	1,34***	0,49***	1,18**	1,23*	1,39***
Ala-Pro-Leu	1,21***	1,19**	1,17***	1,20***	1,20**	1,11***
Ala-Trp	1,24***	1,27***	1,26***	1,20***	1,26***	0,02***
Gly-Pro	1,21***	1,22***	1,16***	1,28***	1,27***	1,22***
Gly-Tyr	1,20***	1,13***	1,04	1,14**	1,21***	1,04
Ile-Arg	1,08	1,03	0,93	1,17**	1,18**	1,06
Ile-Pro-Ile	1,19***	1,23***	1,02	1,14**	1,00	0,81***
Leu-Gly	1,14***	1,18***	1,07	1,10**	1,16	0,96
Leu-Pro	1,23***	1,24***	1,03	1,24***	1,19**	0,99
Leu-Val	1,09***	1,20***	1,00	1,21***	1,28***	1,02
Met-His	1,11**	1,14	1,17	1,03	1,33***	1,13**
Pro-Pro	1,16***	1,28**	1,33***	1,21***	1,16	1,05
Ser-Phe	1,17***	1,20**	1,20***	1,07	1,10	1,11***
Ser-Tyr	1,23***	1,29***	1,28*	1,20***	1,20**	1,11***
Tyr-Gly	1,16***	1,09**	0,93*	1,18***	1,05***	0,96
Val-Phe	1,16***	1,20**	1,14	1,17***	1,32***	0,39***
Val-Tyr	1,09**	1,06	1,10*	1,08	1,15**	0,02***
Val-Tyr-Val	1,20***	1,17**	1,06	1,11	1,05	0,90**
Ala-Val ⁺	1,14**	1,19	1,20**	1,07	1,02	1,02
Ala-Tyr ⁺	1,11**	1,17**	1,18**	1,09	1,17	1,02
His-Leu ⁺	1,18***	1,16**	1,22***	1,07	1,16	0,96
Ile-Pro ⁺	1,13**	1,15**	1,15***	1,14***	1,15**	1,15***
Leu-Trp ⁺	n. d.	n. d.	n. d.	1,05	1,18	0,10***
Phe-Tyr ⁺	0,57***	0,74***	0,82***	1,09	1,11	1,02
Val-Ala ⁺	1,11	1,19	1,02	1,07	1,08	0,88**
Val-Pro ⁺	1,10	1,17**	0,96	1,15**	1,18	1,01
Val-Trp ⁺	1,15***	1,23**	1,01	1,15**	1,11	0,88***

Tabelle 4-26: Effekte (AI_{WST-1}) einer Inkubation mit 0,01 und 1 mmol/L synthetischer Peptide auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (12. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 4 – 96 h Exposition (ab d_0) mit 0,01 bzw. 1,00 mmol/L Peptid, nachfolgend Durchführung des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1). Berechnung der AI_{WST-1} aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (S. E. M._{max}: 0,17, s. Tabellen A-59). Messergebnisse der Negativ-Kontrollen (s. Tabelle A-60). Statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8) werden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gekennzeichnet. + Kennzeichnet in DMSO gelöste Peptide (s. Tabelle 3-8).

Synthetische Peptide	Aktivitäts-Index _{WST-1} [Test/Kontrolle]								
	Konzentration	0,01 mmol/L				1,00 mmol/L			
		Inkubation [$d_{10} + h$]	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$	$d_{10} + 96$	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$
Ala-Leu		1,03	1,07**	0,83	1,13	0,35***	0,12***	0,03***	0,19***
Ala-Pro		1,13	0,89	0,76	1,16	0,29***	0,24***	0,10***	0,30***
Ala-Pro-Leu		0,86	1,27	0,76***	1,23	0,24***	0,24***	0,08***	0,04***
Ala-Trp		0,70**	0,72	0,61**	0,85	0,33***	0,15***	0,22***	0,39***
Gly-Pro		0,84	1,17	0,94	1,06	0,39***	0,15***	0,06***	0,12***
Ile-Arg		0,89	1,33	0,87	1,07	0,35***	0,21	0,16***	0,26***
Ile-Pro-Ile		0,95	1,25	0,90	1,05	0,26**	0,34**	0,27***	0,09***
Leu-Gly		0,62**	0,92	0,64***	0,64***	0,20***	0,13***	0,14***	0,09***
Leu-Pro		0,73**	1,00	0,85**	1,21	0,21***	0,17***	0,01***	0,11***
Leu-Val		0,75	1,53***	0,86	0,83	0,32***	0,42**	0,11***	0,28
Lys-Phe		1,01	1,09	0,84	n. d.	0,89	0,92	0,84	n. d.
Met-His		0,82**	1,25	0,78***	1,35**	0,28**	0,40**	0,13***	0,24**
Pro-Pro		0,82	0,81	0,56**	0,62***	0,19***	0,02***	0,06***	0,02***
Ser-Phe		0,96	1,02	0,70**	0,97	0,54	0,17***	0,09**	0,13***
Ser-Tyr		1,10	1,15	0,77	1,11**	0,29***	0,34**	0,07***	0,02***
Val-Phe		0,86	1,10	0,71**	1,28	0,29***	0,20**	0,01***	0,01***
Val-Tyr		1,21	1,34**	1,43*	1,29	0,23***	0,14***	0,09***	0,01***
Val-Tyr-Val		1,15	1,60**	1,45*	1,46**	0,20***	0,15***	0,26**	0,09***
Ala-Val ⁺		0,91	0,97	1,33*	1,34**	0,26***	0,15***	0,37**	0,05***
Ala-Tyr ⁺		1,24	1,18	0,73***	0,83*	0,50***	0,34***	0,34***	0,79
Gly-Tyr ⁺		0,83	0,47	0,71**	0,76***	0,23***	0,30***	0,27***	0,26***
His-Leu ⁺		0,90	1,15	1,23*	1,40***	0,27***	0,25***	0,34***	0,23***
Ile-Pro ⁺		1,06	1,07	0,62	0,79*	0,26***	0,18***	0,23***	0,02***
Leu-Trp ⁺		1,00	1,13	1,14	1,35*	0,37**	0,24***	0,25***	0,07***
Phe-Tyr ⁺		0,96	1,01	1,19***	1,31**	0,24***	0,08***	0,02***	0,20***
Tyr-Gly ⁺		1,17*	1,02	0,91	1,23	0,19***	0,07***	0,11***	0,25***
Val-Ala ⁺		0,94	1,15**	0,90	0,59**	0,40**	0,07***	0,32***	0,08***
Val-Pro ⁺		0,93	1,24	1,24***	1,33**	0,26***	0,21***	0,12***	0,20***
Val-Trp ⁺		1,23	0,95	0,65**	0,32*	0,46***	0,27***	0,31***	0,13***

4.1.6 Ausgewählte synthetische Peptide und Milchproteinpräparate

Die im Vergleich zur Negativ-Kontrolle signifikante Hemmung des WST-1 Umsatzes differenzierter Caco-2 Zellen nach Inkubation mit 1 mmol/L Peptid steht im Kontrast zur Präsenz intakter Monolayer (TEER-Messung, mikroskopische Beobachtung, s. 4.1.5). Deshalb wurden nachfolgende Tests der Zytotoxizitätsstudie mit ausgewählten Dipeptiden und einem Heptapeptid im Konzentrations-Bereich zwischen 0,01 bis 1 mmol/L wiederholt. Zusätzlich wurden handelsübliche Milchproteinpräparate (in Lebensmittelqualität) als Testsubstanzen eingesetzt, da für diese keine zytotoxischen Wirkungen *in vivo* bekannt sind und diese die ausgewählten Peptide in ihrer Aminosäuren-Sequenz enthalten.

Die Inkubationsdauer der Humanzellen mit Testsubstanz wurde mit 4 bzw. 24 h der physiologischen Verweildauer von Nahrungsbestandteilen im Darm angenähert. Zur Überprüfung der Testsubstanzwirkung auf die intrazelluläre metabolische Enzymaktivität der Humanzellen wurde die Neutralrot-Färbung im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Außerdem wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (s. 3.7.2), die Proliferation von PML (BrdU-Test, s. 3.7.8) und die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung (s. 3.7.9) von Humanzellen untersucht.

Synthetische Peptide

Da eine Unterscheidung der Wirkung von DMSO bzw. dem jeweiligen, darin gelösten Peptid auf Humanzellen nicht möglich war, wurden die nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich mit in PBS löslichen Peptiden durchgeführt. Ein weiteres Auswahlkriterium war eine hohe *in vitro* ACE-inhibitorische Aktivität der synthetischen Peptide (s. Tabelle 2-8), wonach zunächst die vier synthetischen Dipeptide Ala-Pro, Ala-Trp, Val-Phe und Val-Tyr ausgewählt wurden. Zusätzlich wurde Lys-Phe in diese Tests integriert, nachdem es als *in vitro* ACE-inhibitorisches Peptid in Hydrolysaten aus einer Molkenproteinfraktion identifiziert wurde¹.

Die Wirkung von 0,1 bis 1,0 mmol/L Ala-Pro, Ala-Trp, Val-Phe und Val-Tyr auf die extra- bzw. intrazelluläre metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen war Konzentrations-abhängig. Al_{WST-1} bzw. $Al_{Neutralrot}$ Werte kleiner 0,5 wurden nach Zellinkubation mit 0,25/0,5 bis 1 mmol/L Peptid ermittelt (s. Abbildung 4-16).

¹ Unveröffentlichte Ergebnisse, Meisel, H., 2003

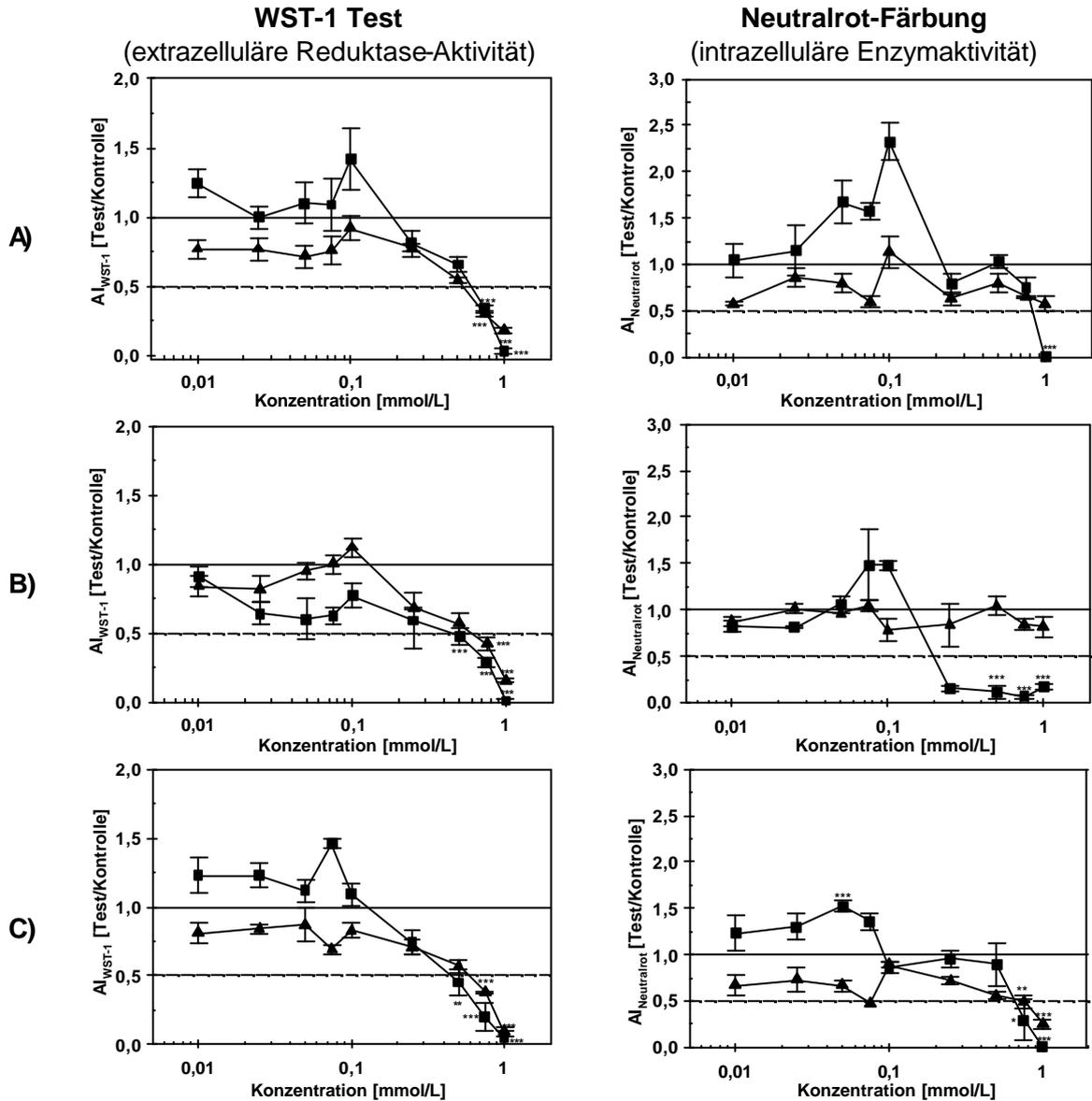


Abbildung 4-16: Effekte (AI_{WST-1} , $AI_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Ala-Pro, B) Ala-Trp und C) Val-Phe auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen

Zellaussaat (13. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und 4 h Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 (◻) bzw. 24 h (◻) Exposition (ab d_0) mit 0,01 bis 1,00 mmol/L Dipeptid, anschließend Durchführung des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1) bzw. der Neutralrot-Färbung (s. 3.7.1.2). Berechnung der AI_{WST-1} bzw. $AI_{Neutralrot}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabellen A-61 bis A-63). Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur Negativkontrolle (Tukey-Test, 3.8) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

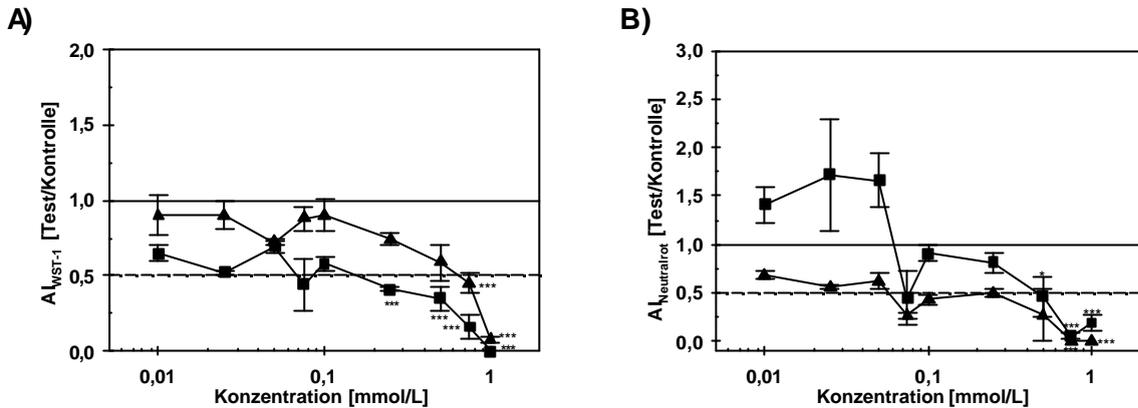


Abbildung 4-17: Effekte (Al_{WST-1} , $Al_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit Val-Tyr auf die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen nach Durchführung A) des WST-1 Tests bzw. B) der Neutralrot-Färbung

4 (◻) bzw. 24 h (◻) Zellinkubation (ab ◻) mit 0,01 bis 1,00 mmol/L Dipeptid, weitere Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-16.

Ala-Pro, Ala-Trp, Val-Phe und Val-Tyr verursachten eine zur Negativ-Kontrolle vergleichbare bzw. geringere Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung in proliferierenden Caco-2 Zell-Lysaten (s. Tabelle 4-27).

Tabelle 4-27: Effekte ($Al_{Apoptose}$) einer Inkubation mit ausgewählten Dipeptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender Caco-2 Zellen

Zellaussaat (36. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und 4 h Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 24 h Exposition (ab ◻) mit Dipeptiden, anschließend Durchführung des Apoptose-Nachweises mit Zell-Lysaten (s. 3.7.8). Berechnung der $Al_{Apoptose}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A64). Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. # IC_{50} der ACE-inhibitorischen Aktivität des jeweiligen Peptids (s. Tabelle 2-8).

C_{Peptid} [mmol/L]	$Al_{Apoptose}$ [Test/Kontrolle]			
	Ala-Pro	Ala-Trp	Val-Phe	Val-Tyr
0,01	0,86***	0,97	0,87	0,81
IC_{50} #	0,97	1,02	0,76**	0,81
1,00	0,64	0,67	0,86***	0,72

Die extrazelluläre Reduktase-Aktivität der Caco-2 Monolayer (WST-1 Test) wurde durch 0,01 bis 0,5 mmol/L Ala-Pro, Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Phe und Val-Tyr unterschiedlich stark moduliert, wobei ausschließlich $Al_{WST-1} > 0,5$ ermittelt wurden. Nach Zellinkubation mit (0,5 bis) 1 mmol/L Dipeptid wurden $Al_{WST-1} = 0,5$ ermittelt (s. Abbildung 4-18 bis Abbildung 4-20).

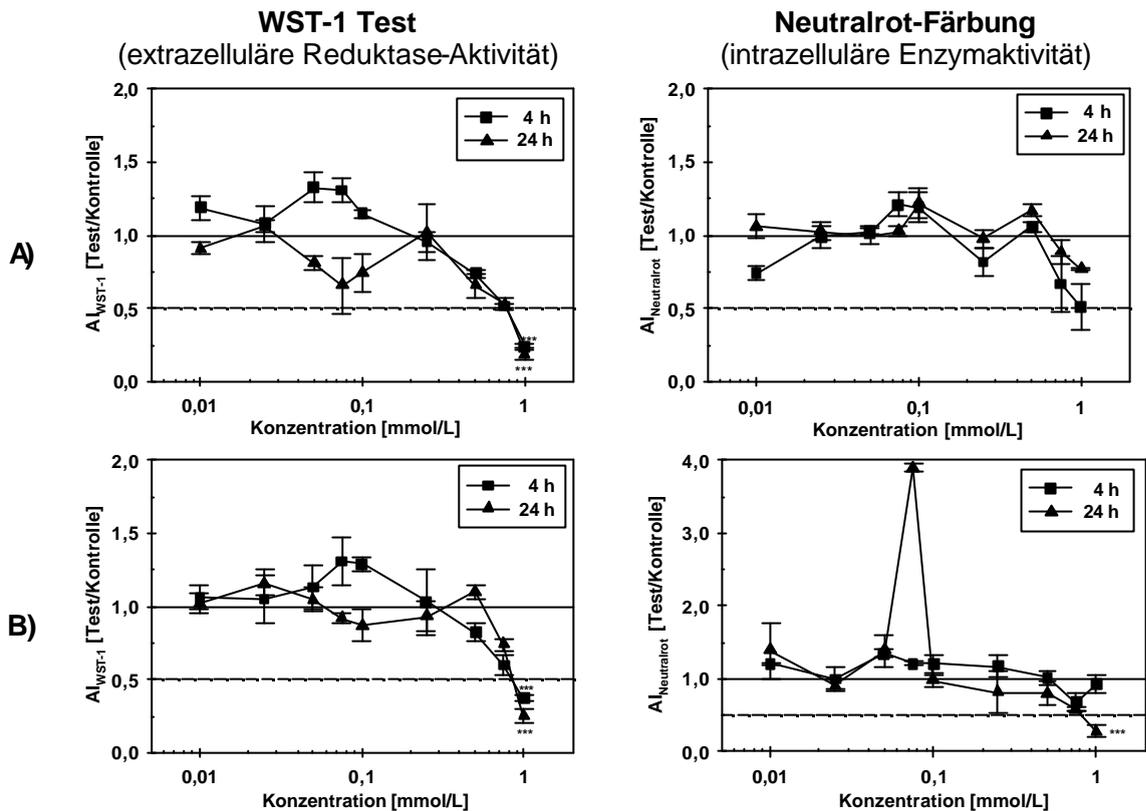


Abbildung 4-18: Effekte (AI_{WST-1} , $AI_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Ala-Pro und B) Ala-Trp auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (13. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4, 24 h Exposition (ab d_{10}) mit Dipeptiden, anschließend Durchführung des WST-1 Tests bzw. der Neutralrot-Färbung (s. 3.7.1). Berechnung der AI_{WST-1} bzw. $AI_{Neutralrot}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-65 bis A-67). Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur Negativkontrolle (Tukey-Test, 3.8) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

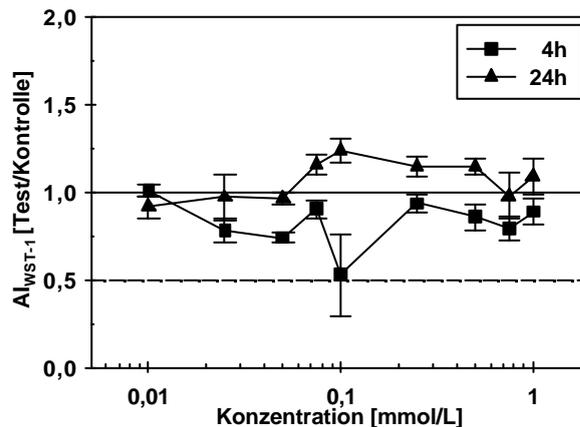


Abbildung 4-19: Effekte (AI_{WST-1}) einer Inkubation mit Lys-Phe auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-18.

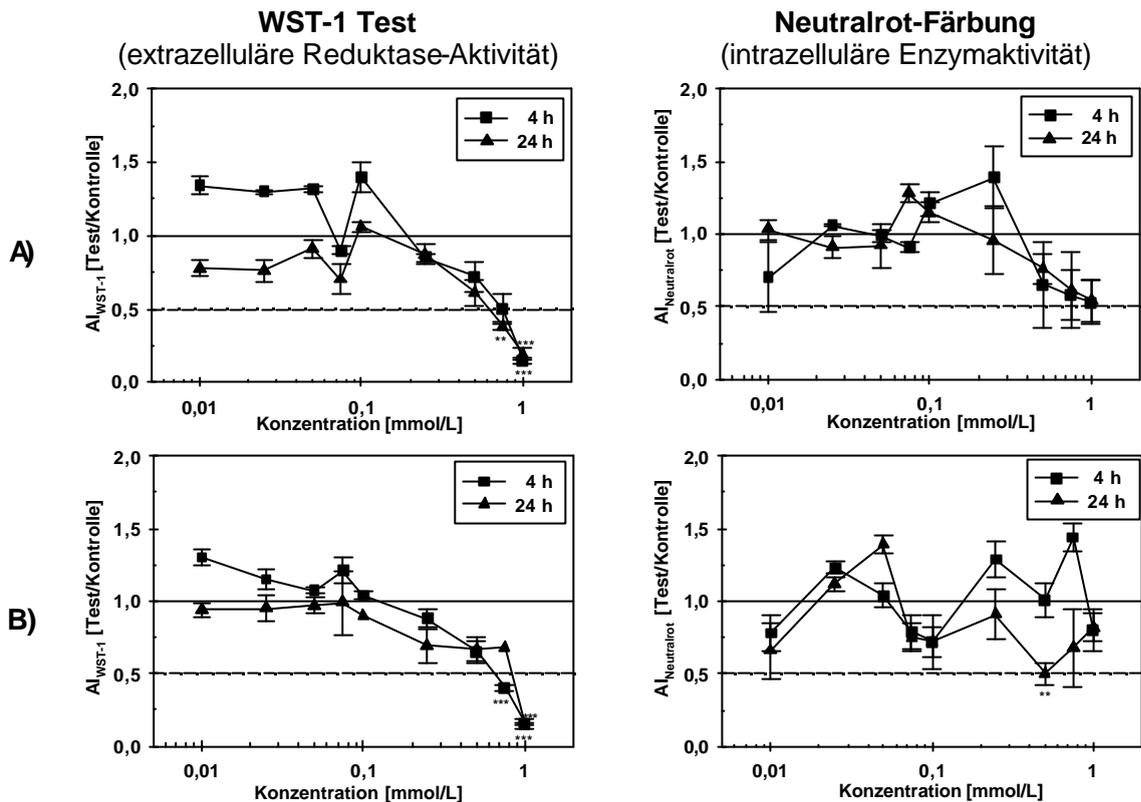


Abbildung 4-20: Effekte (Al_{WST-1} , $Al_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Val-Phe und B) Val-Tyr auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-18.

Die intrazelluläre Enzymaktivität (Neutralrot-Färbung) wurde durch Ala-Pro, Ala-Trp, Val-Phe und Val-Tyr in differenzierten Caco-2 Zellen derart moduliert, dass überwiegend $Al_{Neutralrot}$ größer 0,5 berechnet wurden, außer nach Inkubation mit 1 mmol/L Ala-Trp (24 h) bzw. 0,5 mmol/L Val-Tyr (24 h) (s. Abbildung 4-18 und Abbildung 4-20).

Die Differenzierungsmerkmale der Caco-2 Monolayer wurden durch 0,01 bis 1 mmol/L Ala-Pro, Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Phe und Val-Tyr im Vergleich zur Negativ-Kontrolle in verschiedenster Weise moduliert, wobei keine signifikant TEER-reduzierenden bzw. die DPP IV-Aktivität hemmenden Effekte nachweisbar waren (s. Abbildung 4-22). Auch nach länger anhaltender Kultivierung ($d_{10} + 72$ bis 196 h, s. Tabellen A-68 bis A-76) der Caco-2 Monolayer mit diesen Dipeptiden wurde keine signifikante Senkung des TEER ($WI_{TEER} > 0,5$) ermittelt. Gleichzeitig wurden unter dem Mikroskop nach 4 bis 72/196 h Inkubation intakte Caco-2 Monolayer beobachtet, die vergleichbar mit der Negativ-Kontrolle waren.

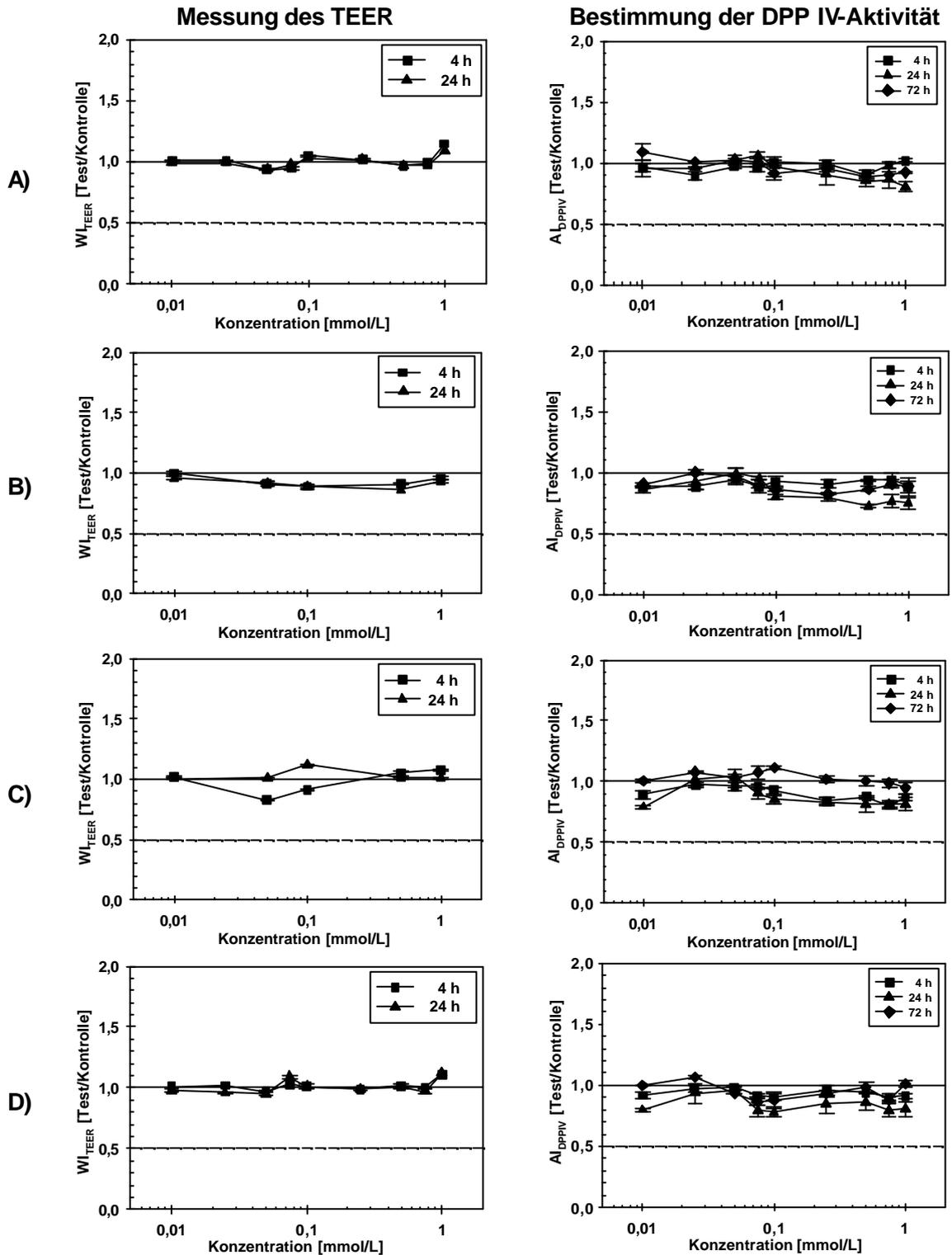


Abbildung 4-21: Effekte (WI_{TEER} , $A_{DPP IV}$) einer Inkubation mit A) Ala-Pro, B) Ala-Trp C) Lys-Phe und D) Val-Phe auf den TEER und die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-22.

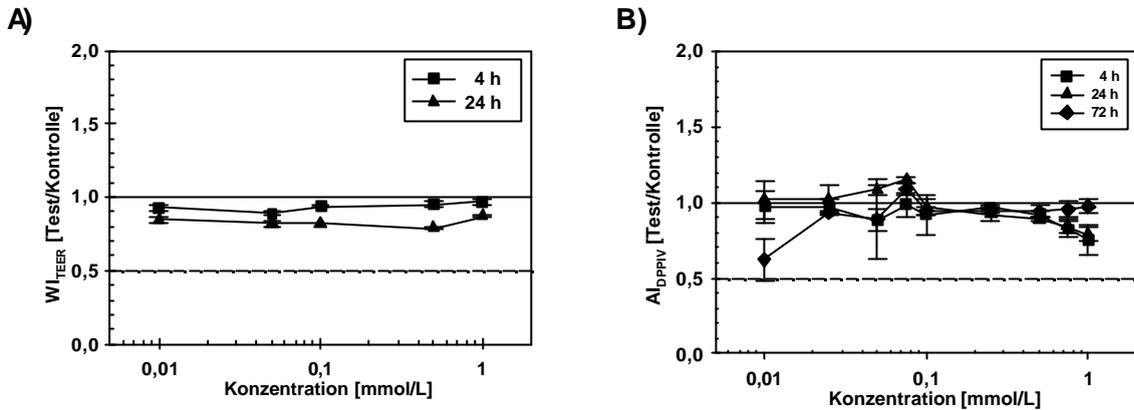


Abbildung 4-22: Effekte (WI_{TEER}, Al_{DPP IV}) einer Inkubation mit Val-Tyr A) auf den TEER und B) die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (12. Passage) in 12-Kavitäten-MTP auf PE-Membranen ($10^5/\text{cm}^2$) und 14 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 bis 72 h Exposition (ab d₁₄) mit Dipeptiden, anschließend Durchführung der TEER-Messung (bei RT, s. 3.7.3) bzw. der Bestimmung der DPP IV-Aktivität (s. 3.7.2). Berechnung der WI_{TEER} bzw. Al_{DPP IV} aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-68 bis A-76).

Ala-Pro, Ala-Trp, Val-Phe und Val-Tyr zeigten zur Negativ-Kontrolle vergleichbare Effekte auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung in Lysaten differenzierter Caco-2 Zellen. Al_{Apoptose} kleiner 0,8 wurden nach Zellinkubation mit 1 mmol/L Dipeptid ermittelt (s. Tabelle 4-28).

Tabelle 4-28: Effekte (Al_{Apoptose}) einer Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (36. Passage) in 96-Kavitäten-MTP ($2 \times 10^4/\text{Kavität}$) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 24 h Exposition (ab d₁₀) mit Dipeptiden, anschließend Durchführung des Apoptose-Nachweises mit Zell-Lysaten (s. 3.7.8). Berechnung der Al_{Apoptose} aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-77). Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur Negativkontrolle (Tukey-Test, 3.8) mit * p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. # IC₅₀ der ACE-inhibitorischen Aktivität des jeweiligen Peptids (s. Tabelle 2-8).

C _{Peptid} [mmol/L]	Ala-Pro	Ala-Trp	Val-Phe	Val-Tyr
0,01	0,92**	0,86***	0,98*	0,94
IC ₅₀ [#]	0,91*	0,79***	0,87***	1,02***
1,00	0,64*	0,61	0,54	0,78

Die extrazelluläre Reduktase-Aktivität polymorphkerniger Leukozyten wurde durch Ala-Pro, Ala-Trp, Val-Phe und Val-Tyr Zeit- und Konzentrations-abhängig gehemmt. Al_{WST-1} < 0,5 wurden jedoch ausschließlich nach Inkubation mit 1 mmol/L Val-Phe identifiziert. Eine im Vergleich zur Negativ-Kontrolle signifikante Hemmung der intrazellulären Enzymaktivität (Al_{Neutralrot}) wurde hingegen mit 0,5 – 1,0 mmol/L Peptid bzw. nach 24 h Inkubation mit 0,01 bis 1,0 mmol/L Val-Tyr nachgewiesen (s. Abbildung 4-23, Abbildung 4-24).

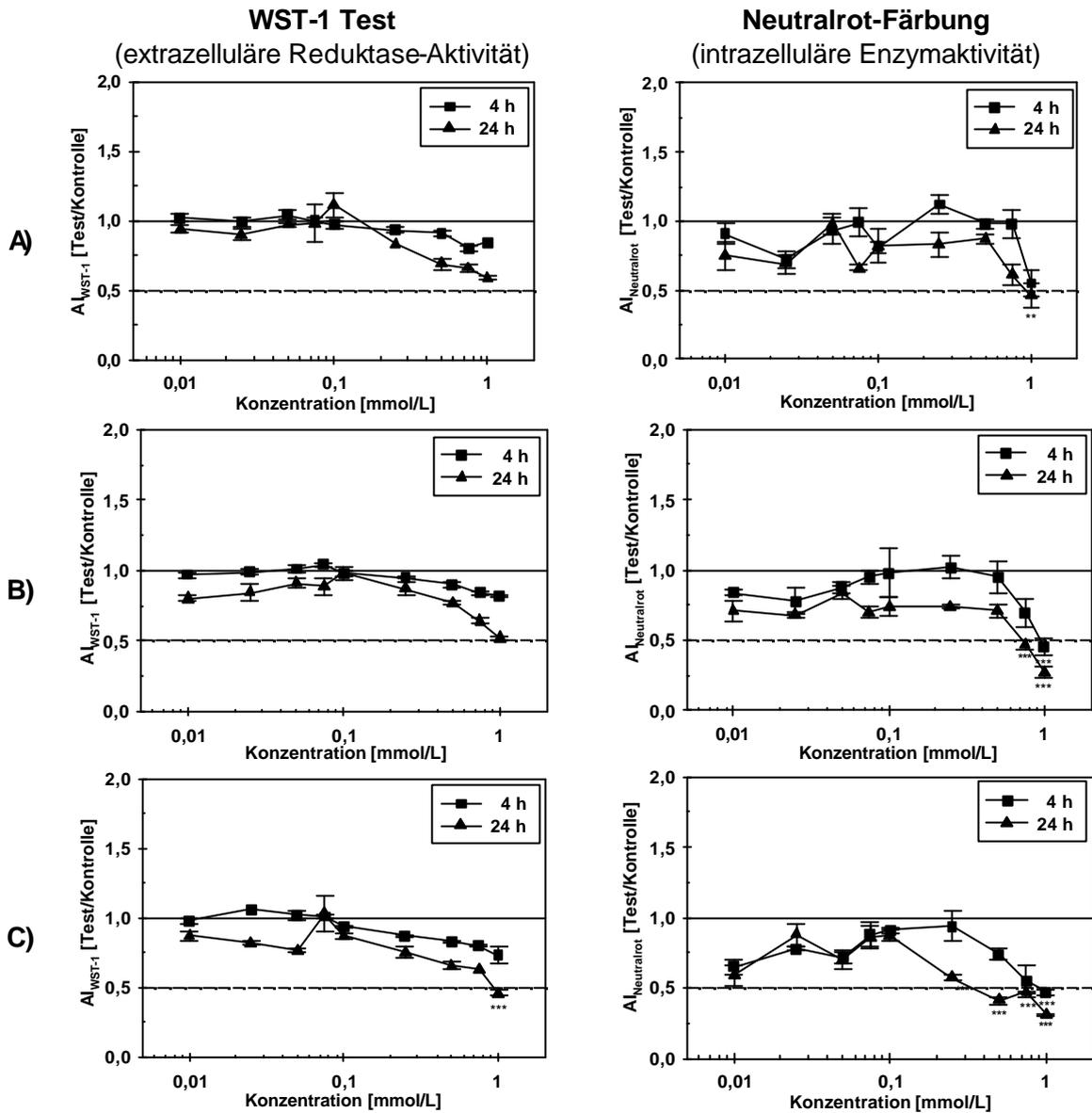


Abbildung 4-23: Effekte (AI_{WST-1} , $AI_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Ala-Pro, B) Ala-Trp und C) Val-Phe auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) polymorphkerniger Leukozyten

Zellaussaat in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4, 24 h Exposition mit Dipeptiden, anschließend Durchführung des WST-1 Tests bzw. der Neutralrot-Färbung (s. 3.7.1). Berechnung der AI_{WST-1} bzw. $AI_{Neutralrot}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-78 und A-80).

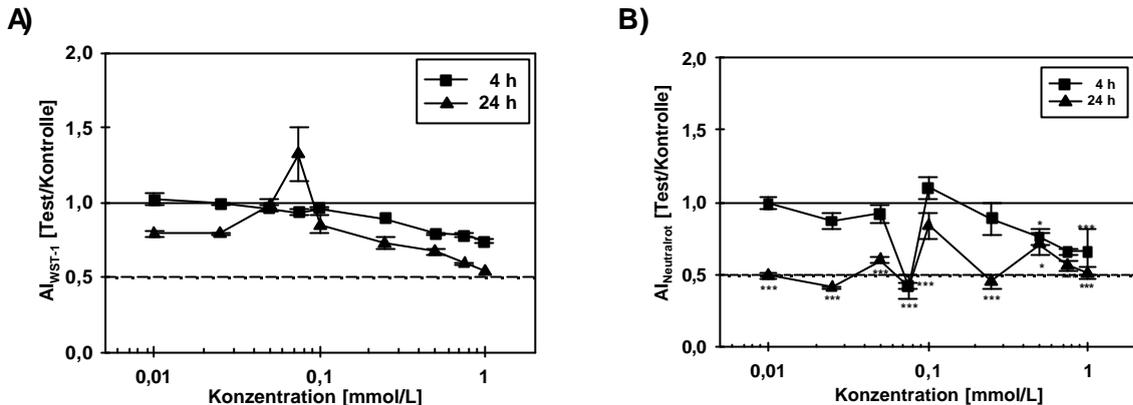


Abbildung 4-24: Effekte (AI_{WST-1} , $AI_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit Val-Tyr auf die metabolische Aktivität polymorphkerniger Leukozyten, untersucht mittels A) WST-1 Tests und B) Neutralrot-Färbung

Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-23.

Die Proliferation der PML (BrdU-Test) wurde durch 0,01 mmol/L Dipeptid im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nicht moduliert bzw. stimuliert. In der höheren Konzentration von 1 mmol/L hemmten Ala-Trp, Val-Phe und Val-Tyr die DNA-Neusynthese im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Abbildung 4-26). Ala-Pro zeigte diesbezüglich keine modulierenden Effekte (s. Abbildung 4-25). In den Zell-Lysaten war eine zu Kontrollzellen vergleichbare Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung nachweisbar (s. Abbildung 4-25, Abbildung 4-26).

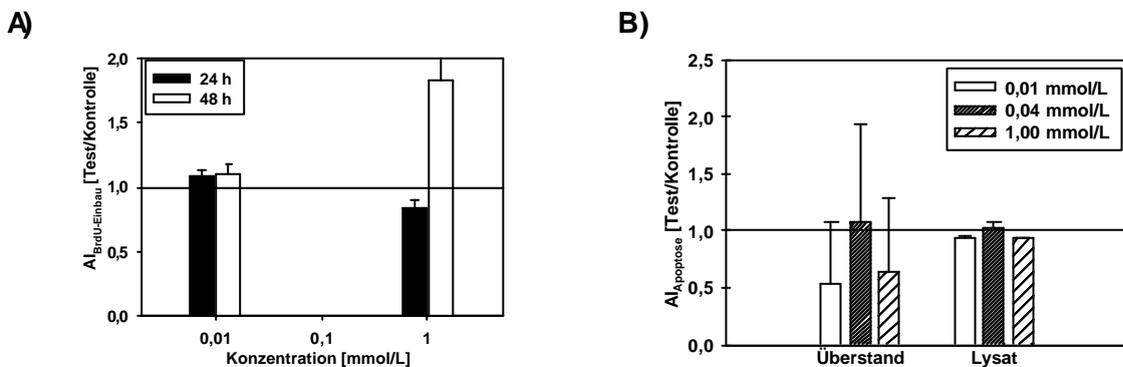


Abbildung 4-25: Effekte (AI_{BrdU} , $AI_{Apoptose}$) einer Inkubation mit Ala-Pro auf A) die DNA-Neusynthese und B) die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung polymorphkerniger Leukozyten

Zellaussaat in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 24 h Exposition mit Dipeptiden, anschließend Durchführung des Proliferations- bzw. Apoptose-Nachweises mit Zell-Lysaten (s. 3.7.7. bzw. 3.7.8). Berechnung der AI_{BrdU} bzw. $AI_{Apoptose}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-81 und A-82). Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

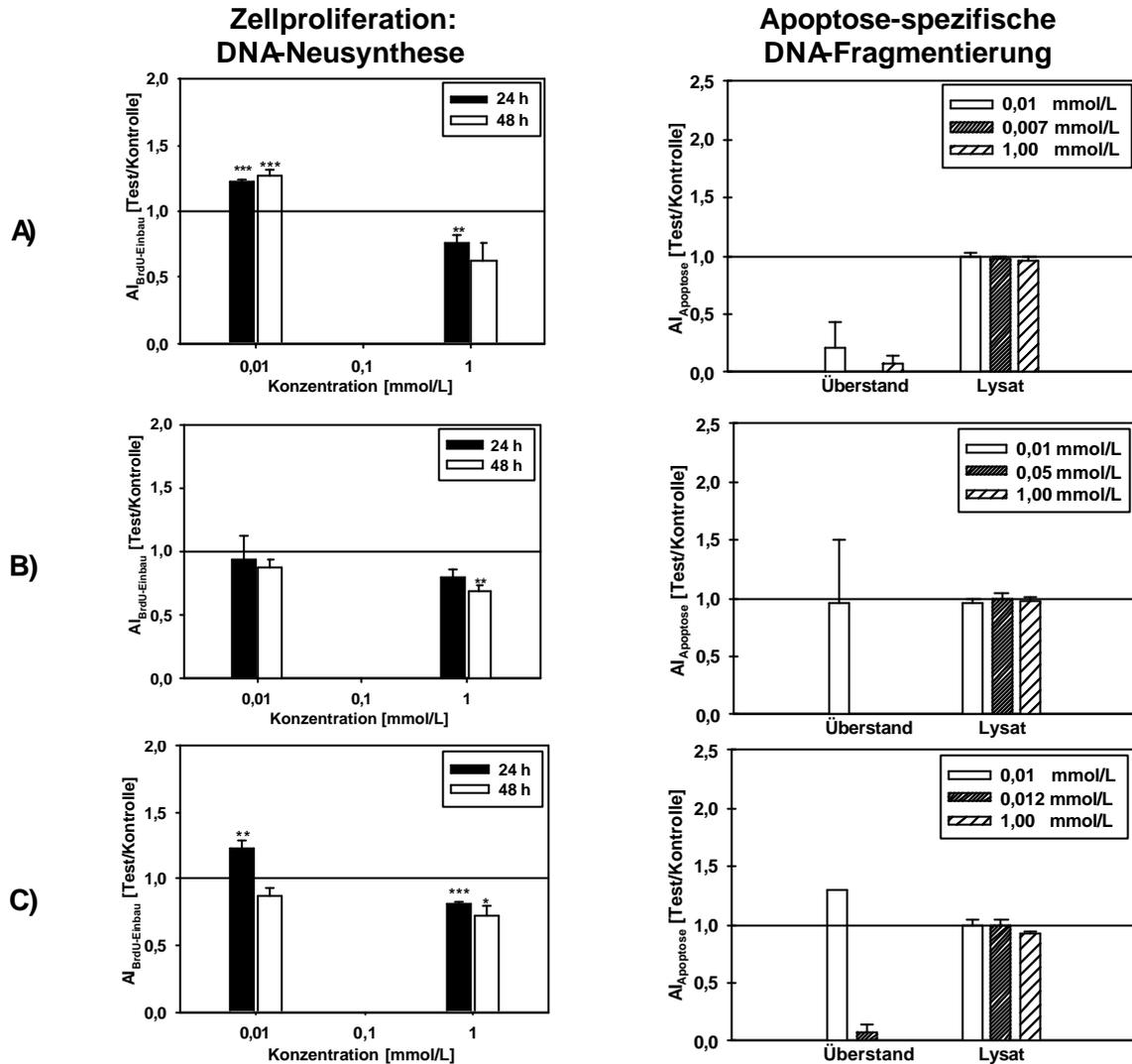


Abbildung 4-26: Effekte (AI_{BrdU} , $AI_{Apoptose}$) einer Inkubation mit A) Ala-Trp, B) Val-Phe und C) Val-Tyr auf die DNA-Neusynthese bzw. Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung polymorphkerniger Leukozyten

Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-25

Die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen wurde durch 0,01 bzw. 1,0 mmol/L Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nicht moduliert bzw. signifikant gehemmt. Die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung wurde durch 0,01 (1,0) mmol/L des Heptapeptids im Vergleich zur Negativ-Kontrolle signifikant stimuliert (gehemmt) (s. Tabelle 4-29).

Tabelle 4-29: Effekte einer Inkubation mit Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg auf verschiedenen Funktionen von Humanzellen: proliferierende bzw. differenzierte Caco-2 Zellen und PML

Proliferierende Caco-2 Zellen und PML bzw. differenzierte Caco-2 Zellen: 4 – 168 h Peptid-Exposition vom Tag der Aussaat an (ab d_0) bzw. nach 10tägiger Vorkultivierung in DMEM (ab d_{10}), anschließend Durchführung der unterschiedlichen Tests: Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test: AI_{WST-1} , s. 3.7.1), Bestimmung von Apoptose (DNA -Fragmentierung: $AI_{Apoptose}$, s. 3.7.9), Messung des TEER (bei RT, WI_{TEER} s. 3.7.3), Untersuchung der Zellproliferation (BrdU-Test: AI_{BrdU} , s. 3.7.8). Angabe der Messergebnisse s. Tabelle A-83. Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur jeweiligen Negativ-Kontrolle (Tukey -Test, 3.8) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Zelltyp	Methode	Inkubation [h]	Indices [Test/Kontrolle]			
			0,01 mmol/L		1,00 mmol/L	
			MW	± S. E. M.	MW	± S. E. M.
Proliferierende Caco-2 - Zellen	Metabolische Aktivität (WST-1 Test)	24	1,05	± 0,07	0,09***	± 0,04
		48	0,90	± 0,12	0,10***	± 0,03
		72	1,11	± 0,09	0,19***	± 0,12
	DNA-Fragmentierung	24	1,16*	± 0,08	0,51	± 0,05
		$d_{10} + 48$	1,16***	± 0,02	1,14**	± 0,02
Caco-2 Monolayer	TEER-Messung	$d_{10} + 96$	1,04	± 0,04	1,08	± 0,03
		$d_{10} + 168$	0,98	± 0,02	0,97	± 0,02
	Metabolische Aktivität (WST-1 Test)	$d_{10} + 4$	0,96	± 0,03	0,10***	± 0,00
		$d_{10} + 24$	1,05	± 0,07	0,01***	± 0,01
PML	DNA-Fragmentierung	$d_{10} + 72$	1,01	± 0,04	0,04***	± 0,04
		$d_{10} + 96$	0,96	± 0,15	0,00***	± 0,00
		$d_{10} + 24$	0,81	± 0,15	0,69	± 0,02
	Metabolische Aktivität (WST-1 Test)	48	0,98	± 0,02	0,40***	± 0,01
		72	0,68***	± 0,03	0,26***	± 0,03
Zellproliferation (BrdU-Test)	96	1,05	± 0,06	0,28***	± 0,02	
	168	0,84	± 0,02	0,20***	± 0,08	
	24	1,28*	± 0,09	0,46***	± 0,07	
DNA-Fragmentierung	48	0,00***	± 0,00	0,00***	± 0,00	
	24	0,96	± 0,02	0,97	± 0,02	

0,01 mmol/L Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg bewirkte eine zur Negativ-Kontrolle vergleichbare Veränderungen des TEER, der metabolischen Aktivität sowie der Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung differenzierter Caco-2 Zellen. 1,0 mmol/L des Heptapeptids erhöhte den TEER zunächst (48 h) und nachfolgend wurden zur Negativ-Kontrolle vergleichbare TEER-Werte gemessen. Die metabolische Aktivität und die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung wurden durch 1,0 mmol/L Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (signifikant) gehemmt ($AI_{WST-1} < 0,5$).

Die metabolische Aktivität von PML wurde durch 0,01 mmol/L Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nach 48, 96, 168 h Inkubation nicht moduliert bzw. nach 72 h Inkubation signifikant gehemmt. $AI_{WST-1} < 0,5$ wurden nach Inkubation der PML mit 1,0 mmol/L Heptapeptid ermittelt. Die Proliferation von PML (BrdU-Test) wurde durch eine 24 h Inkubation mit 0,01 mmol/L Heptapeptid im Vergleich zur Negativ-Kontrolle stimuliert. Diese war 48 h Inkubation mit diesem Peptid vollständig gehemmt. Die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung war nach Peptid-Exposition vergleichbar mit der in Kontrollzellen (s. Tabelle 4-29).

Handelsübliche Milchproteinpräparate

Als Testsubstanzen wurden Lactalbumin 70, Ultralact 35 und ein in PBS gelöstes Magermilchpulver (zertifiziertes Referenzmaterial) eingesetzt.

Die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen wurde durch Lactalbumin 70 und Ultralact 35 im Vergleich zur Negativ-Kontrolle überwiegend gehemmt (s. Abbildung 4-27).

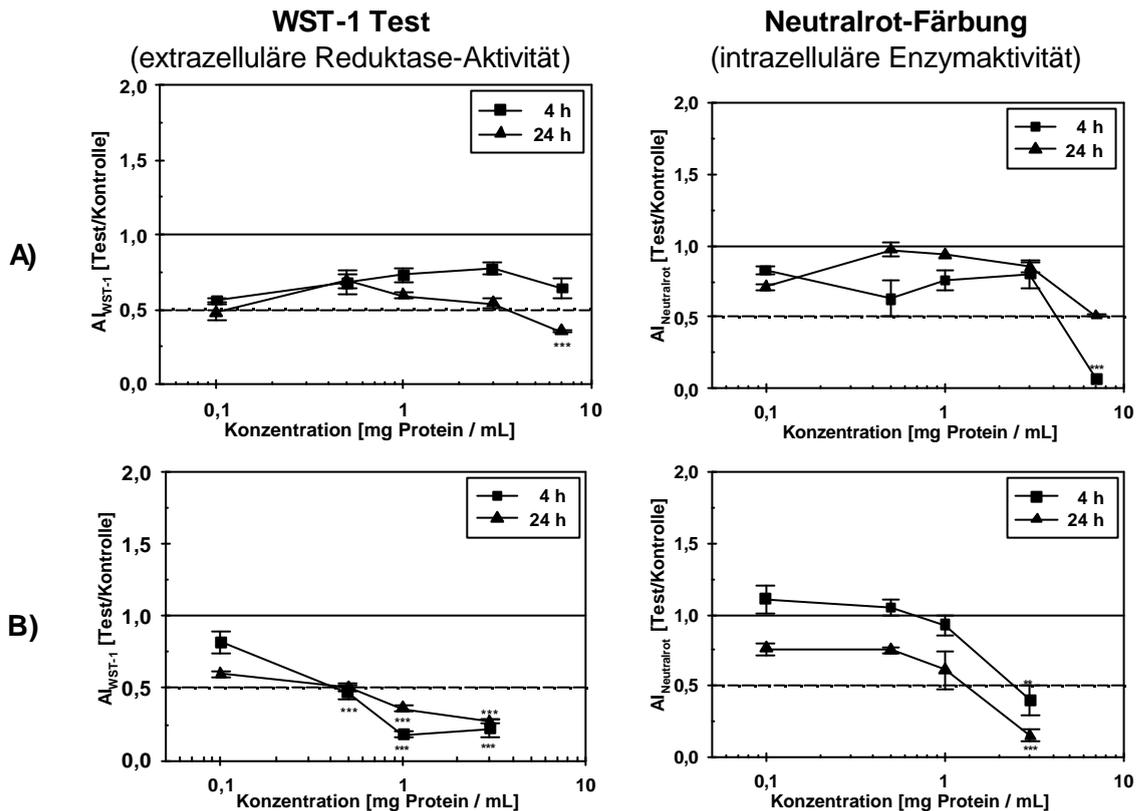


Abbildung 4-27: Effekte (AI_{WST-1} , $AI_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 und B) Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität proliferierender Caco-2 Zellen

Zellaussaat (13. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und 4 h Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 bzw. 24 h Exposition (ab d_0) mit Lactalbumin 70 (0,1 bis 7,0 mg Protein/mL), anschließend Bestimmung der metabolischen Aktivität WST-1 Tests, s. 3.7.1.1 bzw. der Neutralrot-Färbung s. 3.7.1.2). Berechnung der AI_{WST-1} bzw. $AI_{Neutralrot}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabellen A-84, A-85). Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8) mit ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Lactalbumin 70 und Ultralact 35 modulierten den WST-1 Umsatz differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) Konzentrations-abhängig. Eine im Vergleich zur Negativ-Kontrolle signifikante Hemmung der extrazellulären bzw. intrazellulären Reduktase-/Enzym-Aktivität bewirkte die jeweils höchste getestete Konzentration (7 bzw. 3 mg Protein/mL) (s. Abbildung 4-28).

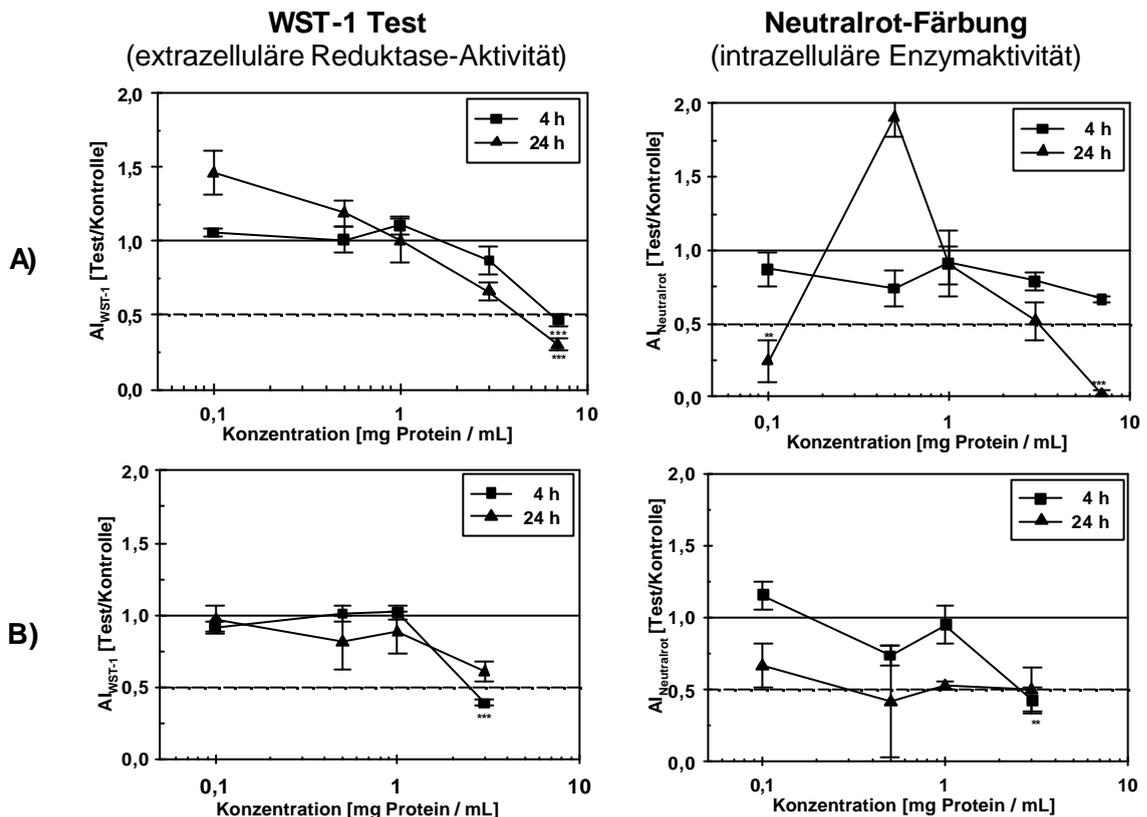


Abbildung 4-28: Effekte (AI_{WST-1} , $AI_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 und B) Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (13. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 bzw. 24 h Exposition (ab d_0) mit A) Lactalbumin 70 (0,1 bis 7,0 mg Protein/mL) und B) Ultralact 35 (0,1 bis 3 mg Protein/mL, anschließend Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test, s. 3.7.1.1 bzw. Neutralrot-Färbung s. 3.7.1.2). Berechnung der AI_{WST-1} bzw. $AI_{Neutralrot}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabellen A-86, A-87). Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8) mit ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Der TEER differenzierter Caco-2 Zellen wurde durch Lactalbumin 70 (0,1 bis 1,0 mg Protein pro mL) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nicht signifikant gesenkt (s. Abbildung 4-29). Gleichzeitig wurden unter dem Umkehrmikroskop zur Negativ-Kontrolle vergleichbare, konfluente Monolayer beobachtet. Die rekonstituierte Magermilch zeigte keine modulierenden Effekte bzw. wirkte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle reduzierend auf den TEER in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 2,0 bzw. 3,0 bis 5,0 mg Protein pro mL. Die Beobachtung der Caco-2 Monolayer unter dem Umkehrmikroskop war hierbei aufgrund der trüben Testlösungen nicht möglich.

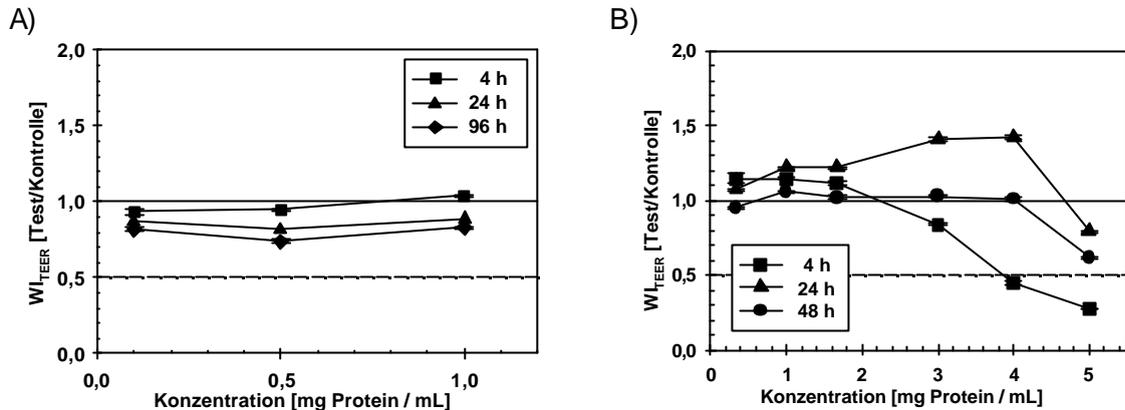


Abbildung 4-29: Effekte (WI_{TEER}) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 bzw. B) rekonstituierter Magermilch auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (12. Passage) in 12-Kavitäten-MTP auf PE-Membranen ($10^5/cm^2$) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 bis 96 h Exposition (ab d_0) mit A) Lactalbumin 70 bzw. B) Magermilchpulver (zertifiziertes Referenzmaterial), anschließend Durchführung der TEER-Messung (bei RT, s. 3.7.3). Berechnung der WI_{TEER} aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-88 und 89).

Die handelsüblichen Milchproteinpräparate modulierten im Vergleich zu Kontrollzellen die DPP IV-Aktivität nicht signifikant (s. Abbildung 4-30).

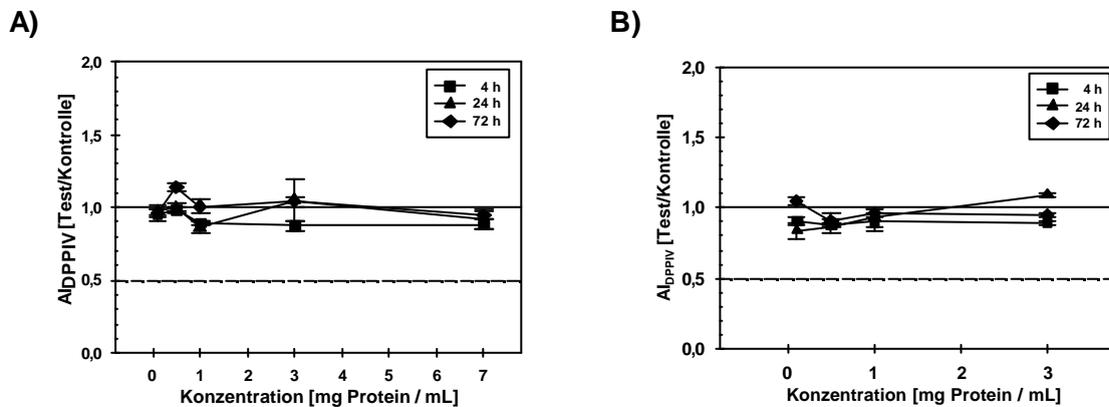


Abbildung 4-30: Effekte ($AI_{DPP IV}$) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 bzw. B) Ultralact 35 auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (12. Passage) in 12-Kavitäten-MTP auf PE-Membranen ($10^5/cm^2$) und 14 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 bis 96 h Exposition (ab d_{14}) mit A) Lactalbumin 70 bzw. B) Ultralact 35, anschließend Durchführung der Bestimmung der DPP IV-Aktivität (s. 3.7.2). Berechnung der $AI_{DPP IV}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabellen A-90, A-91).

Lactalbumin 70 und Ultralact 35 wirkten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle vorwiegend hemmend auf die metabolische Aktivität polymorphkerniger Leukozyten (s. Abbildung 4-31).

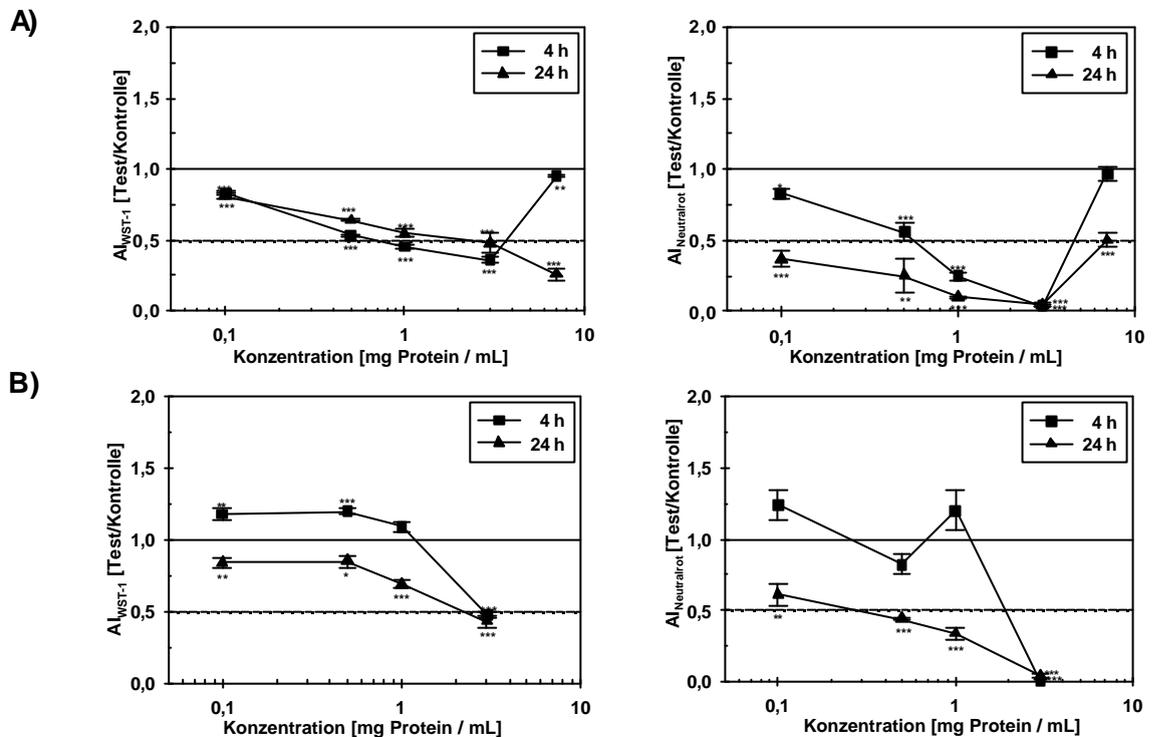


Abbildung 4-31: Effekte (AI_{WST-1} , $AI_{Neutralrot}$) einer Inkubation mit A) Lactalbumin 70 und B) Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität polymorphkerniger Leukozyten

Zellaussaat in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität) und Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 bzw. 24 h Exposition mit A) Lactalbumin 70 (0,1 bis 7,0 mg Protein/mL) und B) Ultralact 35 (0,1 bis 3 mg Protein / mL), anschließend Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test, s. 3.7.1.1 bzw. Neutralrot-Färbung s. 3.7.1.2). Berechnung der AI_{WST-1} bzw. $AI_{Neutralrot}$ aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-92, Tabelle A-93). Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zur Negativ-Kontrolle (Tukey-Test, 3.8) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2 Peptid-Transportstudien

Die Peptid-Transportstudien wurden nach Aussaat der Caco-2 Zellen (10^5 pro cm^2) auf Polycarbonat (PC) - Membranen in 6- bzw. 12-Kavitäten-MTP und 14-(21-)tägiger ($d_{14/21}$) Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO_2) durchgeführt (s. 3.6.). In dieser Zeit differenzierten die Caco-2 Zellen und bildeten Monolayer aus, deren Integrität durch Messung des TEER (bei 37 °C) nachgewiesen wurde (s. 3.7.3). Zur Untersuchung des Peptidtransports (s. 3.7.4, Tabelle 321) wurden ausschließlich intakte Caco-2 Monolayer eingesetzt. Diese wurden mit HBSS gewaschen und nachfolgend mit dem jeweiligen Testpeptid (an d_4) inkubiert, welches vorwiegend ins apikale Kompartiment appliziert wurde. In jede

Testreihe (bzw. auf jeder MTP) wurde eine Negativ-Kontrolle (K_N : ohne Testsubstanzexposition) integriert. Dies war notwendig, da durch Caco-2 Zellen Substanzen sezerniert werden können, die in allen Proben aus basolateralen Kompartimenten enthalten sein würden. Außerdem wurde eine Diffusionskontrolle (K_D) auf jeder MTP integriert, wobei die Testsubstanz auf eine Membran (ohne Zellen) appliziert wurde, um die Durchlässigkeit der Membranen für die jeweilige Probe zu überprüfen. Die Probenentnahme erfolgte zumeist aus den basolateralen Kompartimenten (s. Tabellen 3-24 bis 3-26). Es folgte der Peptidnachweis per HPLC-Analyse (s. 3.7.5.2) bzw. eine photometrische Bestimmung von Hydroxyprolin (Aminosäure aus Kollagen, s. 3.7.7). Hierbei wurde eine Verdünnung der jeweiligen Testsubstanz als Positiv-Kontrolle (K_P) mitgeführt.

4.2.1 Überprüfung der Integrität von Caco-2 Monolayern in Transportstudien

Die Zeit-abhängige Veränderung des TEER wurde an ausgewählten Caco-2 Monolayern (K_N) bis zum jeweiligen Testende untersucht. Hierbei stieg der TEER jeweils innerhalb der ersten 9 bis 14 Tage (d_{10} , d_{14}) der Kultivierung unter Standardbedingungen an und erreichte nachfolgend ein Plateau. Die Größenordnung des TEER variierte in Abhängigkeit von der Anzahl der Zellpassagen bzw. der Zellkulturfläche (s. Abbildung 4-32).

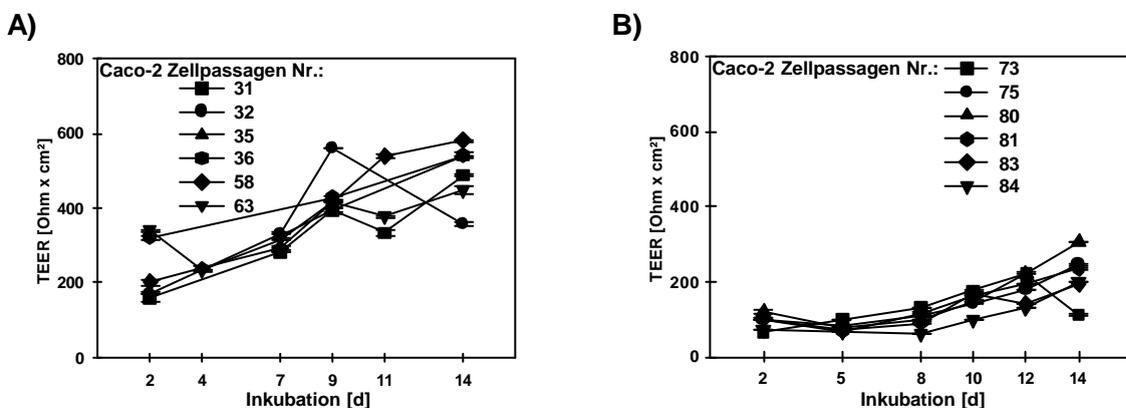


Abbildung 4-32: Zeit-abhängige Veränderung des TEER von Caco-2 Zellen (K_N) nach Aussaat auf PC-Membranen einer Kulturfläche von A) 4,7 cm² bzw. B) 1,1 cm²

Zellaussaat in A) 6 bzw. B) 12-Kavitäten-MTP (Zellpassagen s. Tabelle 321) auf PC-Membranen (10⁵/cm²) und 14 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), TEER-Messung bei 37 °C (s. 3.7.3), direkt vor der jeweiligen Transportstudie. Berechnung der Mittelwerte aus drei Messwiederholungen ± S. E. M..

Zum Nachweis intakter Caco-2 Monolayer wurde außerdem 2 bis 4 Stunden ($d_{14} + 4$ h) nach Durchführung einer jeden Transportstudie erneut der TEER gemessen. Hierbei wurden grundsätzlich niedrigere Werte ermittelt als bei der jeweiligen Messung, die direkt vor der

Transportstudie (d_{14}) durchgeführt wurde (s. Tabelle 4-30, Tabelle 4-31, Abbildung 4-33). Dies ist u. a. begründet in der Probenentnahme und im vollständigen Austausch der Puffer durch DMEM.

Es war notwendig, einen TEER-Wert zu identifizieren und festzulegen, der die Grenze zwischen intakten und zerstörten bzw. nicht vollständig gebildeten Caco-2 Monolayern definiert. Dazu wurden einerseits die Angaben der Literatur herangezogen, die besagen, dass spätestens 7 Tage nach Zellaussaat intakte Caco-2 Monolayer nachweisbar waren² und andererseits die eigenen Ergebnisse der Zeit-abhängigen Veränderung des TEER von Kontrollzellen (s. Abbildung 4-32). Demnach wurde durch einen TEER (d_{14}) von $\geq 90 \Omega \text{ cm}^2$ das Vorhandensein eines intakten Caco-2 Monolayers angezeigt, unabhängig davon, ob die Messung vor bzw. nach der Transportstudie stattfand.

Tabelle 4-30: TEER von Caco-2 Monolayern (K_N) direkt vor bzw. 2 – 4 h nach jeder Transportstudie (I)

Messung des TEER (bei 37 °C, s. 3.7.3) der **Negativ-Kontrolle** (K_N) eines jeden Tests der Transportstudie die mit synthetischen Peptiden durchgeführt wurde (Testkennzeichnung kursiv, s. Tabelle 3-21). Berechnung der Mittelwerte \pm S. E. M. aus drei Messwiederholungen (je Kavität und MTP) unter Berücksichtigung der Leerwerte [Ω] (s. Tabellen A-95).

Test	MTP Nr.	TEER [$\text{W} \times \text{cm}^2$] von Kontrollzellen (je 1 Monolayer pro MTP)			
		Messung A) vor,		B) nach einer jeden Transportstudie	
		MW	\pm S. E. M.	MW	\pm S. E. M.
<i>1</i>	1	580,50	\pm 2,60	358,50	\pm 3,00
	2	516,00	\pm 5,41	423,00	\pm 1,50
	3	604,50	\pm 3,00	294,00	\pm 3,97
	4	564,00	\pm 1,50	225,00	\pm 1,50
<i>2</i>	1	355,50	\pm 5,20	313,50	\pm 1,50
<i>3</i>	1	538,50	\pm 1,50	381,00	\pm 8,35
<i>4</i>	1	540,00	\pm 6,87	307,50	\pm 4,50
	2	484,50	\pm 6,87	298,50	\pm 8,35
	3	571,50	\pm 6,54	397,00	\pm 7,50
	4	456,00	\pm 1,50	253,50	\pm 1,50
<i>5</i>	1	427,50	\pm 9,37	301,50	\pm 4,50
	2	433,50	\pm 3,00	295,50	\pm 1,50
<i>6</i>	1	543,00	\pm 1,50	324,00	\pm 2,60

² Hidalgo, I. et al., 1989, Pinto, M. et al., 1983

Tabelle 4-31: TEER von Caco-2 Monolayern (K_N) direkt vor bzw. 2 – 4 h nach jeder Transportstudie (II)

Messung des TEER (bei 37 °C, s. 3.7.3) der **Negativ-Kontrolle** (K_N) eines jeden Tests der Transportstudie die mit Kollagenhydrolysaten durchgeführt wurde (Testkennzeichnung, s. Tabelle 3-21). Berechnung der Mittelwerte \pm S. E. M. aus drei Messwiederholungen (je Kavität und MTP) unter Berücksichtigung der Leerwerte [Ω] (s. Tabellen A-94).

Test	MTP Nr.	TEER [$W \times cm^2$] von Kontrollzellen (je 1 Monolayer pro MTP)			
		Messung A) vor,		B) nach einer jeden Transportstudie	
		MW	\pm S. E. M.	MW	\pm S. E. M.
1	1	255,93	$\pm 0,97$	190,67	$\pm 1,68$
	2	271,70	$\pm 0,37$	217,43	$\pm 0,37$
	3	262,90	$\pm 1,10$	226,23	$\pm 0,00$
	4	263,27	$\pm 0,73$	213,03	$\pm 1,60$
2	1	188,83	$\pm 0,37$	123,57	$\pm 1,94$
	2	221,83	$\pm 2,23$	111,10	$\pm 1,32$
3	1	245,67	$\pm 2,64$	48,40	$\pm 0,64$
	2 [#]	221,10 [#]	1,76 [#]	210,10 [#]	338,07 [#]
4	1	306,53	$\pm 0,97$	140,07	$\pm 1,32$
	1	356,40	$\pm 1,10$	231,00	$\pm 1,27$
	2	309,83	$\pm 1,94$	215,23	$\pm 1,32$
	2	320,47	$\pm 0,64$	233,93	$\pm 2,86$
	3	284,17	$\pm 0,37$	76,27	$\pm 0,37$
	3	315,70	$\pm 0,97$	213,77	$\pm 0,37$
	4	303,60	$\pm 1,68$	190,67	$\pm 0,73$
	4	329,63	$\pm 2,86$	198,00	$\pm 1,68$
	5	332,93	$\pm 2,20$	190,51	$\pm 5,73$
	5	357,13	$\pm 1,68$	173,80	$\pm 2,04$
	6	335,13	$\pm 2,91$	169,40	$\pm 25,30$
	6	322,30	$\pm 0,37$	216,70	$\pm 0,64$
5	1	234,67	$\pm 0,97$	115,50	$\pm 2,86$
	1	233,20	$\pm 0,64$	154,00	$\pm 1,60$
	2	260,70	$\pm 2,40$	173,80	$\pm 2,04$
	2	265,83	$\pm 1,27$	158,77	$\pm 0,73$
6	1	192,50	$\pm 0,00$	145,57	$\pm 1,83$
7	1	211,93	$\pm 0,37$	106,33	$\pm 1,68$
	2	203,13	$\pm 1,32$	144,47	$\pm 0,73$

[#] Transportstudie nach 21 Tagen Zellkultivierung

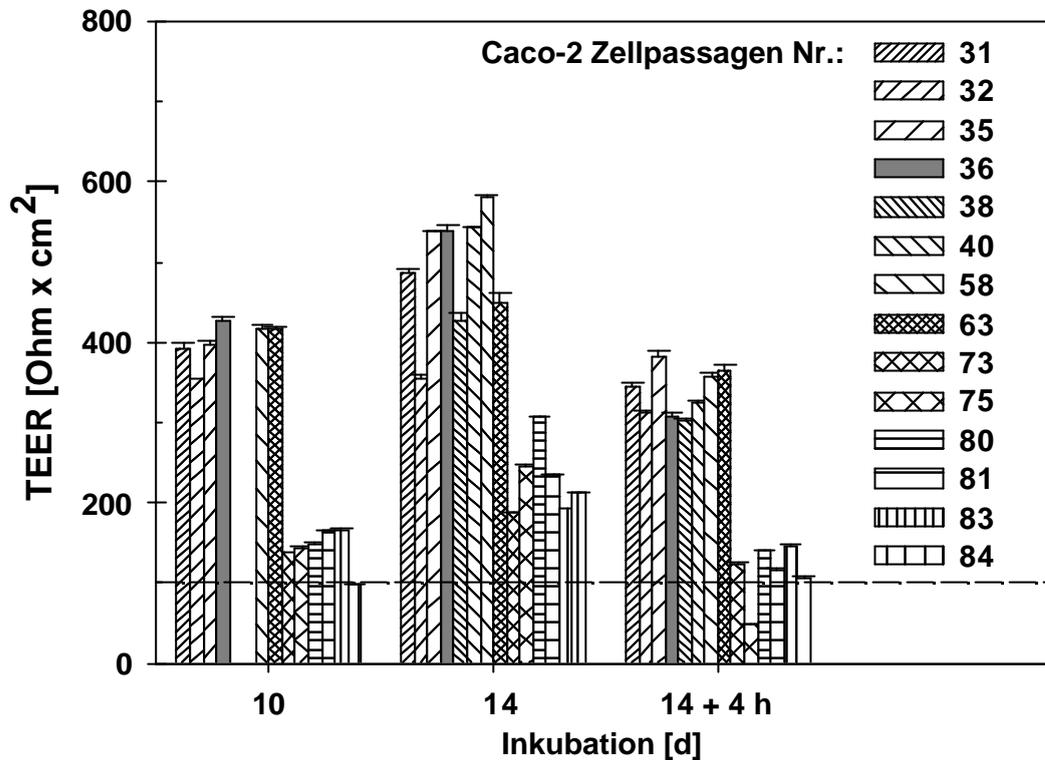


Abbildung 4-33: Veränderung des TEER von Caco-2 Zellen (K_N) in Abhängigkeit von der Zellpassagenanzahl und der Inkubationsdauer

Angaben zur Zellkultivierung s. Abbildung 4-32 (Zellpassagen s. Tabelle 3-21), TEER-Messung nach 10 bzw. 14 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen sowie ca. 4 h nach der jeweiligen Transportstudie.

In der nachfolgenden Tabelle 4-32 werden die Ergebnisse der TEER Messungen der Testkavitäten (P_T) einer jeden MTP zusammengefasst (Messwerte der Leerwerte, s. Tabelle A-94). Dazu wurden Mittelwerte und deren Standardfehler berechnet aus den jeweils drei Einzelmessungen einer jeden Kavität der 5 bzw. 11 Kavitäten (P_T) einer MTP (6 bzw. 12 Kavitäten pro MTP). Nachfolgend wurden zur Durchführung der jeweiligen Transportstudien ausschließlich intakte Caco-2 Monolayer (P_T) eingesetzt (basierend auf den Ergebnissen ermittelt vor einer jeden Transportstudie). Vereinzelt wurden nach einer Transportstudie ($d_{14} + 2-4$ h) TEER Werte kleiner $90 \Omega \text{ cm}^2$ (P_T) ermittelt.

Tabelle 4-32: TEER von Caco-2 Monolayern (P_T) direkt vor bzw. 2 – 4 h nach jeder Transportstudie

Messung des TEER (bei 37 °C, s. 3.7.3) von Caco-2 Monolayer aus **Testkavitäten (P_T)** direkt vor bzw. 2 – 4 h nach der Durchführung einer jeden Transportstudie (Testkennzeichnung, s. Tabelle 3-21). Berechnung der Mittelwerte \pm S. E. M. und Angabe Minima/Maxima aus je drei Messwiederholungen einer jeden Kavität, unter Berücksichtigung der Leerwerte [Ω] (s. Tabellen A-94, A-95).

Test	MTP	TEER [$W \times cm^2$]							
		Messung A) vor, B) nach einer jeden Transportstudie							
		A)				B)			
	MW	\pm S.E.M.	Min.	Max.	MW	\pm S.E.M.	Min.	Max.	
1	1	556,80	\pm 15,98	447,00	606,00	365,40	\pm 8,67	325,50	421,50
	2	559,50	\pm 13,25	487,50	609,00	377,70	\pm 12,72	316,50	423,00
	3	577,50	\pm 6,57	547,50	604,50	360,30	\pm 14,04	294,00	435,00
	4	616,20	\pm 9,17	564,00	660,00	372,00	\pm 25,05	225,00	508,50
2	1	451,80	\pm 16,20	337,50	495,00	382,50	\pm 10,44	330,00	435,00
	3	492,00	\pm 2,59	486,00	507,00	331,50	\pm 5,92	294,00	348,00
4	1	377,70	\pm 8,49	334,50	421,50	319,20	\pm 7,04	279,00	349,50
5	1	538,88	\pm 9,49	493,50	580,50	357,75	\pm 15,86	273,00	400,50
6	1	586,80	\pm 12,94	522,00	645,00	296,70	\pm 8,47	244,50	331,50
	2	597,90	\pm 35,09	484,50	850,50	336,60	\pm 11,47	283,50	385,50
	3	590,10	\pm 13,24	537,00	675,00	324,90	\pm 16,06	225,00	384,00
	4	530,40	\pm 10,89	456,00	574,50	282,60	\pm 8,80	253,50	345,00
7	1	456,00	\pm 10,08	427,50	525,00	319,50	\pm 2,81	301,50	330,00
	2	448,50	\pm 10,36	394,50	508,50	292,20	\pm 6,19	265,50	330,00
8	1	579,90	\pm 22,90	427,50	648,00	312,60	\pm 8,83	264,00	360,00
1	1	249,08	\pm 2,46	233,57	279,77	168,89	\pm 4,85	108,17	198,73
	2	248,34	\pm 2,98	230,63	271,70	203,24	\pm 4,09	164,63	220,73
	3	272,21	\pm 4,25	254,47	336,23	193,12	\pm 6,03	110,00	226,23
	4	278,73	\pm 1,62	263,27	292,97	173,60	\pm 13,14	34,83	262,90
2	1	231,29	\pm 2,84	188,83	246,03	129,54	\pm 5,33	70,77	178,93
	2	237,71	\pm 1,60	221,83	252,27	92,77	\pm 6,23	40,70	140,80
3	1	249,24	\pm 1,77	235,77	273,90	106,79	\pm 2,81	48,40	121,37
	2 [#]	221,10	\pm 1,76	210,10	338,07	182,05	\pm 7,53	107,07	217,43
4	1	320,93	\pm 3,30	295,53	356,40	163,95	\pm 14,75	85,07	259,23
	2	318,58	\pm 10,11	277,93	406,63	200,04	\pm 14,88	71,13	302,13
	3	293,49	\pm 4,41	273,90	333,30	204,02	\pm 10,71	76,27	275,37
	4	306,48	\pm 8,27	276,47	389,40	178,46	\pm 6,15	153,27	245,30
	5	296,58	\pm 3,41	269,50	424,60	87,27	\pm 2,51	87,27	266,20
	6	305,28	\pm 1,99	294,80	335,87	186,69	\pm 6,51	149,60	227,33
5	1	257,07	\pm 2,64	233,20	277,57	163,33	\pm 4,46	115,50	206,43
	2	262,80	\pm 2,39	245,67	284,53	160,00	\pm 3,25	133,83	195,43
6	1	196,72	\pm 2,80	187,37	206,07	104,32	\pm 14,67	61,60	145,57
7	1	211,48	\pm 2,50	201,67	239,07	128,38	\pm 4,78	87,27	154,37
	2	207,21	\pm 1,26	197,27	213,77	147,58	\pm 1,11	137,87	154,37

[#] Transportstudie nach 21 Tagen Zellkultivierung

4.2.2 Einfluss der Testsubstanzen auf die Caco-2 Monolayer-Integrität

Zunächst wurde durch TEER-Messung (und z. T. durch mikroskopische Beobachtung) untersucht, ob die Testsubstanzen der Transportstudien unerwünschte (potenziell zytotoxische) Effekte auf differenzierte Caco-2 Zellen zeigten. In diese Untersuchungen wurden auch Gly-Pro und Bradykinin integriert, die in der Literatur zur Überprüfung des Transportmechanismus von Peptiden (*in vitro*) genannt wurden³.

Synthetische Peptide

Die Wirkung von 0,01 bis 10,00 mmol/L Gly-Pro und 200 bis 800 µg/mL Bradykinin auf Caco-2 Monolayer wurde durch Messung des TEER (bei RT, an d_{10}) nach Zellaussaat auf PE-Membranen untersucht. Beide Peptide veränderten den TEER differenzierter Caco-2 Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nicht bzw. bewirkten einen Anstieg des TEER. Es wurden WI_{TEER} zwischen 0,9 bis 1,4 berechnet (s. Abbildung 4-34).

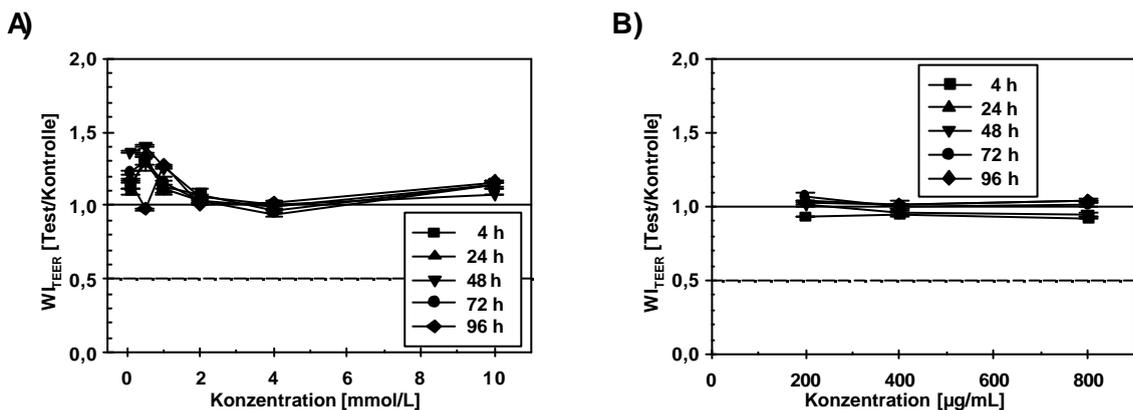


Abbildung 4-34: Effekte (WI_{TEER}) einer Inkubation mit A) Gly-Pro und B) Bradykinin auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (37. Passage) in 12-Kavitäten-MTP auf PE-Membranen ($10^5/cm^2$) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 bis 96 h Exposition (ab d_{10}) mit 0,01 – 10 mmol/L Gly-Pro bzw. 200 – 800 µL/mL Bradykinin, anschließend Durchführung der TEER-Messung (bei RT, s. 3.7.3) und Berechnung der WI_{TEER} aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-96 und A-97).

³ Gardner, M. L. G., 1983, Gardner, M. L., 1991, Shimizu, M. et al., 1997

Kollagenhydrolysate

Die Wirkung der fünf verschiedenen Kollagenhydrolysate auf differenzierte Caco-2 Monolayer wurde durch Messung des TEER nach Zellaussaat auf PE- bzw. PC-Membranen untersucht (s. Abbildung 4-35, Abbildung 4-36). Die Kollagenhydrolysate modulierten den TEER differenzierter Caco-2 Monolayer im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, wobei jedoch keine signifikant TEER-senkenden Effekte ermittelt wurden. In Abhängigkeit von der Testsubstanz-Konzentration wurden nach 4 h Inkubation ansteigende Widerstands-Indices berechnet. Gleichzeitig wurden unter dem Umkehrmikroskop intakte Caco-2 Monolayer beobachtet.

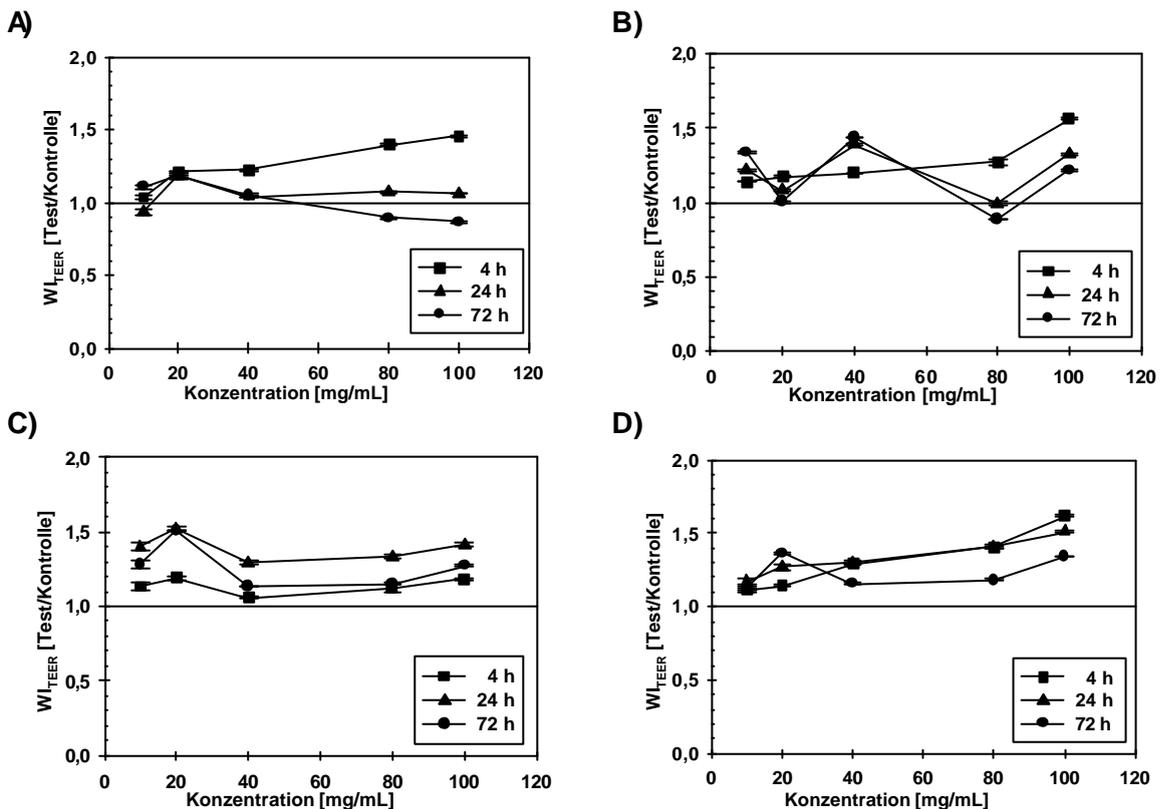


Abbildung 4-35: Effekte (WI_{TEER}) einer Inkubation mit A) Sol D, B) Sol DA, C) Collagel A und D) Collagel BS auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (41. Passage) in 12-Kavitäten-MTP auf PE-Membranen ($10^5/cm^2$) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend 4 bis 72 h Exposition (ab d_{10}) mit 10 bis 100 mg/mL Sol D, Sol DA, Collagel A und Collagel BS, anschließend Durchführung der TEER-Messung (bei RT, s. 3.7.3) und Berechnung der WI_{TEER} aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabellen A-98 bis A-101).

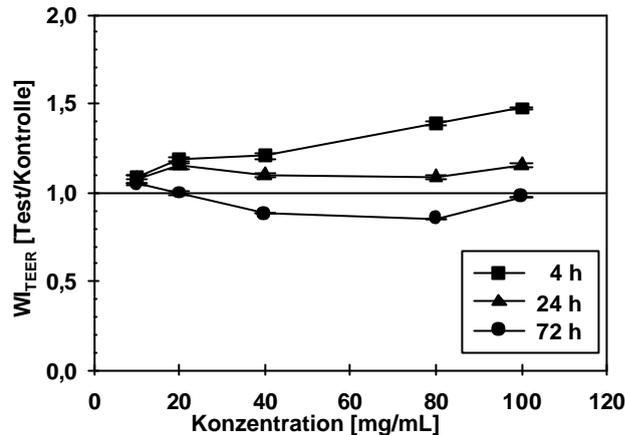


Abbildung 4-36: Effekte (WI_{TEER}) einer Inkubation mit Collagen BS-GA auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-35, Angabe der Messergebnisse s. Tabelle A-102.

Die Wirkung von 100 mg/mL des jeweiligen Kollagenhydrolysats auf differenzierte Caco-2 Zellen (Monolayer) wurde außerdem nach Zellaussaat auf PC-Membranen durch Messung des TEER bei 37 °C untersucht. Auch in diesen Tests wurden im Vergleich zur Negativ-Kontrolle keine TEER-senkenden Effekte nachgewiesen (s. Abbildung 4-37, A).

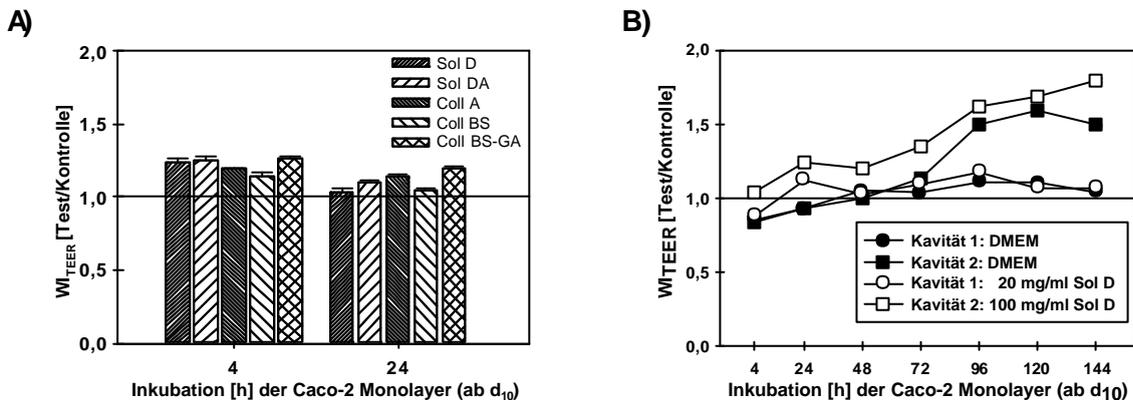


Abbildung 4-37: Effekte (WI_{TEER}) einer A) kontinuierlichen und B) intervallartigen Inkubation mit A) fünf verschiedenen Kollagenhydrolysaten bzw. B) Sol D auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (45. Passage) in 12-Kavitäten-MTP auf PE-Membranen ($10^5/\text{cm}^2$) und 10 d Zellkultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), nachfolgend Exposition (ab d_{10}) mit A) 100 mg/mL Kollagenhydrolysat bzw. B) mit 20, 100 mg/mL Sol D, anschließend Durchführung der TEER-Messung (bei 37 °C, s. 3.7.3): A) ein-, B) zweimal täglich: direkt vor bzw. nach der täglichen 30 min - Inkubation der Monolayer mit Testsubstanz und anschließende Weiterkultivierung in DMEM (schwarze bzw. offene Symbole). Die Berechnung der WI_{TEER} erfolgte aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabellen A-103, A-104).

In einem weiteren Versuch wurde eine tägliche Zufuhr von Sol D simuliert, indem die Caco-2 Monolayer täglich 30 min mit 20 bzw. 100 mg/mL Sol D inkubiert wurden. Anschließend wurde die Testsubstanz aus der jeweiligen Kavität entnommen und die Zellen in DMEM unter

Standardbedingungen weiter kultiviert (s. Abbildung 4-37, B). Im Vergleich der jeweiligen Messungen eines Tages bewirkte diese Art der Sol D Exposition einen Anstieg des TEER.

4.2.3 Synthetische Peptide

Bradykinin (Nonapeptid: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)

In Test 1 der Transportstudie wurden die Caco-2 Monolayer (an d_4) 15 bis 60 Minuten mit 1 mmol/L Bradykinin inkubiert (apikal: pH 6,0, basolateral: pH 7,4), die Proben aus beiden Kompartimenten (AP, BL) jeder Kavität entnommen und mittels RP-HPLC (C 18) analysiert. Zunächst wurde die Retentionszeit von Bradykinin (K_P) ermittelt: t_R 43 min (s. Abbildung 3-15, B). Nachfolgend wurden die Proben der Negativ-Kontrolle analysiert, wobei ausschließlich in der basolateral entnommenen Probe (K_{N-BL}) ein Signal detektiert wurde, t_R 42 min. Dieses Signal unterschied sich ca. um den Faktor 10 vom Rauschen der Basislinie und wies eine Peakfläche von 374254 Abs x min auf (s. Abbildung 4-38).

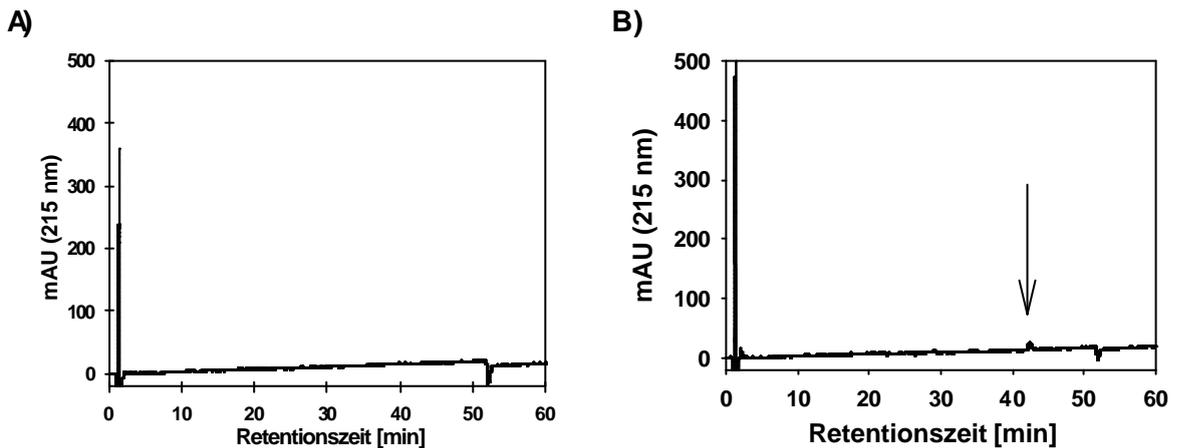


Abbildung 4-38: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) der Negativ-Kontrolle nach Probenentnahme aus A) dem apikalen und B) dem basolateralen Kompartiment

Test 1 und 2: Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 58. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_4 , s. 3.7.3) und anschließend 60 min Inkubation mit HBSS (K_N), Probenentnahme aus A) dem apikalen (Test 2) und B) dem basolateralen Kompartiment (Test 1) und RP-HPLC-Analyse (s. 3.7.4, 3.7.5.1). Der Pfeil markiert ein Signal nach t_R 42 min. Diese Elutionsposition ist identisch mit der von Bradykinin.

Bradykinin wurde nach RP-HPLC-Analyse der basolateral entnommenen Proben (P_{T-BL}) durch Peaks bei t_R 42 min nachgewiesen (s. Abbildung 4-39 B₁, B₂). Es wurden Peakflächen von 1565966 bzw. 1289704 Abs x min ermittelt, die somit 3,4- bis 4,2-mal größer waren als die Fläche des Peaks der Negativ-Kontrolle (s. Abbildung 4-38, B). Die Chromatogramme der Proben aus apikalen Kompartimenten enthielten Peaks nach Retentionszeiten von t_R 38, 40, 42 min. Es wurden folgende Peakflächen ermittelt: 1856461, 8739100, 29449777 bzw. 2403943, 9808209, 25694176 Abs x min (s. Abbildung 4-39 A₁ bzw. A₂).

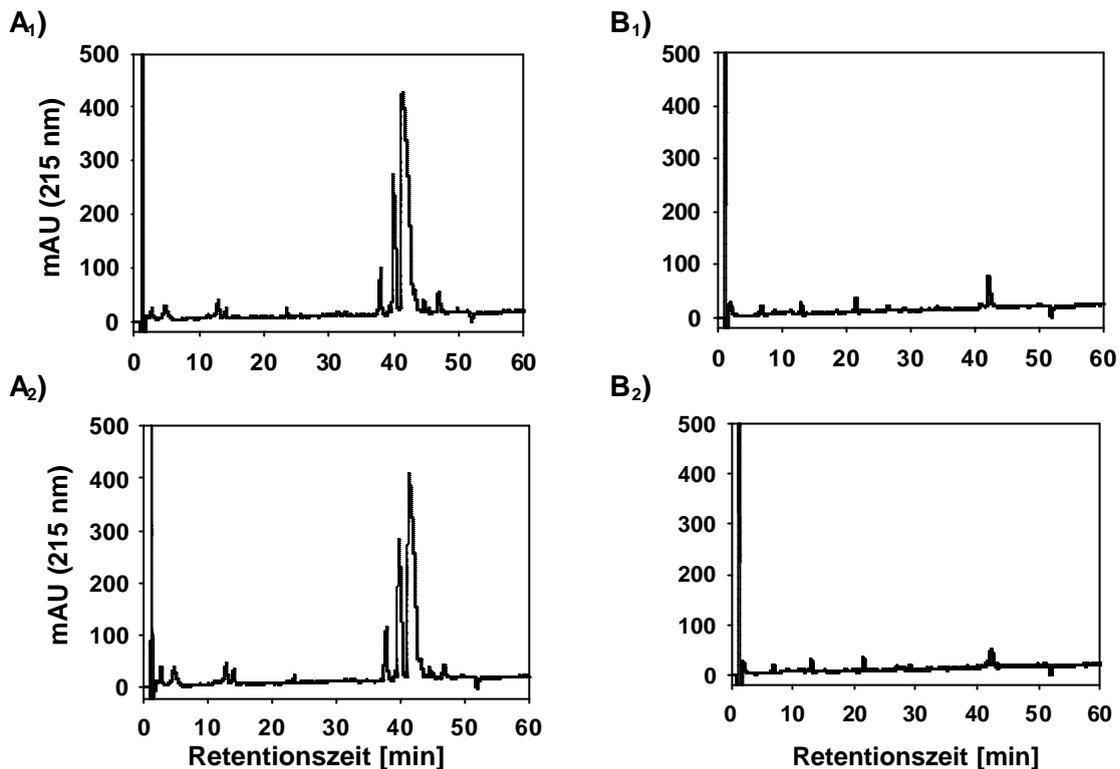


Abbildung 4-39: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) der Proben aus dem A) apikalen und B) basolateralen Kompartiment, nach A₁, B₁) 45 min und A₂, B₂) 60 min Inkubation intakter Caco-2 Monolayer mit 1 mmol/L Bradykinin

Test 1: Zellaussaat ($10^5/\text{cm}^2$, 58. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37°C , an d_4 , s. 3.7.3) und anschließend A₁, B₁) **45 min** bzw. A₂, B₂) **60 min** Exposition mit **1 mmol/L Bradykinin**, Probenentnahme aus A) apikalen bzw. B) basolateralen Kompartimenten und RP-HPLC-Analyse (s. 3.7.4, 3.7.5.1).

Zur Überprüfung der möglichen Hydrolyse von Bradykinin durch Peptidasen der Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen wurde der Test 2 durchgeführt. In diesem Test wurden vier Caco-2 Monolayer (an d_4) mit 1 mmol/L Bradykinin 60 min inkubiert. Außerdem war eine Negativ-Kontrolle integriert. Alle Proben wurden aus **apikalen** Kompartimenten (P_{T-AP} , K_{N-AP}) entnommen und nach entsprechender Vorbereitung mittels Umkehrphasen-Chromatographie (C 18) analysiert. Dabei wurden die Proben der Testkavitäten (P_T) vollständig auf die Säule aufgetragen und jeweils vier Fraktionen der 10 verschiedenen Analysen gesammelt. Nachfolgend wurde die Zusammensetzung dieser vier Fraktionen (4 Proben) mit Hilfe der Aminosäureanalyse untersucht.

Im Chromatogramm der Negativ-Kontrolle war kein Detektionssignal sichtbar, welches sich vom Rauschen der Basislinie unterschied (s. Abbildung 4-38, A). In der Probe der Diffusionskontrolle wurde Bradykinin durch einen Peak nach t_R 38 min nachgewiesen (s. Abbildung 4-40, A). Die Chromatogramme der Proben von Testkavitäten (P_T) enthielten vier Peaks (A bis D) nach t_R 35, 37, 38, 42 min (Abbildung 4-40, B). Durch Aminosäureanalyse dieser vier

verschiedenen HPLC-Fractionen wurde Bradykinin in der Fraktion C (s. Tabelle 4-33) identifiziert. Die Fraktion D enthielt demnach das Bradykinin-Spaltprodukt Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. Die genaue Zuordnung der Fraktionen A und B ist hingegen nicht möglich. Vermutlich enthalten diese von Caco-2 Zellen sezernierte Substanzen.

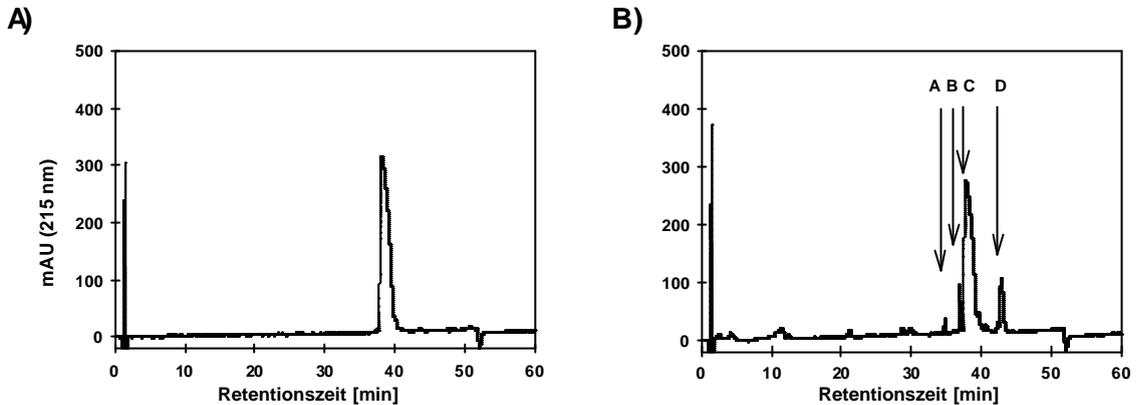


Abbildung 4-40: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) nach Untersuchung des Transports von 1 mmol/L Bradykinin durch A) eine PC-Membran (K_{D-AP}) und B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T) – die Probenentnahme erfolgte aus dem apikalen Kompartiment (P_{T-AP}) – Exemplarische Darstellung eines von 10 Probendurchläufen.

Test 2: Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 32. Passage, s. Tabelle 321) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei $37^\circ C$, an d_{14} , s. 3.7.3) und anschließend 60 min Inkubation mit HBSS (K_N s. Abbildung 4-38) bzw. **60 min** Exposition mit **1 mmol/L Bradykinin** (K_D bzw. P_T), Probenentnahme aus **apikalen** Kompartimenten, Probenzubereitung und Analyse mittels HPLC (s. 3.7.4, 3.7.5.1), nachfolgend Sammlung der eluierten Substanzen (A bis D) und Untersuchung der Zusammensetzung durch Aminosäureanalyse (Ergebnis s. Tabelle 4-33).

Tabelle 4-33: Aminosäuren Zusammensetzung der Fraktionen A-D im Vergleich zu Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)

Die Fraktionen A-D wurden nach t_R 35, 37, 38, 42 min von der RP-18 Säule eluiert (HPLC-Analyse, s. Abbildung 4-40), getrennt gesammelt und entstammten den apikal entnommenen Proben des Tests 2 (s. Tabelle 3-21). Diese Fraktionen A-D wurden für die Analyse im Aminosäureanalysator vorbereitet, verdünnt und in einem Volumen von 40 μL auf die Säule aufgetragen. Die Berechnung der Aminosäuren-Zusammensetzung erfolgte nach Gleichsetzung des Glycin-Anteils der Proben mit 1, da Gly während der Hydrolyse nicht zerstört wird.

AS	Aminosäurenreste in den Fraktionen				Berechnungen (Gly = 1)				Bradykinin
	A	B	C	D	A	B	C	D	
Arg	2,15	1,69	24,37	0,94	2,6	0,8	1,7	0,8	2
Gly	0,84	2,26	14,41	1,13	1,0	1,0	1,0	1,0	1
Phe	5,02	2,45	26,72	1,79	6,1	1,1	1,9	1,6	2
Pro	1,26	1,37	47,26	0,86	1,5	0,6	3,3	0,8	3
Ser	3,36	2,47	12,98	0,99	4,1	1,1	0,9	0,9	1
Ala		0,73				0,3			
Asp		1,62				0,7			
Glu		3,13				1,4			
Leu		2,84				1,3			
Lys		1,45				0,6			
Tyr		1,37				0,6			
Val	0,81	1,36			1,0	0,6			

Undecapeptid Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu

In Test 5 wurden vier intakte Caco-2 Monolayer (an d_4) 60 min mit 1 mmol/L Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte auch in diesem Test aus den jeweiligen apikalen und basolateralen Kompartimenten einer Kavität. In den Proben der Negativ-Kontrolle (K_{N-AP} bzw. K_{N-BL}) wurden durch RP-HPLC-Analyse keine bzw. Signale nach t_R 6, 20, 39 min detektiert. Diese Peaks unterschieden sich von der Basislinie um die Faktoren 20 bis 50 (s. Abbildung 4-41).

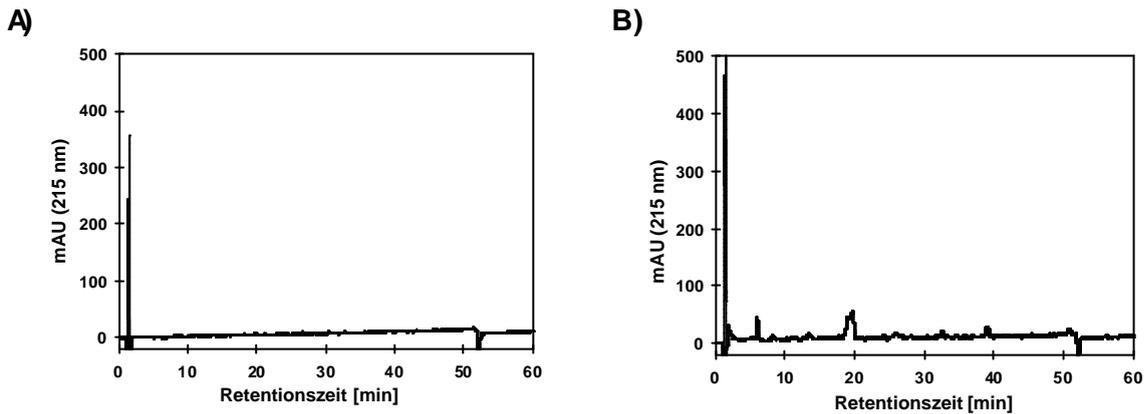


Abbildung 4-41: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) der Negativ-Kontrolle – Probenentnahme aus dem A) apikalen und B) basolateralen Kompartiment

Test 5: Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-42.

Das durch die PC-Membran diffundierte Undecapeptid wurde nach t_R 30 min eluiert (K_{D-BL} , s. Abbildung 4-42, A). Nach Analyse der apikal entnommenen Proben einer Testkavität (P_{T-AP}) wurden vier Signale nach t_R 17, 21, 22, 31 min detektiert, die sich um den Faktor 20 von der Basislinie unterschieden. Außerdem wurden Peaks nach t_R 28 und 30 min aufgezeichnet, der Retentionszeit des Undecapeptids (s. Abbildung 4-42, B₁). An gleicher Position wurden Peaks im Chromatogramm der basolateral entnommenen Probe (P_{T-BL}) detektiert, die sich jedoch lediglich um den Faktor 5 von der Basislinie unterschieden (s. Abbildung 4-42).

Zusätzlich wurden die Fraktionen der basolateral entnommenen Probe (P_{T-BL}) während der HPLC-Analyse getrennt voneinander gesammelt und nachfolgend deren Zusammensetzung durch Aminosäurenanalyse (s. 3.7.6, Berechnung analog Ergebnissen in Tabelle 4-33) ermittelt. Hiernach wurden vier Aminosäuren [nmol/40 μ L Probe] identifiziert: Glu [1,10], Ile [1,61], Lys [0,46], Pro [0,38]. Ein Transport des intakten Undecapeptids Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu durch Caco-2 Monolayer war demnach nicht nachweisbar.

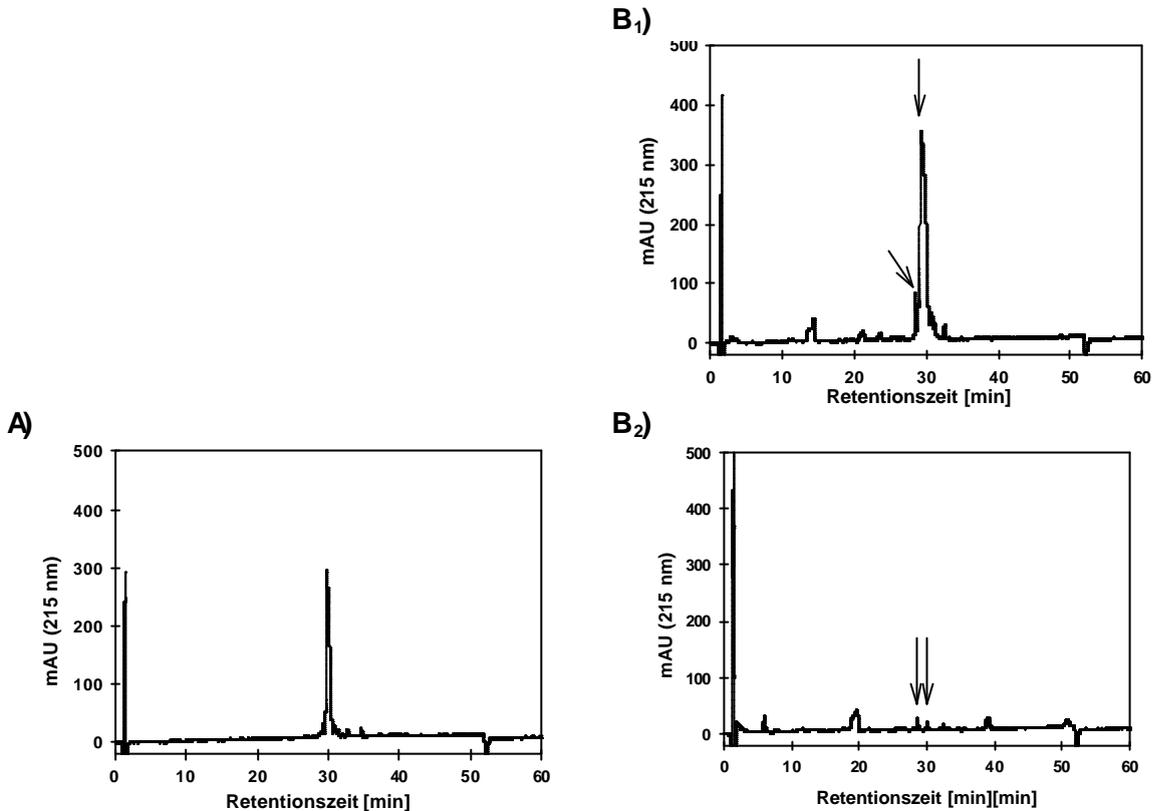


Abbildung 4-42: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) nach Untersuchung des Transports von 1 mmol/L Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu durch A) eine PC-Membran (K_{D-BL}) und B) einen intakten Caco-2 Monolayer. Die Probenentnahme erfolgte aus dem B₁) apikalen und B₂) basolateralen Kompartiment (P_{T-AP} und P_{T-BL})

Test 5 Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 31. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei $37^\circ C$, an d_4 , s. 3.7.3), anschließend 60 min Inkubation mit HBSS (K_N , s. Abbildung 4-41) bzw. 60 min Exposition mit 1 mmol/L Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu (K_D bzw. P_T), Probenentnahme aus apikalen bzw. basolateralen Kompartimenten, Probenvorbereitung und Analyse mittels RP-HPLC (s. 3.7.4, 3.7.5.1). Die Pfeile kennzeichnen die Elutionsposition von Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu nach t_R 30 min und eines möglichen Abbauproduktes dieses Peptids.

Tripeptid Leu-Lys-Pro

In Test 4 wurden drei intakte Caco-2 Monolayer (an d₄) 60 min mit 1 mmol/L Leu-Lys-Pro inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben basolateral entnommen und mittels RP-HPLC analysiert. Da in einem Vorversuch die Retentionszeit des Tripeptids (t_R 18 min) identisch war mit einem Signal im Chromatogramm der Negativ-Kontrolle wurde das Standardprotokoll derart geändert, dass diese Analyse mit flachem Eluentengradienten durchgeführt wurde. Dadurch wurde die Elution des Tripeptids (K_p) verzögert, welches nun nach t_R 23 min eluiert wurde (Abbildung 3-15, A und B). In den Chromatogrammen der Negativ-Kontrolle dieses Tests bzw. der Probe aus der Testkavität (P_{T-BL}) wurden jeweils zwei Signale detektiert, nach t_R 6 und 26 min. Demnach war der Transport des intakten Tripeptids durch Caco-2 Monolayer nicht nachweisbar.

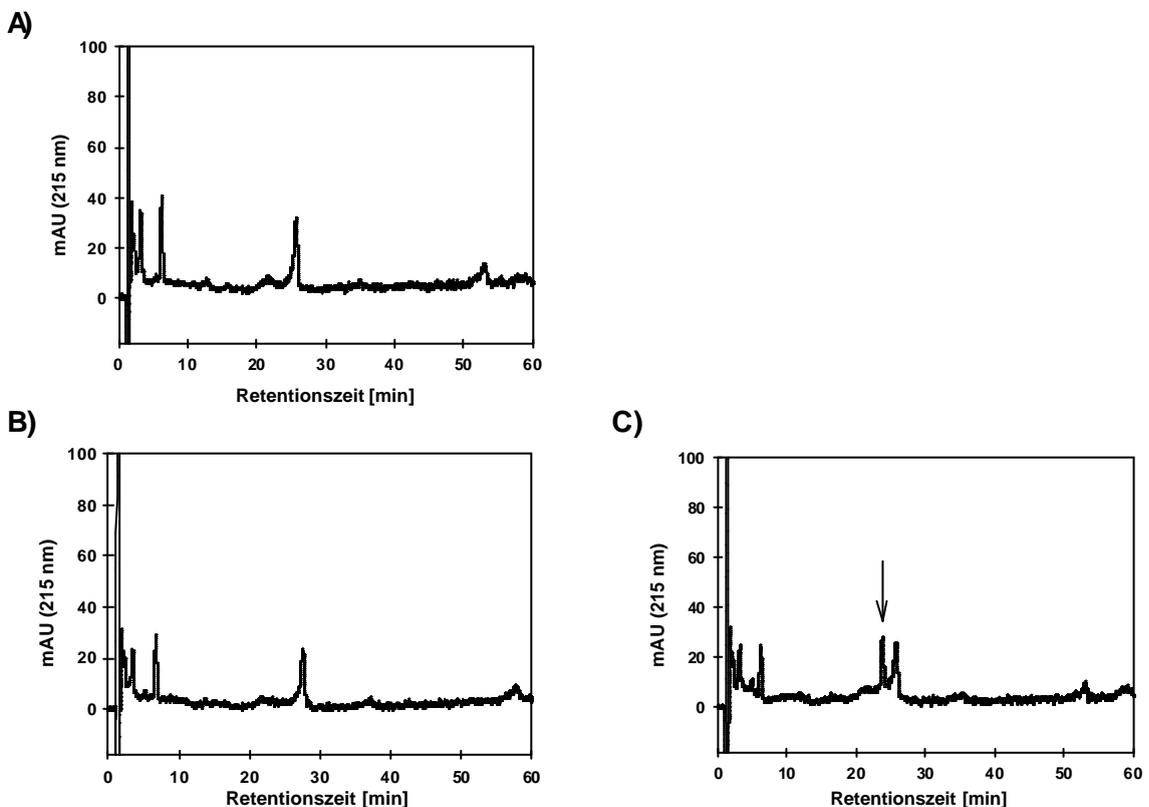


Abbildung 4-43: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) A) der Negativ-Kontrolle (K_{N-BL}) sowie B) und C) zweier Proben (P_{T-BL}) nach Untersuchung des Transports von Leu-Lys-Pro durch intakte Caco-2 Monolayer, wobei die Probe C) direkt vor der HPLC-Analyse mit 0,2 mmol/L Leu-Lys-Pro angereichert wurde (s. Pfeil).

Test 4: Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 35. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d₄, s. 3.7.3) und anschließend **60 min** Inkubation mit **A) HBSS (K_N)** bzw. **B) und C) 60 min** Exposition mit **1 mmol/L Leu-Lys-Pro**, Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten. Probenvorbereitung und Analyse mittels RP-HPLC (s. 3.7.4, 3.7.5.1, nach verändertem Standardprotokoll: flacher Elutionsgradient). Als **Positiv-Kontrolle** wurde **0,2 mmol/L Leu-Lys-Pro** mitgeführt (s. Abbildung 3-15 B). Der Pfeil kennzeichnet die Elutionsposition von Leu-Lys-Pro.

Dipeptide Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Phe, Val-Tyr

In Test 3 und 6 (4 MTP) wurde untersucht, ob intakte Caco-2 Monolayer (an d_4) die Dipeptide Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Tyr bzw. Val-Phe transportieren. Dazu wurden diese (an d_4 je $n = 4$) mit 4 mmol/L Dipeptid 60 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben basolateral entnommen und mittels RP-HPLC (C 18) analysiert. Hierbei wurde jeweils einer von vier Proben das jeweilige Peptid niedrig konzentriert zugesetzt.

Nach Analyse der vier verschiedenen Negativ-Kontrollen wurden Signale nach t_R 6, 19 (32, 40) und 52 min detektiert, die sich jeweils um die Faktoren 10 bis 50 vom Grundrauschen der Basislinie unterschieden (s. Abbildung 4-48).

Die Dipeptide Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Tyr, Val-Phe (K_P , s. Abbildung 3-14, Tabelle 3-22) wurden nach RP-HPLC-Analyse nach t_R 23, 18, 13, 24 min eluiert. Da differenzierte Caco-2 Zellen zur Peptidhydrolyse fähig sind wurden die Elutionspositionen der aromatischen Aminosäuren Phe, Trp bzw. Tyr überprüft, die einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten aufweisen. Freie aromatische Aminosäuren würden Signale nach t_R 11, 20 bzw. 6min ergeben (s. Tabelle 3-22, Abbildung 3-16, Abbildung 3-17).

Das durch die PC-Membran diffundierte Ala-Trp (K_D) wurde nach 23 min eluiert. In den Proben der Testkavitäten (P_{T-BL}) wurde Ala-Trp sowie Trp nachgewiesen (s. Abbildung 4-44).

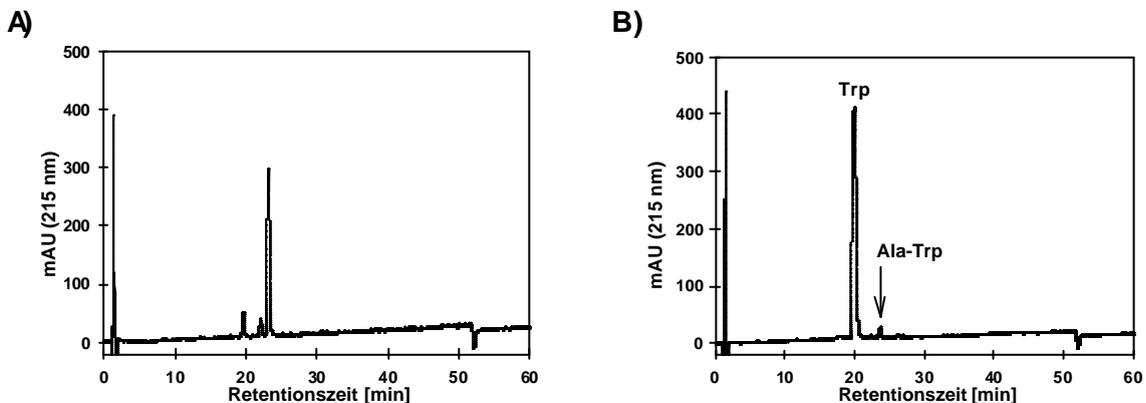


Abbildung 4-44: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18) nach Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Ala-Trp durch A) eine PC-Membran (K_D) bzw. B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T)

Test 3: Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 36. bzw. 40. Passage (Test 3 bzw. 6), s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_4 , s. 3.7.3) und anschließend **60 min** Exposition mit **4 mmol/L Dipeptid** (P_T) sowie 60 min Inkubation mit HBSS (K_N , s. Abbildung 4-48). Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten, Probenvorbereitung (u. a. A) 20-, B) 10-fache Verdünnung der Probe) und Analyse mittels RP-HPLC (C 18) (s. 3.7.4, 3.7.5.1).

Für Ala-Trp wurde eine Peakfläche von 414182 mAbs x min ermittelt, die sich nach Zugabe von 0,01 mmol/L des Dipeptids 7,6-fach erhöhte, auf 3152780 mAbs x min. Außerdem wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von 6:1 berechnet. Unter Berücksichtigung der Peakfläche von 0,025 mmol/L Ala-Trp (Reinsubstanz) und der Annahme, dass die Kalibriergerade in diesem Bereich linear verläuft, wurde eine Menge von 10,95 µg Ala-Trp berechnet, die durch den intakten Caco-2 Monolayer transportiert wurde. Dies entsprach 0,66 % des apikal hinzugefügten Dipeptids (s. Tabelle 4-34).

Das durch die PC-Membran diffundierte Lys-Phe (K_D) wurde nach 17 min eluiert. Im Chromatogramm der untersuchten Probe (P_{T-BL}) wurde ein Peak detektiert, im Bereich zwischen t_R 17 bis 20 min. Da auch in den Chromatogrammen der Negativ-Kontrolle ein Peak nach t_R 19 min sichtbar wurde (s. Abbildung 4-48) war diese Trennung nicht ausreichend. Das berechnete Signal-Rausch-Verhältnis lag bei 1:1. Somit war ein Transport des Dipeptids mit dieser Methode nicht nachweisbar (s. Abbildung 4-45).

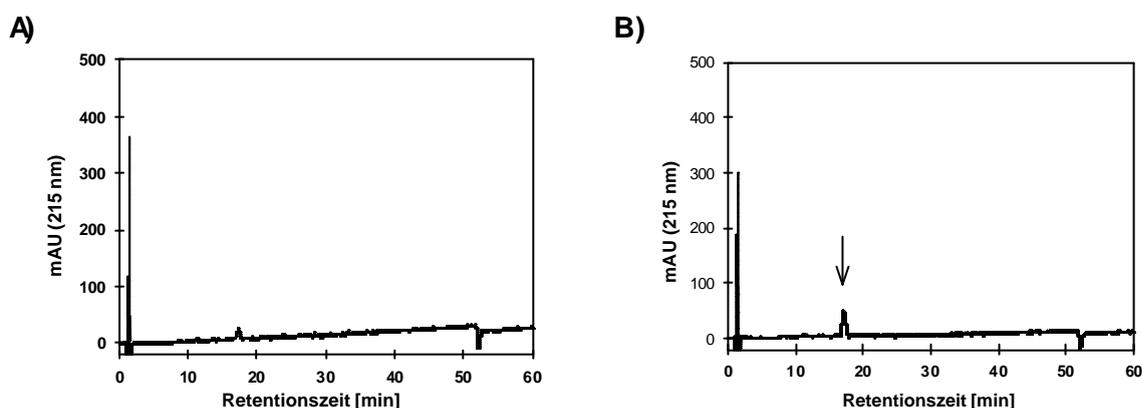


Abbildung 4-45: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18): Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Lys-Phe durch A) eine PC-Membran (K_D) bzw. B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T)

Test 3: Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-44. Die Probe der K_D wurde vor der HPLC-Analyse 20-fach verdünnt. Der Pfeil kennzeichnet die Elutionsposition von Lys-Phe.

Das durch die PC-Membran diffundierte Val-Tyr (K_D) wurde nach 14 min eluiert. In den Proben von drei verschiedenen Testkavitäten (P_{T-BL}) wurden Val-Tyr und Tyr nachgewiesen (s. Abbildung 4-46). Für Val-Tyr wurden Peakflächen von 673302 bzw. 1822587 mAbs x min ermittelt. Für die letzt genannte Probe wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von 8:1 berechnet. Mittels Kalibrierfunktion wurde nachfolgend berechnet, dass die beiden Caco-2 Monolayer 20,33 bzw. 24,91 µg Val-Tyr vom apikalen ins basolaterale Kompartiment transportierten. Dies entsprach 1,21 bzw. 2,08 % des applizierten Dipeptids (s. Tabelle 4-34). Nach Analyse der dritten Probe und vorheriger Zugabe von 0,05 mmol/L des Dipeptids wurde eine Peakfläche von 1130801 mAbs x min berechnet.

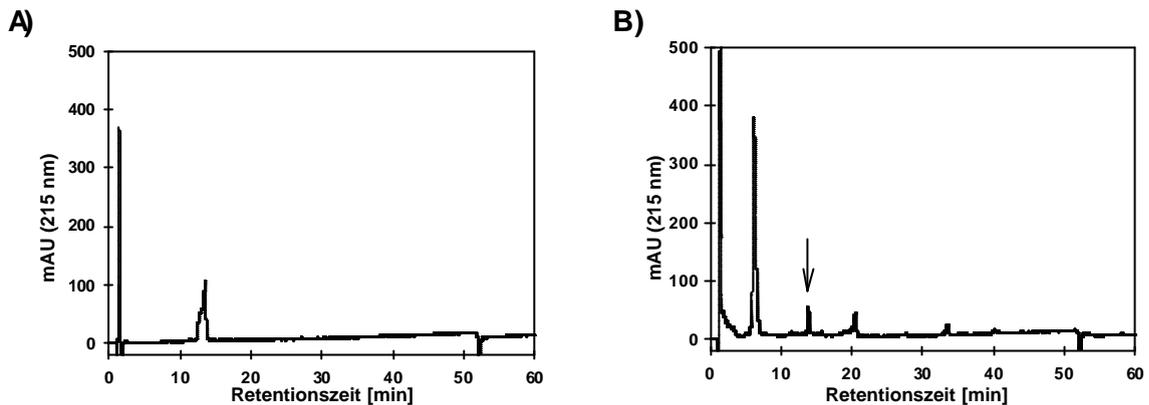


Abbildung 4-46: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18): Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Val-Tyr durch A) eine PC-Membran (K_D) bzw. B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T)

Test 3: Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-44. Der Pfeil kennzeichnet die Elutionsposition von Val-Tyr.

Das durch die PC-Membran diffundierte Val-Phe (K_D) wurde nach 24 min eluiert. In den Proben der Testkavitäten (P_{T-BL}) wurde das Dipeptid sowie Phe nachgewiesen (s. Abbildung 4-47). Für Val-Phe wurde eine Peakfläche von 551492 mAbs x min ermittelt sowie ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 berechnet. Mittels Kalibrierfunktion wurde nachfolgend berechnet, dass der Caco-2 Monolayer 19,52 μ g Val-Phe vom apikalen ins basolaterale Kompartiment transportierte. Dies entsprach 1,23 % des applizierten Dipeptids (s. Tabelle 4-34). Zusätzlich wurde eine Probe analysiert, der zuvor 0,2 mmol/L des Dipeptids zugesetzt wurde und wodurch eine 4,2-fach höhere Peakfläche von 2301386 mAbs x min ermittelt wurde.

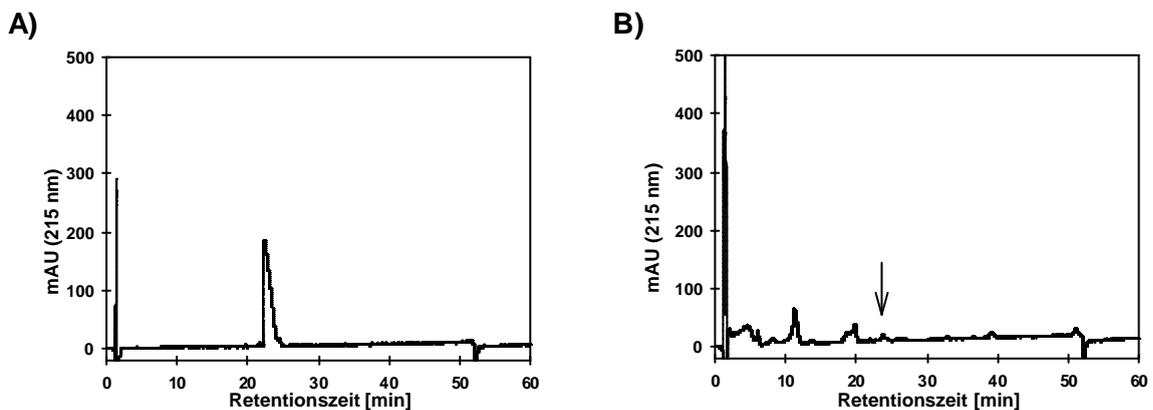


Abbildung 4-47: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18): Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Val-Phe durch A) eine PC-Membran (K_D) bzw. B) intakte Caco-2 Monolayer (P_T)

Test 6 Testdurchführung analog Test 3, Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-44. Der Pfeil kennzeichnet die Elutionsposition von Val-Phe.

Abbildung 4-48 zeigt zusammenfassend und in vergrößerter Skalierung die HPLC-Chromatogramme (C 18) zum Nachweis des Transports der untersuchten Dipeptide durch intakte Caco-2 Monolayer. Außerdem wird exemplarisch eine (von vier) Negativ-Kontrollen (K_N : ohne Testsubstanz -Exposition) aufgeführt. In Tabelle 4-34 werden u. a. die berechneten Dipeptidkonzentrationen (Mengen) aufgeführt, die in den Proben der basolateralen Kompartimente detektiert wurden.

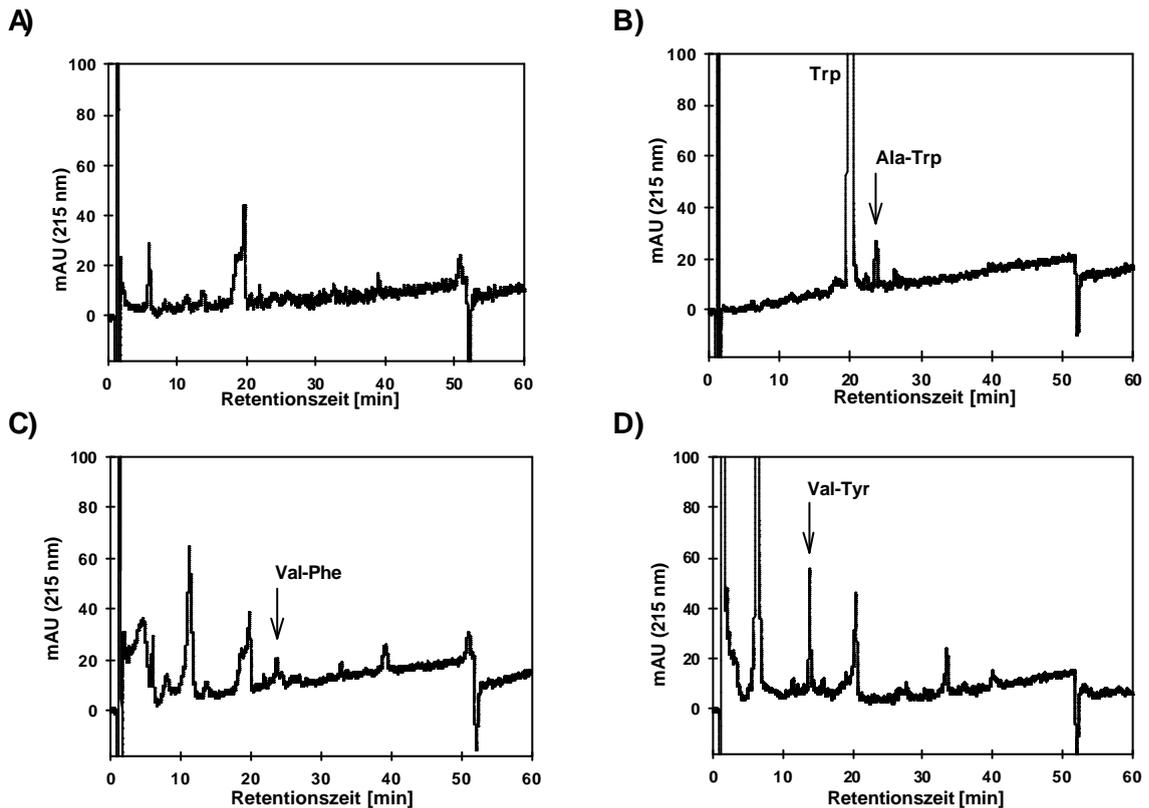


Abbildung 4-48: Chromatogramme nach RP-HPLC (C 18): Ergebnisse nach Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Dipeptid durch intakte Caco-2 Monolayer: A) Darstellung einer Negativ-Kontrolle (K_N) und der Dipeptide, die in Proben aus basolateralen Kompartimenten nachgewiesen wurden: B) Ala-Trp, C) Val-Phe und D) Val-Tyr.

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse von Test 3 und 6.

Tabelle 4-34: RP-HPLC (C 18): Ergebnisse nach Untersuchung des Transports von 4 mmol/L Dipeptid durch intakte Caco-2 Monolayer

Es wurden 4 mmol/L Dipeptid in die apikalen Kompartimente, auf intakte Caco-2 Monolayer appliziert (weitere Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-44) und die basolateral entnommenen Proben durch RP-HPLC (C18) analysiert. Anschließend erfolgte durch Auswertung der Chromatogramme (Peakflächen) die Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Unter Einsatz der Kalibrierfunktionen (s. Tabelle 3-23) wurden die Mengen der transportierten Dipeptide ermittelt. Diese lag für Ala-Trp und Lys-Phe unter der nach DIN 32645 berechneten Nachweisgrenze. Abkürzungen: n. d.: nicht detektiert, BL: basolaterales Kompartiment.

Dipeptid	M _r	Signal-Rausch-Verhältnis	Nachweisgrenze	Dipeptid-Konzentration bzw. Menge im BL			Anteil des applizierten Peptids in BL [%]
				[µg/mL]	[µg/mL]	[µg/BL]	
Ala-Trp	275,31	6 : 1	1,16	0,63	1,65	0,10	
Lys-Phe	293,36	1 : 1	4,55	-	-	-	
Val-Phe	264,32	3 : 1	5,71	7,50	19,52	1,23	
Val-Tyr	280,30	8 : 1	7,96	13,43	34,91	2,08	

4.2.4 Kollagenhydrolysate

Zur Untersuchung des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer wurden die Ausschluss-Chromatographie zum Peptidnachweis sowie die photometrische Bestimmung von Hydroxyprolin eingesetzt. Die verschiedenen Tests wurden fortlaufend nummeriert (s. Tabelle 3-21). Größtenteils wurden beide Nachweismethoden eingesetzt, die Proben aus Test 2 und 6 wurden jedoch ausschließlich zur Bestimmung von Hydroxyprolin eingesetzt.

4.2.4.1 Peptidnachweis durch Ausschluss-Chromatographie

Die Ausschluss-Chromatographie wurde vorrangig als qualitative Nachweismethode von Kollagenhydrolysaten eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Kalibrierkurve mit Sol D erstellt (s. 3.7.5.2), zum (semi-) quantitativen Nachweis dieser Hydrolysate.

Zunächst wurden die fünf Kollagenhydrolysate (K_P) per HPLC analysiert. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4-35 zusammengefasst.

In jedem Test der Transportstudie wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle (K_N) mitgeführt. Nach Analyse dieser Proben wurden jeweils 3 Signale detektiert, die sich vom Grundrauschen der Basislinie unterschieden (s. Tabelle 4-36). Da diese Signale von unbehandelten Caco-2 Monolayern verursacht wurden, ist zu vermuten, dass diese auch in den Chromatogrammen der Proben aus Testkavitäten (P_{T-BL}) enthalten sind. Außerdem wird ein Peak nach 21 bis 22 min detektiert, der durch HBSS verursacht wurde.

Des Weiteren wurde in jedem Test die Diffusion der jeweiligen Testsubstanz durch eine PC-Membran untersucht (K_D). Der Bereich sowie das Maximum der Retentionszeit von Sol D variierten zwischen 8 bis 21 min sowie zwischen 11 bis 14 min (s. Tabelle 4-37). Für die vier anderen Kollagenhydrolysate wurden Retentionszeiten zwischen 7 bis 22 min ermittelt, mit Maxima zwischen 10 bis 12 min.

Tabelle 4-35: Ergebnisse der HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) von Kollagenhydrolysaten

Die Kollagenhydrolysate [Positiv-Kontrollen (K_P): 100 mg/mL] wurden in HBSS gelöst und 10- bis 40-fach verdünnt; dies wurde bei der Berechnung der Peakfläche berücksichtigt.

Kollagenhydrolysat	Retentionszeit [min]		Peakfläche [mAbs x min]
	Bereich	Maximum	
Sol D	8 - 22	13	6497,5
Sol DA	8 - 19	11	3519,0
Collagel A	8 - 19	11	11543,5
Collagel BS	8 - 19	11	12190,5
Collagel BS-GA	8 - 19	11	3529,3

Tabelle 4-36: Ergebnisse der HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) von Proben aus basolateralen Kompartimenten der Negativ-Kontrollen der Tests 1 – 5

Negativ-Kontrollen (K_N) sind Caco-2 Monolayer, die unter Standardbedingungen (s. 3.6) kultiviert wurden, ohne Testsubstanz-Exposition (s. 3.7.4).

Test	Retentionszeit t_R [min] von n			Peakfläche [mAbs min] von n			Absorption [mAbs] von n		
	n_1	n_2	n_3	n_1	n_2	n_3	n_1	n_2	n_3
1	9	10	22	106,6	56,3	117,4	100	10	50
3	n. d.			n. d.					
4_1	9	10	20	17,2	18,3	37,6	20	5	20
4_2	7	8	18	135,0	62,7	47,5	140	20	40
4_3	9	10	20	113,0	57,6	51,0	120	20	40
4_4	9	11	20	144,2	62,0	53,8	150	20	40
4_5	9	11	20	113,0	81,2	48,6	120	20	40
5	9	11	19	179,0	13,3	35,8	160	10	30

Tabelle 4-37: Ergebnisse der HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) von Proben aus basolateralen Kompartimenten der Diffusionskontrollen der Tests 1 - 5

Diffusionskontrollen (K_D) sind dadurch gekennzeichnet, dass in die apikalen Kompartimente, direkt auf die PC-Membranen, jeweils 100 mg/mL Kollagenhydrolysate appliziert wurden. Die Probenentnahme erfolgte aus dem jeweiligen basolateralen Kompartiment.

Test	Retentionszeit t_R [min]		Peakfläche [mAbs min]	Testsubstanz (TS_{AP}) [100 mg/mL]
	Bereich	Maximum		
1	8 - 17	13	3633,6	Sol D
3	9 - 19	13	3032,0	Sol D
4_1	8 - 21	14	2789,0	Sol D
4_2	7 - 19	10	2704,7	Sol DA
4_3	8 - 22	11	2931,7	Collagel A
4_4	8 - 22	12	3346,6	Collagel BS
4_5	8 - 22	12	3110,6	Collagel BS-GA
5	8 - 19	11	3873,4	Sol D

In Test 1 wurde der Konzentrations-abhängige Transport von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer untersucht, indem je 3 Monolayer 60 Minuten mit 10 bis 100 mg/mL Sol D inkubiert und die basolateral entnommenen Proben mittels Ausschluss-Chromatographie analysiert wurden: Die Chromatogramme der Negativ- und Diffusionskontrolle werden in Abbildung 4-49 (A, B) aufgeführt (s. auch Tabelle 4-36, Tabelle 4-37). Die Auswertung der HPLC-Analyse der Proben aus Testkavitäten (P_{T-BL}) ergab, dass sich die Peakflächen in Abhängigkeit von der zugefügten Sol D-Konzentration vergrößerten (s. Tabelle 4-38, Abbildung 4-49, C bis F). Für die Proben 1, 2, 3 wurden mit Hilfe der Kalibrierfunktion (s. 3.7.5.2) eine aus dem apikalen ins basolaterale Kompartiment transportierte Menge an Sol D von 435,03 / 779,61 / 811,04 μg berechnet. Dies entspricht 8,70 / 15,59 / 16,22 % der apikal hinzugefügten Menge an Sol D. Die Detektionssignale der anderen Proben waren höher und lagen außerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierkurve.

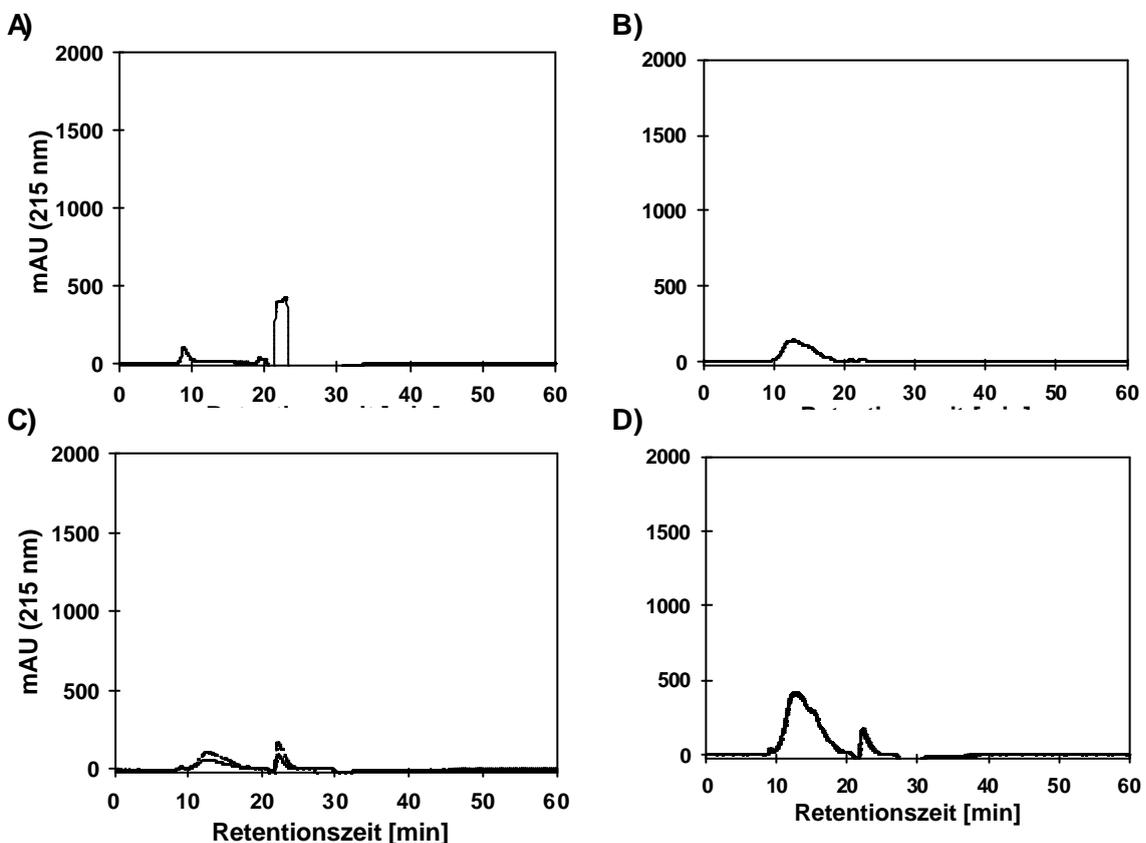


Abbildung 4-49: Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: A) Negativ-Kontrolle, B) Diffusionskontrolle (TS_{AP} : 100 mg/mL Sol D) sowie nach Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer, nach Exposition dieser mit C) 10, D) 40 mg/mL Sol D

Test 1: Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-38. Alle Proben wurden aus basolateralen Kompartimenten (BL) entnommen: K_{N-BL} , K_{D-BL} , P_{T-BL} . Die Probe der K_D wurde vor der HPLC-Analyse 10-fach verdünnt. Die Testsubstanzen wurden nach t_R 10 bis 19 min eluiert.

Abkürzung: TS_{AP} : Testsubstanzexposition der PC-Membran, im apikalen Kompartiment.

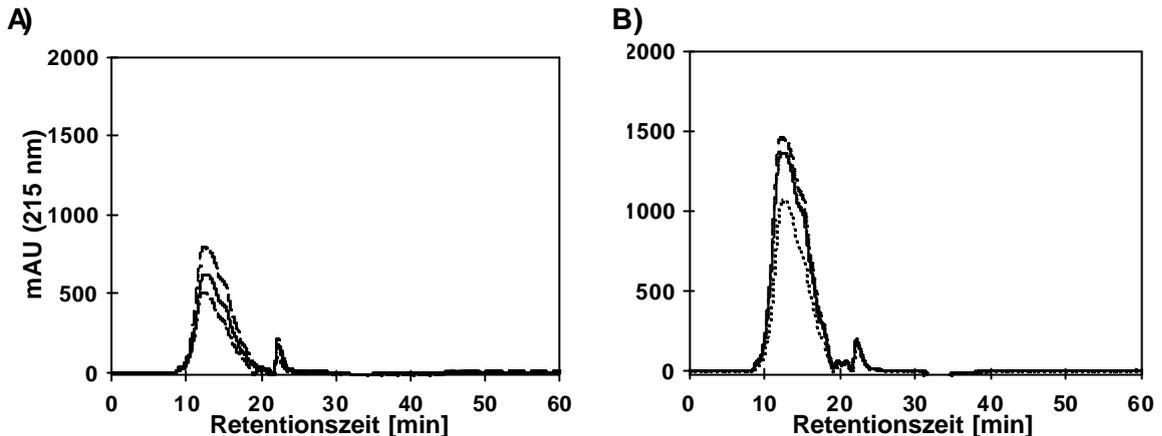


Abbildung 4-50: Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer, nach Exposition dieser mit A) 80 und B) 100 mg/mL Sol D

Test 1: Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-38 sowie Abbildung 4-49.

Tabelle 4-38: Ausschluss-Chromatographie: Konzentrations-abhängiger Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 1: Zellaussaat ($10^5/\text{cm}^2$, 63. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37°C , an d_{14} , s. 3.7.3) und anschließend **60 min** Exposition mit **10 – 100 mg/mL Sol D**, Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten (P_{T-BL}): Sol D Nachweis mittels HPLC-Analyse (Ausschlusschromatographie) (s. 3.7.4, 3.7.5.2). Die Detektionssignale lagen außerhalb (oberhalb) des linearen Bereichs der Kalibrierfunktion, so dass eine Berechnung der entsprechenden Sol D-Mengen nicht durchgeführt wurde. Abkürzungen: AP: apikales Kompartiment, DS: Detektionssignal, TS_{AP} : Testsubstanz im apikalen Kompartiment, VF: Verdünnungsfaktor.

Proben	TS_{AP} : Sol D [mg/mL]	VF	Proben aus basolateralen Kompartimenten: P_{T-BL}			
			Peakfläche [mAbs x min]		Sol D	
			DS: Y	VF · Y	[µg]	[%] aus AP
01			279,73	699,33	435,028	8,701
02	10	2,5	485,61	1214,03	779,606	15,592
03			504,39	1260,98	811,037	16,221
MW ±SEM					1058,11 ± 179,90	675,22 ± 120,44
04	40	2,5	2095,00	5237,50	*	*
05			2116,80	5292,00	*	*
06			2032,50	5081,25	*	*
MW ±SEM			5203,58 ± 63,16			
07	80	5,0	1516,10	7580,50	*	*
08			2066,70	10333,50	*	*
09			1213,40	6067,00	*	*
MW ±SEM			7993,67 ± 1248,84			
10	100	7,5	2337,00	17527,50	*	*
11			2576,50	19323,75	*	*
12			1741,90	13064,25	*	*
MW ±SEM			16638,50 ± 1860,83			

In Test 3 wurden die Unterschiede im Sol D-Transport zwischen verschiedenen Caco-2 Kulturen einer Passage untersucht. Dabei wurden acht intakte Caco-2 Monolayer 90 Minuten mit 100 mg/mL Sol D inkubiert. Eine Negativ-Kontrolle wurde nicht mitgeführt. Das Peptid der Diffusionskontrolle (K_D) wurde nach t_R 9 bis 19 min eluiert (s. Tabelle 4-37). In Tabelle 4-39 werden die Ergebnisse der HPLC-Analyse der Proben aus Testkavitäten (P_{T-BL}) aufgeführt. In diesem Test wurden im Vergleich zu den Ergebnissen aus Test 1 geringere Unterschiede im Sol D-Transport zwischen verschiedenen Monolayern einer Zellpassage nachgewiesen (s. Tabelle 4-38, Proben 10 - 12).

Tabelle 4-39: Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung der Unterschiede im Sol D-Transport nach Inkubation von acht verschiedenen Caco-2 Monolayern einer Zellpassage

Test 3: Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 75. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_{14} , s. 3.7.3). Anschließend **90 min** Exposition mit **100 mg/mL Sol D**, Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten (P_{T-BL}): Sol D-Nachweis mittels HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) (s. 3.7.4, 3.7.5.2) und Angabe der Peakflächen. Nachfolgend Berechnung der Menge Sol D [μg] bzw. des Anteils des applizierten Sol D [%], welches aus dem AP ins BL transportiert wurde. Abkürzung: BL: basolaterales Kompartiment, AP: apikales Kompartiment.

Proben	Fraktion: t_R [min]	Peakfläche [mAbs x min]	MW	\pm S.E.M.
1	10 – 19	1971,55		
2	10 – 19	1981,99		
3	10 – 19	1981,99		
4	10 – 19	1924,87		
5	10 – 19	2191,33	2199,88	\pm 97,02
6	10 – 19	2484,03		
7	10 – 19	2572,84		
8	10 – 19	2490,47		

In Test 4 wurde der Transport von 100 mg/mL Sol D, Sol DA, Collagel A, Collagel BS bzw. Collagel BS-GA (MTP 1 bis 5) durch intakte Caco-2 Monolayer untersucht. Die Probenanalyse erfolgte mittels HPLC (P_{T-BL} : n = 2 je MTP) bzw. durch Hydroxyprolin-Nachweis (P_{T-BL} : n = 7 je MTP, s. 4.2.4.2). Nach Analyse der 5 verschiedenen Negativ-Kontrollen (je MTP eine K_N) wurden Signale nach t_R (7, 8), 9, 10, 11, (18), 20 min detektiert, die sich jeweils um die Faktoren 5 bis 150 vom Grundrauschen der Basislinie unterschieden (s. Tabelle 4-36). Die Ergebnisse der jeweiligen Diffusionskontrolle werden in Tabelle 4-37 sowie in Abbildung 4-51 und Abbildung 4-52 aufgeführt. In diesen Abbildungen sowie in Tabelle 4-40 werden außerdem die Ergebnisse der analysierten Proben aus Testkavitäten (P_{T-BL}) aufgeführt. Demnach wurden Peptide aus Sol D, Sol DA und Collagel BS in den Proben der basolateralen Kompartimente detektiert. Aus dem jeweiligen apikalen Kompartiment wurden 0,08 – 0,5 % des applizierten Kollagen-Hydrolysats durch den intakten Caco-2 Monolayer transportiert. Für Collagel A und Collagel BS-GA ist dieser Nachweis nicht eindeutig, da die maßgeblichen Peaks im Bereich und in der Größenordnung eines Peaks liegen, der nach Analyse von unbehandelten Caco-2 Monolayern detektiert wurde (s. Tabelle 4-40, Tabelle 4-36).

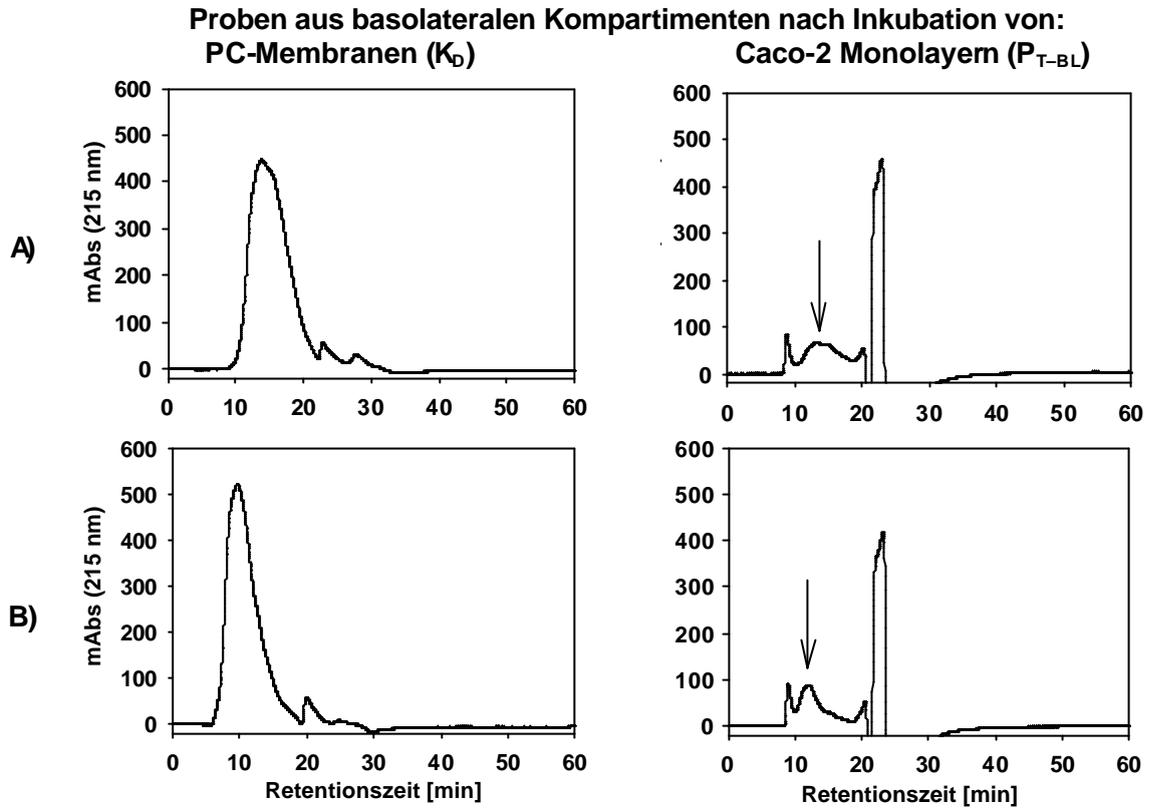


Abbildung 4-51: Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Transports von A) Sol D und B) Sol DA nach 90 min Inkubation von PC-Membranen und intakten Caco-2 Monolayern

Test 4: Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 80. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen in fünf MTP und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_4 , s. 3.7.3). Anschließend **90 min** Exposition der Membranen (K_D) bzw. der Caco-2 Monolayer (P_T) mit **100 mg/mL Kollagenhydrolysaten**, Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten und HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie, s. 3.7.4, 3.7.5.2). Die Pfeile kennzeichnen die Elutionspositionen der jeweiligen Testsubstanz: A) Sol D, B) Sol DA.

Tabelle 4-40: Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Transports von Kollagenhydrolysaten nach 90 min Inkubation intakter Caco-2 Monolayer

Test 4: Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-51. Angabe der Retentionszeiten (t_R) und Peakflächen nach HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) der verschiedenen Kollagenhydrolysate sowie Berechnung der Menge Kollagenhydrolysat [μg] bzw. dessen Anteils [%], der aus dem AP ins BL transportiert wurde. Diese Berechnungen basierten auf der mit Sol D ermittelten Kalibrierfunktion (s. 3.7.5.2), die für alle untersuchten Kollagenhydrolysate als maßgeblich angesehen wurde. Die Peakflächen von Collagel A und Collagel BS-GA lagen außerhalb (unterhalb) der Kalibrierfunktion (#), so dass die transportierte Menge an Kollagenhydrolysat mittels HPLC nicht eindeutig quantifizierbar war(-).

Abkürzung: BL: basolaterales Kompartiment, AP: apikales Kompartiment.

Kollagen-Hydrolysat [M _r]	t_R [min]		Peakflächen [mAbs x min]	Sol D in BL	
	Bereiche	Maxima		[μg]	[%] aus AP
Sol D					
[2,9]	9 - 19	13	395,81	251,72	0,50
Sol DA					
[6,3]	9 - 19	12	293,67	183,34	0,37
Collagel A					
[15,1]	10 - 19	10	375,73	238,28	0,48
Collagel BS					
[9,7]	10 - 19	12	182,43	108,87	0,22
Collagel BS-GA					
[10,5]	10 - 19	12	62,56 [#]	-	-
			11,53 [#]	-	-
			99,61	53,43	0,11
			81,23	41,12	0,08
			12,14 [#]	-	-
			27,51 [#]	-	-

In Test 5 wurde die Wirkung der *tight junctions*-Modulatoren Cytochalasin D und Palmitoyl-DL-Carnitin auf den Transport von Sol D (100 mg/mL) durch intakte Caco-2 Monolayer untersucht (s. Abbildung 4-53). Zunächst wurden die Chromatogramme der *tight junctions*-Modulatoren aufgezeichnet, die mit dieser Methode nicht detektierbar sind (s. Abbildung A3). Die Chromatogramme von Caco-2 Monolayern, die mit in HBSS gelösten *tight junctions* Modulatoren inkubiert wurden (K_N' , s. Abbildung 4-53, A) waren vergleichbar zur Negativ-Kontrolle (K_N) der anderen Tests (s. Tabelle 4-36). Es wurden Peaks nach 9, 11, 19 min detektiert und folgende Peakflächen berechnet: 179,0 / 13,3 / 35,8 mAbs x min.

Die Menge des transportierten Sol D von 179 μg wurde durch Inkubation der Caco-2 Monolayer mit Cytochalasin D auf 353,5 μg verdoppelt. Palmitoyl-DL-Carnitin erhöhte den Sol D-Transport dermaßen, dass eine Peakfläche von 3874,4 mAbs x min detektiert wurde, die außerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierfunktion lag (s., Abbildung 4-53, B, C, D, Tabelle 4-41).

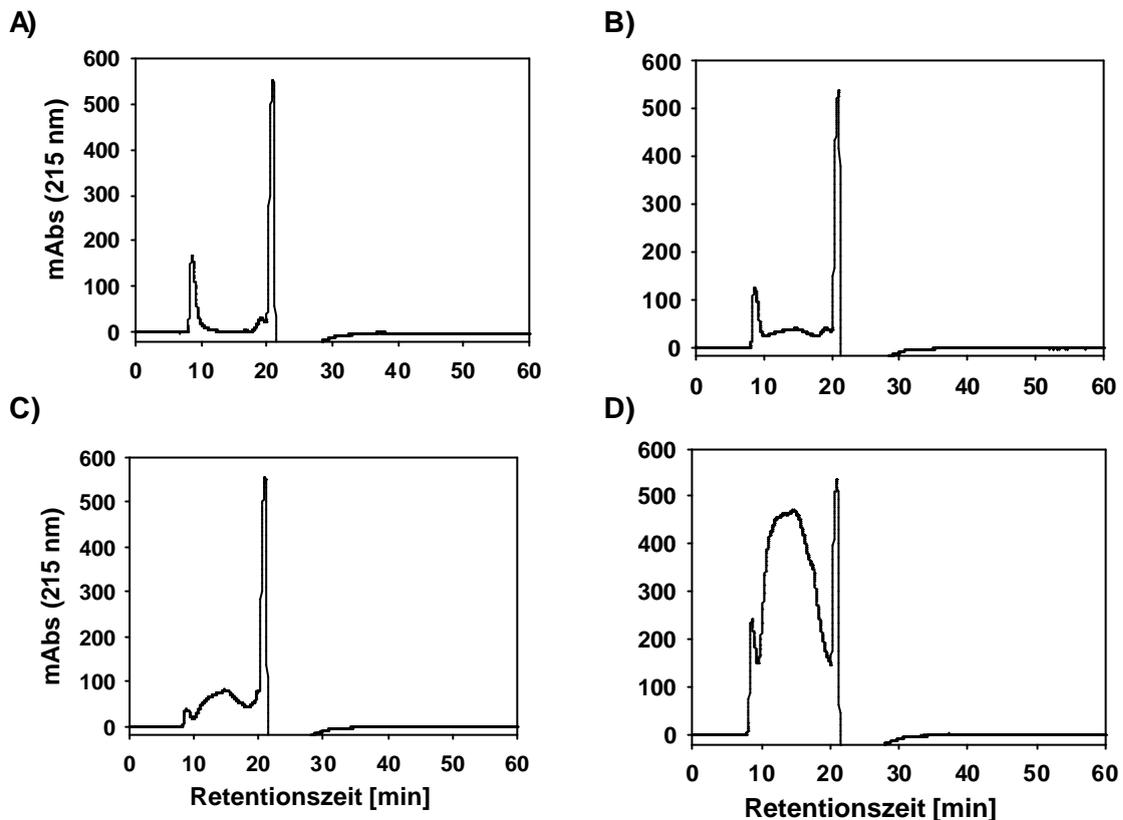


Abbildung 4-53: Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: A) der Negativ-Kontrolle (K_N) sowie nach Untersuchung des Sol D-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer B) ohne sowie nach Vorbehandlung mit C) Cytochalasin D bzw. D) Palmitoyl-DL-Carnitin

Test 5: Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-41. An d_{14} : **90 min** Exposition der intakten Caco-2 Monolayer mit **A) HBSS (K_N), B) 100 mg/mL Sol D** sowie mit **100 mg/mL Sol D und C) 0,5 μ g/mL Cytochalasin D bzw. D) 0,1 mmol/L Palmitoyl-DL-Carnitin** (je $n = 1$), Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten und HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie s. 3.7.4, 3.7.5.2).

Tabelle 4-41: Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung der Wirkung von *tight junctions*-Modulatoren auf den Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 5: Zellaussaat ($10^5/\text{cm}^2$, 81. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37°C , an d_{14} , s. 3.7.3). Anschließend **90 min** Exposition der Monolayer mit **100 mg/mL Sol D** sowie mit **100 mg/mL Sol D und 0,5 μ g/mL Cytochalasin D bzw. 0,1 mmol/L Palmitoyl-DL-Carnitin** (je $n = 1$), Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten (P_{T-BL}) und HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie s. 3.7.4, 3.7.5.2). Angabe der Retentionszeiten (t_R) und Peakflächen nach HPLC-Analyse der Proben sowie Berechnung der Menge Sol D [μ g] bzw. dessen Anteils [%], der aus dem AP ins BL transportiert wurde. # Dieser Messwert liegt nicht im linearen Bereich der Kalibrierfunktion, so dass die transportierte Menge an Sol D mittels HPLC nicht eindeutig quantifizierbar war (-). Abkürzung: BL: basolaterales Kompartiment, AP: apikales Kompartiment.

Sol D / <i>tight junctions</i> Modulatoren	t_R [min] Bereiche	Peakflächen [mAbs x min]	Sol D in BL	
			[μ g]	[%] aus AP
Sol D	9 - 19	287,2	179,0	0,36
Sol D + Cytochalasin D	9 - 19	547,8	353,5	0,70
Sol D + Palmitoyl-DL-Carnitin	9 - 19	3874,4 [#]	-	-

4.2.4.2 Indirekter Peptidnachweis durch photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung

Zur Untersuchung des Kollagen-Hydrolysat-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer wurde in Ergänzung zur HPLC-Analyse der Hydroxyprolin-Gehalt photometrisch bestimmt. Dabei wurden aufgrund des hohen Probenaufkommens verschiedene photometrische Messreihen durchgeführt, die gegen Blindwerte (Reinstwasser) erfolgten (Extinktionen zwischen 0,0322 und 0,0580, s. Tabelle A105). In jeder Messreihe wurden Hydroxyprolin-Standardlösungen mitgeführt, die zur Berechnung der jeweiligen Kalibrierfunktion (s. Tabelle A106) unter Verwendung der Software Valoo[®] eingesetzt wurden.

Zunächst wurde die Menge an freiem Hydroxyprolin bestimmt, die in den fünf verschiedenen Kollagenhydrolysaten (100 mg/mL) enthalten war. Dazu wurde die photometrische Messung (s. 3.7.7) ohne vorherige Probenhydrolyse durchgeführt. In Sol DA, Collagel A und Collagel BS war kein, in Sol D bzw. Collagel BS-GA war 681,25 bzw. 168,05 µg/mL freies Hydroxyprolin enthalten. Aufgrund des geringen Hydroxyprolin-Anteils (s. Tabelle 4-42) wurden diese Ergebnisse in nachfolgenden Berechnungen nicht berücksichtigt.

Tabelle 4-42: Konzentration ungebundenen Hydroxyprolins in Kollagenhydrolysaten

Die Probenvorbereitung zur photometrischen Hydroxyprolin- (HyPro) Bestimmung erfolgte ohne Hydrolyse (s. 3.7.7).

Kollagenhydrolysat	n	Freies HyPro [µg/mL]		HyPro-Anteil [%] (w/w)	
		Mittelwert	± S.E.M.	Mittelwert	± S.E.M.
Sol D	5	681,25	± 21,17	0,68	± 0,02
Sol DA	5	000,00	± 0,00	0,00	± 0,00
Collagel A	5	000,00	± 0,00	0,00	± 0,00
Collagel BS	5	000,00	± 0,00	0,00	± 0,00
Collagel BS-GA	5	168,05	± 15,70	0,17	± 0,03

Außerdem wurde die Gesamtmenge an Hydroxyprolin (freie und gebundene Aminosäure) der fünf verschiedenen Kollagenhydrolysate (100 mg/mL, K_P) bestimmt (Tabelle 4-43). Zusätzlich war in jeden Test eine Positiv-Kontrolle (K_P) mit Sol D integriert (s. Tabelle A107).

Tabelle 4-43: Positiv-Kontrollen (K_P): Berechneter Hydroxyprolin-Anteil der fünf Kollagenhydrolysate (100 mg/mL)

n	HyPro -Anteil im Kollagenhydrolysat [%] (w/v)				
	Sol D	Sol DA	Collagel A	Collagel BS	Collagel BS-GA
1	10,65	12,53	11,94	11,34	11,19
2	11,10	11,90	11,12	11,23	11,40
3	9,89	9,81	10,77	10,80	11,13
4	11,52	10,34	11,51	10,78	11,65
5	11,15	8,90	11,17	11,11	11,33
MW ± S.E.	10,86 ± 0,28	10,70 ± 1,49	11,30 ± 0,44	11,05 ± 0,25	11,34 ± 0,20

Die Durchlässigkeit der PC-Membranen für die verschiedenen Kollagenhydrolysate (zumeist 100 mg/mL) wurde in jedem Test überprüft. Dazu wurden diese ins apikale Kompartiment

direkt auf die PC-Membran appliziert (Diffusionskontrolle: K_D). Anschließend erfolgte die Probenentnahme zur photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung nach der Test-spezifischen Inkubationsdauer aus dem jeweiligen basolateralen Kompartiment: Nach 90 min Inkubation mit Sol DA, Collagel A, Collagel BS bzw. Collagel BS-GA wurden Hydroxyprolin-Anteile von 39, 41, 45 bzw. 40 % ermittelt (s. Tabelle A108). Außerdem wurden nach 15 bis 180 min Inkubation der Membranen mit Sol D in den Proben (K_{D-BL}) 25 bis 53 % des apikal zugeführten Hydroxyprolins ermittelt (s. Tabelle A-109).

In jeden Test (s. Tabelle 3-21) wurde eine Negativ-Kontrolle (K_N) integriert, da Caco-2 Zellen Kollagen sezernieren können. Die entsprechenden Monolayer wurden mit HBSS (AP und BL) inkubiert (an $d_{14/21}$) und die Proben aus basolateralen Kompartimenten entnommen (K_{N-BL}). In diesen wurden Hydroxyprolin-Gehalte zwischen 0,06 bis 1,41 μg ermittelt (s. Tabelle A-110), die nachfolgend von den Ergebnissen der jeweils zur Messreihe zugehörigen Proben aus Testkavitäten (P_{T-BL}) abgezogen wurden.

Im Test 1 wurden die Caco-2 Monolayer (an d_{14}) 60 min mit 10 bis 120 mg/mL Sol D inkubiert und nachfolgend die Proben aus basolateralen Kompartimenten entnommen. In diesen wurden 0,9 bis 3,7 μg Hydroxyprolin detektiert, wobei die Hydroxyprolin-Menge zunächst Konzentrations-abhängig zunahm und nachfolgend stagnierte (s. Tabelle 4-44, s. Tabelle A-111).

Tabelle 4-44: Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 1: Zellaussaat ($10^5/\text{cm}^2$, 63. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_{14} , s. 3.7.3). Anschließend **60 min** Exposition mit **10 bis 120 mg/mL Sol D**, Probenentnahme (d_{14}) aus basolateralen Kompartimenten (s. 3.7.4). Durchführung der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung (s. 3.7.7, Angabe der Extinktionen s. Tabelle A-111) und Ermittlung der Kalibrierfunktion ($y = 0,0272 + 0,0122 x$, $r = 0,9990$). Nachfolgende Berechnung der in der Probe (P_{T-BL}) enthaltenen Menge an Hydroxyprolin [μg] bzw. dessen Anteils [%] aus dem apikal hinzugefügten Sol D, der ins basolaterale Kompartiment transportiert wurde sowie der Menge an Sol D [μg], welche der berechneten HyPro [μg] -Menge entspricht – basierend auf einem HyPro-Anteil in Sol D von 10,86 % (s. Tabelle 4-43).

AP (0,5 mL)		P_{T-BL} : Proben aus basolateralen Kompartimenten (1,5 mL)							
Sol D [mg/mL]		HyPro [μg]		HyPro-Anteile aus AP [%]			Sol D [μg]		
		MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.		
10	1,12	0,89	$\pm 0,28$	0,25	0,23	$\pm 0,03$	22,02	19,92	$\pm 2,54$
	1,21			0,26			22,89		
	0,34			0,17			14,86		
40	1,20	1,20		0,08	0,08		22,79	22,79	-
80	1,47	1,25	$\pm 0,25$	0,05	0,04	$\pm 0,00$	25,25	23,28	$\pm 2,34$
	0,75			0,03			18,61		
	1,54			0,05			25,97		
100	4,03	3,67	$\pm 0,68$	0,05	0,05	$\pm 0,01$	48,87	45,54	$\pm 6,29$
	2,35			0,03			33,37		
	4,63			0,05			54,38		
120	2,05	3,43	$\pm 1,38$	0,04	0,05	$\pm 0,02$	30,63	43,30	$\pm 12,67$
	4,80			0,07			55,97		

In den Proben (P_{T-BL}) wurden Hydroxyprolin-Anteile der apikal applizierten Testsubstanz von 0,23 bis 0,05 % ermittelt. Dies entsprach einem Transport von 19,9 bis 45,5 μg Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer. Da nach Inkubation der Monolayer mit 100 mg/mL Sol D die nachweisbare Hydroxyprolin Menge (P_{T-BL}) am größten war, wurden die Kollagenhydrolysate in den nachfolgenden Tests in dieser Konzentration eingesetzt.

In Test 2 wurde der Sol D-Transport (d_{14} , 100 mg/mL) durch intakte Monolayer in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer untersucht. In den Proben (P_{T-BL}) wurde mit zunehmender Inkubationsdauer eine im Mittel zunehmende Menge an Hydroxyprolin detektiert. Es wurden Mengen zwischen 5,2 bis 13,8 μg Hydroxyprolin ermittelt, die 48,3 bis 127,3 μg Sol D entsprachen. Diese Menge an Sol D, die in den Proben der basolateralen Kompartimenten nachweisbar waren, entsprach 0,1 bis 0,3 % des apikal zugefügten Sol D (s. Tabelle 4-45, s. Tabelle A-112). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in nachfolgenden Tests eine Inkubationsdauer der Caco-2 Monolayer mit Testsubstanz von mindestens 90 Minuten gewählt.

Tabelle 4-45: Untersuchung des Zeit-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 2: Zellaussaat ($10^5/\text{cm}^2$, 73. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_{14} , s. 3.7.3). Anschließend **15 bis 90 min** Exposition mit **100 mg/mL Sol D**, Probenentnahme (d_{14}) aus basolateralen Kompartimenten (s. 3.7.4), Durchführung der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung (s. 3.7.7, Angabe der Extinktionen s. Tabelle A-112) und Ermittlung der Kalibrierfunktion ($y = 0,0217 + 0,0113 x$, $r = 0,9991$). Nachfolgende Berechnung der in der Probe (P_{T-BL}) enthaltenen Menge an Hydroxyprolin [μg] bzw. dessen Anteils [%] aus dem apikal hinzugefügten Sol D, der ins basolaterale Kompartiment transportiert wurde sowie die Menge an Sol D [μg], welche der berechneten HyPro [μg] -Menge entspricht – basierend auf einem HyPro-Anteil in Sol D von 10,86 % (s. Tabelle 4-43).

Inku- bation [min]	P_{T-BL} : Probenentnahme aus den basolateralen Kompartimenten (1,5 mL)								
	HyPro [μg]			HyPro-Anteile aus AP [%]			Sol D [μg]		
	MW	\pm S.E.M.		MW	\pm S.E.M.		MW	\pm S.E.M.	
15	9,61	5,18	$\pm 2,34$	0,18	0,10	$\pm 0,04$	89,07	48,25	$\pm 21,58$
	4,28			0,08			40,00		
	1,64			0,03			15,69		
30	6,32	6,01	$\pm 3,13$	0,12	0,11	$\pm 0,06$	58,80	55,88	$\pm 28,80$
	1,94			0,04			18,48		
	14,73			0,27			136,16		
45	1,03	6,17	$\pm 2,28$	0,02	0,11	$\pm 0,04$	10,08	57,37	$\pm 21,03$
	4,41			0,08			41,18		
	7,48			0,14			69,44		
60	11,76	9,23	$\pm 3,14$	0,22	0,17	$\pm 0,06$	108,89	85,58	$\pm 28,87$
	2,78			0,05			26,18		
	17,52			0,32			161,92		
90	10,04			0,19			92,99		
	6,59			0,12			61,24		
	20,35	13,76	$\pm 3,39$	0,38	0,25	$\pm 0,06$	187,93	127,31	$\pm 31,23$
	11,89			0,22			110,02		
	9,06			0,17			83,98		

Bei Betrachtung der Einzelergebnisse von Test 2 wurden um den Faktor sieben variierende Mengen an Hydroxyprolin (3 bis 20 µg) durch intakte Caco-2 Monolayer nach 60 bis 90 min Inkubation mit 100 mg/mL Sol D transportiert. Deshalb wurde im nachfolgenden Test untersucht, ob diese Ergebnisse auf tatsächlichen Transportunterschieden differenzierter Caco-2 Zellpopulationen für Hydroxyprolin bzw. Hydroxyprolin-haltige Peptide basierten oder statistische Ausreißer vorlagen.

In Test 3 A wurden 11 intakte Caco-2 Monolayer (an d₁₄) 90 Minuten mit 100 mg/mL Sol D inkubiert und nachfolgend die Proben basolateral entnommen (P_{T-BL}). In diesen wurde 4,8 bis 15,4 µg Hydroxyprolin ermittelt (s. Tabelle 4-46 A, s. Tabelle A113). Demnach wiesen differenzierten Caco-2 Zellen unterschiedliche Fähigkeiten im Transport von Hydroxyprolin bzw. -haltigen Peptiden auf: In den Proben (P_{T-BL}) wurden durchschnittlich 8,93 µg Hydroxyprolin nachgewiesen, welches einer Menge von ca. 0,2 % der apikal durch Sol D zugeführten Aminosäure entsprach bzw. einem durchschnittlichen Transport von 82,2 µg Sol D durch intakte Monolayer.

Tabelle 4-46: Untersuchung des Sol D-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer nach 14- bzw. 21-tägiger Zellkultivierung unter Standardbedingungen (an d₁₄ bzw. d₂₁)

Test 3: Zellaussaat (10⁵/cm², 75. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und **A) 14** bzw. **B) 21 d** Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d₁₄ bzw. d₂₁, s. 3.7.3). Anschließend **90 min** Exposition mit **100 mg/mL Sol D**, Probenentnahme (d₁₄ bzw. d₂₁) aus basolateralen Kompartimenten (s. 3.7.4). Durchführung der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung (s. 3.7.7, Angabe der Extinktionen s. Tabellen A-113, A-114) und Ermittlung der Kalibrierfunktion (A) $y = 0,0153 + 0,0102 x$, $r = 0,9998$, B) $y = 0,0246 + 0,0098 x$, $r = 0,9993$). Nachfolgende Berechnung der in der Probe (P_{T-BL}) enthaltenen Menge an Hydroxyprolin [µg] bzw. dessen Anteils [%] aus dem apikal hinzugefügten Sol D, der ins basolaterale Kompartiment transportiert wurde sowie die Menge an Sol D [µg], welche der berechneten HyPro [µg] - Menge entspricht – basierend auf einem HyPro-Anteil in Sol D von 10,86 % (s. Tabelle 4-43). Diese Ergebnisse wurden von statistischen Ausreißern (s. 3.8) bereinigt.

	Hydroxyprolin [µg]		HyPro-Anteile aus AP [%]		Sol D [µg]	
	A) d ₁₄	B) d ₂₁	A) d ₁₄	B) d ₂₁	A) d ₁₄	B) d ₂₁
	15,15	1,53	0,28	0,03	139,46	14,06
	8,88	4,54	0,16	0,08	81,72	41,76
	13,65	1,66	0,25	0,03	125,67	15,27
	15,44	1,55	0,28	0,03	142,18	14,24
	6,00	4,47	0,11	0,08	55,23	41,13
	6,95	2,89	0,13	0,05	63,96	26,59
	7,71	6,30	0,14	0,12	71,03	58,02
	4,82		0,09		44,36	
	5,72		0,11		52,65	
	4,94		0,09		45,49	
MW ± S.E.M.	8,93 ± 1,34	3,27 ± 0,71	0,16 ± 0,02	0,05 ± 0,01	82,18 ± 12,29	26,97 ± 6,47

In Test 3 B wurde außerdem untersucht, ob ein endozytotischer Sol D-Transport wahrscheinlich ist. Dazu wurden die Caco-2 Zellen zunächst 21 Tage unter Standardbedingungen und anschließend (an d₂₁) 90 min mit 100 mg/mL Sol D inkubiert. In den basolateral entnommenen Proben (P_{T-BL}) wurden durchschnittlich 3,3 µg Hydroxyprolin nachgewiesen. Dies

entsprach einer Menge von ca. 0,1 % der apikal durch Sol D zugeführten Aminosäure bzw. einem Transport von durchschnittlich 27,0 µg Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer (s. Tabelle 4-46 B, s. Tabelle A-114).

In Test 4 wurde der Transport der fünf verschiedenen Kollagenhydrolysate durch intakte Caco-2 Monolayer untersucht. Basierend auf den Ergebnissen der vorherigen Tests wurden jeweils sieben Caco-2 Monolayer (an d₁₄) 90 min mit 100 mg/mL Kollagenhydrolysat inkubiert. Diese apikal hinzugefügten Testsubstanzen enthielten die in Tabelle 4-43 aufgelisteten Anteile an Hydroxyprolin von ca. 11 %. In den basolateral entnommenen Proben (P_{T-BL}) wurden nach Inkubation mit Sol D, Sol DA, Collagel A, Collagel BS bzw. Collagel BS-GA durchschnittlich 5,1 / 3,2 / 1,5 / 3,9 bzw. 2,6 µg Hydroxyprolin nachgewiesen (s. Tabelle 4-47, Tabellen A-115, A-116).

Tabelle 4-47: Untersuchung (I) des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 4: Zellaussaat (10⁵/cm², 80. Passage, MTP 1 bis 5, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d₄, s. 3.7.3). Anschließend 90 min Exposition mit 100 mg/mL Sol D, Sol DA, Collagel A, Collagel BS sowie Collagel BS-GA, Probenentnahme (d₁₄) aus basolateralen Kompartimenten (s. 3.7.4). Durchführung der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung (s. 3.7.7, Angabe der Extinktionen s. Tabellen A-115, A-116) und Ermittlung von drei verschiedenen Kalibrierfunktionen ($y = 0,0155 + 0,0105 x$, $r = 0,9996$, $y = 0,0333 + 0,0103 x$, $r = 0,9978$, $y = 0,0299 + 0,0104 x$, $r = 0,9986$, s. auch Tabelle A-106). Nachfolgende Berechnung der in der Probe (P_{T-BL}) enthaltenen Menge an Hydroxyprolin [µg] bzw. dessen Anteils [%] aus dem apikal hinzugefügten Sol D, der ins basolaterale Kompartiment transportiert wurde sowie die Menge an Sol D [µg], welche der berechneten HyPro [µg] -Menge entspricht – basierend auf einem HyPro-Anteil in Sol D von 10,86 % (s. Tabelle 4-43). Diese Ergebnisse wurden von statistischen Ausreißern (s. 3.8) bereinigt (je n = 6/7).

n	P _{T-BL} : Proben aus basolateralen Kompartimenten (1,5 mL)									
	Hydroxyprolin [µg]					HyPro-Anteile aus AP [%]				
	Sol		Collagel			Sol		Collagel		
	D	DA	A	BS	BS-GA	D	DA	A	BS	BS-GA
1	4,93	3,34	1,87	2,05	2,10	0,09	0,06	0,03	0,04	0,04
2	3,08	2,65	1,04	2,11	1,84	0,06	0,05	0,02	0,04	0,03
3	5,31	3,19	1,41	4,42	0,77	0,10	0,06	0,03	0,08	0,01
4	5,24	3,75	2,33	5,56	1,35	0,10	0,07	0,04	0,10	0,02
5	5,56	3,23	1,45	6,94	6,94	0,10	0,06	0,03	0,13	0,12
6	6,18	3,05	1,09	4,96	2,80	0,11	0,06	0,02	0,09	0,05
7				1,42					0,03	
MW	5,05	3,20	1,53	3,92	2,63	0,19	0,06	0,03	0,07	0,05
± SEM.	±0,43	±0,15	±0,20	±0,79	±0,91	±0,01	±0,00	±0,00	±0,01	±0,02

In diesem Ansatz wurde ein niedrigerer mittlerer Gehalt an Sol D berechnet als in Test 3 (5,1 versus 8,9 µg Hydroxyprolin). Die Hydroxyprolin-Mengen des Test 4 entsprachen einem durchschnittlichen Anteil der apikal mit dem jeweiligen Kollagenhydrolysat zugeführten Aminosäure von weniger als 0,1 % bzw. einem durchschnittlichen Transport von 46,5 / 29,9 / 13,6 / 35,5 bzw. 19,1 µg Sol D durch intakte Monolayer (s. Tabelle 4-48, s. Tabelle A-115 und A-116).

Tabelle 4-48: Untersuchung (II) des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 4: Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-47. Diese Ergebnisse wurden von statistischen Ausreißern (s. 3.8) bereinigt (je n = 6/7).

P_{T-BL} : Proben aus basolateralen Kompartimenten (1,5 mL)					
Hydrolysat [M _r]	Kollagenhydrolysat [µg]				
	Sol D [2,9]	Sol DA [6,3]	Collagel A [15,1]	Collagel BS [9,7]	Collagel BS-GA [10,5]
Probenzahl: 1	45,37	31,19	16,54	18,54	18,50
2	28,32	24,80	9,20	19,10	16,27
3	48,87	29,81	12,52	40,01	6,79
4	48,23	35,08	20,59	50,27	11,91
5	51,23	30,20	12,82	62,81	61,18
6	56,86	28,49	9,66	44,86	24,73
7				12,82	
MW ± S.E.M.	46,48 ± 3,96	29,93 ± 1,37	13,56 ± 1,77	35,49 ± 7,14	19,11 ± 8,84

In Test 4 wurde außerdem untersucht, ob ein parazellulärer Transport von Sol D stattfindet (MTP 6). Dazu wurden 100 mg/mL Sol D (an d₁₄) in die basolateralen Kompartimente der Testkavitäten mit intakten Caco-2 Monolayern appliziert. Nach 90 min Inkubation erfolgte die Probenentnahme aus **apikalen** Kompartimenten (P_{T-AP}). In den Proben wurde durchschnittlich 4,3 µg Hydroxyprolin nachgewiesen. Dies entsprach 18,9 % der mit Sol D basolateral zugeführten Aminosäure bzw. einem durchschnittlichen Transport von 37,6 µg Sol D (s. Tabelle 4-49, s. Tabelle A-116).

Tabelle 4-49: Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer (von BL nach AP)

Test Nr. 4 (MTP 6): Zellaussaat (10⁵/cm², 80. Passage, MTP 6, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d₁₄, s. 3.7.3), Applikation von 100 mg/mL Sol D in die basolateralen Kompartimente, 90 min Inkubation und Probenentnahme (d₁₄) aus den apikalen Kompartimenten (0,5 mL) (s. 3.7.4), Durchführung der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung (s. 3.7.7, Angabe der Extinktionen s. Tabelle A-116) und Ermittlung der Kalibrierfunktion ($y = 0,0299 + 0,0104 x$, $r = 0,9986$). Nachfolgende Berechnung der in der Probe (PT-BL) enthaltenen Menge an Hydroxyprolin [µg] bzw. dessen Anteils [%] aus dem apikal hinzugefügten Sol D, der ins basolaterale Kompartiment transportiert wurde sowie die Menge an Sol D [µg], welche der berechneten HyPro [µg] - Menge entspricht – basierend auf einem HyPro-Anteil in Sol D von 10,86 % (s. Tabelle 4-43). Diese Ergebnisse wurden von statistischen Ausreißern (s. 3.8) bereinigt (n = 6 von 7).

P _{T-AP} :		1	2	3	4	5	6	MW	± S.E.M.
HyPro	[µg]	6,37	3,40	2,86	4,31	5,04	4,09	4,34	± 0,51
	[%]	0,23	0,12	0,11	0,16	0,19	0,15	18,90	± 0,00
Sol D	[µg]	58,68	31,22	26,31	39,73	46,37	37,64	37,64	± 0,00

In Test 5 (2 MTP) wurden die Wirkungen der *tight junctions* Modulatoren Cytochalasin D (0,5 µg/mL) und Palmitoyl-DL-Carnitin (0,1 mmol/L) auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer untersucht. Dazu wurden differenzierte Caco-2 Zellen (an d₁₄) 90 min mit 100 mg/mL Sol D bzw. zusätzlich mit einem der beiden *tight junctions* Modulatoren (je n = 3) inkubiert. In den basolateral entnommenen Proben (P_{T-BL}) war nach Inkubation der Monolayer mit Sol D 8,1 bzw. 6,7 µg Hydroxyprolin (MPT 1, 2: s. Tabelle 4-50, Tabelle 4-51)

nachweisbar. Die doppelte Menge an Hydroxyprolin wurde in den Proben detektiert, die nach gleichzeitiger Inkubation der Monolayer mit Sol D und Cytochalasin D aus basolateralen Kompartimenten entnommen wurden (s. Tabelle 4-50, Tabelle A117). Im Vergleich dazu wurde der Hydroxyprolin-Transport aus Sol D nach Inkubation der Monolayer mit Palmitoyl-DL-Carnitin dermaßen erhöht, dass Extinktionswerte größer 4,5 ermittelt wurden, die außerhalb der Kalibriergeraden lagen (s. Tabelle 4-51, Tabelle A-118).

Tabelle 4-50: Effekte einer Inkubation mit 0,5 µg/mL Cytochalasin D auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer

Test Nr. 5: Zellaussaat ($10^5/\text{cm}^2$, 81. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_{14} , s. 3.7.3). Anschließend 90 min Exposition mit **A) 100 mg/mL Sol D** und **B) 100 mg/mL Sol D und *tight junctions*-Modulator: 0,5 µg/mL Cytochalasin D**, Probenentnahme (d_{14}) aus basolateralen Kompartimenten (1,5 mL) (3.7.4). Durchführung der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung (s. 3.7.7, Angabe der Extinktionen s. Tabelle A117) und Ermittlung der Kalibrierfunktion ($y = 0,0173 + 0,0108 x$, $r = 0,9996$). Nachfolgende Berechnung der in der Probe (P_{T-BL}) enthaltenen Menge an Hydroxyprolin [µg] bzw. dessen Anteils [%] aus dem apikal hinzugefügten Sol D, der ins basolaterale Kompartiment transportiert wurde sowie die Menge an Sol D [µg], welche der berechneten HyPro [µg] -Menge entspricht – basierend auf einem HyPro-Anteil in Sol D von 10,86 % (s. Tabelle 4-43).

	P_{T-BL} : Proben aus basolateralen Kompartimenten (BL: 1,5 mL)					
	HyPro [µg]		HyPro-Anteile aus AP [%]		Sol D [µg]	
	A)	B)	A)	B)	A)	B)
	7,22	17,72	0,13	0,33	66,50	163,15
	8,13	14,02	0,15	0,26	74,87	129,08
	9,06	15,08	0,17	0,28	83,39	138,85
MW	8,14	15,61	0,15	0,29	74,92	143,69
\pm S.E.M.	$\pm 0,53$	$\pm 1,10$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 4,88$	$\pm 10,13$

Tabelle 4-51: Effekte einer Inkubation mit 0,1 mmol/L Palmitoyl-DL-Carnitin auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer

Test Nr. 5: Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle 4-50 (bzw. Tabelle A-118): 90 min Exposition der Caco-2 Monolayer mit **A) 100 mg/mL Sol D** und **B) 100 mg/mL Sol D und *tight junctions*-Modulator: 0,1 mmol/L Palmitoyl-DL-Carnitin**. * Keine Ergebnisberechnung möglich, da Extinktionswerte größer 4,5 ermittelt wurden, die außerhalb der Kalibriergeraden lagen.

	P_{T-BL} : Proben aus basolateralen Kompartimenten (BL: 1,5 mL)					
	HyPro [µg]		HyPro-Anteile aus AP [%]		Sol D [µg]	
	A)	B)	A)	B)	A)	B)
	6,04	*	0,11	*	55,61	*
	9,91	*	0,18	*	91,28	*
	4,23	*	0,08	*	38,94	*
MW	6,73		0,12		61,95	
\pm S.E.M.	$\pm 1,68$		$\pm 0,03$		$\pm 15,44$	*

In Test 6 wurden die Bedingungen des vorherigen Tests wiederholt, wobei allerdings jeweils nur ein Monolayer mit 100 mg/mL Sol D bzw. zusätzlich mit einem der beiden *tight junctions*-Modulatoren 90 min inkubiert wurde. Die Ergebnisse dieses Tests bestätigten die des vorherigen Tests: In den Proben (P_{T-BL}) wurden nach Zellinkubation mit Sol D 10,29 µg Hydroxyprolin detektiert, diese Menge entsprach einem Anteil von 0,19 % dieser Aminosäure aus

dem applizierten Sol D und einer transportierten Menge an Sol D von 94,78 µg. Die gleichzeitige Inkubation der Monolayer mit Sol D und Cytochalasin D bewirkte in etwa eine Verdopplung der transportierten Hydroxyprolin-Menge auf 21,85 µg, die einem Anteil der Aminosäure aus dem apikal zugeführten Sol D von 0,40 % entsprach. Demnach wurden 201,22 µg Sol D durch die intakten Monolayer transportiert. Außerdem wurden erneut Extinktionen größer 3 nach Zellinkubation mit 0,1 mmol/L Palmitoyl-DL-Carnitin und Sol D gemessen (s. Tabelle A-119).

In Test 7 wurden die Caco-2 Monolayer (an d_{14}) erneut mit 100 mg/mL Sol D 90 min inkubiert (2 MTP: P_{T-BL} je $n = 5$), wobei die Probenvorbereitung zur Hydroxyprolin-Bestimmung ohne bzw. mit Hydrolyse (MTP 1 bzw. 2) durchgeführt wurde. Dadurch war eine Unterscheidung zwischen dem Anteil der freien bzw. gebundenen Aminosäure möglich, wobei ausschließlich das Peptid-gebundene Hydroxyprolin ein Hinweis auf einen Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer war. In den basolateral entnommenen Proben (P_{T-BL}) der MTP 1 (ohne Hydrolyse) wurde kein Hydroxyprolin nachgewiesen. Hingegen war in den Proben der MTP 2 durchschnittlich 7,62 µg Hydroxyprolin, welches einem Anteil von 0,14 % der apikal hinzugefügten Aminosäure entsprach bzw. einer transportierten Menge an Sol D von 70,82 µg (s. Tabelle 4-52, Tabelle A-120).

Tabelle 4-52: Untersuchung des Hydroxyprolin-Transports (freie und Peptid-gebundene Aminosäure – Sol D-) durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 7: Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 84. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_{14} , s. 3.7.3). Anschließend **90 min** Exposition mit **100 mg/mL** Sol D, Probenentnahme (d_{14}) aus basolateralen Kompartimenten (1,5 mL) (s. 3.7.4). **Probenvorbereitung ohne (MTP 1) bzw. mit Hydrolyse (MTP 2)** zur Durchführung der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung (s. 3.7.7, Angabe der Extinktionen s. Tabelle A-120) und Ermittlung der Kalibrierfunktion ($y = 0,0299 + 0,0113 x$, $r = 0,9984$). Nachfolgende Berechnung der in der Probe (P_{T-BL}) enthaltenen Menge an Hydroxyprolin [µg] bzw. dessen Anteils [%] aus dem apikal hinzugefügten Sol D, der ins basolaterale Kompartiment transportiert wurde sowie die Menge an Sol D [µg], welche der berechneten HyPro [µg] -Menge entspricht – basierend auf einem HyPro-Anteil in Sol D von 10,86 % (s. Tabelle 4-43). Diese Ergebnisse wurden von statistischen Ausreißern (s. 3.8) bereinigt ($n = 4$ von 5). In den Proben der MTP 1 war kein HyPro nachweisbar (-).

P_{T-BL}	MTP 1	MTP 2: Probenvorbereitung mit Hydrolyse						± S.E.M.
		1-5	1	2	3	4	MW	
HyPro [µg]	-	7,28	7,84	7,65	7,69	7,62	0,12	
HyPro [%]	-	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,00	
Sol D [µg]	-	67,02	72,20	70,47	70,82	70,82	0,00	

5 Diskussion

Die Zytotoxizitäts- und Transportstudien dieser Arbeit wurden im Rahmen des EU-Projektes „Hypotensive Peptides from Milk Proteins“ („HTMProt“, QLK1-2000-00043¹) durchgeführt sowie aufgrund einer Kooperation mit der Gelita AG (s. Tabelle A1). Als Testsubstanzen wurden bioaktive Peptide aus Milchprotein und Kollagen eingesetzt: *in vitro* ACE-inhibitorische Milchproteinhydrolysate (158), Hydrolysat-Permeate (3), (synthetisierte) Di-, Tri-, Oligopeptide (36) und chondroprotektive Kollagenhydrolysate (5).

Zur Wirkungsentfaltung *in vivo* ist es notwendig, dass diese mit der Nahrung (z. B. Milch, Gelatine) aufgenommenen ACE-inhibitorischen bzw. chondroprotektiven Peptide (bzw. deren Vorläuferpeptide) ihre Zielorte (u. a. die Blutbahn bzw. das Knorpelgewebe) erreichen. Dazu ist eine (partielle) Hydrolyse-Resistenz gegenüber Enzymen des Verdauungstrakts und des Blutserums notwendig sowie ein intestinaler Transport, u. a. über spezielle Transporter oder durch *tight junctions* (s. 2.2.4). Darüber hinaus ist es notwendig, dass diese Substanzen keine zytotoxischen Wirkungen aufweisen.

Im folgenden Abschnitt 5.1 werden zunächst Ergebnisse diskutiert, die im Zusammenhang mit der Zellkultivierung von Bedeutung sind. Nachfolgend (Abschnitt 5.2) werden methodische Aspekte der zellchemischen Messungen diskutiert. Im letzten Abschnitt (5.3) dieser Diskussion stehen die Wirkungen der untersuchten Testsubstanzen im Vordergrund.

5.1 Humanzellen – Modell für Entero- und Immunozyten

Als Hauptzellkultursystem dieser Arbeit wurden Caco-2 Zellen gewählt, die 1977 von FOGH ET AL. aus einem Colon-Adenocarcinoma isoliert wurden² und seitdem immer besser charakterisiert wurden³. Caco-2 Zellen bilden in der stationären Phase (*in vitro*) spontan morphologische, strukturelle und funktionelle Merkmale reifer Enterozyten aus⁴, wobei die Merkmalsausprägung heterogen ist und zwischen unterschiedlichen Versuchsansätzen variiert⁵. Im Vergleich zu anderen humanen Tumorzelllinien (HT-29, SW1116, LS174T u. a.) weisen Caco-2 Zellen den höchsten Grad der Differenzierung auf⁶ und stellen deshalb ein geeignetes Modell für das humane Dünndarmepithel dar, zur Untersuchung der Wirkung bioaktiver Substanzen aus Lebensmitteln auf entartete Darmzellen (proliferatives Zellstadium) sowie auf

¹ www.ul.ie/acepeptides

² Fogh, et al. 1977

³ Pinto, M. et al., 1983, Hidalgo, I. et al., 1989, Artursson, P. 1990, Wilson, G. et al., 1990, Hashimoto, K. et al., 1994, Shimizu, M. 1999, Haltner, E. et al., 2001

⁴ Pinto, M. et al., 1983

⁵ Eagle, G. et al., 1998, Rousset, M., 1986

⁶ Wilson, G. et al., 1990

Enterozyten-ähnliche Zellen (differenzierte Caco-2 Zellen)⁷. Letztere eignen sich zur Untersuchung des Transports bioaktiver Substanzen durch das Darmepithel sowie zur Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus⁸. In den Zytotoxizitätsstudien dieser Arbeit wurden außerdem polymorphkernige Leukozyten (PML) eingesetzt, da diese Zellen als Modell für alle anderen Körperzellen gelten⁹. Zum Nachweis der Substanzwirkungen wurden verschiedene zytochemische Methoden eingesetzt, die zur Überprüfung der Zellviabilität bzw. zum Nachweis des Zelltods geeignet sind (s. 2.4, s. 5.2).

5.1.1 Caco-2 Zellen

Zell-, Monolayermorphologie und Zellproliferation

Die adhärent wachsenden Caco-2 Zellen werden u. a. durch Trypsinierung geerntet, in Medium suspensiert und als runde bis ovale Einzelzellen ausgesät. Nachfolgend verharren die Zellen zunächst in einer Ruhephase¹⁰, deren Dauer mit zunehmender Passagenanzahl abnimmt¹¹ und proliferieren anschließend rasch, so dass innerhalb 6-7¹² Tagen vollständige Monolayer aus polygonalen Zellen ausgebildet werden¹³, die bis zum 31. Kulturtag beobachtet werden¹⁴. Elektronenmikroskopisch werden allerdings auch Polylayer beobachtet¹¹. Im Caco-2 Monolayer werden ca. vom dritten bis letzten Testtag *domes* (halbkugelförmige Cluster) beobachtet¹⁵, die einen Hinweis auf epitheliale Transportvorgänge geben und deren Zerbersten ein charakteristisches Merkmal der Konfluenz ist¹⁶. In der aktiven zellulären Wachstumsphase (d_7 - d_8) wurde eine Bildungsrate von 100 bis 120 *domes*/cm²/d ermittelt, die sich innerhalb eines Tages halbierte und anschließend bis zum Testende konstant blieb. Im gleichen Zeitraum nahmen Zell-Durchmesser (100 bis 800 µm) und Höhe (80 – 140 µm) zu⁴, wodurch hochprismatische Zellen einer mit reifen Enterozyten (*in vivo*) vergleichbaren Größe entstehen¹⁷.

Die in der proliferativen Phase ansteigende Caco-2 Zellzahl erreichte das Maximum nach 5¹⁵ bzw. 7⁸ Kulturtagen und nahm in der stationären Phase wieder ab (bis d_4)¹⁵ bzw. blieb konstant (bis d_{23})⁴. Proliferierende Caco-2 Zellen (d_{3-7}) wiesen mittlere Durchmesser bzw.

⁷ Audus, K. et al., 1990, Hidalgo, I. et al., 1989, Pinto, M. et al., 1983, Rubio, L. A. & Seiquer, I., 2002

⁸ Shimizu, M. et al., 1997, Satake, M. et al., 2002, Vermeirssen, V. et al., 2002, Haltner, E. et al., 2001

⁹ Short, N., 1994

¹⁰ Hidalgo, I. et al., 1989

¹¹ Briske-Anderson, M. et al., 1997

¹² Hidalgo, I. et al., 1989, Pinto, M. et al., 1983

¹³ Pinto, M. et al., 1983

¹⁴ Hidalgo, I. et al., 1989, Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A.-K., 2000, Haltner, E. et al., 2000

¹⁵ Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A.-K., 2000

¹⁶ Shimizu, M. 1999

¹⁷ Hidalgo, I. et al., 1989, Wilson, G. et al., 1990

¹⁸ Hidalgo, I. et al., 1989

Volumina zwischen 18 bis 19 μm bzw. 3800 fL bis 4100 fL auf (Zell-Counter), die sich nachfolgend (d_{10-14}) auf 17 bis 18 μm bzw. 2800 bis 3400 fl reduzierten¹⁵.

In anderen Versuchen wurde der Proteingehalt bestimmt, der in der proliferativen Phase (d_{0-5}) um das 10fache anstieg, von 25 auf 260 $\mu\text{g}/\text{Kavität}/1,9 \text{ cm}^2$ und nachfolgend zunächst konstant blieb bzw. weiter anstieg auf 400 $\mu\text{g}/\text{Kavität}/1,9 \text{ cm}^2$ (d_{14}). Anschließend nahm der Proteingehalt ab auf 300 $\mu\text{g}/\text{Kavität}/1,9 \text{ cm}^2$ (d_{18}). Diese Reduzierung charakterisiert die Syntheseleistung der zellulären Differenzierung¹⁹. Außerdem wurde der Proteingehalt in Abhängigkeit von der Caco-2 Zellkulturdauer und Passagenzahl untersucht. In diesen Studien nahm der Proteingehalt zunächst mit der Kulturdauer zu und erreichte nachfolgend ein Plateau. Die Maxima von ca. 500, 400, 250 $\mu\text{g}/\text{Membran}$ wurden in Abhängigkeit von einer zunehmenden Passagenanzahl (22, 33, 72) nach 19, 15, 12 Kulturtagen ermittelt¹¹. Ein äquivalentes Maß zum Proteingehalt bzw. der Zellzahl ist der Tryptophangehalt (nmol/mL Lysat) einer Zellkultur. Dieser verdreifachte sich in der proliferativen Phase (d_0-d_7) von 6,17 auf 18,3 nmol/mL, sank danach zunächst auf 14,7 nmol/mL (d_{14}) ab und stieg bis zum Testende (d_{21}) auf 17,47 nmol/mL an. In dieser Phase differenzieren Caco-2 Zellen und synthetisieren funktionelle Proteine u. a. *tight junctions* und charakteristische Enzyme (wie die DPP IV)¹⁵.

Strukturelle Merkmale

Tight junctions werden vom dritten Testtag an unter dem Elektronenmikroskop beobachtet. Die Funktionsfähigkeit (Dichtigkeit) dieser Zell-Zellverbindungen wird u. a. durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) oder Transportstudien mit niedermolekularen, wasserlöslichen Substanzen untersucht. Der TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$) korreliert negativ mit der parazellulären Permeabilität und wird durch methodische Faktoren beeinflusst. In der proliferativen Phase nimmt der TEER mit zunehmenden Grad der Monolayerkonfluenz zu. Nachfolgend wird der TEER ausschließlich von der Anzahl bzw. Dichtigkeit der *tight junctions* beeinflusst²⁰. Außerdem wurde ein Einfluss der Caco-2 Zellpassagenzahl (20 – 109) auf die Ausprägung von Differenzierungsmerkmalen (*tight junctions*, Enzymaktivität u. a.) nachgewiesen. Infolge dessen wurde der Einsatz von Zellen der 28. bis 65. Passage, die 15 bis 18 Tage kultiviert wurden, als optimal angesehen zur Untersuchung der Wirkung von Testsubstanzen¹¹. Allerdings wurden diese Ergebnisse durch Einsatz von Zellen der 22. bis 32. Passage nach Messung des TEER sowie Untersuchung der Transportleistung differenzierter Caco-2 Monolayer für verschiedene Markersubstanzen nicht bestätigt²¹.

In dieser Arbeit wurden nach Zellaussaat mit niedriger bzw. hoher Passagenzahl (31.-63. bzw. 73.-84.) auf PC-Membranen Unterschiede in der Höhe des TEER ermittelt, nach Messung bei 37 °C (s. Abbildung 4-32). Anzumerken ist, dass die Nummerierung laborintern entstanden war, da der Zellenlieferant (s. 3.3) keine exakte Angabe zur Passagenzahl gemacht

¹⁹ Hashimoto, K. et al., 1993

²⁰ Hidalgo, I. et al., 1989, Pinto, M. et al., 1983, Wilson, G. et al., 1990

²¹ Haltner, E. et al., 2000

hatte. In weiteren Untersuchungen wurde nach Zellaussaat einer niedrigen Passagenzahl ein Zusammenhang zwischen Kulturmaterial und der Höhe des TEER (nach Messung bei RT) beobachtet: Caco-2 Zellen, die auf PC-Membranen wuchsen, zeigten im Zeitverlauf (ab d_{17}) einen höheren TEER als solche, die auf PE-Membranen ausgesät wurden (s. Abbildung 5-1, schwarze Symbole)²². Die Material-abhängigen Effekte (PC- versus PE-Membran) wurden nach Zellaussaat niedriger Passagenzahl mit der Kulturdauer ausgeglichen (s. Abbildung 5-1, Ergebnisse an d_{24}).

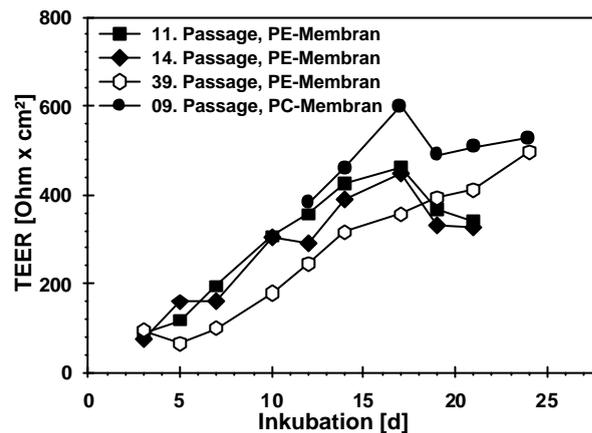


Abbildung 5-1: Veränderungen des TEER (RT) von Kontrollzellen (K_N) im Zeitverlauf und nach Aussaat auf PC- bzw. PE-Membranen

Zellaussaat ($10^5/\text{cm}^2$) in 12-Kavitäten-MTP auf PE- bzw. PC-Membranen, Kultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6), TEER-Messung (RT, s. 3.7.3), Berechnung der Mittelwerte aus drei Messwiederholungen (schwarze Symbole: s. ²², offene Symbole: s. Tabellen 4-30 und A-95).

GONZÁLEZ-MARISCAL ET AL.²³ wiesen nach, dass die Messtemperatur (3 bis 37 °C) einen inversen Einfluss auf die Höhe des TEER ausübt, in dem dieser mit sinkender Temperatur ansteigt. Gleichzeitig wurden elektronenmikroskopisch keine Veränderung der *tight junctions*-Strukturen beobachtet²³. Diese Unterschiede waren in den eigenen Untersuchungen nach 14-tägiger Kultivierung der Caco-2 Zellen auf PC-Membranen und TEER-Messung bei RT bzw. 37 °C nicht nachweisbar. Ein TEER von $\geq 90 \Omega \times \text{cm}^2$ (d_{14}) wies die Integrität der Caco-2 Monolayern nach (s. 3.7.4.2), die in den Transportstudien eingesetzt wurden. Nach Durchführung der Transportstudie wurden vereinzelt TEER-Werte kleiner $90 \Omega \times \text{cm}^2$ ermittelt. Hierbei war es nicht möglich zwischen denkbaren methodischen Fehlern (z. B. Zerstörung der Monolayer-Integrität beim Pipettieren) und einer potenziellen zytotoxischen Substanzwirkung zu unterscheiden. Dies wurde bei der Ergebnisbeurteilung berücksichtigt.

MUKHERJEE ET AL.²⁴ identifizierten in ihren Transportstudien eine zytotoxische Wirkung auf Caco-2 Zellen u. a. mit Dinatrium-EDTA, die durch Messung des TEER nicht nachweisbar

²² Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000

²³ González-Mariscal, L. et al., 1984

²⁴ Mukherjee, T. et al., 2004

war. Die Autoren postulierten deshalb, dass zelleigene Systeme die Membranzerstörungen reparierten, wodurch die Reduzierung des TEER ausgeglichen würde²⁴.

In Übereinstimmung mit zahlreichen Untersuchungen u. a. aus der Lebensmittelforschung wird in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass sich die TEER-Messung (bei 37 °C) zum Nachweis intakter Caco-2 Monolayer eignet. Ein direkter Vergleich der Messergebnisse unterschiedlicher Forschergruppen ist jedoch nicht möglich, da die Bedingungen der Messungen variieren (s. Tabelle 5-1).

Trotz dieser methodischen Unterschiede wurde in der proliferativen Phase der Caco-2 Zellen grundsätzlich ein ansteigender TEER ermittelt²⁵, der in der stationären Phase weiter anstieg bzw. ein Plateau erreichte, welches zumeist bis zum jeweiligen Testende erhalten blieb oder moderat sank²⁶. Die jeweiligen Maxima von 200, 230 bzw. 400 bis 600 wurden nach 8²⁷, 15²⁸ bzw. 17²⁹ sowie 19³⁰ Tagen der Zellkultivierung ermittelt. Die Beurteilung der Messergebnisse zeitlich oder örtlich getrennter Messreihen muss deshalb unter Berücksichtigung einer geeigneten Bezugsgröße stattfinden. Innerhalb dieser Arbeit wurde aufgrund dessen zum Nachweis TEER-modulierender Peptide der Widerstands-Index_{TEER} (WI_{TEER}) [Test/Negativ-Kontrolle] berechnet (s. 3.7.3).

Mikrovilli sind weitere strukturelle Differenzierungsmerkmale von Caco-2 Zellen, die in dieser Arbeit allerdings nicht betrachtet wurden. Mikrovilli sind an der Polarisierung der Zelle beteiligt, entstehen durch fingerförmige Ausstülpungen der apikalen Zellmembran und wurden vereinzelt, als Cluster oder in sehr großer Anzahl auf der Zelloberfläche beobachtet. Ihre Anzahl nahm mit der Kulturdauer von 1,96 auf 2,85 pro μm^2 Zelloberfläche zu. Die Länge nahm zunächst auf ca. 1,22 μm zu (bis d_{15}) und reduzierte sich anschließend auf ca. 0,94 μm (bis d_{23})³¹.

²⁵ Hidalgo, I. et al., 1989, Bacher, A. et al., 1992, Hashimoto, K. & Shimizu, M., 1993, Grès, M.-C. et al., 1998, Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000, Haltner, E. et al., 2000

²⁶ Hashimoto, K. et al., 1993, Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000

²⁷ Hidalgo, I. et al., 1989, Bacher, A. et al., 1992,

²⁸ Hashimoto, K. et al., 1993

²⁹ Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000, Grès, M.-C. et al., 1998

³⁰ Haltner, E. et al., 2000

³¹ Pinto, M. et al., 1983, Hidalgo, I. et al., 1989, Wilson, G. et al., 1990

Tabelle 5-1: Messung des TEER in der Lebensmittelforschung: Methode und Ergebnisse

Literatur	TEER-Messung			Caco-2 Zellen bei der Aussaat			
	M.	T	TEER [W x cm ²]	I. [d]	Dichte [X 10 ⁵ /cm ²]	Passagen Nummer	Membran
Eigene	A	RT	179	14	1,0	25	PE
Untersuchungen	A	37 °C	356 – 605	14	1,0	31 - 63	PC
	A	37 °C	189 – 357	14	1,0	73 - 84	PC
Grès ³²	k. A.	k. A.	ca. 250	14	2,0	88	PE
Haltner ³³	k. A.	k. A.	300-400	14	0,6	22 - 32	PE
Kennefick ³⁴	A	k. A.	200	18	2,5	25 - 50	PE
Hidalgo ³⁵	A	k. A.	200	6 - 17	0,6	18	PC
Schröder ³⁶	A	RT	300	8 - 15	4,0	30 - 35	PC
Rubio ³⁷	k. A.	k. A.	240	21	#	40	PC
Ogawa ³⁸	k. A.	k. A.	715	15	2,3	64 - 78	PC
Hashimoto ³⁹	A, C	k. A.	> 200	9 bzw. 15	1,7	k. A.	PC
	A	37 °C	k. A.	3	2,0	k. A.	PC
Gnoth ⁴⁰	A	37 °C	659	14 – 17	k. A.	k. A.	PC
Konishe ⁴¹	A	37 °C	≥ 250	14	1,0	53 - 75	PC + Kol.
Halleux ⁴²	A	k. A.	350	18 - 21	1,6	k. A.	PC, PET
Shimizu ⁴³	A	RT	200	14/15	2,0	38 - 70	PC + Kol.
Satake ⁴⁴	A	RT	100 – 150	14	4,0	40 – 70	PC + Kol.
			ca. 500				
Briske-Anderson ⁴⁵	A	k. A.	ca. 500	15	#	33	PET + Kol.
			ca. 1100				
Wilson ⁴⁶	B	RT	300 - 400	12 - 15	3,0	80 - 110	NZ
Finley ⁴⁷	A	k. A.	1000		0,6	20 - 30	k. A.
Vermeirssen ⁴⁸	C	RT	300	23	k. A.	95	k. A.

Abkürzungen: I.: Inkubationsdauer, k. A.: keine Angaben, Kol.: Kollagenbeschichtung, M.: Methode, NZ: Nitrozellulose, PC: Polycarbonat, PE: Polyethylen, PET: Polyethylenterephthalat, RT: Raumtemperatur, T: Temperatur. A: Volt-Ohm-Meter (Millipore ERS, World Precision Instruments), B: Methode nach Bonsdorff et al., 1985, C: andere Methode. # 10⁵ Zellen pro Kavität, ## 2,5 x 10⁵ Zellen pro Kavität.

³² Grès, M.-C. et al., 1998

³³ Haltner, E. et al., 2000

³⁴ Kennefick, S. & Cashman, K. D., 2000

³⁵ Hidalgo, I. et al., 1989

³⁶ Schröder, 1999

³⁷ Rubio, 2002

³⁸ Ogawa, 1999

³⁹ Hashimoto, M. 1993, 1994 und 1997

⁴⁰ Gnoth, M. J. et al., 2002

⁴¹ Konishe, Y. et al., 2003 b

⁴² Halleux, E. 1994

⁴³ Shimizu, M. et al., 1997

⁴⁴ Satake, M. et al. 2002

⁴⁵ Briske-Anderson, M. et al., 1997

⁴⁶ Wilson, G. et al., 1990

⁴⁷ Finley, J. W. et al., 1994

⁴⁸ Vermeirssen, V. et al., 2002

Funktionelle Differenzierungsmerkmale

Zu den funktionellen Differenzierungsmerkmalen von Caco-2 Zellen gehören u. a. die Expression von Bürstensaum-Membranenzymen und -transportern (s. 2.2.4). In der apikalen Zellmembran wurden die alkalische Phosphatase, Saccharase-Isomaltase, Aminopeptidase N, Dipeptidyl-Aminopeptidase IV, Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase, Katalase u. a. nachgewiesen. Die Aktivität dieser Enzyme nimmt zumeist mit der Kulturdauer der Caco-2 Zellen zu (s. Tabelle 5-2)⁴⁹. In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der DPP IV-Aktivität durchgeführt.

Tabelle 5-2: Zeitabhängige Veränderung der Aktivität von Enzymen der Bürstensaum-Membran in Caco-2 Zellkulturen

	Pinto ⁵⁰	Hashimoto ⁵¹	Briske-Anderson ⁵²			Pentzien ⁵³
ALP [mU/mg P]	67/764	50/150/200	-/24/18/23	-/27/25/25	-/15/20/ 8	
ALP [U/mmol _{TRP}]	n. d.	n. d.		n. d.		823/1522/1793
Saccharase ^A	1/220	0/ 6/15	10/20/30/45	10/22/40/60	12/35/55/40	n. d.
Aminopeptidase ^A	4/101	n. d.		n. d.		n. d.
Kulturdauer [d]	5/19	4/15/19	4/15/19/26	4/15/19/26	4/15/19/26	7/15/21
Zelldichte ^B [10 ⁵ /cm ²]	0,4	1,7		2,5 ^C		1,0
Passagen	20 – 40	k. A.	22	33	72	17
Material	KF	PC-M.	PC-Membran + Kollagenbeschichtung			PP

^A Konzentration: mU/mg Protein (P), ^B Zelldichte bei der Aussaat [10⁵/cm²], ^C 2,5 x 10⁵/Kavität.

Abkürzungen: k. A.: keine Angaben, KF: Kulturflaschen aus PP, n. d.: nicht detektiert, M.: Membran, PC: Polycarbonat, PP: Polypropylen

In die Bürstensaum-Membran sind verschiedene Peptid-Transporter integriert, u. a. PepT1, HPT-1, PHT-1⁵⁴. Ein PepT-1 vermittelter Transport wurde für folgende Peptide nachgewiesen: Gly-Pro, Gly-Sar, Lys-Pro und Derivate, Gly-Gln⁵⁵, Gly-Leu, Gly-Lys, Gly-Gln⁵⁶, Val-Val, Val-Val-Val⁵⁷ sowie Val-Pro-Pro⁵⁸. Der PepT1-Transporter ist kompetitiv hemmbar, u. a. durch 10 mmol/L Gly-Pro. Außerdem wurden D-Ala-Lys-AMCA und Lys-[Z(NO₂)]-Pro als spezifische Inhibitoren dieses Transporters identifiziert⁵⁹. Ein weiterer Peptidtransport-Mechanismus ist die Endozytose (Transzytose), die in einer späten Zelldifferenzierungsphase stattfindet⁶⁰ und Makromoleküle bzw. Flüssigkeiten über Membranvesikel aufnimmt⁶¹. Neben diesen transzellulären Transportmechanismen für überwiegend hydrophobe Substanzen bzw. Makromoleküle existiert der parazelluläre Transport niedermolekularer, hydrophiler Substan-

⁴⁹ Hashimoto, K. et al., 1993, Hidalgo, I. et al., 1989, Pinto, M. et al., 1983, Briske-Anderson, M. et al., 1997, Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000

⁵⁰ Pinto, M. et al., 1983

⁵¹ Hashimoto, K. et al., 1993

⁵² Briske-Anderson, M. et al., 1997

⁵³ Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000

⁵⁴ Herrera-Ruiz, D. et al., 2001

⁵⁵ Knütter, I. et al., 2001

⁵⁶ Daniel, H. 1997

⁵⁷ Tamura K. et al., 1996

⁵⁸ Satake, M. et al., 2002

⁵⁹ Groneberg, D. et al., 2001, Knütter, I. et al., 2001

⁶⁰ Heymann, M. et al., 1990

⁶¹ Swaan, P. W., 1998, Shen, W.-Ch. et al., 1992

zen (s. 2.2.3.3). Dieser Transport findet durch die Poren von *tight junctions* statt, deren Öffnung durch chemische Substanzen modulierbar ist, u. a. durch Cytochalasin D und Palmitoyl-DL-Carnitin⁶².

In der lebensmittelwissenschaftlichen Forschung wurde für folgende bioaktive Peptide (*in vitro*) ein Transport durch intakte Caco-2 Monolayer nachgewiesen (s. Tabelle 2-29): Bradykinin (Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), Ovokinin (Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu)⁶³, Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg⁶⁴, β -Casomorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly), Gly-Gly-Tyr-Arg⁶³, Ile-Lys-Trp, Ile-Lys-Pro und Val-Pro-Pro⁶⁵. Außerdem wurden nachgewiesen, dass das hydrophobe Tripeptid Val-Pro-Pro einerseits PepT1-vermittelt und andererseits parazellulär transportiert wurde⁶⁵.

5.1.2 Polymorphkernige Leukozyten

Polymorphkernige Leukozyten (PML) sind neutrophile, segmentkernige Granulozyten. Diese Zellen der unspezifischen Immunabwehr (s. 2.3) werden im roten Knochenmark gebildet, zirkulieren im Blut und in der Lymphe und sind zur gerichteten Migration fähig. PML verlassen dabei die Gefäße, passieren entzündetes Gewebe (u. a. das Zahnfleisch bei Parodontitis, Gingivitis), gelangen an die Epitheloberfläche und in die Mundhöhle bzw. in den Speichel. Zunächst wurde postuliert, dass die Anzahl der isolierbaren PML mit der Anzahl von Entzündungsherden in der Mundhöhle eines ansonsten gesunden Probanden korreliert⁶⁶. Diese Annahme wurde später durch ASHKENAZI UND DENNISON⁶⁷ korrigiert, durch den Nachweis von PML im Speichel, unabhängig vom Auftreten einer Entzündung in der Mundhöhle. Dies bedingt allerdings, dass die Gesamtzellzahl der jeweiligen Primärkulturen vor der Isolierung aus der Mundhöhle unterschiedlicher Probanden nicht abschätzbar ist⁶⁸.

Die Methoden zur Isolierung von PML aus der Mundhöhle wurden erstmals in der zahnmedizinischen Forschung eingesetzt (2.4.3.2) und durch HARTMANN ET AL.⁶⁹ an zellchemische Methoden der Lebensmittelforschung adaptiert⁶⁹. Diese Methode zur Isolierung der PML wurde auch in dieser Arbeit eingesetzt: Die Expektorate eines gesunden Probanden wurden gewaschen, filtriert und nachfolgend einer Magnetische Antikörperzellseparierung (MACS) unterzogen, wodurch reine Zellkulturen (99 % PML) gewonnen wurden.

⁶² Gasbarrini, G. & Montalto, M., 1999, Matter, K. & Balda, S., 2003, Stein, J. & Krotta, G., 1997, Okumu, et al., 1997

⁶³ Shimizu, M. et al., 1997

⁶⁴ Vermeirssen, V. et al., 2002

⁶⁵ Satake, M. et al., 2002

⁶⁶ Klinkhamer, J. M., 1968 a, b, Adams, D. H., Shaw, S., 1994

⁶⁷ Ashkenazi, M., Dennison, D. K., 1989

⁶⁸ Tsuda, I. et al., 1997

⁶⁹ Hartmann, R. et al., 2000

PML sind zur Zellpolarisation, Chemotaxis, Zelladhäsion und Agglutination fähig sowie zur Phagozytose. PML generieren verschiedene aktive Sauerstoffspezies (u. a. Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale) sowie Nitridoxid⁷⁰.

5.2 Zellchemische Methoden zur Identifizierung potenziell zytotoxischer Substanzen und zur Charakterisierung bioaktiver Substanzen

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Zielsetzung, die Wirkung von Peptiden und Proteinhydrolysaten auf Humanzellen (s. 5.1) zu untersuchen, erforderte die Auswahl geeigneter zellchemischer Methoden (s. 2.4.2) zum Nachweis potenziell zytotoxischer Peptide und zur Charakterisierung *in vitro* bioaktiver Peptide.

Potenziell zytotoxische Substanzen zeigen unerwünschte Effekte auf die Viabilität gesunder Zellen, die zum Zelltod führen, unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus (Apoptose oder Nekrose)⁷¹. Bioaktive Substanzen hingegen werden definiert als originäre sowie bei der Lebensmittelherstellung freigesetzte oder gebildete Komponenten des verzehrfertigen Lebensmittels, die – über eine mögliche nutritive Bedeutung hinaus – regulative Wirkungen im menschlichen Organismus entfalten⁷².

Gesunde (viable) Zellen sind zur Aufrechterhaltung ihres physiologischen Metabolismus fähig, wodurch Zellproliferation, -wachstum und –differenzierung realisiert werden. Eine zytotoxische Substanz bewirkt den Zelltod nach ihrem Einsatz in physiologisch relevanten Konzentrationen bzw. nach einer entsprechenden Zellinkubationsdauer (4 bis 24 h). Diese Wirkung tritt unabhängig vom Zelltyp (Humanzellen: u. a. Caco-2 Zellen, HepG-2, HL-60 Zellen, Jurkat Zellen, RPMI-2650)⁷³ bzw. zugrunde liegenden Mechanismus (Apoptose bis Nekrose)⁷⁴ auf und ist mit den verschiedensten zellchemischen Methoden (u. a. Tests unter Einsatz von Tetrazoliumsalzen (u. a. WST-1), Neutralrot-, Trypanblau-Färbung, Zellzählung)⁷⁵ entsprechend der europäischen Norm 30993-5 (DIN ISO 30993-5)⁷⁶ nachweisbar.

Der WST-1 Test war innerhalb dieser Arbeit ein wichtiges Testsystem zur Identifizierung von Peptiden mit potenziell zytotoxischer Wirkung auf proliferierende (entartete) bzw. differenzierte Caco-2 Zellen (Enterozyten-ähnliche Zellen) und PML (u. a. Screening, s. 4.1.2., 4.1.5).

⁷⁰Yamamoto, M. et al., 1991, Eisuke, F. S. et al., 1996

⁷¹Hartmann, R. & Meisel, H., 2000

⁷²Meisel, M., 2001

⁷³v. Berridge, M., 1996, Francoer, A., 1997, Boehringer Mannheim, 1998,

⁷⁴Hartmann, R. & Meisel, H., 2000

⁷⁵Babich, H. et al., 1991, Martin, A. & Clynes, M., 1991, Kaiser, Th., 1999, v. Berridge, M.; Tan, A. S., 2000

⁷⁶DIN EN 30993-5, 1994

Außerdem wurden für diese Zwecke die Neutralrot-Färbung und der BrdU-Test eingesetzt, zwei weitere Methoden, die sich zur Untersuchung einer Testsubstanzwirkung unabhängig vom eingesetzten Zelltyp eignen. Weiterhin wurden die Bestimmung der DPP IV-Aktivität und Messung des TEER u. a. zur Überprüfung einer potenziell zytotoxischen Testsubstanzwirkung auf differenzierte Caco-2 Zellen durchgeführt. Zum Nachweis einer potenziell antikanzerogenen Wirkung wurde der Cell Death ELISA^{PLUS} Test eingesetzt.

WST-1 Test: Bestimmung der extrazellulären metabolischen Zellaktivität

Der WST-1 Test ist eine durch die FDA validierten Methode zur Bestimmung von Zytotoxizität und zeichnet sich durch eine einfache und schnelle Durchführbarkeit sowie eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus⁷⁷. Weitere Vorteile des Tests sind: Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen innerhalb kurzer Zeit zum dunkelroten, wasserlöslichen Formazan reduziert, welches photometrisch detektierbar ist. Außerdem wirkt dieses Tetrazoliumsalz selbst nicht zytotoxisch, so dass wiederholte Messungen an einer Kultur in Abständen von Stunden bis Wochen möglich sind⁷⁸.

Der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings noch nicht genau bekannt. VON BERRIDGE UND TAN⁷⁹ wiesen in Studien mit 15 verschiedenen Zelltypen nach, dass die Substanz WST-1 die Zellmembranen nicht permeiert, sondern durch transmembrane Enzymsysteme (Oxidoreduktasen) reduziert wird⁷⁹. In den Versuchen von WANG ET AL.⁸⁰ wurde nachgewiesen, dass die wirksame Konzentration (IC₅₀) von 16 verschiedenen, zytotoxischen Referenzsubstanzen in unterschiedlichen Zellsystemen vergleichbar ist. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die wirksame Konzentration in nicht metabolisierenden Zellen höher ist als in metabolisierenden Zellen⁸⁰.

In den eigenen Untersuchungen führte der WST-1 Test nach 4, 24 h Inkubation der Humanzellen mit Lebensmitteln (Milchproteinfraktionen bzw. -präparaten) zu falsch-positiven Ergebnissen (s. 5.3.1). Demnach war dieser Test (*in vitro*) sensibler als es für das Humansystem (*in vivo*) zu erwarten ist. Aufgrund dessen wurde zur Beurteilung der Wirkung der Milchproteinhydrolysate bzw. -permeate die der Milchproteinfraktionen (Substrate) durch Berechnung des Relativen-Zytotoxizitäts-Indexes $[AI_{WST-1}(\text{Hydrolysat})/AI_{WST-1}(\text{Substrat})]$ herangezogen. Nachteilig ist bei dieser Vorgehensweise, dass eine solche Bezugsgröße nicht für jede Testsubstanz (z. B. für die synthetischen Peptide) existiert.

Nach Berücksichtigung des RZI₅₀ wurden Hydrolysat-Permeate (aus Milchprotein) identifiziert, die demnach auf Caco-2 Zellen potenziell zytotoxisch wirkten (s. Tabellen 4-22). Diese Wirkung wurde jedoch durch Messung des TEER bzw. Bestimmung der DPP IV-Aktivität

⁷⁷Boehringer Mannheim, 1998, Wang, K. et al., 2002

⁷⁸Boehringer Mannheim, 1998

⁷⁹v. Berridge, M.; Tan, A. S., 2000

⁸⁰Wang, K. et al., 2000

nicht bestätigt (s. 4.1.3, s. S. 251). Aufgrund dessen können die Ergebnisse des WST-1 Tests nicht als ein Hinweis auf ein zytotoxisches Potenzial dieser Hydrolysat-Permeate gewertet werden.

Neutralrot-Färbung: Bestimmung der intrazellulären metabolischen Aktivität

Der Neutralrot-Färbung ist eine weitere, validierte Referenzmethode für Zytotoxizitätsuntersuchungen⁸¹. Der Farbstoff Neutralrot permeiert Membranen viabler Zellen, akkumuliert in Lysosomen, wird fixiert und durch Zell-Lyse gezielt freigesetzt und nachfolgend photometrisch detektiert. Die Farbintensität korreliert direkt mit der Zellzahl.

Dieser Test wurde als Alternative zum WST-1 Test innerhalb dieser Arbeit im Labor etabliert. Da mit beiden Testsystemen vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden, u. a. nach Einsatz der Milchproteinpräparate (s. 4.1.6), war eine Unterscheidung zwischen falsch-positiven Ergebnissen und dem Hinweis auf ein zytotoxisches Potenzial der Testsubstanzen nicht möglich. Aufgrund dessen wurde zur Identifizierung einer potenziell zytotoxischen Wirkung ausgewählter Testsubstanzen die Bestimmung der DPP IV-Aktivität und die TEER-Messung (bei RT) durchgeführt.

Bestimmung der DPP IV-Aktivität

Die Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (DPP IV) ist ein multifunktionales, ubiquitär vorkommendes Zelloberflächenenzym (CD 26), welches u. a. in Nieren-, Leber- Immun- und Endothelzellen (z. B. Caco-2 Zellen) nachweisbar ist⁸². Die Expression dieses Enzyms wird durch prolinhaltige Peptide (Kollagen, α -Casein, Gliadin) stimuliert⁸³. Die DPP IV weist eine breite Substratspezifität auf⁸⁴ und spaltet N-terminale Dipeptide von Oligopeptiden ab (X-Pro, XAla, X-Lys; s. Tabelle 2-23). Dieses Enzym weist keine Dipeptidase- bzw. Aminopeptidase-Aktivität auf. Aufgrund dessen steht eine Vielzahl an Substraten zum Nachweis der DPP IV-Aktivität zur Verfügung: u. a. Ala-Pro-p-Nitroanilid, welches durch die DPP IV in das photometrisch nachweisbare, gelb gefärbte p-Nitroanilin und Ala-Pro gespalten wird (s. 3.7.2).

Die Methode zur Bestimmung der DPP IV-Aktivität wurde erstmals zur Untersuchung eines zytotoxischen Potenzials bioaktiver Peptide im Humanzellkulturversuch eingesetzt. Als Grundlage wurde das Protokoll von SANZ UND TOLDRÁ⁸⁵ zum Nachweis der DPP IV-Aktivität in *Lactobacillus sakei* herangezogen⁸⁵ und nachfolgend für die eigene Fragestellung optimiert. Dabei zeigte sich, dass die DPP IV-Aktivität in Abhängigkeit von der Dauer (d_0 – d_{21}) der Caco-2 Zellkultivierung unter Standardbedingungen anstieg bzw. mit der Zelldifferenzierung zunahm. Außerdem nahm der Substratumsatz differenzierter Caco-2 Zellen (an d_{15}) Zeit- und

⁸¹ Babich, H. & Borenfreund, E., 1990

⁸² Abbott, C. A., 1999; 2000

⁸³ Erickson, R. H. et al., 1999

⁸⁴ Hildebrandt, M. et al., 2000

⁸⁵ Sanz, Y. & Toldrá F., 2001

Konzentrations-abhängig zu. Die Methodendurchführung erwies sich als einfach, es war ein hoher Probendurchsatz in kurzer Zeit möglich (s. 3.7.2).

Die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen wurde durch die untersuchten Lebensmittel (Milchproteinfraktionen, –präparaten) bzw. Hydrolysat-Permeate (aus Milchprotein) und ausgewählte Dipeptide im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle moderat moduliert. Es wurden $AI_{DPP\ IV}$ zwischen 0,8 und 1,6 berechnet (s. Abbildungen 4-12, 4-21, 4-22, 4-30). Demnach wiesen diese Testsubstanzen kein zytotoxisches Potenzial auf differenzierte Caco-2 Zellen auf. Im Vergleich hierzu wurden nach 4, 24 h Zellinkubation (d_{14}) mit 1 mmol/L des modifizierten Ribonucleosids N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado: Positiv-Kontrolle) $AI_{DPP\ IV}$ zwischen 0,4 und 0,1 berechnet. Aufgrund dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass sich diese Methode zur schnellen Identifizierung potenziell zytotoxischer Substanzen eignet.

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) von Caco-2 Kulturen

Die Höhe des TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$) wird von der Anzahl und Struktur der *tight junctions* determiniert: bei arithmetischer Zunahme von *tight junctions*-Strängen steigt der parazelluläre Widerstand logarithmisch an⁸⁶. Infolge dessen korreliert der TEER mit der parazellulären Permeabilität von Caco-2 Monolayern (s. 5.1.1).

Die TEER-Messung kann mit unterschiedlichen Methoden erfolgen, u. a. durch Einsatz von Membran-Insert-Kits zur Kultivierung von Caco-2 Zellen und des Messgeräts Millicell ERS. Diese nicht-invasive Methode verhindert unerwünschte molekulare Veränderungen und ermöglicht Verlaufsuntersuchungen über lange Testzeiträume (bis 30 Tage), wobei die in unterschiedlichen Versuchsphasen variierende Stärke des Effektes differenziert erfassbar ist. In den eigenen Untersuchungen wurde die TEER-Messung zur Charakterisierung bioaktiver Peptide (s. 5.3) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Überprüfung der Integrität von Caco-2 Monolayern wurde das Standardprotokoll an die Erfordernisse der Transportstudie angepasst: Die TEER-Messungen wurden bei $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ durchgeführt (s. 3.7.3). Im Handel ist zur Durchführung von Screening-Tests eine automatisierte Variante der TEER-Messung erhältlich, unter Einsatz von Membran-Insert-Kits für 96-Kavitäten-MTP⁸⁷.

Es wurden methodische Einflüsse auf die Höhe des TEER identifiziert, die im Zusammenhang mit der Caco-2 Zellkultivierung standen und dort beschrieben wurden (s. 5.1.1). Der TEER (RT) differenzierter Caco-2 Zellen wurde durch die in den Zytotoxizitätsstudien untersuchten Lebensmittel (Milchproteinfraktionen, –präparate), die Hydrolysat-Permeate (aus Milchprotein) und ausgewählten Dipeptide nach 4, 24 h Inkubation im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle moderat moduliert: Es wurden WI_{TEER} zwischen 0,7 und 1,6 berechnet (s. Abbildungen 4-10, 4-11, 4-21, 4-22, 4-29). Gleichzeitig wurden unter dem

⁸⁶ Madara, J. L., 1987

⁸⁷ Produktinformationen der Fa. Millipore

Umkehrmikroskop intakte Caco-2 Monolayer beobachtet. Demnach wiesen diese Testsubstanzen kein zytotoxisches Potenzial auf differenzierte Caco-2 Zellen auf.

Nach Inkubation differenzierter Caco-2 Monolayer mit rekonstituierter Magermilch (3 und 5 mg Protein/mL) wurden WI_{TEER} kleiner 0,5 ermittelt (s. Abbildung 4-29 B). Eine gleichzeitige Beobachtung der Caco-2 Zellen (Monolayer) unter dem Mikroskop war aufgrund der trüben Testsubstanzlösungen nicht möglich. Deshalb ist die Unterscheidung zwischen einem zytotoxischen Potenzial oder einer zytochemisch nicht relevanten Hemmung der Zellaktivität (*tight junctions* „Dichtigkeit“) in diesem Falle nicht möglich.

Durch Messung des TEER wurden zytotoxische Wirkungen nach 4 (bzw. 24) h Inkubation von Caco-2 Monolayern (an d₁₄) mit 0,5 bzw. 1 mmol/L N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin (ip6Ado: Positiv-Kontrolle der Zytotoxizitätsstudie dieser Arbeit) nachgewiesen, durch Berechnung von WI_{TEER} zwischen 0,54 und 0,04 (s. Abbildung 4-7). Die modifizierten Ribonucleoside ip6Ado und m6,2Ado (N6-Dimethyladenosin) sowie Guanosin wirkten in einer Konzentration von 1 mmol/L auf proliferierende Caco-2 Zellen innerhalb von 72 h zytotoxisch⁸⁸.

Es lässt sich schlussfolgern, dass sich die TEER-Messung (RT) zur schnellen Identifizierung potenziell zytotoxischer Substanzen eignet: eine solche Wirkung wurde innerhalb von 72 h nach Inkubation proliferierender Caco-2 Zellen nachgewiesen. Eine längere Testzeit (ca. 10 – 14 Tage) ist dann notwendig, wenn zytotoxische oder trophische Effekte (teil-) differenzierten Caco-2 Zellen untersucht werden sollen, welche die charakteristischen Merkmale reifer Enterozyten zeigen. Die Wirkung stark modulierender bioaktiver Substanzen ist dann allerdings innerhalb von einem Testtag zu erfassen, wie u. a. mit 1 mmol/l ip6Ado nachgewiesen wurde. In weiteren Untersuchungen mit Ribonucleosiden wurde ein gegenüber unbehandelten Caco-2 Zellen (K_N) signifikanter Anstieg des TEER nach 24 h Zellinkubation mit 1 mmol/l m6Ado bzw. m1Guo nachgewiesen⁸⁹.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann außerdem festgestellt werden, dass zur Identifizierung eines zytotoxischen Potenzials auf humane Intestinalzellen (Caco-2) die Untersuchung der Testsubstanzwirkung auf spezifische Differenzierungsmarker besser geeignet ist als die Durchführung des WST-1 Tests (bzw. der Neutralrot-Färbung), dessen Wirkmechanismus noch nicht vollständig bekannt ist. Darüber hinaus stellt der Nachweis intakter Caco-2 Monolayer u. a. durch Messung des TEER eine notwendige Voraussetzung zur Durchführung von Transportstudien dar.

⁸⁸ Hartmann, R. et al., 2000

⁸⁹ Unveröffentlichte Ergebnisse, Pentzien, A. -K., 2000

Detektion von Peptiden in zellchemischen Transportstudien

In dieser Arbeit wurde die RP-HPLC (C-18) Analyse eingesetzt zum Nachweis von Peptiden bzw. aromatischen Aminosäuren, die als Testsubstanzen im Caco-2 Zellkulturversuch (Transportstudie) ins apikale Kompartiment appliziert bzw. durch enzymatische Hydrolyse aus Peptiden freigesetzt wurden. Die Probenentnahme erfolgte vorwiegend aus basolateralen Kompartimenten. Es konnte jeweils nur eine Probe je Kompartiment entnommen werden, aufgrund der zu erwartenden transportierten Peptidmenge von 1 bis 2%⁹⁰. Zusätzlich variierte die Peptid-Transportkapazität unterschiedlicher Caco-2 Monolayer⁹¹, da differenzierte Caco-2 Zellen eine heterogene Merkmalsausprägung aufwiesen⁹². Infolge dessen integrierten SHIMIZU ET AL.⁹¹ Bradykinin als Referenzprotein in ihre Studien⁶³. In den eigenen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass dieses Nonapeptid durch Bürstensaumenzyme teilweise hydrolysiert wurde. Deshalb wurde zum Peptidnachweis zunächst jeweils eine von (mindestens) zwei Proben vor der HPLC-Analyse mit dem jeweiligen Peptid aufgestockt und die Peakflächen gleicher Elutionspositionen miteinander verglichen. Aufgrund der variierenden Transportkapazität unterschiedlicher Caco-2 Monolayer wurden nach Analyse aufgestockter Proben z. T. kleinere Peakflächen ermittelt als erwartet. Deshalb wurden nachfolgend Dipeptid-Verdünnungsreihen analysiert und Kalibrierfunktionen (Software Valoo[®]) berechnet (s. Tabelle 3-23). Diese dienten zur Quantifizierung der durch intakte Caco-2 Monolayer transportierten Dipeptide sowie zur Ermittlung der Nachweisgrenzen (basierend auf DIN 32645⁹³). Außerdem gilt, dass eine Signalhöhe, die um den Faktor 3 über dem Untergrundrauschen liegt, die Nachweisgrenze kennzeichnet. Mit Hilfe der ermittelten Nachweisgrenze und unter Berücksichtigung eines Signal-Rausch-Verhältnisses von 3:1 wurde der Transport von Val-Tyr, Val-Phe und Ala-Trp durch intakte Caco-2 Monolayer nachgewiesen (s. 5.3.2).

Zum Nachweis der heterogenen Peptidgemische der Kollagenhydrolysate existiert keine spezifische Methode. Allerdings enthalten diese Testsubstanzen ca. 11,6 % Hydroxyprolin, welches photometrisch nachweisbar ist. Die eingesetzte Methode ist in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG⁹⁴ enthalten. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 4,7495 µg/mL Hydroxyprolin. Die photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung erfolgt nach einer entsprechenden Probenvorbereitung u. a. durch saure Hydrolyse. Diese Hydrolyse wurde zum Nachweis der freien Aminosäure in den Kollagenhydrolysaten bzw. verschiedenen Proben nicht durchgeführt. Hierbei wurde kein freies Hydroxyprolin detektiert und somit nachgewiesen, dass diese Aminosäure Peptidgebunden in der Probe vorlag. Mit dieser Methode wurde der Transport von allen getesteten Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer nachgewiesen. Die zusätzlich durchgeführte HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) bestätigte den Nachweis des

⁹⁰ Satake, M. et al., 2002

⁹¹ Shimizu, M. et al., 1997

⁹² Eagle, G. et al., 1998, Rousset, M., 1986

⁹³ DIN 32645

⁹⁴ Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG L 06.00 8, September 1980

Transports von Sol D, Sol DA und Collagel BS-GA, nicht jedoch den von Collagel A und Collagel BS, die die höchsten Molekulargewichte aufwiesen (s. 5.3.3).

Einfluss von Bestandteilen der Peptid-Lösungsmittel

Ein Teil der in dieser Arbeit eingesetzten Peptide wurde in DMSO gelöst, welches deshalb in Konzentrationen zwischen 0,1 bis 0,7 mol/L in den Stammlösungen enthalten war (s. Tabellen 3-8, 3-9, s. 4.1.1). 0,01 bis 3,2 mol/L bzw. 1,9 bis 3,2 mol/L DMSO hemmte im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen und PML bzw. differenziert Caco-2 Zellen. Nach 96 bis 168 h Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) mit 1,9 bis 3,2 mol/L DMSO wurden WI_{TEER} kleiner 0,5 ermittelt.

In Studien mit B-Lymphozyten sowie differenzierten Caco-2 Zellen wurde ein zytotoxisches Potenzial für DMSO in Konzentrationen von 0,15 mol/L bzw. über 2 % (größer 2,5 mol/L) ermittelt⁹⁵. Demnach reagierten Immunzellen empfindlicher auf DMSO als differenzierte Caco-2 Zellen. Da in den eigenen Untersuchungen beide Zellkulturmodelle eingesetzt wurden und eine Unterscheidung zwischen der DMSO- bzw. Peptidwirkung nicht möglich war, wurden in nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich in PBS lösliche Peptide eingesetzt.

Der HPLC-Analysenpuffer (0,2 und 0,5 mol/L), in dem die Milchproteinhydrolysate (s. Tabelle 3-1, s. 4.1.2) gelöst wurden, wirkte im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle überwiegend hemmend auf die metabolische Aktivität der Humanzellen (AI_{WST-1} zwischen 0,5 und 1,3), wobei die Wirkung des höher konzentrierten Puffers stärker war. Aufgrund dessen wurden die Hydrolysat-Permeate (aus Milchprotein) und deren Substrate (β -Lactoglobulin, WPC 75, Natrium-Caseinat) in 0,2 mol/L Analysenpuffer gelöst vom Projektpartner zur Verfügung gestellt.

⁹⁵ Winkelmeier, P. et al., 1993, Haltner, E. et al., 2001

5.3 Wirkungen von Peptiden und Proteinhydrolysaten auf Humanzellen

Die Untersuchungen der Wirkung von Peptiden und Proteinhydrolysaten auf Humanzellen (Caco-2 Zellen, PML) wurden zur zellchemischen Charakterisierung der Testsubstanzen durchgeführt, insbesondere zur Identifizierung eines zytotoxischen Potenzials und zum Nachweis des Transports intakter Peptide durch das simulierte Dünndarmepithel. Diese zellchemischen Studien waren eine Voraussetzung zur Auswahl der *in vitro* ACE-inhibitorischen Peptide bzw. chondroprotektiven Proteinhydrolysate für Humanstudien, die vom Projektpartner durchgeführt wurden. In Humanstudien ist der Nachweis der *in vivo* Wirkung bioaktiver Substanzen zu erbringen, bevor diese in funktionellen Lebensmitteln integriert werden dürfen bzw. bevor Lebensmittel, die diese Substanzen natürlicherweise enthalten, diesbezüglich beworben werden können. Gleichzeitig ist der Nachweis zu erbringen, dass die bioaktive Substanz ihre Wirkung *in vivo* entfaltet, nach Verzehr des jeweiligen Lebensmittels in ernährungsphysiologisch wünschenswerten Mengen.

5.3.1 Milchproteinfraktionen, -hydrolysate, -permeate und -präparate

Die Wirkung der Milchproteinhydrolysate bzw. deren Ausgangssubstanzen (Milchproteinfraktionen: β -Lactoglobulin, WPC 75, Natrium-Caseinat) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von Humanzellen wurde in zwei Konzentrationen untersucht, so dass ca. 0,1 bzw. 1,0 mg Protein pro mL Testlösung enthalten war (s. 3.5.1, 3.6.2). Die niedrigere Konzentration entsprach in etwa der effektiven ACE-inhibitorischen Konzentration (IC_{50}). In beiden Konzentrationen wirkten die Milchproteinhydrolysate und ihre Substrate überwiegend hemmend auf die extrazelluläre Reduktase-Aktivität der untersuchten Humanzellen; es wurden AI_{WST-1} zwischen 0,1 und 1,5 ermittelt. Da die Milchproteinfraktionen Lebensmittel sind, von denen keine unerwünschten Wirkungen auf den menschlichen Organismus (*in vivo*) bekannt sind, stellte sich die Frage nach der biologischen Relevanz dieser *in vitro* Reaktionen. Infolge dessen wurde als Grenze zwischen zytochemisch irrelevanten, hemmenden Effekten und einem zytotoxischen Potenzial der AI_{50} ($AI_{WST-1} = 0,5$) definiert. Demnach wirkten β -Lactoglobulin und WPC 75 auf Caco-2 Zellen bzw. PML sowie Natrium-Caseinat auf PML potenziell zytotoxisch (s. Tabellen 4-1 und 4-2). Außerdem wurden $AI_{WST-1} \leq 0,5$ für die Mehrzahl der untersuchten Milchproteinhydrolysate berechnet (s. Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Anzahl der Milchproteinhydrolysate mit potenziell zytotoxischer Wirkung auf Humanzellen

Zusammenfassung der Ergebnisse der Tabellen A-34 bis A-51.

Die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von Humanzellen wurden untersucht nach 72 h Inkubation mit Milchproteinhydrolysaten und -fraktionen, die z. T. einer simulierten gastrointestinalen Verdauung (mit / ohne sGIV) unterzogen wurden. Diese Testsubstanzen wurden in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen (VS) eingesetzt (s. Tabelle 3-12), die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein / mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen. Die Proteingehalte wurden in Tabellen 3-2 bis 3-4 aufgeführt.

Abkürzungen: sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, S: Substrate: β -Lg.: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75, Na-CN: Natrium-Caseinat. Enzym: Bezeichnung des Enzyms, welches die eingesetzten Hydrolysate (H) produzierte.

Humanzellen			Proliferierende Caco-2				Differenzierte Caco-2				PML			
sGIV			Mit		Ohne		Mit		Ohne		Mit		Ohne	
Verdünnungsstufe			2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1
S	Enzym	H [n]												
	Alca	8	0	8	0	8	0	3	0	3	0	0	0	0
b-Lg.	Co 7089	6	0	4	0	6	0	2	0	4	0	0	0	0
	Protamex	6	0	6	1	6	0	3	0	3	0	0	0	0
	Tryp	7	0	7	0	7	0	0	0	1	0	0	0	0
	Alca	8	0	6	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0
WPC 75	Co PNL	6	0	4	0	5	1	5	0	6	0	0	0	0
	Co PP	9	0	7	0	6	0	6	0	3	0	0	0	0
	Tryp	7	0	4	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Na-CN	Co 7089	6	0	5	0	2	1	3	0	0	0	0	4	2
	Co L 10	4	0	2	0	4	2	1	0	1	0	0	1	0
	Co PNL	6	0	1	0	4	0	1	0	3	1	0	0	0
	Protamex	6	1	2	0	5	0	1	0	1	0	0	0	0
	S	79	1	56	1	55	4	27	0	27	1	0	5	2
			Anzahl der Milchproteinhydrolysate mit $AI_{WST-1} \leq 0,5$.											

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde nachfolgend die Wirkung der Milchproteinpräparate Lactalbumin 70 und Ultralact 35 auf Humanzellen untersucht und zwar durch Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung), der DPP IV-Aktivität sowie Messung des TEER. In diesen Versuchen wurde die Wirkung der Testsubstanzen Konzentrations-abhängig untersucht sowie nach 4 und 24 h Inkubation der Humanzellen, wodurch die Test- den physiologischen Bedingungen angepasst wurden. Auch in diesem Falle war der Nachweis eines zytotoxischen Potenzials der Testsubstanzen nicht zu erwarten, da diese handelsübliche Lebensmittelinhaltsstoffe (u. a. von Back-, Fleischwaren) sind, von denen keine unerwünschten ernährungsphysiologischen (*in vivo*) Wirkungen bekannt sind.

Lactalbumin 70 und Ultralact 35 wirkten Konzentrations-abhängig überwiegend hemmend auf die metabolische Aktivität der Humanzellen: AI_{WST-1} bzw. $AI_{Neutralrot}$ kleiner 0,5 wurden nach (4 bis) 24 h Inkubation der Humanzellen mit der jeweils höchsten Protein-Konzentration ermittelt. Die Ausprägung der Differenzierungsmerkmale von Caco-2 Zellen wurde hingegen nur wenig beeinflusst. Die Ergebnisse, die 4 h nach Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) durch Messung des TEER, Bestimmung der DPP IV-Aktivität und mikroskopische Beobachtung ermittelt wurden, waren vergleichbar zur jeweiligen Negativ-Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigten, dass der WST-1 Test ein sehr sensibles *in vitro* Testsystem darstellt, welches falsch-positive Ergebnisse hinsichtlich der zytotoxischen Relevanz produziert und offenbar sensitiver ist als das Humansystem (*in vivo*). Der Nachweis der Inhibierung der extrazellulären Reduktase-Aktivität ist demnach lediglich ein Hinweis auf ein mögliches zytotoxisches Potenzial. Deshalb wurden zur Beurteilung der Wirkung der Hydrolysate auf Humanzellen die Ergebnisse der Milchproteinfraktionen (Substrate) herangezogen, indem die Berechnung des Relativen-Zytotoxizitäts-Indexes (RZI) $[A_{\text{WST-1}}(\text{Hydrolysat})/A_{\text{WST-1}}(\text{Substrat})]$ eingeführt wurde. Analog dem vorherigen Vorgehen wurde festgelegt, dass ein RZI_{50} ($\text{RZI} = 0,5$) die Grenze zwischen zytochemisch irrelevanten, hemmenden Effekten und einem zytotoxischen Potenzial markiert.

Eine potenziell zytotoxische Wirkung ($\text{RZI} \leq 0,5$) auf Humanzellen wurde nachgewiesen mit (s. Tabelle 4-21):

- 5 von 54 Hydrolysaten aus β -Lactoglobulin auf proliferierende bzw. differenzierte Caco-2 Zellen (Monolayer). Diese Hydrolysate wurden durch Alcalase, Corolase 7089 und TPCK-Trypsin produziert.
- 5 von 60 Hydrolysaten aus WPC 75 auf proliferierende Caco-2 Zellen. Diese Hydrolysate wurden durch Corolase PNL, Corolase PP und TPCK-Trypsin produziert.
- 24 von 44 Hydrolysaten aus Natrium-Caseinat auf proliferierende bzw. differenzierte Caco-2 Zellen (Monolayer) und PML. Diese Hydrolysate wurden durch Corolase 7089, Corolase L 10, Corolase PNL und Protamex produziert.

Von den 124 *in vitro* ACE-inhibitorischen Milchproteinhydrolysate, die kein zytotoxisches Potenzial auf Humanzellen ($\text{RZI} \geq 0,5$) aufwiesen wurden drei als Testsubstanzen für weitere zellchemische Untersuchungen ausgewählt. Diese Hydrolysate wiesen zusätzlich erwünschte physikochemische Eigenschaften auf und wurden von Projektpartnern im Technikum- (versus Labor-) Maßstab hergestellt, ultrafiltriert und als gefriergetrocknete Permeate zur Verfügung gestellt. Die Milchproteinfraktionen (Substrate) sowie das WPC 75-Hydrolysat lagen ebenfalls gefriergetrocknet vor. Diese Testsubstanzen wurden in den Konzentrationen eingesetzt, die für nachfolgende Humanstudien geplant waren: Die Probanden sollten eine tägliche Dosis von 200 mg pro Kilogramm Körpergewicht (in 250 mL) oral zuführen. Dementsprechend wurden die Humanzellen mit 1 – 8 % (w/v) dieser Testsubstanzen inkubiert. Aufgrund einer verminderten Löslichkeit von WPC 75 und dessen Hydrolysats in PBS waren dies trübe Testlösungen, welche die photometrische Messung des WST-1 Tests beeinflussten und deshalb in der Ergebnisberechnung nicht berücksichtigt wurden.

Die Hydrolysat-Permeate sowie die Milchproteinfraktionen (Substrate) wirkten im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle auf die extrazelluläre Reduktase-Aktivität (WST-1 Test) proliferierender sowie differenzierter Caco-2 Zellen und PML nach 4 bis 72 h Inkubation vorwiegend hemmend. Die Hydrolysat-Permeate zeigten dabei eine stärkere Wirkung als die Milchproteinfraktionen, so dass überwiegend RZI kleiner 0,5 berechnet wurden. Allerdings

wurden höhere RZI-Werte (RZI: 0,6 bis 1,8) nach 4 h Inkubation von PML berechnet. Des Weiteren stimulierten bzw. hemmten die Milchproteinfraktionen bzw. deren Hydrolysat-Permeate die Proliferation von PML (BrdU-Test) im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle. Der TEER bzw. die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) wurde moderat moduliert, wobei vorwiegend $WI_{TEER} \leq 1$ bzw. $AI_{DPPIV} \geq 1$ berechnet wurden. Gleichzeitig wurden intakte Monolayer unter dem Umkehrmikroskop beobachtet.

Die Hydrolysat-Permeate (aus Milchprotein) und deren Ausgangssubstanzen zeigten eine stärker hemmende Wirkung auf die Aktivität der extrazellulären Reduktasen als auf die Ausbildung der Differenzierungsmerkmale von Caco-2 Zellen (Monolayern), untersucht durch Messung des TEER (*tight junctions* Funktion) bzw. Bestimmung der DPP IV-Aktivität. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass der WST-1 Test zu falsch-positiven Ergebnissen führte. Deshalb wurde diesen Hydrolysat-Permeaten kein zytotoxisches Potenzial zugeschrieben, so dass diese in Humanstudien als Testsubstanzen einsetzbar sind.

Im Screening der Zytotoxizitätsstudie wurden 17 Milchproteinhydrolysate identifiziert, die auf proliferierende Caco-2 Zellen (entartete Zellen) potenziell zytotoxisch wirkten, nicht jedoch auf differenzierter Caco-2 Zellen und nicht-maligne PML (s. 5.1.2). Nachfolgend wurde ein Apoptose-induzierendes Hydrolysat identifiziert. Dieses Hydrolysat entstand nach Einsatz von Corolase 7089 aus Natrium-Caseinat und wurde nachfolgend einer simulierten gastrointestinalen Verdauung unterzogen. Diese zytotoxischen Effekte auf proliferierende Caco-2 Zellen wiesen auf eine potenziell antikanzerogene Wirkung hin.

5.3.2 Synthetische Peptide

Zunächst wurde die Wirkung synthetischer, *in vitro* ACE-inhibitorischer Peptide (Screening) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von Humanzellen nach 72 h Inkubation sowie auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen nach 48 bis 96 h Inkubation untersucht. Die Peptide wurden in Konzentrationen von 0,01 und 1,0 mmol/L eingesetzt, wobei die niedrigere Konzentration in etwa der effektiven ACE-inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) entsprach. Die metabolische Zellaktivität wurde Konzentrations-abhängig moduliert: $AI_{WST-1} \leq 0,5$ wurden ausschließlich nach Einsatz von 1 mmol/L Peptid ermittelt (s. Tabelle 4-26). Diese Ergebnisse sind jedoch nur ein Hinweis auf ein mögliches zytotoxisches Potenzial der synthetischen Peptide (1 mmol/L, s. 5.3.1) und wurden durch Messung des TEER und nach Berechnung von WI_{TEER} zwischen 0,93 bis 1,34 (s. Tabelle 4-25) nicht bestätigt: Die untersuchten Peptide bewirkten in beiden Konzentrationen im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle differenzierter Caco-2 Zellen überwiegend eine moderate Erhöhung des TEER.

In weiteren zellchemischen Untersuchungen wurden die Wirkungen ausgewählter Peptide auf Humanzellen Konzentrations- und Zeit-abhängig untersucht.

Heptapeptid Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg

Das *in vitro*-ACE-inhibitorische Heptapeptid Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (s. Tabelle 5-4) wurde von MULLALLY ET AL.⁹⁶ aus β -Lactoglobulin isoliert und in den eigenen Untersuchungen zellchemisch charakterisiert. Dieses Peptid zeigte in einer Konzentration von 0,01 mmol/L keine potenziell zytotoxische Wirkung auf proliferierende bzw. differenzierte Caco-2 Zellen sowie PML (s. Tabelle 4-29). 1 mmol/L Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg hemmte die metabolische Aktivität (WST-1 Test) der Humanzellen im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle signifikant, der TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) wurde hingegen nicht moduliert. VERMEIRSEN ET AL.⁹⁷ wiesen den Transport des Heptapeptids durch intakte Caco-2 Monolayer nach⁹⁷. In Studien (*in vitro*) von WALSH ET AL.⁹⁸ wurde dieses Peptid durch Enzyme des gastrointestinalen Verdauungstraktes bzw. des Humanblutserums (37 °C) gespalten (s. Tabelle 5-4). Im Serum wurde eine Reduzierung der ACE-inhibitorischen Aktivität von 77,1 % auf 20,5 % innerhalb von 60 min nachgewiesen. Das Hauptabbauprodukt war Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg, welches keine ACE-inhibitorische Wirkung aufwies. In Humanstudien mit normotensiven Probanden wurden keine modulierenden Effekte auf den Blutdruck, die Herzrate bzw. die ACE-Aktivität im Blutserum nachgewiesen. Außerdem war das Heptapeptid im Blut dieser Probanden durch einen spezifischen, kompetitiven ELISA-Test nicht nachweisbar. Somit war die *in vitro* ACE-inhibitorische Wirkung dieses Peptids *in vivo* nicht nachweisbar⁹⁸.

Tabelle 5-4: Ausgewählte ACE-inhibitorische Peptide aus Milchprotein

[#]Der Peptidnachweis erfolgte durch RP-HPLC (C-18), s. 4.2.3. Abkürzung: Der Peptidtransport wurde nicht untersucht (n. u.), war mit dieser Methode nicht nachweisbar (n. n.).

Potenzielles Vorläuferprotein	ACE-inhibitorisch wirkendes Peptid ⁹⁹	IC ₅₀ [µmol/L] ⁹⁹	Hydrolyseresistenz im Humanblutserum ⁹⁹	Transport durch intakte Caco-2 Monolayer [#]
β -Lactoglobulin	Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg	43,0	vollständig	Ja ⁹⁷
α_{s1} -, β -Casein, β -Lactoglobulin	Ala-Pro	36,7	vollständig	n. u.
α_{s1} -Casein	Ala-Trp	6,5	partiell	Ja
β -Lactoglobulin	Lys-Phe	112,7	?	n. n.
α_{s1} -, α_{s2} -Casein, α -, β -Lactoglobulin	Val-Phe	51,0	vollständig	Ja
β -Casein, β -Lactoglobulin	Val-Tyr	12,2	vollständig	Ja

⁹⁶ Mullally, M. M. et al., 1997

⁹⁷ Vermeirssen, V. et al., 2002

⁹⁸ Walsh, D. et al., 2004

⁹⁹ Unveröffentlichte Ergebnisse, Meisel, H., 2003

Dipeptide: Ala-Pro, Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Phe, Val-Tyr sowie Gly-Pro

Die *in vitro* ACE-inhibitorischen Dipeptide Ala-Pro, Ala-Trp, Lys-Phe, Val-Phe und Val-Tyr reduzierten Konzentrations-abhängig (0,5 - 0,75 bis 1 mmol/L) die metabolische Aktivität (WST-1 Test, Neutralrot-Färbung) der untersuchten Humanzellen im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle. Es wurden jedoch keine zytochemisch relevanten hemmenden Effekte nach 4, 24 h Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen mit diesen Dipeptiden auf die Aktivität der DPP IV und keine TEER-modulierenden Effekte ermittelt. Demnach wiesen diese Dipeptide kein zytotoxisches Potenzial auf Humanzellen auf und würden sich deshalb zum Einsatz in geplanten Humanstudien eignen.

Da diese Dipeptide in der Aminosäuresequenz der Milchproteinfraktionen enthalten sind (s. Tabelle 5-4) besteht die Möglichkeit ihrer Freisetzung während der gastrointestinalen Verdauung bzw. der Lebensmittelverarbeitung sowie nach Nahrungsaufnahme des Peptid-Transports ins Blutserum zur Entfaltung der bioaktiven Wirkung *in vivo*, der ACE-inhibitorischen bzw. hypotensiven Wirkung. Letztere Wirkung wurde für Val-Tyr nachgewiesen¹⁰⁰ (s. Tabelle 2-13). In dieser Arbeit wurde erstmals der Transport dieser Dipeptide durch intakte Caco-2 Monolayer untersucht und für Ala-Trp, Val-Phe und Val-Tyr erstmals nachgewiesen (s. Abbildung 4-48, Tabelle 4-34). Es wurden jeweils 0,63 / 7,50 und 13,43 µg/mL Peptid ins basolaterale Kompartiment transportiert. Dies entsprach 0,10 / 1,23 und 2,08 % des auf den jeweiligen Monolayer applizierten Peptids. Besonders bemerkenswert ist, dass Studien mit Enzymen des Verdauungstraktes bzw. Humanblutserums (*in vitro*) ergaben, dass diese synthetischen Peptide vollständig bzw. partiell Hydrolyse-resistent sind (s. Tabelle 5-4)¹⁰¹.

Zusätzlich wurde die Wirkung von 0,01 bis 10,00 mmol/L Gly-Pro auf differenzierte Caco-2 Zellen durch Messung des TEER untersucht. Gly-Pro modulierte den TEER im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nicht bzw. erhöhte diese (WI_{TEER} zwischen 1,0 bis 1,4). Auch dieses Dipeptid ist in der Aminosäuresequenz von Milchprotein enthalten (s. Tabelle 2-8), erwies sich als Hydrolyse-resistent gegenüber Enzymen der Bürstensaummembran¹⁰² und wird PepT1-vermittelt in Caco-2 Zellen aufgenommen¹⁰³. Aufgrund dessen eignet sich Gly-Pro als Kompetitiver Inhibitor dieses Transporters, zur Untersuchung des Transportmechanismus anderer Dipeptide (s. 5.1.1).

¹⁰⁰ Kawasaki, T. et al., 2000

¹⁰¹ Unveröffentlichte Ergebnisse, Meisel, H., 2003

¹⁰² Gardner, M. L. G., 1983, Gardner, M. L., 1991, Shimizu, M. et al., 1997

¹⁰³ Knütter, I. et al., 2001

Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)

In den Studien von SHIMIZU ET AL.¹⁰⁴ wurde der Transport von Bradykinin durch Caco-2 Monolayer per Endozytose (Transzytose) nachgewiesen sowie eine Hydrolyse-Resistenz gegenüber Enzymen der Bürstensaummembran¹⁰⁴. Außerdem zeigte sich, dass die Peptidtransportkapazität verschiedener Caco-2 Monolayer variierte. Deshalb wurde dieses Nonapeptid als Referenzpeptid in allen Peptid-Transportstudien dieser Arbeitsgruppe eingesetzt.

Da in den eigenen Transportstudien zunächst ein analoges Vorgehen geplant war, wurde die Wirkung von (200 – 800 µg/mL) Bradykinin auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen untersucht und im Vergleich zur Negativ-Kontrolle keine modulierende Wirkung ermittelt. Außerdem wurde mittels HPLC-Analyse (RP 18) der Transport des Nonapeptids durch intakte Caco-2 Monolayer nachgewiesen. Die oben genannte Hydrolyse-Resistenz gegenüber Bürstensaumenzymen differenzierter Caco-2 Zellen wurde in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht bestätigt, da in den apikal entnommenen Proben das Hexapeptid Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (RP-HPLC (C 18)) identifiziert wurde.

Undecapeptid Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu und Tripeptid Leu-Lys-Pro

Ein Vorläuferpeptid des *in vitro* ACE-inhibitorisch wirkenden Leu-Lys-Pro¹⁰⁵ wurde aus der Aminosäuresequenz des β-Lactoglobulin (f 45-55) eines WPC 75 Hydrolysats (produziert durch Alcalase) isoliert¹⁰⁶. Dieses Hydrolysat zeigte eine *in vitro* ACE-inhibitorische Wirkung, nicht jedoch das Undecapeptid Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu. Dieses wurde außerdem vom Angiotensin-Umwandlungs- (Converting-) Enzym nicht gespalten. Des Weiteren erwies es sich als relativ Hydrolyse-resistent gegenüber Enzymen des Humanblutserums: Nach 60 min wurden ca. 88 % des intakten Undecapeptids detektiert sowie die Abbauprodukte Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu und Leu-Lys-Pro. Das Tripeptid wurde sehr schnell im Serum abgebaut (Halbwertszeit: 5 min)¹⁰⁷. Dennoch konnte in den zellchemischen Studien dieser Arbeit kein Transport des Tri- bzw. Undecapeptids durch intakte Caco-2 Monolayer nachgewiesen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit als Testsubstanzen eingesetzten *in vitro* ACE-inhibitorischen Peptide sind in der Aminosäuresequenz von Milchproteinen enthalten (s. Tabelle 28¹⁰⁸), sind möglicherweise die aktiven Substanzen der ACE-inhibitorisch wirkenden Milchproteinhydrolysate bzw. -permeate (5 kD, s. Tabelle 3-1) und weisen ein hohes Potenzial der Bioverfügbarkeit auf. Dipeptide repräsentieren außerdem die Minimalstruktur ACE-inhibitorischer Peptide (Lacto-, Casokinine, s. 2.1.1.2.1). Es besteht jedoch keine direkte Beziehung zwischen *in vitro* ACE-inhibitorischen Effekten und einer hypotensiven Wirkung. Beispielsweise

¹⁰⁴ Shimizu, M. et al., 1997

¹⁰⁵ Fujita, H. et al., 2001, Fujita, H. et al., 1999

¹⁰⁶ Unveröffentlichte Ergebnisse, Walsh, D., 2003

¹⁰⁷ Unveröffentlichte Ergebnisse, Meisel, H., 2003

¹⁰⁸ Unveröffentlichte Ergebnisse, Meisel, H., 2003

bewirkte das Tetrapeptid Tyr-Gly-Gly-Tyr, für das ein niedriger IC_{50} von 16,2 $\mu\text{mol/L}$ berechnet wurde, nach oraler Zufuhr (100 mg/kg) keine Änderung des systolischen Blutdrucks. Im Gegensatz dazu wurde dieser um 31,5 mmHg reduziert, nach oraler Aufnahme von 1 mg/kg Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln (β -Casein [f169-175]: IC_{50} : 1000 $\mu\text{mol/L}$). Dieses Peptid wurde von Pankreasenzymen (*in vitro*) hydrolysiert zu Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro, einem Peptid mit hoher ACE-inhibitorischer Wirkung. Außerdem wurde im Tierversuch (SHR) eine hypotensive Wirkung nach subkutaner Aufnahme von α -Lactorphin (IC_{50} : 733 $\mu\text{mol/L}$) nachgewiesen. Diese Wirkung wurde durch Naloxon inhibiert, einem Opiatrezeptor-Antagonisten¹⁰⁹.

5.3.3 Kollagenhydrolysate

In verschiedenen Humanstudien wurde gezeigt, dass Gelatine- bzw. Kollagenhydrolysate (insbesondere Sol D) nach oraler Zufuhr eine chondroprotektive Wirkung aufweisen (s. 2.1.2). Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Wirkung ist jedoch noch unklar. OESSER, ET AL.¹¹⁰ untersuchten deshalb die Verteilungswege von Hydroxyprolin aus Gelatine im Tierversuch mit Ratten. Sie schlussfolgerten, dass ein heterogenes Peptidgemisch aus Gelatine resorbiert wurde und sich bevorzugt im Knorpel ansammelt. In weiteren Untersuchungen mit bovinen Chondrozyten wiesen OESSER ET AL. nach, dass extrazellulär vorliegendes hydrolysiertes Kollagen I und II (MG < 10 kD) die intrazelluläre Kollagen-II-Biosynthese stimulierte. Diese Wirkungen waren nach Zellinkubation mit den nativen Kollagenen bzw. mit hydrolysiertem Weizenprotein nicht nachweisbar¹¹⁰.

Die Ergebnisse der Humanstudien und des Tierversuchs waren indirekte Nachweise für den Transport der chondroprotektiven Peptide aus Gelatine- bzw. Kollagenhydrolysaten durch das Dünndarmepithel sowie dafür, dass diese Peptide kein zytotoxisches Potenzial auf Humanzellen aufwiesen. Dies wurde in den eigenen Untersuchungen nach Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen mit den fünf verschiedenen Kollagenhydrolysaten (10 bis 100 mg/mL) durch Messung des TEER bestätigt ($W_{TEER} \geq 1$). Die intakten Caco-2 Monolayer transportierten Peptide aus Sol D, Sol DA, Collagel BS, Collagel BS-GA und Collagel A in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der Kollagenhydrolysate, wie durch photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung eindeutig nachgewiesen wurde. Hierbei wurden Mengen an Kollagen-Hydrolysat zwischen 46,48 und 13,56 μg je Probe ermittelt (P_{T-BL} : s. Tabelle 4-48). Ein Transport von Sol D, Sol DA und Collagel BS-GA durch intakte Caco-2 Monolayer wurde außerdem durch Ausschluss-Chromatographie nachgewiesen (s. Tabelle 4-40). Die transportierte Menge an Collagel BS-GA und Collagel A lag unter der Nachweisgrenze von 3,9859 μg (s. 3.7.5.2), so dass der Transport dieser hochmolekularen Kollagenhydrolysate mittels HPLC nicht eindeutig quantifizierbar war (s. 5.2).

¹⁰⁹ Meisel, M. et al., 2005

¹¹⁰ Oesser, St. et al., 1999, Oesser, St. et al., 2003

Der *in vitro* Transport von Sol D wurde in sechs weiteren, jeweils voneinander unabhängigen Tests genauer untersucht: Es wurde eine Zunahme der durch intakte Caco-2 Monolayer transportierten Sol D-Menge im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle mit ansteigender Konzentration (10 bis 100 mg/mL, s. Tabellen 438, 444) bzw. Inkubationsdauer (15 bis 90 min, s. Tabelle 4-45) sowie nach Zellinkubation mit *tight junctions*-Modulatoren (0,5 µg/mL Cytochalasin D, 0,1 mM Palmitoyl-DL-Carnitin, s. Tabellen 4-41, 4-50, 4-51) nachgewiesen.

In diesen sechs Tests (s. 4.2.4) wurden 28 verschiedene, konfluente Caco-2 Monolayer mit 100 mg/mL Sol D 90 min inkubiert. Nachfolgend wurde in den basolateral entnommenen Proben eine zwischen 2,35 und 20,35 µg variierende Menge an Hydroxyprolin nachgewiesen, die einer Menge an Sol D von 45,54 bis 127,31 µg entsprach. Der Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer wurde durch HPLC-Analyse (Ausschluss-Chromatographie) bestätigt. Diese variierende Menge an Hydroxyprolin entsprach einem Transport dieser Aminosäure von 0,03 bis 0,38 % aus dem apikalen ins basolaterale Kompartiment. Da in den entnommenen Proben (P_{T-BL}) kein bzw. sehr geringe Mengen an freiem Hydroxyprolin nachweisbar waren (s. Tabelle 442), wurde diese Aminosäure Peptid-gebunden durch intakte Caco-2 Monolayer transportiert.

Diese Hydroxyprolin-haltigen Peptide wurden überwiegend parazellulär transportiert, da nach Applikation von Sol D ins apikale bzw. basolaterale Kompartiment in den Proben des jeweils anderen Kompartiments in etwa gleich große Mengen an Hydroxyprolin detektiert wurden (s. Tabelle 4-49). Außerdem wurde im Vergleich zu diesen Ergebnissen eine in etwa doppelt so große Menge an Hydroxyprolin ermittelt nach Inkubation der Caco-2 Monolayer mit *tight junctions*-Modulatoren und Sol D (s. Tabellen 4-50, 4-51). Auch diese Ergebnisse wurde durch eine zusätzlich durchgeführte HPLC-Analyse bestätigt (s. Tabelle 4-41).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass Peptide der Kollagenhydrolysate Sol D, Sol DA, Collagel A, Collagel BS und Collagel BS-GA durch das simulierte Dünndarmepithel transportiert wurden. Dies unterstützt die *in vivo*-Ergebnisse (s. Tabellen 2-18 bis 2-20), wonach die chondroprotektive Wirkung auf die Wirkung bioaktiver Peptide aus Gelatine- bzw. Kollagenhydrolysaten zurückzuführen ist. Eine solche bioaktive Wirkung der Aminosäure Hydroxyprolin ist unwahrscheinlich, da aus der Nahrung stammendes Hydroxyprolin nicht in den Kollagenstoffwechsel einfließt¹¹¹ und im Stoffwechsel freigesetztes Hydroxyprolin nicht reutilisierbar ist (s. 2.1.2.3.2). Es ist aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht möglich eine ernährungsphysiologisch relevante Empfehlung abzuleiten, da die eigentlichen bioaktiven Peptidfragmente noch nicht bekannt sind.

¹¹¹ Prockop, D. et al., 1962, Bronstein, H. D. et al., 1966

5.4 Ausblick

Human- sowie Tierzellkulturen stellen eine Alternative zu Tierversuchen dar und ermöglichen eine bessere Planung und teilweise eine Verkürzung klinischer Humanstudien. Die eingesetzten Zellkulturen modellieren spezifische Bereiche des menschlichen Organismus: Caco-2 Zellen beispielsweise modellieren den humanen Dünndarm und werden als Standard für Resorptionsstudien betrachtet sowie als Ersatz für Bioverfügbarkeits- und Bioäquivalenzstudien (*in vivo*) durch Behörden (u. a. FAO) akzeptiert. PML (Primärzellen) sind ein Modell für Körperzellen allgemein. Diese beiden Zellkultursysteme wurden in den Zytotoxizitätsstudien dieser Arbeit eingesetzt, deren Ergebnisse grundlegend für die Auswahl von Testsubstanzen (ACE-inhibitorische Milchproteinhydrolysate) waren, die in den Humanstudien des EU-Projektes „HTMProt“ eingesetzt wurden.

Die in dieser Arbeit eingesetzten zellchemischen Methoden sind geeignete Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung bioaktiver Substanzen, u. a. aus Lebensmittel. Der WST-1 Test hat sich in den Zytotoxizitätsstudien dieser Arbeit als sehr sensibles Testsystem erwiesen, so dass nach Einsatz von Lebensmitteln (u. a. Milchproteinpräparate) falsch-positive Ergebnisse ermittelt wurden. Infolge dessen wurde die Methode der Bestimmung der DPP IV-Aktivität von differenzierten Caco-2 Zellen etabliert, die sich zur Identifizierung potenziell zytotoxischer Substanzen eignet. Aufgrund der einfachen, schnellen Testdurchführung und dem Vorhandensein des Oberflächenproteins CD 26 (DPP IV) erscheint es sinnvoll, diese Methode zukünftig für den Einsatz von PML zu optimieren. Zum schnellen und sicheren Nachweis eines zytotoxischen Potenzials, auch in Abhängigkeit von Konzentration bzw. Inkubationsdauer, eignet sich außerdem die TEER-Messung (RT) nach Einsatz von Caco-2 Zellen. Beide Methoden sind zur Untersuchung der Wirkung bioaktiver Substanzen auf das modellierte intestinale Epithel sowie zur Durchführung von Screening-Tests geeignet, die an Bedeutung zunehmen werden, da viele bioaktive Substanzen der Nahrung noch unbekannt sind. Ein weiteres Anwendungsgebiet zellchemischer Methoden ist die Überprüfung ausgeübter Produkteigenschaften des verzehrfertigen (funktionellen) Lebensmittels.

Innerhalb dieser Arbeit wurden des Weiteren die Methode der TEER-Messung bei 37°C und die Durchführung von Transportstudien für lebensmittelwissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt und optimiert. Das entwickelte Standardprotokoll ist geeignet zum Nachweis des Transports bioaktiver Substanzen (u. a. Peptide) durch das modellierte intestinale Epithel. Diese Methode eignet sich außerdem zur Untersuchung von Transportmechanismen, die nicht zur Fragestellung dieser Arbeit gehörten. Die Untersuchung des *in vitro*-transepithelialen Transports bioaktiver Peptide (> 4 Aminosäurenreste) aus Nahrungsproteinen wurde bisher erst in drei Publikationen beschrieben¹¹².

¹¹² Shimizu, M. et al., 1997, Satake, M. et al., 2002, Vermeirssen, V. et al., 2002

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro*-bioaktive Peptide als Testsubstanzen eingesetzt. Die Mehrzahl dieser Peptide zeigte keine zytotoxische Wirkung auf differenzierte Caco-2 Zellen (reife Enterozyten) bzw. nicht-maligne PML. Ein Milchproteinhydrolysat wirkte ausschließlich auf proliferierende Caco-2 Zellen zytotoxisch, indem es Apoptose induzierte. Diese Hydrolysat weist ein antikanzerogenes Potenzial auf, da die meisten antikanzerogenen Pharmaka Apoptose induzieren¹¹³. Dieser Effekt ist jedoch vor einem denkbaren Einsatz als antikanzerogener Wirkstoff in weiteren Studien (*in vitro*, *in vivo*) zu überprüfen.

Die *in vitro* ACE-inhibitorischen Dipeptide Ala-Trp, Val-Phe, Val-Tyr erwiesen sich als Hydrolyse-resistent gegenüber Verdauungs- und Serumenzymen. Insbesondere wurden diese Peptide intakt durch differenzierte Caco-2 Monolayer transportiert. Somit gelang erstmalig der *in vitro*-Nachweis des transepithelialen Transports bioaktiver Peptide, die ACE-inhibitorische bzw. hypertensive Aktivitäten besitzen. Sollte außerdem der Nachweis der hypotensiven Wirkung in Humanstudien gelingen, so ist der Einsatz dieser Peptide in funktionellen Lebensmitteln zur Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (u. a. Bluthochdruck) denkbar. Da diese Peptide in der Aminosäuren-Sequenz des Milchproteins enthalten sind, ist deren Freisetzung auch während der Verdauung bzw. der Lebensmittelverarbeitung möglich. Es bliebe zu untersuchen, ob die Freisetzung in effektiven Konzentrationen erfolgen würde, nach Verzehr von Milch und Milchprodukten in üblichen Portionsgrößen.

Aufgrund verschiedener klinischer Studien werden Kollagenhydrolysate bereits zur Prävention und Therapie degenerativer Gelenk- (Arthrose, Arthritis, Rheumatische Arthritis) und Knochenerkrankungen (Osteoporose) eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig nachgewiesen, dass Peptide der chondroprotektiven Kollagenhydrolysate die Monolayer der Caco-2-Intestinalzellen passieren. Dieser Transport nahm Zeit- und Konzentrations-abhängig zu. Weitere Studien sind notwendig, um die bioaktive(n) Substanz(en) zu identifizieren und deren Transportmechanismus zu untersuchen. Danach wird es möglich sein Ernährungsempfehlungen zu formulieren.

¹¹³ Meisel, H. et al., 1998

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes „Hypotensive Peptides from Milk Proteins“ (HTPMProt) sowie aufgrund einer Kooperation mit der Gelita AG (Eberbach, D) durchgeführt. Es wurde die Wirkung von Peptiden und Proteinhydrolysaten aus Lebensmitteln auf Humanzellen untersucht. Im Literaturteil wurden bioaktive Peptide der Milch, ACE-inhibitorische Peptide aus Lebensmitteln sowie chondroprotektive Peptide aus Gelatine bzw. Kollagenhydrolysaten aufgeführt sowie Funktionen des Intestinaltraktes, Differenzierungsmerkmale von Caco-2 Zellen und Charakteristika von PML u. a. behandelt.

In den Zytotoxizitäts- und Transportstudien wurden folgende zellchemische Methoden eingesetzt: WST-1 Test, Neutralrot-Färbung, Bestimmung der DPP IV-Aktivität, TEER-Messung (bei RT bzw. 37 °C), BrdU-Test und Cell Death Detection ELIAS^{PLUS} Test. Der Peptid- und Aminosäurenachweis erfolgte mittels etablierter HPLC-Verfahren und photometrischer Hydroxyprolin-Bestimmung.

Caco-2 Zellen stellen ein ideales Modell des intestinalen Epithels dar, mit dem modulierende Effekte bioaktiver Substanzen auf proliferierende (Krebszellen) und (teil-) differenzierte Caco-2 Zellen (vergleichbar mit reifen Enterozyten) untersucht werden können. Letztere wurden als Hauptzellkultursystem dieser Arbeit eingesetzt, u. a. zur Durchführung von Transportstudien, die erstmals in diesem Labor durchgeführt wurden. Die photometrischen Bestimmungen der DPP IV-Aktivität bzw. von Hydroxyprolin wurde erstmals zum Nachweis bioaktiver Wirkungen bzw. Substanzen eingesetzt und für diese Ziele adaptiert. Es wurden Protokolle entwickelt, um eine standardisierte Durchführung der zellchemischen Analysen zu gewährleisten. In Screening-Tests wurden zusätzlich polymorphkernigen Leukozyten (PML) eingesetzt, die ein Modell für Körperzellen im Allgemeinen darstellen und neuerdings in der Lebensmittelforschung eingesetzt werden. Diese Primärzellen wurden aus der Mundhöhle gesunder Probanden isoliert. Die Generierung reiner Kulturen (99 % PML) wurde durch magnetischen Antikörper-Zellseparierung (MACS) gewährleistet.

Die Auswertung der Ergebnisse der Zytotoxizitätsstudien ergab, dass der WST-1 Test zu falsch-positiven Ergebnissen hinsichtlich der zytotoxischen Bewertung führen kann. Zur schnellen und sicheren Identifizierung potenziell zytotoxischer Substanzen (auch innerhalb von Screening-Tests) eigneten sich die Bestimmung der DPP IV-Aktivität und die TEER-Messung. Die nicht-invasive Methode der TEER-Messung wurde außerdem zur kontinuierlichen Überprüfung der Wirkung bioaktiver Substanzen auf adhärente Humanzellen sowie zum Nachweis intakter Caco-2 Monolayer direkt vor bzw. nach Transportstudien eingesetzt. Aufgrund der unkomplizierten Durchführung ist die TEER-Messung außerdem eine geeignete Methode zur Überprüfung der Qualität funktioneller Inhaltsstoffe während eines Produktionsprozesses sowie zur Kontrolle ausgelobter Produkteigenschaften und der Produktsicherheit.

Als Testsubstanzen wurden eingesetzt: 178 *in vitro* ACE-inhibitorische Hydrolysate (Permeate), die aus vier Milchproteinfraktionen (β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75, Natrium-Caseinat) durch unterschiedliche Enzyme hergestellt und vom Projektpartner bereitgestellt wurden, 36 synthetische Peptide, zwei Milchproteinpräparate (Lactalbumin 70, Ultralact 35), ein zertifiziertes, rekonstituiertes Magermilchpulver sowie fünf Kollagenhydrolysate der Gelita AG. In den Zytotoxizitätsstudien wurden im Vergleich zur jeweiligen Negativ-Kontrolle überwiegend hemmende Effekte auf die metabolische Zellaktivität nachgewiesen, die sich nach Einbeziehung des Relativen-Zytotoxizitäts-Indexes zumeist als zytochemisch irrelevante Effekte erwiesen. Jedoch 17 der Hydrolysate wirkten potenziell zytotoxisch auf Humanzellen, wovon ein Hydrolysat potenziell anticancerogen wirkte, da es ausschließlich in proliferierenden Caco-2 Zellen (entarteten Zellen) Apoptose induzierte.

In den Transportstudien wurde erstmalig nachgewiesen, dass die Dipeptide Ala-Trp, Val-Phe, Val-Tyr sowie Peptide der Kollagenhydrolysate Sol D, Sol DA, Collagel A, Collagel BS und Collagel BS-GA intakte Caco-2 Monolayer passieren. Außerdem wurde der Transport von Bradykinin durch Caco-2 Monolayer bestätigt und erstmals nachgewiesen, dass dieses Peptid teilweise durch Bürstensaum-Enzyme differenzierter Caco-2 Zellen gespalten wird.

Summary

The present thesis was prepared within the framework of the EU project „Hypotensive Peptides from Milk Proteins“ (HTPMProt). Furthermore parts of the work were conducted in cooperation with Gelita AG (Eberbach, D).

The effects of different peptides and food protein hydrolysates on human cell culture model systems were studied. An overview is given on the current literature on bioactive milk peptides, food derived ACE inhibitory peptides as well as chondro-protective peptides from gelatine and collagen hydrolysates. In addition, details on gastro-intestinal mechanisms and on characteristic properties of Caco-2 cells and PML are given.

Various cytochemical methods were applied In the cytotoxicity and transport studies: WST-1 assay, neutral red staining, determination of DPP IV activity, TEER measurement (at RT and 37 °C), BrdU assay and Cell Death Detection ELIAS^{PLUS}. Peptides and amino acids were quantified by established HPLC methods and photometry (hydroxyproline).

Caco-2 cells represent an ideal model of the intestinal epithelium, allowing to examine modulating effects of bioactive substances on proliferating (cancerous) and (partly) differentiated Caco-2 cells (similar to mature enterocytes). The latter were applied as main cell culture system in the present studies to conduct transport studies that had not been carried out in the respective laboratory before. Both the photometric determination of hydroxyproline and of DPP IV activity had been adapted to suit the intention of the cell culture studies and were applied for the first time to determine effects of bioactive substances. Protocols were developed to guarantee a standardized procedure of cytochemical analyzes. In screening assays polymorphonuclear leukocytes (PML), that are increasingly used in food science, were used as a general model for human cells. These primary cells were isolated from the oral cavity of healthy donors. Purification of extracted cell populations was done by magnetic cell separation (MACS) up to purities of 99% PML.

Cytotoxicity studies showed that the results of the WST-1 assay might lead to false positive results i.e. overestimate the cytotoxic potential. The determination of DPP IV activity and TEER were suitable for a fast and secure identification of potentially cytotoxic compounds, even in screening tests. In addition, non-invasive TEER measurement was applied to continuously monitor effects of bioactive substances on adherent human cells or the integrity of cell monolayers before and after the transport studies. The measurement of TEER is suitable for quality assessment of functional food ingredients during processing allowing to check for the claimed beneficial properties as well as the product's safety.

The following test substances were examined: 178 different ACE-inhibitory *in vitro* hydrolysates (permeates) obtained by enzymatic digestion of 4 different milk protein fractions

(β -lactoglobulin, enriched whey protein, WPC 75, sodium caseinate), which were provided by the project partner; 36 synthetic peptides, 2 commercially available milk protein preparations (Lactalbumin 70, Ultra lact 35); a certified reconstituted skim milk powder as well as 5 collagen hydrolysates from Gelita AG.

Cytotoxicity studies mostly showed decreased metabolic activity as compared to untreated control, turning out to be irrelevant from the cytochemical point of view considering the relative cytotoxicity index. However, 17 hydrolysates had potential cytotoxic effects on human cells with one special hydrolysate showing anti-carcinogenic potential by selectively inducing apoptosis in proliferating Caco-2 cells (cells carrying mostly malignant properties).

In transport experiments it was shown for the first time that the dipeptides Ala-Trp, Val-Phe, Val-Tyr as well as peptides from collagen hydrolysates Sol D, Sol DA, Collagel A, Collagel BS und Collagel BS-GA are able to pass intact Caco-2 monolayers. Furthermore, the ability of Bradykinin to pass through Caco-2 monolayers was confirmed and it could be shown for the first time that this compound is partly cleaved by brush border enzymes in differentiated Caco-2 monolayers.

Literaturverzeichnis

- Abbott, C. A.; McCaughan, G. W.; Gorell, M. D. (1999)
Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted beta propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity.
FEBS Lett. **458**, S. 278– 284.
- Abbott, C. A.; Yu, D. M. T.; Woollatt, E.; Sutherland, G. R.; McCaughan, G. W.; Gorrell, M. D. (2000)
Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human Dipeptidyl peptidase IV homolog DPP 8.
Eur. J. Biochem., S. 6140– 6150.
- Abe, M.; Hoshi, T.; Tajima, A. (1987)
Characteristics of transmural potential changes associated with the protonpeptide co-transport in to ad small intestine.
J. Physiol. **394**, S. 481– 499.
- Abesundara, K. J. M.; Higuchi, M.; Matsui, T.; Matsumoto, K. (2002)
Evaluation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity by an FIA convined with biosensor.
Analytical Sciences **18**, S. 467– 468.
- Adam, M. (1991)
Therapie der Osteoarthrose– Welche Wirkungen haben Gelatinepräparate?
Therapiewoche **41**, S. 2456– 2461.
- Adibi, S. A.; Kim, Y. S. (1981)
Peptide absorption and hydrolysis.
In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*.
[ed.: Johnson, L.] New York: Raven Press, 2. Auflage, S. 1073– 1095.
- Adibi, S. A.; Morse, E. (1977)
The number of Glycin residues which limits intact absorption of glicine oligopeptides in human jejunum.
J. Clin. Invest. **60**, S. 665 – 667.
- Akasu, M.; Urata, H.; Kinoshita, A. (1998)
Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro.
Hypertension **32**, S. 514– 520.
- Allander, P. S.; Cutler, J. A.; Follmann, D.; Cappuccio, F. P.; Pryer, J.; Elliott, P. (1996)
Dietary calcium and blood pressure: a meta-analysis of randomized clinical trials.
Ann Intern Med **124**, S. 825– 831.
- Alpers, D. H. (1994)
Digestion and apsrption of carbohydrates and proteins.
In: *Physiology of the gastrointestinal tract*.
[Johnson, L. R., Editor] New York, Raven Press, Vol. 3, S. 1723– 1750.
- Ames, R. P. (1983)
Negative effects of diuretic drugs on metabolic risk factors for coronary heart diseas.
Am J Cardiol **51**, S. 632– 638.
- Ardawi, M. S. M.; Newsholme, E. A. (1983)
Biochem. J. **212**, S. 835– 842.
- Arend, W. P. (2001)
Cytokines and cellular interactions in inflammatory synovitis.
J Clin Invest **107**, S. 1081– 1082.
- Ariyoshi, Y. (1993)
Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins.
Trends Food Sci. Technol. **4**, S. 139– 144.
- Artusson, P. (1990)
Epithelial transport of drugs in cell culture. I: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells.
Journal Pharmaceutical Science **79**, S. 476– 482.
- Asa, D.; LaRocca, P. (1997)
Comparison of the BIOCOAT® intestinal epithelial environment with the conventional 12-day Caco-2 system.
Becton Dickinson, S. 1– 3.
- Ashar, M. N.; Chand, R. (2003)
ACE-inhibitory activity of lactic acid bacteria in fermented milks.
Milchwissenschaft **58**, S. 59– 61.
- Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. (1998)
Death receptors: signaling and modulation.
Science **281**, S. 1305– 1308.

- Asp, N. G.; Cummings, J. H.; Mesnink, R. P.; Prentice, A.; Richardson, D. P.; Saris, W. H. M. (2003)
PASSCLAIM: Process for the assessment of scientific support for claims on foods.
Eur J Nutr **42**, S. 3– 26.
- Atkinso, A. B.; Brown, J. J.; Lever, A. F.; Robertson, J. I. (1980)
Combined treatment of severe intractable hypertension with captopril and diuretic.
Lancet **2**, S. 105– 107.
- Audus, K. L.; Bartel, R. L.; Hidalgo, I. J.; Borchardt, R. T. (1990)
The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies.
Pharmaceutical Research **7**, S. 435– 451.
- Auricchio, S.; Greco, L.; De Vizia, B.; Buonocore, V. (1978)
Dipeptidylaminopeptidase and Carboxypeptidase activities of the brush border of rabbit small intestine.
Gastroenterology **75**, S. 1073– 1079.
- Babel, W. (1996)
Gelatine – ein vielseitiges Biopolymer.
Chemie in unsere Zeit **30**, S: 1 - 11
- Babich, H.; Borenfreund, E. (1990)
Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology.
ATLA **18**, S. 129– 144.
- Babich, H.; Martin-Alguacil, N.; Raul, C.; Rosenberg, D. W.; Borenfreund, E. (1991)
Response of human cell cultures to cytotoxicants requiring metabolic activation.
In: *Alternatives methods in toxicology*.
[Goldberg, A. M., Editor], S. 263– 276.
- Bacher, A.; Griehl, K.; Mackamul, S.; Mitreiter, R.; Mückter, H.; Ben-Shaul, Y. (1992)
Proteases inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines.
Experimental Cell Research **200**, S. 97– 104.
- Bahna, S. L. (2002)
Cow's milk allergy versus cow milk intolerance.
Annals of allergy, asthma and immunology **89**, S. 56– 60.
- Bailey, P. D.; Boyd, C. A.; Bronk, J. R.; Collier, I. D.; Meredith, D.; Morgan, K. M.; Temple, C. S. (2000)
How to make drugs orally active: a substrate template for peptide transporter PepT1.
Angew. Chem. Int. ed. Engl. **39**, S. 505– 508.
- Barki-Harrington, L.; Daaka, Y. (2001)
Bradykinin induced mitogenesis of androgen independent prostate cancer cells.
J Urol **165**, S. 2121 - 2125.
- Barth, A.; Schulz, H.; Neubert, K. (1974)
Untersuchungen zur Reinigung und Charakterisierung der Dipeptidylpeptidase IV.
Acta Biol Med Ger **32**, S. 157– 174.
- Baskaran, K.; Ahamath, B. K.; Shanmugasundaram, K. R. (1990)
J. Ethnopharmacol. **30**, S. 295– 300.
- Battistini, B.; Ayach, B.; Molez, St.; Blouin, A.; Jeng, A. Y. (2002)
Effects of benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, combined with CGS 35066, a selective endothelin-converting enzyme inhibitor, on arterial blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats.
Clinical Science **103**, S. 363– 366.
- Bernard, H.; Meisel, H.; Creminon, C., Wal, J. M. (2000)
Post-translational phosphorylation affects the IgE binding capacity of caseins.
FEBS Letters **467**, S. 239– 244.
- Berridge, M. V.; Tan, A. S. (2000)
Cell-surface NAD(P)H-oxidase: relationship to trans-plasma membrane NADH-oxidoreductase and a potential source of circulating NADH-oxidase.
Antioxid Redox Signal **2**, S. 277– 288.
- Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D.; Wang, R. (1996)
The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts.
Biochemica **4**, S. 14– 18.
- Beuker, F.; Rosenfeld, J. (1996)
Die Wirkung regelmäßiger Gelatinegaben auf chronisch-degenerative Schäden am Stütz- und Bewegungssystem.
Int. J. Sportmed. **1**, S. 1 - 88.
- Beuker, F.; Stehle, P.; Ritsch, M.; Theel, H. (1993)
Der Einfluss regelmäßiger Gelatinesubstituion auf den Aminosäurenspiegel im Blutplasma.
Ernährungs-Umschau **40**, S. 2

- Blais, A.; Aymar, P.; Lacour, B. (1997)
Paracellular calcium transport across caco-2 and HT29 cell monolayers.
Pflügers Arch. **434**, S. 300–305.
- Blok, J.; Fransen, J. A.; Ginsel, L. A. (1984)
Runover of brush-border glycoproteins in human intestinal absorptive cells: do lysosomes have a regulatory function.
Cell Biol Int Rep **8**, S. 993–1014.
- Blok, J.; Mulder-Stapel, A. A.; Ginsel, L. A.; Daems, W. T. (1981)
Endocytosis in absorptive cells of cultured human small-intestinal tissue: horseradish peroxidase, lactoperoxidase, and ferritin as markers.
Cell Tissue Res **216**, S. 1–13.
- Boato, F.; Wortley, G. M.; Liu, R. H.; Glahn, R. (2002)
Red grape juice inhibits iron availability: application of an *in vitro* digestion/Caco-2 model.
J. Agric. Food Chem **50**, S. 6935–6938.
- Bock, U.; Kolac, C.; Borchardt, G.; Koch, K.; Fuchs, R.; Streichhan, P.; Lehr, C. M. (1998)
Transport of proteolytic enzymes across Caco-2 monolayers.
Pharm. Res. **15**, S. 1393–1400.
- Boisset, M.; Botham, R. P.; Haegele, K. D.; Lenfant, B.; Pachot, J. I. (2000)
Absorption of angiotensin II antagonists in Ussing chambers, Caco-2, perfused jejunum loop and *in vivo*: Importance of drug ionisation in the *in vitro* prediction of *in vivo* absorption.
Eur. J. Pharm. Sci. **10**, S. 215–224.
- Bolte, G.; Wolburg, H.; Beuermann, K.; Stocker, S.; Stern, M. (1998)
Specific interaction of food proteins with apical membranes of the human intestinal cell lines Caco-2 and T84.
Clin Chim Acta **270**, S. 151–167.
- Bordin, G.; Raposo, R. C.; dela Calle, B.; Rodriguez, A. R. (2001)
Identification and qualification of major bovine milk proteins by liquid chromatography.
J. of Chromatography A **928**, S. 63–76.
- Borgström, B.; Dahlquist, A.; Lundh, G.; Sjövall, J. (1957)
Studies of intestinal digestion and absorption in the human.
J Clin Invest **36**, S. 1521–1536.
- Bralet, J., Schwartz, J.-Ch. (2001)
Vasopeptidase inhibitors: an emerging class of cardiovascular drugs.
Trends Pharmac. Sci. **22**, S. 106–110.
- Brandtzaeg, P.; Halstensen, T. S.; Kett, K. et al. (1989)
Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes.
Gastroenterology **97**, S. 1562–1584.
- Briske-Anderson M. J.; Finley J. W.; Newman, S. M. (1997)
The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells.
Proc Soc Exp Biol Med **214**, S. 248–257.
- Bronstein, H. D.; Haeffner, L. J.; Kowlessar, O. D. (1966)
The significance of gelatin tolerance in malabsorptive states.
Gastroenterology **50**, S. 621–630.
- Brooks, S. P. J. (1994)
A program for analyzing enzyme rate data obtained from a microtiter reader.
BioTech **17**, S. 1154–1161.
- Bruns, J.; Steinhagen, J. (2000)
Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität – Biologische Grundlagen.
Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin **51**, S. 42-46.
- Bucher, H. C.; Cook, R. J.; Guyatt, G. H.; Land, J. D.; Cook, D. H.; Hatala, R.; Hunt, D. L. (1996)
Effect of dietary calcium supplementation on blood pressure. A meta-analysis of randomized controlled trials.
JAMA **275**, S. 1016–1022.
- Buonopan, G. J.; Kilara, A.; Smith, J. S.; McCarthy, R. D. (1992)
Effect of skim milk supplementation on blood cholesterol concentration, blood pressure, and triglycerids in a free-living human population.
J Am Coll Nutr **11**, S. 56–67.
- Burdett, K.; Lauterbach, R. (1994)
Eur. J. Physiol. **426**, S. 491–498.
- Burton, P. S.; Conradi, R. A.; Hilgers, A. R.; Ho, N. F. H.; Maggiora, L. L. (1992)
The relationship between peptide structure and transport across epithelial cell monolayers.
J. Control. Release **19**, S. 87–98.

- Burton, P. S.; Conradi, R. A.; Ho, N. F.; Hilgers, A. R.; Borchardt, R. T. (1996)
How structural features influence the biomembrane permeability of peptides.
J Pharm Sci **85**, S. 1336–1340.
- Cappuccio, F. P.; MacGregor, G. A. (1991)
Does potassium supplementation lower blood pressure? A meta-analysis of published trials.
J. Hypertens **9**, S. 465–473.
- Chabance, B.; Marteau, P.; Rambaud, J. C.; Migliore-Samour, D.; Boynard, M.; Perrotin, P.; Guillet, R.; Jollès, P.; Fiat, A. M. (1998)
Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yoghurt.
Biochimie **80**, S. 155–165.
- Chen, J. - R.; Okada, T.; Muramoto, K.; Suetsuna, K.; Yang, S. - Ch. (2003)
Identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein.
J. Food Biochem. **26**, S. 479–568.
- Cheung, H.-S.; Wang, F.-L.; Ondetti, M. A.; Sabo, E. F.; Cushman, D. W. (1980)
Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme.
J. Biol. Chem. **255**, S. 401–407.
- Citi, S. (1994)
The molecular composition of tight junctions.
In: *Molecular Mechanisms of epithelial cell junctions: From development to diseases.*
[Citi, S., Editor], R. G. Landes Company, Chapter 5, S. 83–106.
- Clare, D. A.; Swaisgood, H. E. (2000)
Bioactive milk proteins: a prospectus.
J Dairy Sci **83**, S. 1187–1195.
- Clissold, S. O.; Edward, C. (1988)
Drugs **35**, S. 214–243.
- Collett, A.; Higgs, N. B.; Siems, E. (1999)
Modulation of the permeability of H₂ receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **288**, S. 171–178.
- Colony, P. C.; Neutr, M. R. (1985)
Macromolecular transport in the fetal rat intestine.
Gastroenterology **89**, S. 294–306.
- Conneely, O. M. (2001)
Anti-inflammatory activities of lactoferrin.
J Am College of Nutrition **20**, S. 389 S–395 S.
- Conradi, R. A.; Hilgers, A. R.; Ho, N. F. H.; Burton, P. S. (1992)
The influence of peptide structure on transport across Caco-2 cells. II. Peptide bond modification which results in improved permeability.
Pharm. Res. **9**; S. 435–439.
- Conradi, R. A.; Wilkinson, K. F.; Rush, B. D.; Hilgers, A. R.; Ruwart, M. J.; Burton, P. S. (1993)
In vitro/in vivo models for peptide oral absorption: Comparison of Caco-2 cells permeability with rat intestinal absorption or renin inhibitory peptides.
Pharm. Res. **10**, S. 1790–1792.
- Coulter-Immunotech Diagnostics (1998)
Apoptose-Handbuch. S. 1–20.
- Cowan, F. M. (1991)
Effect of sulfur exposure on protease activity in human peripheral blood lymphocytes.
Cell Biol Toxicol. **7**, S. 239–48.
- Cuinn, G. O.; Fottrell, P. F. (1975)
Purification and characterization of an amino acyl proline hydrolase from guinea-pig intestinal mucosa.
Biochim Biophys Acta **391**, S. 388–395.
- D'Amours, D.; Germain, M.; Orth, K.; Dixit, V. M.; Poirier, G. G. (1998)
Proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase by caspase 3:
Kinetics of cleavage of mono(ADP-ribosyl)ated and DNA-bound substrates.
Radiation Research **150**, S. 3–10.
- Daengprok, W., Garnjanagoonchorn, W., Naiviku, O., Prnsinpatip, P., Issingonis, K., Mine, Y. (2003)
Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2.
J. Agric. Food Chem. **51**, S. 6056–6061.
- Daniel, H.; Morse, E. L.; Adibi, S. A. (1992)
Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane.
J. Biol. Chem. **267**, S. 9565–9573.

- Danielsen, E. M. (1992)
Folding of intestinal brush border enzymes. Evidence that high-mannose glycosylation is an essential early event.
Biochemistry **31**, S. 2266–2272.
- Das, M.; Radhakrishnan A. N. (1973)
Glycyl-L-leucin hydrolase, a versatile "master" dipeptidase from monkey small intestine.
Biochem J. **135**, S. 609–615.
- Davis, L. (2003)
Peptide power.
Ingredients, Health & Nutrition **6**, S. 16–18.
- Deal, C. L.; Moskowitz, R. W. (1999)
Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The role of glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysate.
Rheum Dis Clin North Am. **25**, S. 379–395.
- Debatin, K. (2000)
Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment.
Toxicol. Lett. **112-113**, S. 41–48.
- Deferne, J. L.; Leeds, A. R. (1996)
Resting blood pressure and cardiovascular reactivity to mental arithmetic in mild hypertensive males supplemented with black currant seed oil.
J. Human Hyper. **10**, S. 531
- Delie, F.; Rubas, W. (1997)
A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantage and limitations of the Caco-2 model.
Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems **14**, S. 221–286.
- Deprez, S.; Mila, I.; Huneau, J. F.; Tome, D.; Scalbert, A. (2001)
Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells.
Antioxid Redox Signal **3**, S. 957–967.
- Diaz, M.; Dunn, Ch. M.; McClements, D. J.; Decker, E. A. (2003)
Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions.
J. Agric. Food Chem. **51**, S. 2365–2370.
- DIN 32645
Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung.
DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin.
- DIN EN 30993-5 (1994)
Biologische Beurteilung von Medizinprodukten,
Teil 5: Prüfungen auf Zytotoxizität: *in vitro*-Methoden.
- Ding, C. H.; Li, W.; Xiong, Z. Y.; Zhou, A. W.; Jones, G.; Xu, S. Y. (2003)
Oral administration of type II collagen suppresses pro-inflammatory mediator production by synoviocytes in rats with adjuvant arthritis.
Clin Exp Immunol **132**, S. 416–423.
- Diplock, A. T.; Aggett, P. J.; Ashwell, M.; Bornet, F.; Fern E. B.; Roberfroid, M. B. (1999)
Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document.
Brit. J. Nutr. **81**, S. S 1–S 27.
- Donlon, J.; Fottrell, P. F. (1973)
Purification and characterization of one of the forms of peptide hydrolases from guinea-pig small intestinal mucosa.
Biochim Biophys Acta **327**, S. 425–436.
- Dorkoosh, F. A.; Setyaningsih, D.; Borchard, G.; Rafiee-Tehrani, M.; Verhoef, J. C.; Junginger, H. E. (2002)
Effects of superporous hydrogels on paracellular drug permeability and cytotoxicity studies in Caco-2 cell monolayers.
Int J Pharm **241**, S. 34–45.
- Dutta, A. S. (2001)
Analogue and conformational studies on peptides, hormones and other biologically active peptides.
Amino Acids, Pept., Proteins **32**, S. 163–286.
- Dziuba, J.; Minkiewicz, P.; Nalecz, D.; Iwaniak, A. (1999)
Database of biologically active peptide sequences.
Nahrung **43**, S. 190–195.

- Earnshaw, W. C.; Martins, L. M.; Kaufmann, S. H. (1999)
Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.
Ann. Rev. Biochem. **68**, S. 383–424.
- Eckstein, L. M.; Bruhn, M. (2003)
Health Claims für *functional food*?
Deutsche Lebensmittel-Rundschau **99**, S. 347–359.
- Ekmekcioglu, C.; Feyertag, J.; Marktl, W. (1998)
Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells.
Cancer Lett. **128**, S. 137–144.
- Ekmekcioglu, C.; Pomazal, K.; Steffan, I.; Schweiger, B.; Marktl, W. (1999)
Calcium transport from mineral water across caco-2 cells.
J. Agric. Food Chem. **47**, S. 2594–2599.
- Elliot, P. (1991)
Observational studies of salt and blood pressure.
Hypertension **17**, S. 13–8.
- Engle, M. J.; Goetz, G. S.; Alpers, D. H. (1998)
Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes.
J. Cell Physiol **174**, S. 362–369.
- Engler, M. M. (1996)
Gamma-linolenic acid: A potent blood pressure lowering nutrient.
In: *Gamma-linolenic acid: Metabolism and its roles in nutrition and medicin.*
[Huang, Y.-S, Mills, D. E., Editor] AOCS Press, Champaign, Ill, S. 200–217.
- Engler, M. M.; Schambelan, M.; Engler, M. B.; Ball, D. L.; Goodfriend, T. L. (1998)
Effects of dietary g-linolic acid on blood pressure and adrenal angiotensin receptors in hypertensive rats.
Proc. Soc. Exptal. Biol. Med. **218**, S. 234.
- Erickson, R. H.; Gum, J. R.; Lotterman, C. D.; Hicks, J. W.; Lai, R. S.; Kim, Y. S. (1999)
Regulation of the gene for human dipeptidylpeptidase IV by hepatocyte nuclear factor 1 a.
Biochem. J. **338**, S. 91–97.
- Erickson, R. H.; Kim, Y. S. (1990)
Digestion and absorption of dietary protein.
Annu. Rev. Med. **41**, S. 133–139.
- Eriksson, U.; Danilczyk, U.; Penninger, J. M. (2002)
Just the beginning: novel functions for angiotensin-converting enzymes.
Curr Biol **12**, S. R 745–R 752.
- Fatini, J.; Verrier, B.; Robert, C.; Pic, P.; Pichon, J.; Mauchamp, J.; Marvaldi, J. (1990)
Suramin-induced differentiation of the human colonic adenocarcinoma cell clone HT29-D4 in serum-free medium.
Experimental Cell Research **189**, S. 109–117.
- Feinleib, M. D.; Lenfant, C.; Miller, S. A. (1984)
Hypertension and calcium.
Science **226**, S. 384–389.
- Feldmann, M. (2001)
Pathogenesis of arthritis: recent research progress.
Nat Immunol **2**, S. 771–773.
- Ferguson, R. K.; Vlasses, P. H.; Koplín, J. R.; Shirinaian, A.; Burke, J. F.; Alexande, J. C. (1980)
Captopril in severe treatment-resistant hypertension.
Am Heart J **99**, S. 579–585.
- Fernandez, P. G.; Galway, A. B.; Kim, B. K. (1982)
Prolonged normotension following cessation of therapy in uncomplicated essential hypertension.
Clin. Invest. Med. **5**, S. 31–37.
- Ferreira, S. H.; Bartelt, D. C.; Green, L. J. (1970)
Isolation of bradykinin-potentiating peptides from bothrops jararaca venom.
Biochemistry **9**, S. 2583.
- Fesus, L.; Davies, J. A. P.; Piacentini, M. (1991)
Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death.
European Journal of Cell Biology **56**, S. 170–177.
- Finley, J. W.; Johnson, P. E.; Reeves, P. G.; Vanderpool, R. A.; Briske-Anderson, M. (1994)
Effect of bile/pancreatic secretions and absorption of radioactive or stable zinc. *In vivo* and *in vitro* studies.
Biol. Trace Elem. Res. **42**, S. 81–96.
- Fisher, G. H.; Ryan, J. W. (1983)
Distant binding sites of kininase II.
Adv Exp Med Biol **156 B**, S. 813–821.

- FitzGerald, R. J.; Meisel, H. (2000)
Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme.
Brit J Nutr **84**, S. 33–37.
- Fleet, J. C.; Wood, R. J. (1994)
Identification of calbindin D-9k mRNA and its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in caco-2 cells.
Arch Biochem Biophys **308**, S. 171–174.
- Fleet, J.C.; Bradley, J.; Reddy, G. S.; Ray, R.; Wood, R. J. (1996)
1 α ,25-(OH)₂-vitamin D₃ analogs with minimal in vivo calcemic activity can stimulate significant transepithelial calcium transport and mRNA expression in vitro.
Arch. Biochem. Biophys. **329**, S. 228–234.
- Fogh, J.; Wright, W. C.; Loveless, J. D. (1977)
Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.
J. Natl. Cancer Inst. **58**, S. 209–214.
- Ford, D.; Geggie, M. E.; Hirst, B. H. (1999)
Peptide specificity for up-regulation of the human proton-coupled peptide transporter, hPepT1, in human intestinal Caco-2 cells
The Journal of Physiology **520**, S. 16P.
- Francoeur, A.-M.; Assalian, A. (1997)
Microcat: A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1.
Biochemica Information **100**, S. 20–25.
- Frenzel, Th.; Miller, A.; Engel, K.-H. (2002)
Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Lebensmittel.
Lebensmittelchemie **56**, S. 17.
- Friedmann, M. (1996)
Nutritional value of protein from different food sources. A review.
J. Agric. Food Chem. **44**, S. 6–29.
- Frydoonfar, H. R.; McGrath, D. R.; Spigelman, A. D. (2002)
The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid Naringenin.
Colorectal Disease **5**, S. 149–152.
- Fuqiang, A.; Nilsson, D.; Nyborg, N. C. B. (2002)
Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats.
App Env Microbiol **68**, S. 3566–3569.
- Fujita, A.; Kawakita, H.; Saito, K.; Sugita, K. (2003)
Production of tripeptide from gelatin using collagenase-immobilized porous hollow-fibre membrane.
Biotechnology Progress **19**, S. 1365–1367.
- Fujita, H.; Yamagami, T.; Ohshima, K. (2001)
Effect of an ace-inhibitory agent, katuobishi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects.
Nutr Res **21**, S. 1149–1158.
- Fujita, H.; Yasumoto, R.; Hasegawa, M.; Ohshima, K. (1997)
Antihypertensive activity of "Katsuobushi Oligopeptide" in hypertensive and borderline hypertensive subjects.
Jpn Pharmacol Ther **25**, S. 147–151.
- Fujita, H.; Yasumoto, R.; Hasegawa, M.; Ohshima, K. (1997)
Antihypertensive activity of "Katsuobushi Oligopeptide" in hypertensive and borderline hypertensive subjects.
Jpn Pharmacol Ther **25**, S. 153–157.
- Fujita, H.; Yokoyama, K.; Yoshikawa, M. (2000)
Classification and antihypertensive activity of Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derive from food proteins.
J Food Science **65**, S. 564–569.
- Fujita, H.; Yokoyama, K.; Yoshikawa, M. (2000)
Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins.
J Food Sci **65**, S. 564–569.
- Fujita, H.; Yoshikawa, M. (1999)
LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein.
Immunopharmacology **44**, S. 123–127.
- Fujiwara, S.; Imain, J.; Fujiwara, M.; Yaeshima, T.; Kawashima, T. Kobayashi, K. (1990)
A potent antibacterial protein in royal jelly.
J. Biol. Chem **265**, S. 11333–11337.

- Fulcher, I. S.; Kenny, A. J. (1983)
Proteins of the kidney microvillar membrane.
Biochem. J. **211**, S: 743 – 753.
- Furie, M. B.; Naprstek, B. L.; Silverstein, S. C. (1987)
Migration of neutrophils across monolayers of cultured microvasculare endothelial cells: an in vitro model of leukocyte extravasation.
J. Cell Sci. **88**, S: 161 – 175.
- Furushiro, M.; Sawada, H.; Hirai, K.; Motoike, M.; Sansawa, H.; Kobayashi, S.; Watanuki, M.; Yokokura, H. (1990)
Blood pressure-lowering effect of extract from *Lactobacillus casei* in spontaneously hypertensive rats (SHR).
Abstr. Biol. Chem. **54**, S. 2193.
- Gainer, J. V.; Morrow, J. D.; Loveland, A. (1998)
Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects.
N Engl J Med **339**, S. 1285 - 1292.
- Gainer, J. V.; Morrow, J. D.; Loveland, A., King, D. J., Brown, N. J. (2003)
Effect of Bradykinin-receptor on the response to Angiotensin-converting enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects.
N Engl. J. Med. **339**, S. 1285 – 1292.
- Ganapathy, V.; Leibach, F. H. (1983)
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**, S. 14189 – 14192.
- Ganapathy, V.; Leibach, F. H. (1985)
Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient?
Am. J. Physiol. **249**, S. G 153 – G 160.
- Gao, J.; Winslow, S. L.; Vander Velde, D.; Aubé, J.; Borchardt, R. T. (2001)
Transport characteristics of peptides and peptidomimetics: II Hydroxyethylamine biosostere containing peptidomimetics as substrates for the oligopeptide transporter and P-glycoprotein in the intestinal mucosa.
J. Peptide Res. **57**, S. 361 – 373.
- Garcia, M. N.; Flowers, C.; Cook, J. D. (1996)
The caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability.
J. Nutr. **126**, S. 251 – 258.
- Garcia, M.; Mirre, C.; Quaroni, A.; Reggio, H.; Le Bivic, A. (1993)
GPI-anchored proteins associate to form microdomains during their intracellular transport in Caco-2 cells.
J. Cell Sci. **104**, S. 1281 – 1290.
- Gardner, M. L. G. (1983)
Evidence for, and implications of passage of intact peptides across the intestinal mucosa.
Biochemical Society Transaction **11**, S. 810.
- Gardner, M. L. G. (1988)
Gastrointestinal absorption of intact proteins
Ann. Rev. Nutr. **8**, S. 329– 350.
- Gasbarrini, G.; Montalto, M. (1999)
Structure and function of tight junctions. Role in intestinal barrier.
Ital. J. Gastroenterol. Hepatol. **31**, S. 481 – 488.
- Gatti, M.; Fornasari, M. E.; Mucchetti, G.; Addeo, F.; Neviani, E. (1999)
Presence of peptidase activities in different varieties of cheeses.
Lett App Microbiol **28**, S. 368 – 372.
- German, J. B.; Morgan, C. J.; Robert, E. W. (2003)
Milk: a model for nutrition in the 21st century.
Austr J Dairy Tech **58**, S. 49 - 54.
- Gilbert, Th.; Le Bivic, A., Quaroni, A., Rodriguez-Boulan, E. (1991)
Microtubular organisation and its involvement in the biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells.
J. Cell Biol. **113**, S. 275 – 288.
- Giovanni, C.; Maiuri, M.; De Vincenzi, M. (1995)
Cytotoxic effect of prolamin-derived peptides on in vitro cultures of cell line Caco-2: Implications for coeliac disease.
Toxicology in vitro **9**, S. 251 – 255.
- Giovanni, C.; Mancini, E.; De Vincenzi, M. (1996)
Inhibition of the cellular metabolism of Caco-2 cells by prolamin peptides from cereals toxic for coeliacs.
Toxicology in vitro **10**, S. 533 – 538.

- Giovannini, C.; Lechetti, R.; De Vincenzi, M. (1997)
The activities of peptides "31 – 43", "44 – 55" and "56 – 68" of a -Gliadin on *in vitro* cultures of Caco-2 cells.
ATLA **25**, S. 437 – 443.
- Gitter, A. H.; Bendfeldt, K.; Schulzke, J. D.; Fromm, M. (2000)
Trans/paracellular, surface/crypt, and epithelial/subepithelial resistance of mammalian colonic epithelia.
Pflugers Arch. **439**, S. 477 – 482.
- Glahn, R. P.; Wien, E. M.; van Campen, D. R.; Miller, D. D. (1996)
Caco-2 iron uptake from meat and casein digests parallels *in vivo* studies: Use of a novel *in vitro* method for rapid estimation of iron bioavailability.
J. Nutr. **126**, S. 332 – 339.
- Gnoth, M. J.; Kunz, C.; Kinne-Saffran, E.; Rudloff, S. (2000)
Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*.
Journal of Nutrition, S. 1304 – 3020.
- Gnoth, M. J.; Rudloff, S.; Kunz, C.; Kinne, R. K. H. (2001)
Investigations of the *in vitro* transport of human milk oligosaccharides by a caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique.
Journal of Biological Chemistry **276**, S. 34363 – 34370.
- Gnoth, M. J.; Rudloff, S.; Kunz, C.; Kinne, R. K. H. (2002)
Studies on the intestinal transport of human milk oligosaccharides (HMO) using Caco-2 cells.
Food Research International **35**, S. 145 – 149.
- Gobbetti, M.; Ferranti, P.; Smacchi, E.; Goffredi, F.; Addeo, F. (2000)
Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4.
Applied Environ Microbio, S. 3898 – 3904.
- Gochoco, C. H.; Ryan, F. M.; Miller, J.; Smith, P. L.; Hidalgo, I.J. (1994)
Uptake and transepithelial transport of the orally absorbed cephalosporin cephalexin, in the human intestinal cell line, Caco-2.
Int. J. Pharm. **104**, S. 187 – 202.
- Goldberg, J. H.; Rutenburg, A. M. (1958)
The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases.
Cancer **11**, S. 283 – 291.
- Goldberg, I. (1994)
Introduction. In: *Functional foods*.
[Goldberg, Israel, Editor] Chapman & Hall, New York, 571 Seiten.
- González-Mariscal, L.; de Ramirez, Ch. B.; Cerejido, M. (1994)
Effect of temperature on the occluding junctions of monolayers of epithelioid cells (MDCK).
J. Membrane Biol. **79**, S. 175 – 184.
- Gottwald, W. (2001)
Ausreißertests.
Labo 7, S. 24 – 26.
- Grenby, T. H.; Andrews, A. T.; Mistry, M.; Williams, R. J. H. (2001)
Dental caries-protective agents in milk and milk products: investigations *in vitro*.
Journal of Dentistry **29**, S. 83 – 92.
- Grès, M.C.; Julian, B.; Bourrie, M. (1998)
Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line.
Pharm. Res. **15**, S. 726 – 733.
- Großklaus, R. (2000)
Die Bewertung von Nahrungsergänzungsmitteln aus der Sicht des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes.
Ernährungsumschau **47**, S. 132 – 141.
- Groziak, S. M.; Miller, G. D. (2000)
Natural bioactive substances in milk and colostrum: effects on the arterial blood pressure system.
Br J of Nutrition **84**, S. 119 – 125.
- Gruchaw H. W.; Cobocinski, K. A.; Barboriak, J. J. (1985)
Alcohol, nutrient intake and hypertension in U. S. adults.
J. Am. Med. Assoc **253**, S. 1567 – 1570.
- Guan, D.; Yoshioka, M.; Erickson, R. H.; Heizer, W.; Kim, Y. S. (1988)
Protein digestion in human and rat small intestine: Role of new neutral endopeptidases.
Am. J. Physiol. **255**, S. G 212 – 220.

- Guilliano, A. R.; Wood, R. J. (1991)
Vitamin D regulated calcium transport in caco-2 cells: unique in vitro model.
Am. J. Physiol. **260**, S. G 207 – G 212.
- Gumbiner, G. L. (1993)
Breaking through the tight junction barrier.
J. Cell. Biol. **123**, S. 1631 – 1633.
- Haberhauer, G.; Feyertag, J.; Dunky, A. (2003)
Knorpel-Stoffwechsel: Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) als "Prognostikum" der Gelenkknorpel-
Destruktion.
J Miner Stoffwechs **10**, S. 17 – 21.
- Hakansson, A.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S.; Sabharwal, H.; Svanborg, C. (1995)
Apoptosis induced by a human milk protein.
Proc. Natl. Acad. Sci **92**, S. 8064 – 8068.
- Haltner, E.; Schmitz, S.; Gindorf, C.; Ruoff, J. (2001)
In vitro permeability studies as a substitute for in vivo studies -which requirements have to be met.
ALTEX **18**, S. 81 – 87.
- Hansen, M.; Sansström, B.; Lönnerdal, B. (1996)
The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in
rat pups and Caco-2 cells.
Pediatr. Res. **40**, S. 547 – 552.
- Hansen, S. H.; Olsson, A.; Casanova, J. E. (1995)
Wortmannin, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase, inhibits transcytosis in polarized epithelial cells.
J. Biol. Chem **270**, S. 28425 – 28432.
- Harris, M. N.; Maura, J. D.; Ming, L.-J.; Harwood, V. J. (2001)
Kinetic and mechanistic studies of prolyl Oligopeptidase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*.
J Biol Chem **276**, S. 19310 – 19317.
- Harsha, D. W.; Lin, P.-H.; Obarzanek, E.; Karanja, N.; Moore, T.; Caballero, B. (1999)
Dietary approaches to stop hypertension: a summary of study results.
J Am Diet Assoc **99**, S. 35– 39.
- Hartmann, R., Günther, S., Martin, D., Meisel, H., Pentzien, A.-K., Schlimme, E., Scholz, K. (2000)
Cytochemical model systems for the detection and characterization of potentially bioactive milk components.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **52**, S. 61 – 85.
- Hasegawa, M.; Yagi, K.; Iwakawa, S.; Hirai, M. (2001)
Chitosan induces apoptosis via caspase-2 activation in bladder tumor cells.
Jap J Cancer Res **92**, S. 459 – 466.
- Hashimoto, K.; Matsunaga, N.; Shimizu, M. (1994)
Effect of vegetable extracts on the transepitheliale perm eability of the human intestinal caco-2 monolayer.
Biosci. Biotech. Biochem. **58**, S. 1345 – 1346.
- Hashimoto, K.; Nakayama, T.; Kawagishi, H., Shimizu, M. (1997)
Biophys. Acta **1323**, S. 281 – 290.
- Hashimoto, K.; Shimizu, M. (1993)
Epithelial properties of human intestinal Caco-2 cells cultured in serum -free medium.
Cytotechnology **13**, S. 175 - 184.
- Hashimoto, K.; Takeda, K.; Nakaqama, T.; Shimizu, M. (1995)
Stabilization of tight junction of intestinal Caco-2 monolayer by milk whey proteins.
Biosci. Biotech. Biochem. **58**, S. 1951 – 1952.
- Hata, Y.; Yamamoto, M.; Ohni, M.; Nakajima, K.; Nakamura, Y.; Takano, T. (1996)
A placebo controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects.
Am. J. Clin. Nutr. **64**, S. 767 – 771.
- Hauri, H.-P.; Sterchi, E. E.; Bienz, D.; Fransen, J. A. M.; Marxer, A. (1985)
Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells.
J. Cell. Biol. **101**, S. 838 – 851.
- Hazato, T.; Kase, R. (1986)
Isolation of angiotensin I converting enzyme inhibitor from porcine plasma.
Bioch Biophys Res. Com. **139**, S. 52 – 55.
- Hendriks, H. G. C.; Kik, M. J.; Koninks, J. F.; van den Ingh, T. S. G.; Mouwen, J. M. V. (1991)
Binding of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) isolectins to differentiated human colon carcinoma caco-2 cells and
their effect on cellular metabolism.
Gut **32**, S. 196 – 201.

- Hernández-Ledesma, B.; Martín-Álvarez, P. J.; Pueyo, E. (2003)
Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting enzyme activity: influence of the inhibitor type.
J. Agric. Food Chem. **51**, S: 4175– 4179.
- Heyman, M.; Desjeux, J. F. (1992)
Significance of intestinal food protein transport.
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **15**, S. 48– 57.
- Heyman, M.; Ducroc, R.; Densjeux, J.-F.; Morgat, J. L. (1982)
Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro.
Am. J. Physiol. **242**, S. G 558– G 564.
- Heymann, M.; Crain-Denoyelle, A.-M.; Nat, S. K.; Desjeux, J.-F. (1990)
Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line caco-2.
J. Cell. Phys. **143**, S. 391– 395.
- Hidalgo, I. K.; Borchardt, R. T. (1990)
Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2.
Biochim. Biophys. Acta **1028**, S. 25– 30.
- Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T. (1989)
Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.
Gastroenterology **96**, S. 736– 749.
- Hildebrandt, M.; Reuter, W.; Arck, P.; Rose, M.; Klapp, B. (2000)
Guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immunodefence.
Clinical Sci. **99**, S. 93– 104.
- Hoburg, C. H.; de Haas, M.; Von dem Borne, F.; Verhoven, A. J.; Reutlingsperger, C. P. M.; Roos, D. (1995)
Human neutrophils lose their surface FcγRIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro.
Blood **85**, S. 532- 540.
- Hoffmann, L. (2003)
Obst und Gemüse zur Krebsprävention. Eine Auswertung epidemiologischer Studien.
Ernährung im Fokus **3**, S. 99– 105.
- Hollenberg, N. K. (1990)
Management of hypertension: considerations involving cardiovascular risk reduction.
J Cardiovasc Pharmacol **15**, S. 37– 38.
- Hopfner, U. (1987)
Membrane transport mechanisms for hexoses and amino acids in the small intestine.
In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*.
[Johnson, L., Editor] New York: Raven Press, 2. Auflage, S. 1499– 1526.
- Hoshi, T. (1986)
Proton-coupled transport of dipeptides across renal and intestinal brush border membranes.
In: *Ion Gradient-Coupled Transport*.
[Alvarado, F.; Van Os, D. H., Editoren] New York: Elsevier Science Pub. Co., S. 183– 191.
- Hou, W. - C.; Chen, H. - J.; Lin, Y. - H. (2003)
Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification.
J. Agric. Food Chem. **51**, S. 1706– 1709.
- Haupt, J. B.; McMillan, R.; Wein, C.; Page-Dellio, D. (1999)
Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee.
J Rheumatol **26**, S. 2423– 2430.
- Howell, S.; Kenny, A.J.; Turner, A. J. (1992)
A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29.
Biochem. J. **284**, S. 595– 601.
- Hughes, T. E.; Sasak, W. V.; Ordovas, J. M.; Forte, T. M.; Lamon-Fava, S.; Schaefer, E. J. (1987)
A novel cell line (Caco-2) for the study of intestinal lipoprotein synthesis.
J. Biol Chem **262**, S. 3762– 3767.
- Huhtala, A.; Alajuuja, P.; Burgalassi, S.; Chetoni, P.; Diehl, H.; Engelke, M.; Marselos, M.; Monti, D.; Pappas, P.; Saetone, M. F.; Salminen, L.; Sotiropoulou, M.; Tahti, H.; Uusitalo, H.; Zorn-Kruppa, M. (2003)
A collaborative evaluation of the cytotoxicity of two surfactants by using the human corneal epithelial cell line and the WST-1 test.
J Ocul Pharmacol Ther **19**, S. 11– 21.

- Hunter, J.; Hirst, B. H.; Simmons, N. L. (1993)
Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers.
Pharm. Res. **10** (5), S. 743–749.
- Hussein, A. (2000)
Guidance for Industrie: Waiver of in-vivo bioviability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system.
U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
- Inaba, T.; Alexander, J. W.; Ogle, J. D.; Ogle, C. K. (1999)
Nitric oxide promotes the internalization and passage of viable bacteria through cultured Caco-2 intestinal epithelial cells.
Shock **11**, S. 276–282.
- Inoue, K.; Shirai, T.; Ochiai, H.; Kasao, M.; Hayakawa, K.; Kimura, M.; Sansawa, H. (2003)
Blood pressure lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives.
Eur. J. Clin. Nutrition **57**, S. 490–495.
- Intersalt Cooperative Research Group (1988)
Intersalt: An international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 h urinary sodium and potassium excretion.
BMJ **297**, S. 319–328.
- Ishiyama, M.; Tominaga, H.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Ohkura, Y.; Ueno, K. (1996)
A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet.
Biol Pharm Bull. **19**, S. 1518–1520.
- Iso, H.; Stamper, M.; Manson, J.; Rexrode, K.; Hennekens, R.; Colditz, G.; Speizer, E.; Willett, W. (1999)
Prospective study of calcium, potassium, and magnesium intake and risk of stroke in women.
Stroke **30**, S. 1772–1779.
- Janssen, K. -P. (2004)
Altered signal transduction and chromosomal instability in colorectal carcinogenesis: what turns an intestinal epithelial cell into a cancer cell?
Zellbiologie aktuell **30**, S. 21–22.
- Johnston, C. I. (1992)
Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control.
J. Hypert. **10**, S. S13–S26.
- Johnston, C. I.; Burrell, L. M. (1995)
Evolution of blockade of the renin-angiotensin system.
J. Hum. Hypertens **9**; S. 375–380.
- Kaiser, T. (1999)
Zellkulturtest für den täglichen Gebrauch.
LaborPraxis; Heft 10/99, S. 50–52.
- Kajimoto, O.; Nakamura, Y.; Yada, H.; Moriguchi, S.; Hirata, H.; Takahashi, T. (2001)
Hypotensive effects of sour milk in subjects with mild or moderate hypertension.
J Jpn Soc Nutr Food Sci **54**, S. 347–354.
- Karaki, H.; Doi, K.; Sugano, S.; Uchiwa, H.; Sugai, R.; Murakami, U.; Takemoto, S. (1990)
Antihypertensive effect of tryptic hydrolyzate of milk casein in spontaneously hypertensive rats.
Comp. Biochem. Physiol. **96**, S. C 367–371.
- Kasper, H. (2003)
Die chondroprotektive Wirkung von Gelatine.
Med Welt **54**, S. 47–49.
- Katayama, K.; Tomatsu, M.; Kawahara, S.; Yamauchi, K.; Fuchu, H.; Kodama, Y.; Kawamura, W.; Muguruma, M. (2004)
Inhibitory profile of nonapeptide derived from porcine troponin C against angiotensin I converting enzyme.
J. Agric. Food Chem. **52**, S. 771–775.
- Kawakami, A.; Inbe, R.; Kayahara, H.; Horii, A. (1995)
Preparations of enzymatic hydrolysates of buckwheat globulin and their angiotensin converting enzyme inhibitory activities.
Current advances in buckwheat research, S. 927–934.
- Kawamoto, R.; Kohara, K.; Tabara, Y.; Miki, T. (2002)
An interaction between systolic blood pressure and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on carotid atherosclerosis.
Hypertens Res **25**, S. 875–880.

- Kawasaki, T.; Dela C. S.; Bartter, F. C.; Smith, H. (1978)
The effect of high sodium and low sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension.
Am. J. Med. **64**, S. 193–198.
- Kawasaki, T.; Seki, E.; Osajima, K.; Yoshida, M.; Asada, K.; Matsui, T.; Osajima, Y. (2000)
Antihypertensive effect of Val-Tyr, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolysate, on mild hypertensive subjects.
J Human Hypertension **14**, S. 519–523.
- Kawase, M.; Hashimoto, H.; Hosoda, M.; Morita, H.; Hosono, A. (2000)
Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure.
J. Dairy Sci **83**, S. 255–263.
- Kennedy, D. J.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V.; Thwaites, D. T. (2002)
Optimal absorptive transport of the dipeptide glycylsarcosine is dependent on functional Na⁺/H⁺ exchange activity.
Pflugers Arch. **445**, S. 139-146.
- Kennefick, S.; Cashman, K. D. (2000)
Inhibitory effect of wheat fibre extract on calcium absorption in Caco-2 cells: evidence for a role of associated phytate rather than fibre per se.
Eur. J. Nutr. **39**, S. 12–17.
- Kerb, R.; Hoffmeyer, S.; Brinkmann, U. (2001)
ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR 1, MRP1 and MRP2.
Pharmacogenomics **2** (1), S. 51–64.
- Kies, C. (1981)
Bioavailability: A factor in protein quality.
J. Agric. Food Chem. **29**, S. 435–440.
- Kim, D.-C.; Burton, P. S.; Borchardt, R. T. (1993)
A correlation between the permeability characteristics of a series of peptides using an in situ perfused rat ileum model of the intestinal mucosa.
Pharm. Res. **10**; S. 1710–1714.
- Kim, H. J.; Moon, S. M.; Ham, K. S.; Park, Y. K.; Kang, S. G. (2001)
Purification and characterization of ACE inhibitors from fermented anchovy sauce.
Nutraceuticals & Functional Foods, IFT Annual Meeting, New Orleans, Louisiana.
- Kim, S.-K., Byun, H.-G., Park, P.-J., Shahidi, F. (2001)
Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatine hydrolysate.
J. Agric. Food Chem. **49**, S. 2992–2997.
- Kles, K. A.; Wallig, M. A.; Tappenden K. A. (2001)
Luminal nutrients exacerbate intestinal hypoxia in the hyperfused jejunum.
J. Parenter. Enteral Nutr. **25**, S. 246–253.
- Knütter, J.; Hartrodt, B.; Theis, S.; Foltz, M.; Rastetter, M.; Daniel, H.; Neubert, K.; Brandsch, M. (2004)
Analysis of the transport properties of side chain modified dipeptides at the mammalian peptide transporter PEPT1.
Eur. J. Pharm. Sciences
- Knütter, J.; Theis, S.; Hartrodt, B.; Born, I.; Brandsch, M.; Daniel, H.; Neubert, K. (2001)
A novel inhibitor of the mammalian peptide transporter PEPT1.
Biochemistry. **40**, S. 4454–4458.
- Koechelin, N.; Pissam M.; Poujeol, P.; Tauc, M.; Rambourg, A. (1991)
Conversion of a rabbit proximal convoluted tubule (PCT) into a cell monolayer: ultrastructural study of cell differentiation and redifferentiation.
Eur J Cell Biol. **54**, S. 224–236.
- Konishi, Y., Hagiwara, K., Shimizu, M. (2002)
Trans epithelial transport of fluorescein in caco-2 monolayers and use of such transport in *in vitro* evaluation of phenolic acid availability.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**, S. 2449–2457.
- Konishi, Y., Kobayashi, S., Shimizu, M. (2003 b)
Tea polyphenols inhibit the transport of dietary phenolic acids mediated by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal caco-2 cell monolayers.
J. Agric. Food Chem. **51**, S. 7296–7302.
- Konishi, Y., Shimizu, M. (2003)
Trans epithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **67**, S. 856–862.

- Konishi, Y.; Kubo, K.; Shimizu, M. (2003 a)
Structural effects of phenolic acids on the transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers.
- Konstantinov, K. B. (1996)
Monitoring and control of the physiological state of cell cultures.
Biotech Bioeng **52**, S. 271 – 289.
- Korhonen, H.; Pihlanto, A. (2003)
Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry.
Austr. J Dairy Tech **58**, S. 129 - 134.
- Kottra, G.; Stamford, A.; Daniel, H. (2002)
PEPT1 as a paradigm for membrane carriers that mediate electrogenic bidirectional transport of anionic, cationic and neutral substrates.
J Biol Chem. **277**, S. 32683 - 32691.
- Kraus, Ch. ;Schwarz, E. (2001)
Funktionsfähige Knochen und Gelenke bis ins hohe Alter.
Proteva Food AG, S. 3 – 64.
- Krönig, B. (2004)
Nicht medikamentöse Therapie bei Hypertonie.
EU **51**, S. 58– 61.
- Kühnel, W. (1999)
Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie.
10. überarb. u. erweít. Aufl. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 250 Seiten.
- Kwon, Y. S.; Lee, H. G.; Shin, H.-K., Yang, C.-B. (2000)
Purification and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from small red bean protein hydrolysate.
Food Sci Biotechnol **9**, S. 292 – 296.
- Lambeir, A. M.; Durinx, C.; Scharpe, S.; De Meester, I. (2003)
Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, clinical aspects of the enzyme DPP IV.
Crit Rev Clin Lab Sci. **40**, S. 209 – 294.
- Le Bivic, A.; Quaroni, A.; Nichols, B.; Rodriguez-Boulan, E. (1990)
Biogenic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line.
J. Cell. Biol. **111**, S. 1351– 1361.
- Le, M. T., Vanderheyden, P. M. L., Szaszak, M., Hunyady, L., Vauquelin, G. (2002)
Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT₁ receptors.
J Biol Chem **277**, S. 23107 - 23110.
- Leclerc, P.-L., Gauthier, S. F., Bachelard, H., Santure, M., Roy, D. (2002)
Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by lactobacillus helveticus.
Int Dairy J **12**, S. 995– 1004.
- Lee, S. H.; Song, K. B. (2003)
Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptid from irradiated bovine blood plasma protein hydrolysates.
J. Food Scie **68**, S. 2469 – 2472.
- Leist, M.; Brigelius-Flohé, R.; Raab, B.; Maurer, S.; Rösick U. (1996)
Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidants and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity.
Free Radic Biol Med **21**, S. 297- 306.
- Li, J.; Tamura, K.; Lee, C. P.; Smith, P. L.; Borchardt, R. T., Hidalgo, I. J. (1998)
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**, S. 317– 327.
- Lindl, Toni; Bauer, J. (1994)
Zell- und Gewebekultur.
3. überarb. u. erweít. Aufl., G. Fischer Verlag, Stuttgart, 250 Seiten.
- Lium Y.; Hu, M. (2002)
Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model.
Drug Metab Dispos **30**, S. 370 - 377.
- Löffler, G.; Petrides, P. E. (1997)
Biochemie und Pathobiochemie.
5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1155 Seiten.

- Lohmander, L. S.; Dalen, N.; Englund, G.; Mamalainen, M.; Jensen, E. M.; Karlsoson, K. (1996)
Hyaluronan multicenter trial group intra-articular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo controlled multicenter trial.
Ann. Rheum Dis **55**, S. 424– 431.
- Loshak, D. (2002)
Risk factor-gene interaction could help predict atherosclerosis.
Hypertens Res **25**, S. 875– 880.
- Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, A.; Randall, R. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
Journal of Biochemistry **193**, S. 265 - 275.
- Ma, T. Y.; Cyer, D. L.; Said, H. M. (1994)
Human intestinal cell line Caco-2: A useful model for studying cellular and molecular regulation of biotin uptake.
Biochim. Biophys. Acta **1189**, S. 81 – 88.
- Mackay, A.; Kominiczak, A. F. (1998)
A review of the interactions between angiotensin II and other factors associated with endothelial dysfunction in hypertension and atherosclerosis.
ACE Report **134**, S. 7.
- Madara, J. L. (1988)
Tight junctions dynamics: is paracellular transport regulated?
Cell **53**, S. 497– 498.
- Madara, J. L.; Pappenheimer, J. R. (1987)
Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia.
J. Membr. Biol **100**, S. 149– 164.
- Maes, M.; Goossens, F.; Scharpe, S.; Meltzer, H. Y.; D'Hondt, P.; Cosyns, P. (1994)
Lower serum prolyl endopeptidase enzyme activity in major depression: further evidence that peptidases play a role in the pathophysiology of depression.
Biol Psychiatry **35**, S. 545– 552.
- Maes, W.; Van Camp, J.; Vermeirssen, V.; Hemeryck, M.; Ketelslegers, J. M.; Schrezenmeir, J.; Van Osstveldt, P.; Huyghebaert, A. (2003)
Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on release of endothelin-1 by endothelial cells.
Regul Peptides **118**, S. 105 – 109.
- Mahe, S.; Tome, D.; Dumontier, A.-M.; Desjeux, J. F. (1989)
Absorption of intact β -casomorphin (β -CM) in rabbit ileum in vitro.
Reprod. Nutr. Develop **29**, S. 725– 733.
- Mahfoud, R.; Maresca, M.; Garmy, N.; Fantini, J. (2002)
The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathion.
Toxicology and applied Pharmacology **181**, S. 209 – 218.
- Mandara, J. L.; Barenberg, D.; Carlson, S. (1986)
Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: Further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity.
J. Cell Biol. **102**, S. 2125– 2136.
- Maroux, S.; Louvard, D.; Baratti, J. (1973)
The aminopeptidase from hog intestinal brush border.
Biochim. Biophys Acta **321**, S. 282 – 295.
- Margues-Vidal, P.; Montaye, M.; Haas, B.; Bingham, A.; Evans, A.; Juhan-Vague, I.; Ferrières, J.; Luc, G.; Amouyel, P.; McMaster, D.; Ruidavets, J. B.; Bard, J.-M.; Scarabin, P. Y.; Ducimetière, P. (2000)
Association of hypertensive status and its drug treatment with lipid and haemostatic factors in middle-aged men: the PRIME study.
J. Human Hypertension **14**, S. 511– 518.
- Martin, A.; Clynes, M. (1991)
Acid phosphatase: Endpoint for in vitro toxicology tests.
In Vitro Cell Dev. Biol. **27 A**, S. 183– 184.
- Maruyama, S.; Mitachi, H.; Awaya, J.; Suzuki, H. (1987)
Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of κ -casein.
Agric. Biol. Chem. **51**, S. 2557.
- Maruyama, S.; Miyoshi, S.; Kaneko, T.; Tanaka, H. (1989)
Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein.
Agric. Biol. Chem. **53**, S. 177 – 1081.

- Maruyama, S.; Nakagome, K.; Tomizuka, N.; Suzuki, H. (1985)
Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein.
II Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats.
Agric. Biol. Chem. **49**, S. 1405 - 1409.
- Masuda, O.; Nakamura, Y.; Takano, T. (1996)
Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats.
J. Nutr. **126**, S. 3063– 3068.
- Matsufuji, H.; Matsui, T. Seki, E.; Osajima, K.; Makashima, M.; Osajima, Y. (1994)
Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **58**, S. 2244– 2245.
- Matsui, T.; Li, Ch.-H.; Tanaka, T.; Maki, T.; Osajima, Y.; Matsumoto, K. (2000)
Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma.
Biol Pharm Bull **23**, S. 427 – 431.
- Matsui, T.; Lie, C. H.; Osajima, Y. (1999)
Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I converting enzyme inhibition from wheat germ.
J. Peptide Sci. **5**, S. 289– 297.
- Matsui, T.; Matsufuji, H.; Seki, E.; Osajima, K.; Makashima, M.; Osajima, Y. (1993)
Inhibition of angiotensin I converting enzyme by *Bacillus licheniformis* Alkaline Protease hydrolyzates derived from sardine muscle.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **57**, S. 922– 925.
- Matsui, T.; Matsumoto, K. (2000)
Physiological functions of food components: Analytical evaluation of complex functional food matrices.
Bunseki. Kagaku. **49**, S. 477 – 491.
- Matsui, T.; Tamaya, K.; Kawasaki, T.; Osajima, Y. (1999)
J Chromatogr B **729**, S. 89– 95.
- Matsui, T.; Tamaya, K.; Matsumoto, K.; Osajima, Y.; Kawasaki, T. (1999)
Plasma concentration of angiotensin metabolites in young male normotensive and mild hypertensive subjects.
Hypertens Res **22**, S. 273 – 277.
- Matsui, T.; Tamaya, K.; Matsumoto, K.; Seki, E.; Osajima, K.; Kawasaki, T. (2000)
The bioavailability of antihypertensive small peptide, Val-Tyr, in human.
J. Hypertension **18**, S. 87.
- Matsui, T.; Tamaya, K.; Seki, E.; Osajima, K.; Matsumoto, K.; Kawasaki, T. (2002)
Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system.
Clin. Exp. Pharm. Physiol. **29**, S. 204– 208.
- Matsui, T.; Yuki Yoshi, A.; Doi, S.; Sugamoto, H.; Yamada, H.; Matsumoto, K. (2002)
Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR.
J. Nutr. Biochem. **13**, S. 80– 86.
- Matsumoto, H.; Erickson, R. H.; Gum, J. R.; Yoshioka, M.; Gum, E.; Kim, Y. S. (1990)
Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2.
Gastroenterology **98**, S. 1198– 1207.
- Matsumoto, H.; Erickson, R.; Gum, J.; Yoshioka, M.; Gum, E.; Kim, Y. (1990)
Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line caco-2.
Gastroenterology **98**, S. 1199 - 1207.
- Matsumoto, M., Hosono, A. (2000)
Study of angiotensin I converting enzyme from bacteria found on buckwheat seeds.
Ital. J. Food Sci. **4**, S. 451– 456.
- Matter, K.; Balda, M. S. (2003)
Signalling to and from tight junctions.
Molecular Cell Biology **4**, S. 225– 236.
- Matter, K.; Stieger, B.; Klumpermann, J.; Ginsel, L.; Hauri, H.-P. (1990)
Endocytosis, recycling, and lysosomal delivery of brush border hydrolases in cultured human intestinal epithelial cells caco-2.
J. Biol. Chem. **265**, S. 3503– 3512.
- Matthew, D. M. (1983)
Intestinal absorption of peptides.
Biochemical Society Transaction **11**, S. 808– 810.

- Matthies, H.; Stark, H.; Hartrodt, B.; Ruethrich, H. L.; Spieler, H. T.; Barth, A.; Neubert, K. (1984)
Peptides **5**, S. 463–470.
- Mattila-Sandholm, T.; Blum, S.; Collins, J. K.; Crittenden, R.; de Vos, W.; Dunne, C.; Fondén, R.; Grenov, G.; Isolauri, E.; Kiely, B.; Marteau, P.; Morelli, L.; Ouwehand, A.; Reniero, R.; Saarel, M.; Saminen, S.; Saxelin, M.; Schiffrin, E.; Shanahan, F.; Vaughan, E.; von Writth, A. (1999)
Probiotics: towards demonstrating efficacy.
Trends in Food Science und Technology **10**, S. 393–399.
- Mazzetti, L.; Grigolo, B.; Pusatelli, L.; Dolzani, P.; Silvestri, T.; Roseti, L.; Meliconi, R.; Facchini, A. (2001)
Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis.
Clin Sci **101**, S. 593–599.
- McCarron, D. A. (1998)
Diet and blood pressure. The paradigm shift.
Science **281**, S. 933–934.
- McCarron, D. A.; Morris, C. D. (1985)
Blood pressure response to oral calcium in persons with mild to moderate hypertension.
Amn. Intern. Med. **103**, S: 825–831.
- McCarron, D. A.; Morris, D. D.; Henly, H. J. (1984)
Blood pressure and nutrient intake in the United States.
Science **224**, S. 1392–1398.
- McIntosh, G. H. (2003),
Dairy foods and colon cancer prevention.
Austr J Dairy Tech **58**, S. 140–143.
- Meisel, H. (1995)
Application of fourth derivative spectroscopy to quantitation of whey protein and casein in total milk protein.
Milchwissenschaft **50**, S. 247 - 251.
- Meisel, H. (1997)
Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins.
Inc. Biopoly **43**, S. 119–128.
- Meisel, H. (1998)
Overview on milk protein-derived peptides.
Int. Dairy Journal **8**, S. 363–373.
- Meisel, H. (2001)
Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers.
The Australian Journal of Dairy Technology **56**, S. 83–92.
- Meisel, H., Günther, S. (1998)
Food proteins as precursors of peptides modulating human cell activity.
Nahrung/Food **42**, S. 175- 176.
- Meisel, H., Günther, S., Martin, D., Schlimme, E. (1998)
Apoptosis induced by modified ribonucleosides in human cell culture systems.
FEBS Lett. **433**, S. 265–268.
- Meisel, H.; Bernard, H.; Fairweather-Tait, S.; FitzGerald, R. J.; Hartmann, R.; Lane, D. N.; McDonagh, D.; Teucher, B.; Wal, J. M. (2003)
Brit J Nutr **89**, .s 351–358.
- Meisel, H.; Bockelmann, W. (1999)
Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties.
Antonie van Leeuwenhoek **76**, S. 207–215.
- Meisel, H.; FitzGerald, R. J. (2000)
Opioid peptides encrypted intact milk protein sequences.
Brit J Nutr **84**, S. 37–31.
- Meisel, H.; FitzGerald, R. J. (2003)
Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects.
Current Pharmaceutical Design **9**, S. 1289–1295.
- Meisel, H.; Goepfert, A., Günther, S. (1997)
ACE-inhibitory activities in milk products.
Milchwissenschaft **52**, S. 307 - 311.
- Meisel, H.; Günther, S.; Martin, D.; Schlimme, E. (1998)
Apoptosis induced by modified ribonucleosides in human cell culture systems.
FEBS Letters **433**, S. 265 - 268.

- Meisel, H.; Walsh, D.; Murray, B., FitzGerald, R. J. (2005)
ACE inhibitory peptides.
In: *Nutraceutical Proteins and peptides in health and disease*.
[Mine, Y.; Shahidi, F., Editoren], Marcel Dekker, Inc., New York, in press.
- Meredith, D.; Boyed, C. A. (1995)
Oligopeptide transport by epithelial cells.
J Membr Biol **145**, S. 1–12.
- Michael, S.; Thole, M.; Dillmann, R.; Fahr, A.; Drewe, J.; Fricker, G. (2000)
Improvement of intestinal peptide absorption by a synthetic bile acid derivative, cholylsarcosine.
Eur J Pharma Sci **10**, S. 133–140.
- Miyoshi, S.; Ishikawa, H.; Kaneko, T.; Fukui, F.; Tanaka, H.; Maruyama, S. (1991)
Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an a-zein hydrolysate.
Agric. Biol. Chem. **55**, S. 13113–13118.
- Mizuno, K.; Niimura, S.; Katoh, K.; Fukuchi, S. (1994)
TCV-116, a newly developed angiotensin II receptor antagonist, induces regression of cardiac hypertrophy through suppression of the tissue renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats.
Life Sci. **54**, S. 1987–1994.
- Moran, J. P.; Cohen, L.; Green, J. M. (1993)
Plasma ascorbic acid concentrations relate inversely to blood pressure in human subjects.
Am J Clin Nutr **57**, S. 213–217.
- Morganti, P. (1984)
Nutrition and hair.
J. Appl. Cosmetol. **2**, S. 41–49.
- Moskowitz, D. W. (2002)
Is angiotensin I-converting enzyme a "master" disease gene?
Diabetes Technol Ther **4**, S. 683–711.
- Moskowitz, D. W. (2002)
Is "somatic" angiotensin-I-converting enzyme a mechanosensor?
Diabetes Technol Ther **4**, S. 841–858.
- Moyer, M. P. (1983)
Culture of human gastrointestinal epithelial cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **174**, S. 11–15.
- Mukherjee, T.; Squillante, E.; Gillespie, M., Shao, J. (2004)
Transepithelial electrical resistance is not a reliable measurement of the caco-2 monolayer integrity in Transwell.
Drug Delivery **11**, S. 11–18.
- Mullally, M. M.; Meisel, H.; FitzGerald, R. J. (1997)
FEBS Lett **402**, S. 99–101.
- Murakami, M.; Tonouchi, H.; Takahashi, R.; Kitazawa, H.; Kawai, Y.; Negishi, H.; Saito, T. (2004)
Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -Lactosin B) isolated from a commercial whey product.
J. Dairy Sci. **87**, S. 1967–1974.
- N. N. (1997)
The sixth report of the joint national committee on prevention, detection, and treatment of high blood pressure.
Arch. Intern. Med. **157**, S. 2413–2446.
- N. N. (2003)
Nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben bei Lebensmitteln.
EU **50**, S. 436–438.
- N. N. (2004)
Pläne für Health Claims gestoppt.
EU **51**, S. 205–206.
- Nagaoka, S.; Miwa, K.; Eto, M.; Kuzuya, Y.; Hori, G.; Yamamoto, K. (1999)
Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cell.
J. Nutr. **129**, S. 1725–1730.
- Nakajima, K.; Hata, Y.; Osono, Y.; Hamura, M.; Kobayashi, S.; Watanuki, M. (1995)
Antihypertensive effect of an extract of Lactobacillus casei in patients with hypertension.
J Clin Biochem Nutr **18**, S. 181–187.
- Nakano, T.; Ozimek, L. (2003)
Analysis of hydroxyproline in yogurt with and without gelatin.
Milchwissenschaft **58**, S. 517–519.

- Nakashima, Y.; Arihara, K.; Sasaki, A.; Mio, H.; Ishikawa, S.; Itoh, M. (2002)
Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats.
J Food Sci **67**, S. 434–437.
- Nathisuwan, S.; Talbert, R. L. (2002)
A review of vasopeptidase inhibitors: A new modality in the treatment of hypertension and chronic heart failure.
Pharmacotherapy **22**, S. 27–42.
- National Heart, Lung, and Blood Institute (2003)
The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure.
Publication No. 03-5233. National Institute of Health, Bethesda, MD.
- Navarro, P.; Aspe, T.; Seiquer, I. (2000)
Zinc transport in Caco-2 cells and zinc balance in rats: influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose mixture.
J. Agric. Food Chem **48**, S: 3589–3596.
- Nerurkar, M. M.; Burton, P. S.; Borchardt, R. T. (1996)
The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system.
Pharm. Res. **13**, S. 528–534.
- Noren, O.; Sjostrom, H.; Josefsson, L. (1993)
Studies on a soluble dipeptidase from pig intestinal mucosa. I. Purification and specificity.
Biochim Biophys Acta **327**, S. 446–456.
- Notarangelo, A. (1997)
Focus **19**, S. 58–59
- Nurminen, M. - L. (2000)
Milk-derived peptides and blood pressure.
IDF Bull. **353**, S. 11–15.
- Nurminen, M. - L.; Sippola, M.; Kaarto, H.; Pihlmat-Leppälä, A.; Piilola, K.; Korpela, R.; Tossavainen, O.; Korhonen, H.; Vapaatalo, H. (2000)
 α -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats.
Life Sci. **66**, S. 1536–1543.
- O'Neil, D. A.; Porter, E. M.; Elewaut, D.; Anderson, G. M.; Eckmann, L.; Ganz, Th.; Kagnoff, M. F. (1999)
Expression and regulation of the human β -defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.
J. Imm. **163**, S. 6718–6724.
- Oberschelp, U. (1985)
Individuelle Arthrosetherapie ist möglich!
Therapiewoche **44**, S. 5094–5097.
- Oesser, St.; Adam, M.; Babel, W.; Seifert, J. (1999)
Oral administration of ^{14}C labeled gelatine hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL).
J. Nutr. **129**, S. 1891–1895.
- Oesser, St.; Seifert, J. (2003)
Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen.
Cell Tissue Res **311**, S. 393–399.
- Ogawa, N.; Satsu, H.; Watanabe, H.; Fukaya, M.; Tsukamoto, Y.; Miyamoto, Y.; Shimizu, M. (2000)
Acetic acid suppresses the increase in disaccharidase activity that occurs during culture of Caco-2 cells.
J. Nutr. **130**, S. 507–513.
- Oh, K. S.; Park, Y. S.; Sung, H. C. (2002)
Expression and purification of an ACE-inhibitory peptide multimer from synthetic DNA in *Escherichia coli*.
J Microbiol Biotechnol **12**, S. 59–64.
- Okuda, H.; Kenji, K.; Morimoto, C.; Matsuura, Y.; Chikaki, M.; Jiang, M. (1998)
Studies on insulin-like substances and inhibitory substances toward angiotensin-converting enzyme in royal jelly.
Honeybee Sci **19**, S. 9–14.
- Okumu, F. W.; Pauletti, G. M.; Vander Velde, D. G.; Siahaan, T. J.; Borchardt, R. T. (1995)
Pharm. Res. **12**, S. 302
- Okumu, F. W.; Pauletti, G. M.; Vander Velde, D. G.; Siahaan, T. J.; Borchardt, R. T. (1997)
Effect of restricted conformational flexibility on the permeation of model hexapeptides across Caco-2 cell monolayer.
Pharm Res **14**, S. 169–175.

- Ondetti, M. A.; Cushman, D. W. (1982)
Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors.
Ann. Rev. Biochem. **51**, S. 283–308.
- Ondetti, M. A.; Rubin, B.; Cushman, D. W. (1997)
Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: a new class of orally active antihypertensive agents.
Science **196**, S. 441–444.
- Ono, Y.; Mizuno, K.; Hashimoto, K.; Gotoh, M. (2000)
Usefulness of genotyping of angiotensin converting enzyme (ACE), plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and platelet activating factor acetylhydrolase (PFA-AH) for predicting efficacy of antihypertensive treatment with ACE inhibitor and angiotensin receptor antagonist.
J. Hypertens. **18**, S. 15.
- Oremek, G. M.; Seiffert, U. B. (1992)
Die Aktivität des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) im Serum und Plasma – ein Methodenvergleich.
Klin. Labor **38**, S. 73–75.
- Oshima, G.; Shimabukuro, H.; Nagasawa, K. (1979)
Peptide inhibitors of angiotensin I converting enzyme in digests of gelatine by bacterial collagenase.
Biochim & Biophys Act **566**, S. 128–137.
- Osiescka, I.; Proter, P. A.; Borchardt, R. T.; Fix, J. A.; Gardner, C. R. (1985)
In vitro drug absorption models. Brush border membrane vesicles, isolated mucosal cells and everted intestinal rings: Characterization and salicylate accumulation.
Pharm. Res. **2**, S. 284–293.
- Paolisso, G.; Gambardella, A.; Verza, M.; D'Amore, A.; Sgambato, S.; Varricchio, M. (1992)
ACE inhibition improves insulin-sensitivity in aged insulin-resistant hypertension patients.
J Hum Hypertens **6**, S. 175–179.
- Pappenheimer J. R. (1987)
Physiological regulation of transepithelial impedance in the intestinal mucosa of rats and hamsters.
J. Membr. Biol. **100**, S. 137–148.
- Pappenheimer, J. R.; Dahl, C. E.; Karnovsky, M. L.; Maggio, J. E. (1994)
Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D-amino acids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, S. 1942–1945.
- Parodi, P. W. (2003)
Austr J Dairy Tech **58**, S. 114–118.
- Parrot, S.; Degraeve, P.; Curia, C.; Martial-Gros, A. (2003)
In vitro study on digestion of peptides in emmental cheese: analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides.
Nahrung/Food **47**, S. 87–94.
- Partsch, G.; Schwarzer, C.; Neumüller, J.; Dunky, A.; Petera, P.; Broll, H.; Ittner, G.; Jansch, S. (1989)
Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells by hyaluronic acid.
Zeitschrift für Rheumatologie **48**; S. 123–128.
- Patten, R. D.; Aronovitz, M. J.; Einstein, M.; Lambert, M.; Pandian, N. G.; Mendelsohn, M. E.; Konstam, M. A. (2003)
Effects of angiotensin II receptor blockade versus angiotensin-converting enzyme inhibition on ventricular remodelling following myocardial infarction in the mouse.
Clin Sci **104**, S. 109–118.
- Pauletti, G. M.; Gangwar, S.; Wang, B.; Borchardt, R. T. (1997)
Pharm. Res. **14**, S. 11–17
- Pauletti, G. M.; Okumu, F. W.; Vander Velde D. G.; Siahaan, T. J.; Borchardt, R. T. (1996)
Pharm. Res. **13**; S. –235
- Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C. (2000)
A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1).
Clin Chim Acta **293**, S. 157–166.
- Peterson, M. D.; Mooseker, M. S.; (1992)
Characterization of the enterocyte-like brush-border cytoskeleton of the C2bbe clones of the human intestinal cell line Caco-2.
J. Cell Sci. **102**, S. 581–600.
- Petzold, E.; Richter, W.; Karschunke, H.-J. (1985)
Nebenwirkungen nichtsteroidaler und steroidaler antientzündlicher Pharmaka auf den Knorpelstoffwechsel-Erkenntnisse aus der Forschung und Praxis.
Z. Alternsforsch. **4**, S. 153–159.

- Phan, D. D.; Chin-Hong, P.; Lin, E. T.; Anderle, P.; Sadee, W.; Guglielmo¹, B. J. (2003)
Intra- and interindividual variabilities of valacyclovir oral bioavailability and effect of coadministration of an hPEPT1 inhibitor.
Antimicrob Agents Chemother **47**, S. 2351 – 2353.
- Phillips, T. E.; Phillips, T. L.; Neutra, M. (1987)
Macromolecules can pass through occluding junctions of rat ileal epithelium during cholinergic stimulation.
Cell Tissue Res. **247**, S. 547 – 554.
- Piggott, C. O.; Fottrell, P. F. (1975)
Purification and characterization from guinea-pig intestinal mucosa of two peptide hydrolases which preferentially hydrolyze dipeptides.
Biochim Biophys Acta **391**, S. 403 – 409.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001)
Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides.
Trends Food Sci & Tech **11**, S. 347 – 356.
- Pihlanto-Leppälä, A.; Rokka, T.; Korhonen, H. (1998)
Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins.
Int Dairy J **8**, S. 325 – 331.
- Pins, Joel J.; Keenan, Joseph M. (2002)
The antihypertensive effects of a hydrolyzed whey protein isolate supplement (Biozate[®] 1)
Cardiovascular drugs and therapy **16**, S. 68.
- Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M.-D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussault, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; Zweibaum, A. (1983)
Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture.
Biology of the Cell **47**, S. 323 – 330.
- Playne, M. J.; Bennett, L. E.; Smithers, G. W. (2003)
Functional dairy foods and ingredients.
The Australian Journal of Dairy Technology **58**, S. 242 – 264.
- Pollare, T.; Lithel, H.; Berne, C. A. (1989)
A comparison of the effects of hydrochlorothiazide and captopril on glucose and lipid metabolism in patients with hypertension.
N Engl J Med **321**, S. 868 – 873.
- Prado, G. N.; Taylor, L.; Zhou, X.; Ricupero, D.; Mierke, D.; Pogar, P. (2002)
Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signalling-function of the Bradykinin B2 und B1 receptors.
J Cell Phys **193**, S. 275 – 286.
- Prockop, D. J.; Deiser, H. R.; Sjoerdsma, A. (1962)
Gastrointestinal absorption and renal excretion of hydroxyproline peptides.
Lancet **2**, S. 527 – 528.
- Prockop, D. J.; Udenfriend, M. (1960)
A specific method for analysis of hydroxyproline in tissues and urine.
Anal. Biochem. **1**, S. 228 – 239.
- Rangachari, P. K.; Berezin, M.; Prior, T. (1993)
Effects of bradykinin on the canine proximal colon.
Regu. Pept. **46**, S. 511 – 522.
- Reaux, A.; Iturrioz, X.; Vazeux, G.; Fournie-Zaluski, M.-C.; David, C.; Roques, B. P.; Corvol, P.; Llorens-Cortes, C. (2000)
Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure.
Biochem Society Transact **28**, S. 435 - 440
- Reddy, M. B.; Cook, J. D. (1991)
Assessment of dietary determinants on nonheme-iron absorption in humans and rats.
Am. J. Clin. Nutr. **54**, S. 723 – 728.
- Regan, P. T.; Go, V. L. W.; DiMagno, E. P. (1980)
Comparison of the effects of cholecystokinin and cholecystokinin octapeptide on pancreatic secretion, gallbladder contraction, and plasma pancreatic polypeptide in man.
J. Lab. Clin. Med **96**, S. 743 – 748.
- Regester, G. O.; Belford, D. A.; West, R. J.; Goddard, C. (2003)
Development of minor dairy components as therapeutic agents – whey growth factor extract, a case study.
Austr J Dairy Tech **58**, S: 104 – 106.
- Regoli, D.; Gobeil, F.; Nguiyen, Q. T.; Jukic, D.; Seoane, P. R.; Salvino, J. M.; Sawutz, D. G. (1994)
Bradykinin receptor types and B₂ subtypes.
Life Sci. **55**, S. 735 – 749.

- Rehner, G.; Daniel, H. (1999)
Biochemie der Ernährung.
Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, 551 Seiten.
- Reynolds, E. C. (2003)
Dairy components in oral health.
Austr J Dairy Tech **58**, S. 79– 81.
- Rieger, M. A.; Parlesak, A., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Bode, C. (1999)
A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of „fecal water“.
Carcinogenesis **20**, S. 2311– 2316.
- Riley, S. A.; Warhust, G.; Crowe, P. T.; Tumberg, L. A. (1991)
Active hexose transport across cultured human Caco-2 cells: Characterization and influence of culture conditions.
Biochim. Biophys. Acta. **1066**, S. 175– 182.
- Rindler, M. J.; Traber, M. G. (1998)
A specific sorting signal is not required for the polarised secretion of newly synthesised proteins from cultured intestinal cells.
J. Cell Biol. **107**, S. 471– 479.
- Roberts, P. R.; Burney, J. D.; Black, K. W., Zaloga, G. P. (1998)
Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract.
Digestion **60**, S. 332– 337.
- Rocca, T., Syväoja, E.-L., Tuominen, J., Korhonen, H. (1997)
Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of lactobacillus GG fermented UHT milk.
Milchwissenschaft **52**, S. 675 – 677.
- Rose, J. M.; Audus, K. (1998)
Receptor-mediated angiotensin II transcytosis by brain microvessel endothelial cells.
Peptides **19**, S. 1023 – 1030.
- Rosenberg, S. W. (1957)
Further studies in the use of gelatin in the treatment of brittle nails.
AMA Arch Dermatol **76**, S. 330– 335.
- Roy, M. K.; Watanabe, Y.; Tamai, Y. (2000)
Yeast protease B-digested skimmed milk inhibits angiotensin-I-converting enzyme activity.
Biotechnol. Appl. Biochem. **31**, S. 95 – 100.
- Rubio, L. A.; Seiquer, I. (2002)
Transport of amino acids from *in vitro* digested legume proteins or caseins in caco-2 cell cultures.
J. Agric. Food Chem. **50**, S. 5202– 5206.
- Russet, M. (1996)
Human colon carcinoma lines HT-29 and caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation.
Biochemie **68**, S. 1035 – 1040.
- Ryder, S. D., Smith, J. A., Rhods, E. g. H., Parker, N., Rhods, J. M. (1994)
Proliferative responses of HT 29 and Caco-2 human colorectal cancer cells to a panel of lectins.
Gastroenterology **106**, S. 85– 93.
- Saito, H.; Inui, K. (1993)
Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line Caco-2.
Am. J. Physiol. **265**, S. G 289– 294.
- Saito, T.; Nakamura, T.; Kitazawa, H.; Kawai, Y.; Itoh, T. (2000)
Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese.
J Dairy Sci **83**, S: 1434– 1440.
- Saito, Y.; Wanezaki, K.; Kawato, A.; Imayasu, S. (1994)
Structure and activity of Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees.
Biosci. Biotech. Biochem **58**, S. 1767 – 1771.
- Sakakibara, Y.; Takami, Y.; Zwieb, C.; Nakayama, T.; Suiko, M.; Nakajima, H.; Liu, M. - C. (1995)
Purification and characterization, and molecular cloning of a novel rat liver dopa/tyrosine sulfotransferase.
J. Biol. Chem. **270**, S. 30470 – 30478.
- Sanz, Y., Toldrá, F. (2001)
Purification and characterization of an X-Prolyl-Dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus sakei*.
App. Env. Microbiol. **67**, S. 1815– 1820.
- Satake, M.; Enjoh, M.; Nakamura, Y.; Takano, T.; Kawamura, Y.; Arai, S., Shimizu, M. (2002)
Trans epithelial transport of the bioactive Tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 monolayers.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**, S. 378 – 384.
- Sawada, H.; Furushiro, M.; Hirai, K.; Motoike, M.; Watanabe, T.; Yokokura, T. (1990)
Purification and characterization of an antihypertensive compound from *Lactobacillus casei*.
Agric Biol Chem **54**, S. 3209– 3211.

- Scala, J., Hollies, N. R. S.; Sucher, K. P. (1976)
Effect of daily gelatine ingestion on human scalp hair.
Nutr Rep Int **13**, S. 579- 592.
- Schärfe, J. (2004)
Elektronische Zellvitalitätsbestimmung, ein Vergleich mit dem klassischen Trypanblau Assay.
Biospektrum **3**, S. 2- 4.
- Scheppach, W.; Bartram, H. P.; Richter, F. (1995)
Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer.
Eur J Cancer **31 A**, S. 1077– 1080.
- Schirmer, Ch., Meisel, H. (2004)
Aminosäurezusammensetzungen verschiedener Konsummilchen.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **56**, S. 5–23.
- Schlechte, W.; Brattain, M.; Boyd, D. (1990)
Invasion of extracellular matrix by cultured colon cancer cells: Dependence on urokinase receptor display.
Cancer Communications **2**, S. 173– 179.
- Schmidl, M. K. (1993)
Food products for medical purposes.
Trends in Food Science and Technology **4**, S. 163 – 168.
- Schmiegelow, P.; Puschmann, M.; Geise, U. (1984)
Wirkstoffnachweis von ³⁵S-markiertem L-Cystin im Gelenkknorpel, in der Zwischenwirbelscheibe sowie der Skelettmuskulatur.
Therapiewoche **34**, S. 428– 432.
- Schusdziarra, V.; Schick, R.; Fuente, A.; Holland, A.; Brantl, V.; Pfeiffer, E. F. (1983)
Effect of β -casomorphins and analogs on insulin release in dogs.
Endocrinology **112**, S. 1948– 1951.
- Schusdziarra, V.; Schick, R.; Fuente, A.; Specht, J.; Klier, M.; Brantl, V.; Pfeiffer, E. F. (1983)
Effect of β -casomorphins on somatostatin release in dogs.
Endocrinology **112**, S. 885– 889.
- Seeligmüller, K. (1989)
Kann eine Gelatine / L-Cystin Mischung die Kollagen- und Proteoglycansynthese stimulieren?
Therapiewoche **39**, S. 3153– 3157.
- Seeligmüller, K.; Happel, K. H. (1993)
Dem Knorpel auf die Sprünge helfen.
Therapiewoche **43**, S. 1810– 1813.
- Seifert, J., Sass, W. (1990)
Intestinal absorption of macromolecules and small peptides.
Dig Dis **8**, S. 169– 178.
- Seiquer, I., Aspe, T., Vaquero, P., Navarro, P. (2001)
Effects of heat treatment of casein in the presence of reducing sugars on calcium bioavailability: *in vitro* and *in vivo* assay.
J. Agric. Food Chem **49**, S. 1049– 1055.
- Sekiya, S.; Kobayashi, Y.; Kita, E.; Imamura, Y.; Toyama, S. (1992)
Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers.
J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci **45**, S. 513– 517.
- Seppo, L.; Jauhiainen, T.; Poussa, T.; Korpela, R. (2003)
A fermented milk, high in bioactive peptides, has a blood pressure lowering effect in hypertensive subjects.
Am. J. Clin. Nutr. **77**, S. 326– 330.
- Seppo, L.; Kerojoki, O.; Suomalainen, T.; Korpela, R. (2002)
The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension – a pilot study on human.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **57**, S. 124 – 127.
- Shah, N. P. (2000)
Effects of milk-derived bioactivities: an overview.
Brit. J. Nutr. **84**, S. 3– 10.
- Shan, L., Molber, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., Khosla, Ch. (2002)
Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue.
Science **297**, S. 2275– 2278.
- Sharpe, S. J.; Gamble, G. D.; Sharpe, D. N. (1994)
Cholesterol-lowering and blood pressure effects of immune milk:
Am J Clin Nutr **59**, S. 929– 934.
- Shen, J. B.; Pappano, A. J. (1995)
Palmitoyl-L-carnitine acts like ouabain on voltage-current and contraction in guinea pig ventricular cells.
Am. J. Physiol. **268**, S. H 1027– H 1036.

- Shen, W. C.; Wan, J.; Ekrami, H. (1992)
Enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytosis and transcytosis.
Adv. Drug Delivery Rev. **8**, S. 93–113.
- Shimizu, M. (1999)
Modulation of intestinal functions by food substances.
Nahrung **43**, S. 154–158.
- Shimizu, M.; Tsunogai, M.; Arai, S. (1997)
Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2.
Peptides **18**, S. 681–687.
- Silagy, C. A.; Neil, A. W. (1994)
A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure.
J Hypertens **12**, S. 463–468.
- Silk, D. B. A. (1980)
Digestion and absorption of dietary protein in man.
Proc. Nutr. Soc. **39**, S. 61–70.
- Sipola, M.; Finckenberg, P.; Korpela, R.; Vapaatalo, H.; Nurminen, M. - L. (2002)
Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats.
J Dairy Res **69**, S. 103–111.
- Sittinger, M.; Buija J.; Rotter, N.; Reitzel, D.; Minuth, W. W.; Burmester, G. R. (1996)
Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques.
Biomaterials **17**, S. 237–242.
- Sittinger, M.; Schultz, O.; Keyszer, G.; Minuth, W. W.; Burmester, G. R. (1997)
Artificial tissues in perfusion culture.
Int J Artificial Organs **20**, S. 57–62.
- Skeggs, L. T.; Kahn, J. E.; Shumway, N. P. (1956)
The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme.
J Exp Med **103**, S. 295–293.
- Smith, J. G.; Yokoyama, W. H.; Germaqn, B. G. (1998)
Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression.
Clin Rev Food Sci **38**, S. 259–297.
- Souci, S.; Fachmann, W.; Kraut, H. (2000)
Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert - Tabellen.
Medpharm GmbH Scientific Publishers, S. 318.
- Sporn, L. A.; Marder, V. J.; Wagner, D. D. (1989)
Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand Factor in endothelial cells.
Journal of Cell Biology **108**, S. 1283–1290.
- Stein, J., Krotta, G. (1997)
Intestinale Schlußleisten.
Z Gastroenterol **35**, S. 205–220.
- Stelzner, T. J.; Weil, J. V.; O'Brien, R. F. (1989)
Role of cyclic AMP in the induction of endothelial barrier properties.
Journal of Cell Physiology **139**, S. 157–166.
- Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S. (2000)
Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation.
Biochim. Biophys. Acta **1477**, S. 296–306.
- Stepaniak, L.; Jedrychowski, L.; Wróblewska, B.; Sorhaug, T. (2001)
Immunoreactivity and inhibition of angiotensin I converting enzyme and lactococcal oligopeptidase by peptides from cheese.
Italian Journal of Food Science **13**, S. 373–381.
- Stieger, B.; Matter, K.; Baur, B.; Bucher, K.; Höchli, M.; Hauri, H. - P. (1988)
Dissection of the asynchronous transport of intestinal microvillar hydrolases to the cell surface.
J. Cell. Biol. **106**, S. 1853–1861.
- Stornello, M.; Di Rao, G.; Iachello, M. (1983)
Hemodynamic and humoral interactions between captopril and nifedipine.
Hypertension **5**, S. 154–156.
- Suetsuna, K. (1998)
Isolation and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor dipeptides from *Allium sativum* L (garlic).
J. Nutr. Biochem. **9**, S. 415–419.

- Suetsuna, K. (2002)
Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of the short-neck clam *Tapes philippinarum* and the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*.
Fisheries Sci., S. 231–235.
- Svensson, M.; Hakansson, A.; Mossberg, A.-K.; Linse, S.; Svanborg, C. (2000)
Conversion of α -Lactalbumin to a protein inducing apoptosis.
PNAS **97**, S. 4221–4226.
- Swaan, P. (1998)
Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways.
Pharm. Res. **15**, S. 828–836.
- Swaan, P. W.; Koops, B. C.; Moret, E. E.; Tukker, J. J. (1998)
Mapping the binding site of the small intestinal peptide carrier (PepT1) using comparative molecular field analysis.
Receptors & Channels. **6**, S. 189–200.
- Swaan, P.; Marks, G. J.; Ryan, F. M.; Smith, P. L. (1994)
Determination of transport rates for arginine and acetaminophen in rabbit intestinal tissues in vitro.
Pharm Res **11**, S. 283–287.
- Swaan, P.; Stehouwer, M. C.; Tukker, J. J. (1995)
Molecular mechanism for the relative binding affinity to the intestinal peptide carrier. Comparison of three ACE-inhibitors: Enalapril, enalaprilat, and Lisinopril.
Biochi & Biophys Act **1236**, S. 31–38.
- Swaan, P.; Tukker, J. J. (1997)
Molecular determinants of recognition for the intestinal peptide carrier.
Pharm. Sci. **86**, S. 596–602.
- Tagawa, K.; Mizobe, M.; Noda, K. (1995)
A saturable tissue Angiotensin I converting enzyme binding model for the pharmacokinetic analysis of Imidapril.
Biol. Pharm. Bull **18**, S. 64–69.
- Takayanagi, T.; Yokotsuka, K. (1999)
Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine.
Am. J. Enol. Vitic. **50**, S. 65–68.
- Tamura, K.; Bhatnagar, P. K.; Takaka, J. S.; Lee, C. P.; Spith, P. L.; Borchardt, R. T. (1996)
Metabolism, uptake, and transepithelial transport of the diastereomers of Val-Val in the human intestinal cell line Caco-2.
Pharm. Res. **13**, S. 1213–1218.
- Tan, A. S.; Berridge, M. V. (2000)
Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents.
J Immunol Methods **21**, S. 59–68.
- Tauzin, J.; Miclo, L.; Gaillard, J. - L. (2002)
Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{s2} -casein.
FEBS Lett **531**, S. 369–374.
- Taylor, C. L. (2004)
Regulatory frameworks for functional foods and dietary supplements.
Nutrition Reviews **62**, S. 55–59.
- Thiel, G. B.; Benoit, F. L.; Watten, R. H. (1963)
An oral gelatin-xylose test for estimating pancreatic proteolytic activity.
Amer. J. Dig. Dis. **8**, S. 1008–1016.
- Timmermanns, G.; Kadmon, M.; Möslein, G.; Buhr, H. J.; Herfarth, Ch. (1994)
Das Heidelberger Polyposis-Register – Extrakolonische Manifestation der familiären adenomatösen Polyposis im oberen GI-Trakt.
In: *Krebsrisikofaktoren des Verdauungstraktes*.
[Häring, R., Editor], Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, S.109–115.
- Tobey, N.; Heizer, W.; Yeh, R.; Huang, T.-I., Hoffner, C. (1985)
Human intestinal brush border peptidases
Gastroenterology **88**, S. 913–926.
- Tome, D.; Dumontier, A.-M.; Hautefeuille, M.; Desjeux, J. F. (1987)
Opiate activity and transepithelial passage of intact β -casomorphins in rabbit ileum.
Am. J. Physiol. **253**, S. G 737–744.
- Towheed, T. E. (1998)
Glucosamine sulfate in osteoarthritis: a systematic review.
Arthritis Rheum **41**, S. 198

- Traganos, F.; Kapuscinski, J.; Gong, J.; Ardelt, B.; Darzynkiewicz, R.; Darzynkiewicz, Z. (1993)
Caffeine Prevents apoptosis and cell cycle effects induced by camptothecin or topotecan in HL-60 cells.
Cancer Research **53**, S. 4613 - 4618.
- Trentham, D. E.; Dynesius-Trentham, R. A.; Orav, E. J.; Combitchi, D.; Lorenzo, C.; Sewell, K. L.; Hafler, D. A.;
Weiner, H. L. (1993)
Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis.
Science **261**, S. 1727– 1730.
- Trier, J. S.; Madara, J. L. (1989)
Functional morphology of the mucosa of the small intestine.
In: *Physiology of gastrointestinal tract*.
[Johnson, L. R., Editor] New York: Raven, S. 925– 958.
- Tsuiji, A.; Tamai, I. (1996)
Carrier-mediated intestinal transport of drugs.
Pharm. Res. **13**, S. 963– 977.
- Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Suda, H.; Hamada, M. (1976)
Bestatin, an inhibitor of aminopeptidases B, produced by *Actinomycetes*.
J. Antibiotics **29**, S. 97 – 99.
- Unger, S. (1999)
Die Bedeutung der Pro- und Präbiotika in der Ernährung.
J Ernährungsm **1**, S: 22 – 29.
- Unteregger, G. (1997)
Quantitative und qualitative Bestimmung von Apoptose.
BIOforum **20**, S. 680 – 683.
- Van der Meer, R.; Bovee-Oudenhoven, I. M. J.; Sesink, A. L. A.; Kleibeuker, J. H. (1998)
Milk products and intestinal health.
Int. Dairy Journal **8**, S: 163– 170.
- Van Dyke, R. (1989)
Mechanisms of digestion and absorption of food.
In: *Gastrointestinal Disease, Pathophysiology, Diagnosis, and Management*
[Sleisenger, M., Fordtran, J., Editoren] Philadelphia: Saunders Company, 4. Auflage, S. 1062– 1088.
- Van't Hof, W.; van Meer, G. (1990)
Generation of lipid polarity in intestinal epithelial (Caco-2) cells: Sphingolipid synthesis in the golgi complex and sorting before vesicular traffic to the plasma membrane.
Journal of Cell Biology **111**, S. 977– 986.
- Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpe, S. (1995)
Proline motifs in peptides and their biological processing.
FASEB J **9**, S. 736– 744.
- Varilek, G. W.; Neil, G. A.; Bishop, W. P. (1994)
Caco-2 cells express type I interleukin-1 receptors: ligand binding enhances proliferation.
Am. J. Physiol. **267**, S. G 1101 – 1107.
- Vermeirssen, V.; Deplancke, B.; Tappenden, K. A.; Van Camp, J.; Gaskins, H. R.; Verstraete, W. (2002)
Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer.
J. of Peptide Sci. **8**, S. 95– 100.
- Vormann, J.; Daniel, H. (2001)
The role of nutrition in human acid-base homeostasis.
Eur. J. Nutr. **40**, S. 187-888.
- Wacher, V. J.; Salphati, L.; Benet, L. Z. (2001)
Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption.
Adv. Drug. Deliv. Rev. **46**, S. 89– 102.
- Walsh, D. J.; Bernard, H.; Murray, B. A.; MacDonald, J.; Pentzien, A.-K.; Wright, G. A.; Wal, J.-M.; Struthers, A. D.,
Meisel, H.; FitzGerald, R. J. (2004)
In vitro generation and stability of the Lactokinin β -Lactoglobulin fragment (142– 148).
J. Dairy Sci **87**, S. 3845 – 3857.
- Wang, K.; Shindoh, H.; Inoue, T.; Horii, I. (2002)
Advantages of *in vitro* cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines.
J Toxicol Sci **27**, S. 229 – 237.
- Webb, K. E. (1990)
Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review.
J Anim Sci **68**, S. 3011– 3022.
- Weh, L.; Petau, C. (2001)
Änderung der Gewebeeigenschaften durch Gelatineaufnahme.
Extracta Orthopaedica **24**, S. 12– 16.

- Weiss, T. L.; Selleck, S. E.; Reusch, M.; Wintroub, B. U. (1990)
Serial subculture and relative transport of human endothelial cells in serum-free, defined conditions.
In Vitro Cellular & Developmental Biology **26**, S. 759–768.
- Wilson, G.; Hassan, I. F.; Dix, C. J.; Williamson, I.; Shah, R.; Mackay, M.; Artursson, P. (1990)
Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier.
Journal of Controlled Release **11**, S. 24–40.
- Wingler, K.; Müller, C.; Schmehl, K.; Florian, S.; Brigelius-Flohé, R. (2000)
Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in caco-2 cells.
Gastroenterology **119**, S. 420–430.
- Winkelmeier, P.; Glauner, B.; Lindl, T. (1993)
Quantification of cytotoxicity by cell volume and cell proliferation.
ATLA **21**, S. 269–280.
- Wu, J.; Ding, X. (2001)
Hypotensive and physiological effect of Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats.
J. Agric. Food Chem. **49**, S. 501–506.
- Yamada, Y., Matoba, N., Usui, H., Onishi, K., Yoshikawa, M. (2002)
Design of a highly potent antihypertensive peptide based on ovokinin (2-7).
Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**, S. 1213–1217.
- Yamamoto, N. (1997)
Antihypertensive peptides derived from food proteins.
Inc. Biopoly **43**, S. 129–134.
- Yamamoto, N.; Akino, A.; Takano, T. (1993)
Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790.
J Biochem. **114**, S. 740.
- Yamamoto, N.; Akino, A.; Takano, T. (1994)
Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790.
J. Dairy Sci. **77**, S. 917–922.
- Yamamoto, N.; Ejiiri, M; Mizuno S. (2003)
Biogenic peptides and their potential use.
Curr Pharm Des **9**, S. 1345–1355.
- Yamamoto, N.; Maeno, M.; Takano, T. (1999)
Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN 4.
J Dairy Sci **82**, S. 1388–1393.
- Yamashita, S.; Konishi, K.; Yamazaki, Y.; Taki, Y.; Sakane, T.; Sezaki, H.; Furuyama, Y. (2002)
New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system.
J Pharm Sci **91**, S. 669–679.
- Yang C. Y.; Dantzig, A. H.; Pidgeon, C. (1999)
Intestinal peptide transport systems and oral drug availability.
Phar. Res. **16**, S. 1331–1343.
- Yokoyama, K.; Chiba, H.; Yoshikawa, M. (1992)
Peptides inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito.
Biosci Biotechnol Biochem **56**, S. 1541–1545.
- Yoshii, H.; Tachi, N.; Ohba R.; Sakamura, O.; Takeyama, H.; Itani, T. (2001)
Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken eggs yolks.
Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol. **128**, S. 27–33.
- Yoshioka, M.; Matsumoto, H.; Gum, E.; Erikson, R. H.; Hauri, H.-P., Kim, Y. S. (1988)
Biosynthesis and expression of dipeptidyl aminopeptidase IV during differentiation of human colon cancer (Caco-2) cells.
Gastroenterology **94**, S. A 513.
- Yu, H.; Cook, T. J.; Sinko, P. J. (1997)
Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages.
Pharm Res. **6**, S. 757–762.

A Anhang

A 1 Einleitung

Tabelle A-1: Kooperationspartner dieser Arbeit

Partner des EU-Projektes QLK1-2000-00043		Internet: www.ul.ie/acepeptides
1	University of Limerick, Irland Department of Life Sciences	Prof. Dr. R. FitzGerald (Koordinator), Dr. D. J. Walsh, B. A. Murray
2	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel, Deutschland Institut für Chemie und Technologie der Milch	Prof. Dr. H. Meisel, Dipl. oec. troph. A.-K. Pentzien
3	Institut National de la Recherche Agronomique, Frankreich Laboratoire d'Immuno-Allergiealimentaire, INRA-CEA, SPI	Prof. Dr. J.-M. Wal, Dr. H. Bernard
4	Glanbia Food Ingredients Lfd, Kilkenny, Irland	P. Paodonovan, J. O'Connor
5	University of Dundee, Schottland Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics Ninewells Hospital and Medical School	Prof. Dr. A. D. Struthers, Dr. G. A. Wright
6	European Commission DG XII, Belgien European FPV Programme	Dr. M. Nielsen
Weiterer Kooperationspartner		
7	Gelita AG, Eberbach, Deutschland Abt. Produktentwicklung / Anwendungstechnik	B. Eggersgluß

A 2 Material und Methoden

Tabelle A-2: Effekte einer Caco-2 Zellkultivierung mit verschiedenen Medien auf den TEER

Mittelwert (MW) Berechnung aus 3 Messwiederholungen (bei RT) und Berechnung der TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] \pm S. E. M. (s. 3.4, Abbildung 3-2). Abkürzung: I.: Inkubationsdauer.

I. [d]	DMEM (+ 20 % FKS)		DMEM (+ 10 % FKS)		OptiMEM (+ 10 % FKS)	
	MW _{TEER} [W cm^2]	\pm S.E.M.	MW _{TEER} [W cm^2]	\pm S.E.M.	MW _{TEER} [W cm^2]	\pm S.E.M.
1	14,3	\pm 1,3	2,2	\pm 1,6	25,3	\pm 1,9
2	86,5	\pm 1,8	83,6	\pm 0,0	68,9	\pm 1,0
3	190,3	\pm 1,0	176,0	\pm 0,4	232,8	\pm 3,5
6	436,3	\pm 1,3	454,3	\pm 2,8	399,7	\pm 0,7
8	691,5	\pm 2,0	771,8	\pm 1,0	514,8	\pm 1,0
10	821,3	\pm 6,4	1087,9	\pm 8,9	723,8	\pm 1,7
13	774,8	\pm 1,8	739,9	\pm 1,9	775,9	\pm 2,4
15	773,3	\pm 10,7	269,1	\pm 2,9	774,0	\pm 8,0
17	616,7	\pm 15,0	95,0	\pm 1,9	723,4	\pm 11,5

Tabelle A-3: Effekte (Extinktionen) einer Caco-2 Zellkultivierung mit verschiedenen Medien auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test)

Zellaussaat (14. Passage, 2×10^4 /Kavität) in 96-Kavitäten-MTP und 10 d Kultivierung in verschiedenen Medien unter Standardbedingungen, nachfolgend (an d₁₀) Bestimmung der metabolischen Zellaktivität (WST-1 Test, s. 3.7.1.1). Berechnung des Mittelwerts (MW) der Extinktionen ($\lambda = 450 \text{ nm}$) aus 8 unabhängigen Messergebnissen \pm S. E. M. sowie Berechnung der Aktivitäts-Indices_{WST-1} [Test/Kontrolle] \pm S. E. M. (s. 3.4, s. S. 101).

Medium	Extinktion [mAbs]		AI _{WST-1}	
	MW	\pm S. E. M.	MW	\pm S. E. M.
DMEM (+ 20 % FKS)	0,329	\pm 0,063		
DMEM (+ 10 % FKS)	0,403	\pm 0,014	1,229	\pm 0,044
OptiMEM® (+ 10 % FKS)	0,154	\pm 0,014	0,469	\pm 0,042

Tabelle A-4: DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) nach Kultivierung in DMEM bzw. mit ip6Ado

Zellaussaat (2×10^4 /Kavität, 30. Passage) in 96-Kavitäten-MTP 1 ([#]) und 2 (^{##}) und 10 d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 4 h Inkubation mit 1,0 mmol/L ip6Ado bzw. Kultivierung in DMEM (K_N), nachfolgend 30 – 60 min Exposition mit 0,5 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid, photometrischer Nachweis von p-Nitroanilid, automatischer Abzug des BLANK (Mittelwert) von allen Testergebnissen (s. auch Tabelle A-5 und Tabelle A-6). Die Werte der Negativ-Kontrolle (K_N) dienen u. a. zur Berechnung der AI_{DPPIV} (s. u. sowie s. 3.7.2, Abbildungen 3-8 und 3-9). Abkürzung: l.: Inkubationsdauer.

Mittelwerte der Extinktionen ($l = 405 \text{ nm}$) \pm S.E.M.						
BLANK [#]	0,090	$\pm 0,009$	0,100	$\pm 0,014$	0,111	$\pm 0,018$
$K_P^{\#}$	0,419	$\pm 0,067$	0,616	$\pm 0,090$	0,783	$\pm 0,112$
$K_N^{\#}$	1,123	$\pm 0,025$	1,423	$\pm 0,033$	1,599	$\pm 0,028$
BLANK ^{##}	0,101	$\pm 0,028$	0,119	$\pm 0,043$	0,137	$\pm 0,060$
$K_P^{##}$	0,289	$\pm 0,086$	0,428	$\pm 0,126$	0,559	$\pm 0,165$
$K_N^{##}$	1,049	$\pm 0,097$	1,313	$\pm 0,105$	1,501	$\pm 0,098$
l. [min]	30	45	60	30	45	60

Tabelle A-5: Effekte (Extinktionen) einer 4 h Inkubation mit Dipeptiden auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) – Mittelwerte der Extinktionen -

Zellaussaat (2×10^4 /Kavität, 30. Passage) in 96-Kavitäten-MTP 1 ([#]) und 2 (^{##}) und 10 d Kultivierung in DMEM, unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 4 h Inkubation mit 0,01 bis 1,0 mmol/L Dipeptiden, nachfolgend 30 – 60 min Exposition mit 0,5 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid, photometrischer Nachweis von p-Nitroanilid, Berechnung des AI_{DPPIV} (s. 3.7.2, s. Abbildungen 3-8 und 3-9). Abkürzung: l.: Inkubationsdauer.

Peptid	l. [min]	Mittelwerte (n = 3) der Extinktionen ($l = 405 \text{ nm}$) \pm S.E.M.								
		C_{Peptid} [mmol/L]								
		0,010	0,025	0,050	0,075	0,100	0,250	0,500	0,750	1,000
Ala-Pro [#]	30	1,083	1,004	1,090	1,080	1,126	1,109	1,012	1,099	1,141
	45	1,382	1,278	1,367	1,376	1,425	1,394	1,329	1,397	1,417
	60	1,564	1,462	1,535	1,553	1,602	1,581	1,518	1,582	1,616
Ala-Trp [#]	30	0,995	0,997	1,063	0,997	1,042	1,022	1,058	1,055	0,996
	45	1,248	1,278	1,359	1,310	1,331	1,316	1,360	1,360	1,258
	60	1,447	1,464	1,539	1,512	1,516	1,488	1,530	1,531	1,425
Lys-Phe ^{##}	30	0,935	1,023	1,006	1,007	0,972	0,881	0,915	0,847	0,914
	45	1,200	1,294	1,288	1,292	1,252	1,145	1,156	1,111	1,172
	60	1,390	1,483	1,488	1,491	1,457	1,355	1,382	1,314	1,353
Val-Phe [#]	30	1,031	1,096	1,100	1,031	1,017	1,080	1,056	1,016	1,026
	45	1,302	1,382	1,398	1,315	1,317	1,381	1,339	1,279	1,290
	60	1,481	1,546	1,576	1,503	1,504	1,567	1,470	1,445	1,460
Val-Tyr ^{##}	30	1,018	1,016	0,922	1,036	0,965	1,018	0,969	0,866	0,790
	45	1,293	1,281	1,181	1,328	1,243	1,300	1,252	1,147	1,038
	60	1,490	1,459	1,375	1,521	1,451	1,507	1,467	1,358	1,230
\pm S.E.M.										
Ala-Pro [#]	30	$\pm 0,036$	$\pm 0,043$	$\pm 0,015$	$\pm 0,038$	$\pm 0,023$	$\pm 0,031$	$\pm 0,047$	$\pm 0,032$	$\pm 0,013$
	45	$\pm 0,045$	$\pm 0,036$	$\pm 0,025$	$\pm 0,035$	$\pm 0,030$	$\pm 0,032$	$\pm 0,036$	$\pm 0,041$	$\pm 0,008$
	60	$\pm 0,040$	$\pm 0,029$	$\pm 0,020$	$\pm 0,023$	$\pm 0,031$	$\pm 0,032$	$\pm 0,033$	$\pm 0,039$	$\pm 0,008$
Ala-Trp [#]	30	$\pm 0,003$	$\pm 0,020$	$\pm 0,028$	$\pm 0,059$	$\pm 0,045$	$\pm 0,036$	$\pm 0,007$	$\pm 0,061$	$\pm 0,055$
	45	$\pm 0,004$	$\pm 0,023$	$\pm 0,036$	$\pm 0,058$	$\pm 0,040$	$\pm 0,010$	$\pm 0,011$	$\pm 0,058$	$\pm 0,058$
	60	$\pm 0,011$	$\pm 0,023$	$\pm 0,037$	$\pm 0,044$	$\pm 0,031$	$\pm 0,010$	$\pm 0,014$	$\pm 0,053$	$\pm 0,059$
Lys-Phe ^{##}	30	$\pm 0,040$	$\pm 0,023$	$\pm 0,040$	$\pm 0,017$	$\pm 0,027$	$\pm 0,029$	$\pm 0,015$	$\pm 0,034$	$\pm 0,029$
	45	$\pm 0,039$	$\pm 0,023$	$\pm 0,041$	$\pm 0,022$	$\pm 0,027$	$\pm 0,023$	$\pm 0,020$	$\pm 0,047$	$\pm 0,018$
	60	$\pm 0,043$	$\pm 0,023$	$\pm 0,040$	$\pm 0,023$	$\pm 0,018$	$\pm 0,020$	$\pm 0,012$	$\pm 0,049$	$\pm 0,014$
Val-Phe [#]	30	$\pm 0,036$	$\pm 0,033$	$\pm 0,026$	$\pm 0,009$	$\pm 0,030$	$\pm 0,046$	$\pm 0,001$	$\pm 0,027$	$\pm 0,023$
	45	$\pm 0,026$	$\pm 0,038$	$\pm 0,022$	$\pm 0,011$	$\pm 0,021$	$\pm 0,042$	$\pm 0,008$	$\pm 0,025$	$\pm 0,018$
	60	$\pm 0,025$	$\pm 0,035$	$\pm 0,018$	$\pm 0,008$	$\pm 0,016$	$\pm 0,033$	$\pm 0,043$	$\pm 0,019$	$\pm 0,016$
Val-Tyr ^{##}	30	$\pm 0,105$	$\pm 0,054$	$\pm 0,077$	$\pm 0,086$	$\pm 0,135$	$\pm 0,013$	$\pm 0,017$	$\pm 0,062$	$\pm 0,109$
	45	$\pm 0,121$	$\pm 0,052$	$\pm 0,078$	$\pm 0,088$	$\pm 0,144$	$\pm 0,016$	$\pm 0,019$	$\pm 0,070$	$\pm 0,143$
	60	$\pm 0,116$	$\pm 0,047$	$\pm 0,069$	$\pm 0,076$	$\pm 0,140$	$\pm 0,016$	$\pm 0,018$	$\pm 0,065$	$\pm 0,149$

Tabelle A-6: Effekte (Extinktionen) einer 4 h Inkubation mit Milchproteinpräparaten auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (2×10^4 /Kavität, 30. Passage) in 96-Kavitäten-MTP ([#]) und 2 (^{##}) und 10 d Kultivierung in DMEM, unter Standardbedingungen (s. 3.6), anschließend 4 h Inkubation mit Milchproteinpräparaten, nachfolgend 30 – 60 min Exposition mit 0,5 mmol/L Ala-Pro-p-Nitroanilid, photometrischer Nachweis von p-Nitroanilid, Berechnung des $AI_{DPP\ IV}$ (s. 3.7.2, s. Abbildung 3-9). Abkürzung: l.: Inkubationsdauer.

I. [min]	Lactalbumin 70 [mg Protein /mL]					Ultralact 35 [mg Protein /mL]			
	0,1	0,5	1,0	3,0	7,0	0,1	0,5	1,0	3,0
30	0,993	1,032	0,937	0,918	0,928	0,951	0,923	0,945	0,936
45	1,259	1,328	1,222	1,206	1,212	1,242	1,191	1,211	1,220
60	1,436	1,538	1,431	1,412	1,401	1,444	1,374	1,396	1,415
Mittelwerte (n = 3) der Extinktionen (l = 405 nm)									
30	± 0,043	± 0,020	± 0,020	± 0,039	± 0,032	± 0,034	± 0,005	± 0,063	± 0,013
45	± 0,040	± 0,014	± 0,017	± 0,039	± 0,036	± 0,039	± 0,008	± 0,067	± 0,018
60	± 0,034	± 0,014	± 0,015	± 0,032	± 0,051	± 0,033	± 0,014	± 0,062	± 0,013
± S.E.M.									

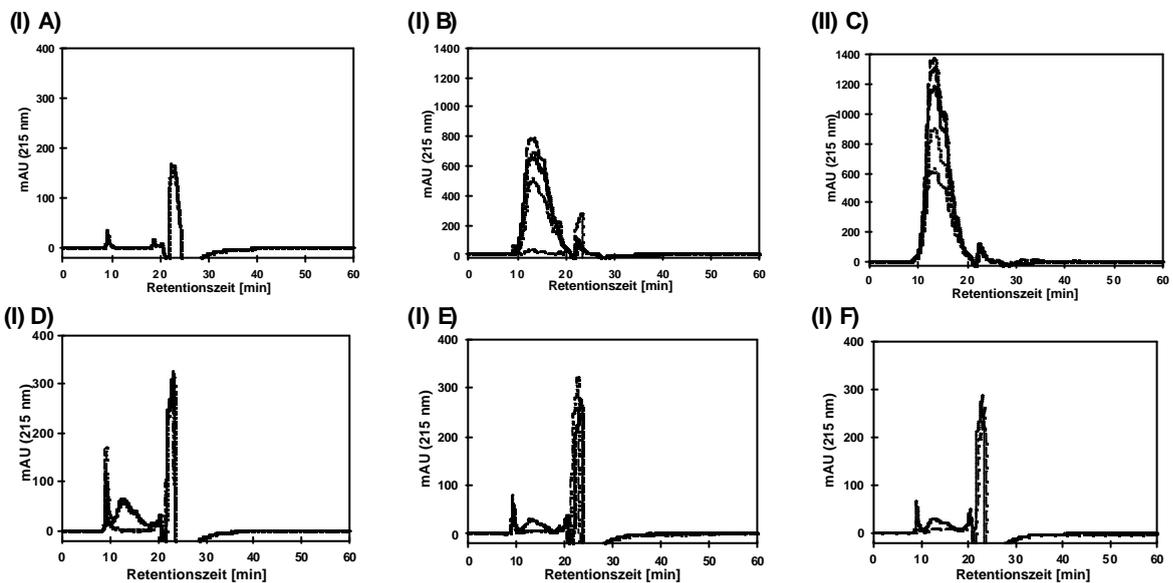


Abbildung A-1: Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie der A) Negativ-Kontrolle, B) und C) Diffusionskontrollen sowie D) bis F) nach Untersuchung des Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer in Abhängigkeit vom pH Wert im apikalen Kompartiment (I) pH 7,4, (II) pH 6,0 bzw. in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer A) 60 min, B) 15 – 45 min, C) 60, 90 min, D) 15, 30 min, E) 45, 60 min und F) 90 min.

Zellaussaat (10^5 pro Kavität, 59. Passage) auf PC Membranen in zwei 12-Kavitäten-MTP und 14tägige Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6), Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (an d₁₄ bei 37 °C, s. 3.7.3), anschließend Durchführung der Transportstudie: 15, 30, 45, 60 bzw. 90 min Inkubation (je n = 2) von Caco-2 Monolayer mit A) (MES-) HBSS im apikalen Kompartiment: MTP 1: pH 7,4 (I), MTP 2: pH: 6,0 (II) (s. 3.7.4.1) sowie B) und C) von PC-Membranen bzw. D) bis F) von Caco-2-Monolayer mit 100 mg/mL Sol D (B-F) (s. auch Abbildung A-2), Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten und Durchführung der HPLC-Analyse (s. 3.7.5.2).

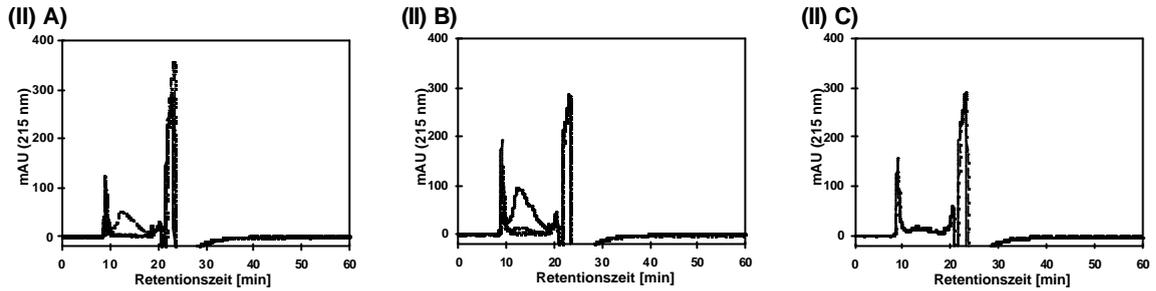


Abbildung A-2: Chromatogramme nach Ausschluss-Chromatographie: Untersuchung des Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer in Abhängigkeit vom pH Wert im apikalen Kompartiment (I) pH 7,4, (II) pH 6,0 bzw. in Abhängigkeit von Inkubationsdauer: A) 15, 30 min, B) 45, 60 min und C) 90 min

Testdurchführung s. Abbildung A-1

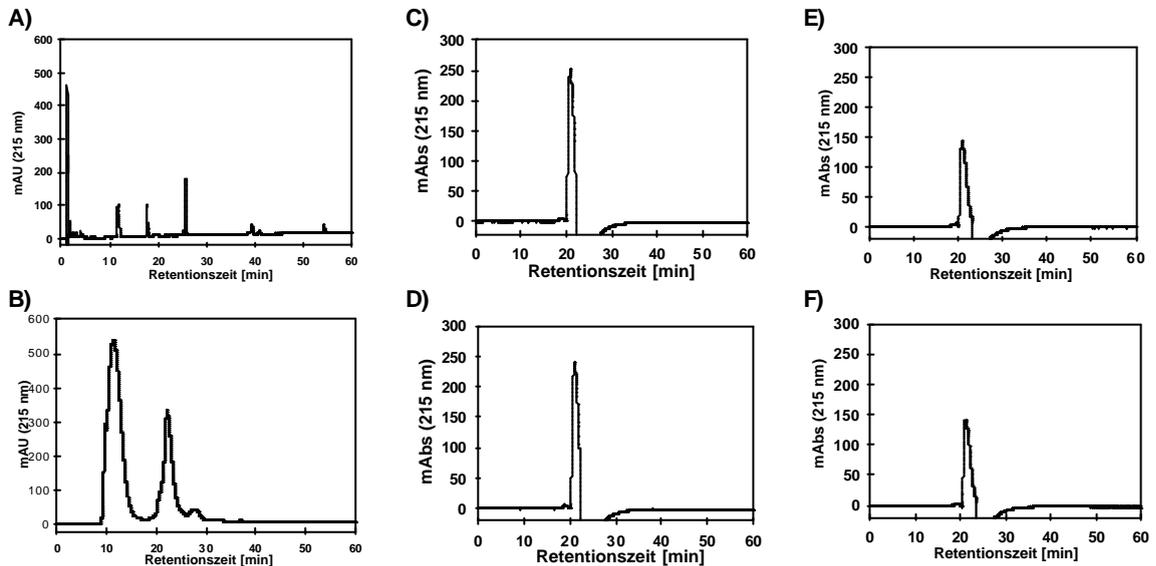


Abbildung A-3: Chromatogramme A) Adsorptions- und B) bis D) Ausschluss-Chromatographie von A) und B) DMEM, C) MES-HBSS, D) HBSS, E) Cytochalasin D und F) Palmitoyl-DL-Carnitin

Erläuterung der HPLC-Analyse s. 3.7.5.1 und 3.7.5.2.

Tabelle A-7: RP-HPLC (C 18): Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Ala-Trp

Verdünnungsstufe	Ala-Trp [mmol/L]	Ala-Trp [$\mu\text{mol}/150\mu\text{L}$]	Verdünnungs- verhältnis zur nächsthöheren Konzentration	HPLC-Analyse: Peakflächen [mAbs x min]
0	4,0000			
1	0,0100	0,001500	400,0	1952753
2	0,0050	0,000750	2,0	1156215
3	0,0025	0,000375	2,0	619108
4	0,0010	0,000150	2,5	256973

Tabelle A-8: RP-HPLC (C 18): Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Lys-Phe

Verdünnungsstufe	Lys-Phe [mmol/L]	Lys-Phe [$\mu\text{mol}/150\mu\text{L}$]	Verdünnungs- verhältnis zur nächsthöheren Konzentration	HPLC-Analyse: Peakflächen [mAbs x min]
0	4,000			
1	0,250	0,03750	16,0	0212073,0
2	0,100	0,01500	02,5	0391202,0
3	0,050	0,00750	02,0	0552712,0
4	0,025	0,00375	02,0	0994716,0
5	0,010	0,00150	02,5	2250279,0

Tabelle A-9: RP-HPLC (C 18): Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Val-Phe

Verdünnungsstufe	Val-Phe [mmol/L]	Val-Phe [$\mu\text{mol}/150\mu\text{L}$]	Verdünnungs- verhältnis zur nächsthöheren Konzentration	HPLC-Analyse: Peakflächen [mAbs x min]
0	4,00			
1	0,40	0,0600	10	0199920,0
2	0,20	0,0300	02	0427636,0
3	0,10	0,0150	02	0752764,0
4	0,04	0,0060	03	1751347,0
5	0,02	0,0030	02	3090880,0
6	0,01	0,0015	02	6231521,0

Tabelle A-10: RP-HPLC (C 18): Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Val-Tyr

Verdünnungsstufe	Val-Tyr [mmol/L]	Val-Tyr [$\mu\text{mol}/150\mu\text{L}$]	Verdünnungs- verhältnis zur nächsthöheren Konzentration	HPLC-Analyse: Peakflächen [mAbs x min]
0	4,000			
1	0,500	0,07500	8,0	0229164,0
2	0,250	0,03750	2,0	0583827,0
3	0,100	0,01500	2,5	2415904,0
4	0,025	0,00375	4,0	5720769,0
5	0,010	0,00150	2,5	9879775,0

Tabelle A-11: Ausschluss-Chromatographie: Ergebnisse der HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe mit Sol D

Verdünnungsstufe	Sol D [mg/mL]	Sol D [$\mu\text{g}/50\mu\text{L}$]	Verdünnungs- verhältnis zur nächsthöheren Konzentration	HPLC-Analyse: Peakflächen [mAbs x min]
0	10,000			
1	2,500	125,00	4,0	1412,80
2	1,000	50,00	2,5	602,90
3	0,500	25,00	2,0	291,71
4	0,250	12,50	2,0	157,63
5	0,100	5,00	2,5	79,58
6	0,050	2,50	2,0	45,73
7	0,025	1,25	2,0	26,92

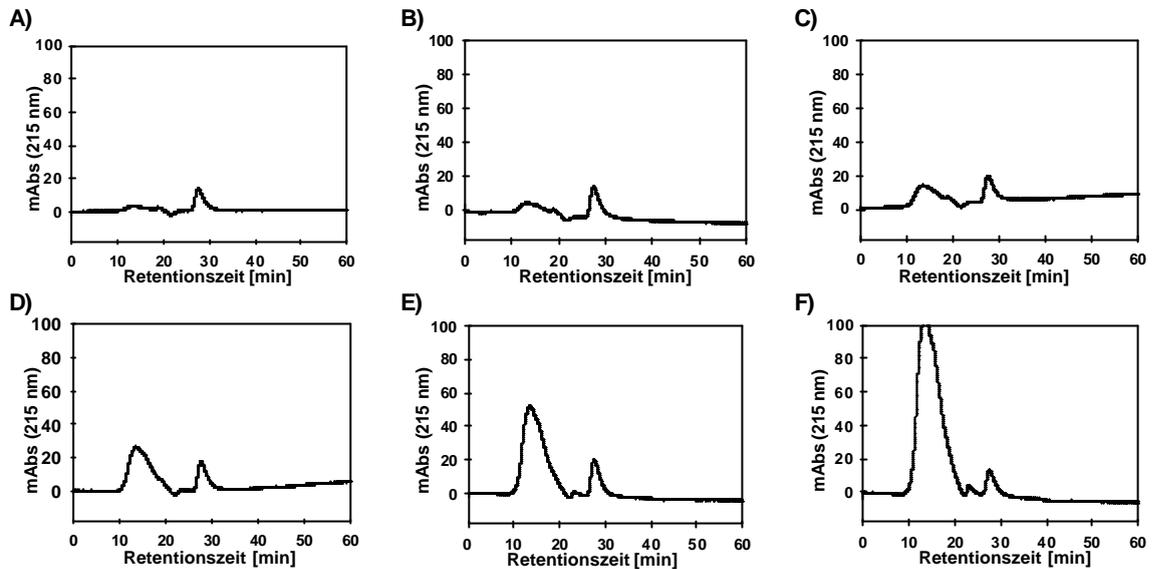


Abbildung A-4: Chromatogramme nach Ausschuss-Chromatographie von A) 0,025, B) 0,05, C) 0,1, D) 0,25, E) 0,5 und F) 1,0 mg/mL Sol D (Verdünnungsreihe), außerdem s. Tabelle A-11, 3.7.5.2.

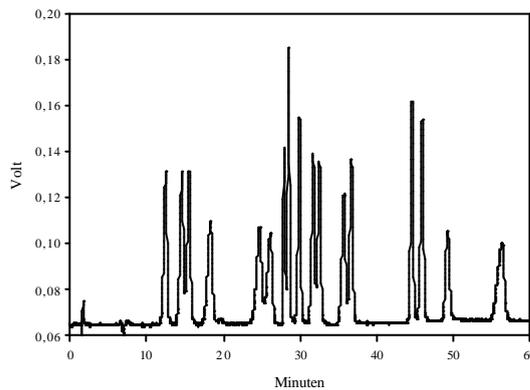


Abbildung A-5: Chromatogramm einer Analyse von Aminosäurestandards (s. Tabelle A12) mittels Alpha Plus LKB 4151, aufgenommen bei einer Wellenlänge von 570 nm

Tabelle A-12: Nummerierung der Peaks des Chromatogramms der Aminosäuren Analyse, s. Abbildung A-5

Nr.	t _R [min]	Aminosäure	Nr.	t _R [min]	Aminosäure
1	12,43	Asp	10	29,88	Met
2	14,53	Thr	11	31,68	Ile
3	15,48	Ser	12	32,50	Leu
4	18,27	Glu	13	35,70	Tyr
5	19,61	–	14	36,68	Phe
6	24,68	Gly	15	44,60	His
7	26,07	Ala	16	45,92	Lys
8	27,90	Cys	17	49,20	NH ₃
9	28,48	Val	18	56,32	Arg

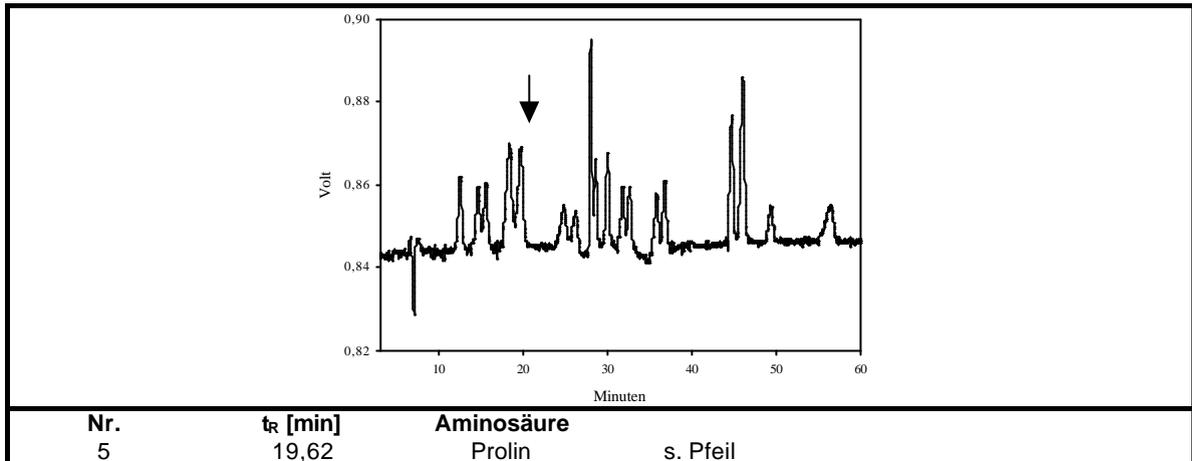


Abbildung A-6: Chromatogramm einer Analyse von Aminosäurenstandards mittels Alpha Plus LKB 4151, aufgenommen bei einer Wellenlänge von 420 nm

Tabelle A-13: Ermittlung der notwendigen Proben-Hydrolysedauer für Sol D

Die Sol D-Stammlösung (100,64 mg/10 mL) und 20-fache Verdünnung wurde mit Reinstwasser hergestellt. Der Hydroxyprolin-Gehalt dieser Proben wurde nach einer Hydrolysedauer von 4 – 72 h photometrisch ermittelt und unter Einsatz der Software Valoo® berechnet (Kalibrierfunktion: $y = 0,0202 + 0,0105x$, $r = 0,9995$). Unter Berücksichtigung der Probenverdünnung wurde nachfolgend die Hydroxyprolin-Konzentration und deren Anteil in der Stammlösung berechnet (s. 3.7.7).

Methode	Photometrie		Berechnungen mit				
	Extinktion		Valoo®		Excel		
Hydrolyse-Dauer [h]	1	2	Hydroxyprolin _{Probe} [mg/mL]		MW	Hydroxyprolin _{Stammlösung} [mg/mL]	[%]
4	0,6223	0,6462	57,384	59,661	58,52	1,17	11,63
8	0,6772	0,6608	62,616	61,053	61,83	1,24	12,29
24	0,6547	0,6977	60,471	64,569	62,52	1,25	12,42
36	0,6997	0,6371	64,760	58,794	61,78	1,24	12,28
72	0,6360	0,6534	58,689	60,348	59,52	1,19	11,83
MW ± S. E. M.						1,22 ± 0,02	12,09 ± 0,15

Tabelle A-14: Effekte des Materials der Reaktionsgefäßes auf die Hydroxyprolin-Bestimmung

Als Proben wurden 20 mg/mL Sol D-Verdünnungen eingesetzt, die während der Probenvorbereitung zur Hydroxyprolin-Bestimmung 44,44-fach verdünnt wurden. Die Durchführung der Hydroxyprolin-Bestimmung (s. 3.7.7) erfolgte nach dem Standardprotokoll, wobei allerdings Glasampullen sowie Reaktionsgefäße 3810 während der Probenhydrolyse eingesetzt wurden. Nach Berechnung der Kalibrierfunktion ($y = 0,0228 + 0,0114x$, $r = 0,9984$) mittels Software Valoo® wurde der Hydroxyprolin-Gehalt der Proben, auch unter Berücksichtigung der Probenverdünnung, berechnet und der Anteil [%] dieser Aminosäure in 20 mg/mL Sol D.

Gefäße	Photometrie		Berechnungen mit		
	Extinktion		Valoo®	Excel	
	n		HyPro _{Probe} [mg/mL]	[mg/mL]	HyPro _{SolD} [%]
Ampullen		0,6617	56,060	2,49	12,46
		0,6679	56,604	2,52	12,58
		0,6722	56,981	2,53	12,66
		0,6671	56,534	2,51	12,56
	MW ± S. E. M.	0,6610 ± 0,006	56,544 ± 0,189	2,51 ± 0,01	12,57 ± 0,04
Reaktions-Gefäße 3810		0,6829	57,920	2,57	12,87
		0,6775	57,446	2,55	12,77
		0,6732	57,069	2,54	12,68
		0,6741	57,148	2,54	12,70
	MW ± S. E. M.	0,6792 ± 0,003	57396 ± 0,193	2,55 ± 0,01	12,75 ± 0,04

A 3 Zytotoxizitätsstudien

Tabelle A-15: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit DMSO auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Berechnung der [#]Mittelwerte (MW) der Extinktionen nach automatischem Abzug des Leerwertes und Berechnung der Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen. Al_{WST-1} s. Abbildung 4-1 A.

Inkubation [h]	MW der Extinktionen [#] (l = 450 nm)			\pm S. E. M.		
	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24	d ₁₀ + 72	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24	d ₁₀ + 72
K_N: Messwerte	1,427	0,797	0,362	\pm 0,028	\pm 0,015	\pm 0,035
DMSO [mol/L]						
0,013	0,937	1,159	1,397	\pm 0,091	\pm 0,036	\pm 0,063
0,026	0,890	1,084	1,324	\pm 0,031	\pm 0,055	\pm 0,046
0,051	0,967	0,862	1,224	\pm 0,082	\pm 0,038	\pm 0,067
0,102	1,223	0,878	0,784	\pm 0,047	\pm 0,078	\pm 0,021
0,128	1,205	0,979	0,840	\pm 0,052	\pm 0,084	\pm 0,091
0,256	1,206	0,901	1,196	\pm 0,038	\pm 0,014	\pm 0,035
0,512	0,951	0,750	1,127	\pm 0,116	\pm 0,090	\pm 0,115
1,024	0,859	0,596	1,326	\pm 0,109	\pm 0,001	\pm 0,010
1,280	0,768	0,678	0,806	\pm 0,064	\pm 0,030	\pm 0,057
1,920	0,737	0,493	0,506	\pm 0,014	\pm 0,045	\pm 0,011
2,560	0,511	0,323	0,137	\pm 0,051	\pm 0,036	\pm 0,058
3,200	0,336	0,102	0,000	\pm 0,049	\pm 0,039	\pm 0,000

Tabelle A-16: Effekte einer Inkubation mit DMEM (K_N) bzw. DMSO auf den TEER [W cm²] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Berechnung der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen. [#] bzw. [§]: Berechnung der W_{TEER} (s. 4.1.1) unter Einbeziehung des TEER der K_N beider MTP: A bzw. B. W_{TEER} s. Abbildung 4-1, B).

Inkubation [h]	K _N	MW TEER [Ω cm ²] \pm S. E. M.					
		d ₁₀ + 48		d ₁₀ + 96		d ₁₀ + 168	
	A	460,94	\pm 57,42	549,55	\pm 62,74	698,20	\pm 48,29
	B	458,47	\pm 46,38	518,28	\pm 63,90	551,00	\pm 45,02
DMSO [mol/L]							
0,013[#]		423,13	\pm 1,45	523,23	\pm 26,31	684,93***	\pm 10,91
0,026[#]		423,87	\pm 19,65	480,70	\pm 22,70	540,10***	\pm 5,84
0,051[#]		429,73**	\pm 18,23	508,20	\pm 23,45	556,97***	\pm 6,00
0,102[#]		441,47	\pm 16,91	490,23	\pm 22,28	565,03***	\pm 7,64
0,128[#]		438,90	\pm 11,93	501,60	\pm 21,96	548,53**	\pm 7,02
0,256[#]		425,70**	\pm 13,93	517,73	\pm 22,98	577,13***	\pm 7,69
0,512[#]		446,60***	\pm 13,64	476,67	\pm 18,18	508,57***	\pm 1,86
1,024[#]		479,60***	\pm 10,48	514,07	\pm 14,84	584,47***	\pm 4,81
1,280[#]		470,80**	\pm 11,02	477,77	\pm 15,39	470,80***	\pm 2,60
1,920[#]		457,97***	\pm 9,21	463,47	\pm 14,42	437,80***	\pm 2,73
2,560[§]		359,70	\pm 10,60	377,30	\pm 25,83	424,23**	\pm 9,87
3,200[§]		371,07	\pm 8,21	401,87	\pm 19,22	476,67	\pm 4,18

Tabelle A-17: Effekte (Extinktionen) einer 24 h Inkubation mit DMSO auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender bzw. differenzierter Caco-2 Zellen sowie PML

Berechnung der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen, Positiv-Kontrolle: Anti-Histon-Komplex. Al_{Apoptose} s. Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3.

Humanzellen	Caco-2 Zellen				PML		
	Extinktion (l = 450 nm)	proliferierende		differenzierte		MW	\pm S. E. M.
		MW	\pm S. E. M.	MW	\pm S. E. M.		
Negativ-Kontrolle		0,943	\pm 0,173	1,452	\pm 0,187	0,736	\pm 0,022
Positiv-Kontrolle		1,289***	\pm 0,046	1,289***	\pm 0,046	1,899***	\pm 0,051
[mol/L] DMSO [%]							
0,026	0,02	0,484**	\pm 0,083	1,008***	\pm 0,096	0,707	\pm 0,009
0,256	0,20	0,518***	\pm 0,042	0,840***	\pm 0,068	0,703	\pm 0,014
2,560	2,00	0,490	\pm 0,042	1,120***	\pm 0,187	0,699	\pm 0,010

Tabelle A-18: Effekte (Extinktionen) einer 24 h Inkubation mit DMSO auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und die Zellproliferation (BrdU-Test) proliferierender Caco-2 Zellen und PML

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktionen (WST-1 Test: $\lambda = 450$ nm, BrdU-Test: $\lambda = 370$ nm) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen. A_{WST-1} und A_{BrdU} s. Abbildung 4-3.

Methode	Metabolische Aktivität (WST-1 Test)				Zellproliferation (BrdU-Test)		
	Proliferierende Caco2 Zellen		PML		PML		
	Extinktion	MW	\pm S. E. M.	MW	\pm S. E. M.	MW	\pm S. E. M.
K_N		0,808	$\pm 0,166$	1,111	$\pm 0,035$	0,187	$\pm 0,008$
DMSO [mol/L]							
0,013		0,145	$\pm 0,047$	0,883	$\pm 0,050$	0,195	$\pm 0,010$
0,026		0,222	$\pm 0,056$	0,847	$\pm 0,040$	0,211	$\pm 0,019$
0,051		0,153	$\pm 0,034$	0,750	$\pm 0,045$	0,200	$\pm 0,020$
0,102		0,114	$\pm 0,033$	0,818	$\pm 0,005$	0,183	$\pm 0,007$
0,128		0,158	$\pm 0,019$	0,775	$\pm 0,006$	0,206	$\pm 0,016$

Tabelle A-19: Fortsetzung der Ergebnisse aus Tabelle A-18

Methode	Metabolische Aktivität (WST-1 Test)				Zellproliferation (BrdU-Test)		
	Proliferierende Caco2 Zellen		PML		PML		
	Extinktion	MW	\pm S. E. M.	MW	\pm S. E. M.	MW	\pm S. E. M.
0,256		0,140	$\pm 0,028$	0,926	$\pm 0,056$	0,178	$\pm 0,017$
0,512		0,104	$\pm 0,014$	0,803	$\pm 0,035$	0,196	$\pm 0,024$
1,024		0,059	$\pm 0,014$	0,698	$\pm 0,055$	0,166	$\pm 0,013$
1,280		0,088	$\pm 0,039$	0,599	$\pm 0,037$	0,214	$\pm 0,056$
1,920		0,036	$\pm 0,017$	0,567	$\pm 0,036$	0,144	$\pm 0,007$
2,560		0,008	$\pm 0,002$	0,545	$\pm 0,028$	0,142	$\pm 0,023$
3,200		0,006	$\pm 0,002$	0,426	$\pm 0,026$	0,104	$\pm 0,003$

Tabelle A-20: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktionen ($\lambda = 450$ nm) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils fünf Messwiederholungen, Pufferkonzentration: A) 0,2 bzw. B) 0,5 mol/L. A_{WST-1} s. Abbildung 4-4. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer.

I. [h]	MW der Extinktion ($\lambda = 450$ nm)				\pm S. E. M.			
	4	24	48	72	4	24	48	72
K_N	0,357	0,460	0,714	0,588	$\pm 0,029$	$\pm 0,034$	$\pm 0,047$	$\pm 0,052$
A: [μ L/K]								
1,00	0,284	0,517	0,604	0,681	$\pm 0,015$	$\pm 0,031$	$\pm 0,029$	$\pm 0,043$
2,00	0,369	0,547	0,701	0,547	$\pm 0,032$	$\pm 0,025$	$\pm 0,065$	$\pm 0,027$
5,00	0,321	0,464	0,666	0,526	$\pm 0,035$	$\pm 0,014$	$\pm 0,060$	$\pm 0,043$
10,00	0,451	0,367	0,443	0,322	$\pm 0,037$	$\pm 0,018$	$\pm 0,053$	$\pm 0,024$
B: [μ L/K]								
1,00	0,430	0,560	0,689	0,570	$\pm 0,029$	$\pm 0,015$	$\pm 0,051$	$\pm 0,030$
2,00	0,439	0,466	0,640	0,510	$\pm 0,061$	$\pm 0,034$	$\pm 0,049$	$\pm 0,015$
5,00	0,434	0,382	0,544	0,440	$\pm 0,014$	$\pm 0,024$	$\pm 0,025$	$\pm 0,011$
10,00	0,270	0,228	0,281	0,305	$\pm 0,035$	$\pm 0,014$	$\pm 0,020$	$\pm 0,029$

Tabelle A-21: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktionen ($\lambda = 450 \text{ nm}$) und Standardfehler ($\pm \text{S. E. M.}$) aus jeweils fünf Messwiederholungen, Pufferkonzentration: A) 0,2 bzw. B) 0,5 mol/L. $\text{Al}_{\text{WST-1}}$ s. Abbildung 4-5. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer.

I. [h]	MW der Extinktion ($\lambda = 450 \text{ nm}$)			$\pm \text{S. E. M.}$		
	d_{10+24}	d_{10+48}	d_{10+72}	d_{10+24}	d_{10+48}	d_{10+72}
K_N	0,894	0,540	0,525	$\pm 0,076$	$\pm 0,040$	$\pm 0,016$
A: [$\mu\text{L/K}$]						
1,00	0,944	0,641	0,509	$\pm 0,073$	$\pm 0,033$	$\pm 0,040$
2,00	0,954	0,590	0,451	$\pm 0,071$	$\pm 0,037$	$\pm 0,025$
5,00	1,002	0,596	0,478	$\pm 0,045$	$\pm 0,037$	$\pm 0,035$
10,00	0,854	0,551	0,402	$\pm 0,083$	$\pm 0,011$	$\pm 0,022$
B: [$\mu\text{L/K}$]						
1,00	0,919	0,600	0,387	$\pm 0,051$	$\pm 0,022$	$\pm 0,046$
2,00	0,847	0,565	0,371	$\pm 0,056$	$\pm 0,041$	$\pm 0,022$
5,00	0,804	0,483	0,331	$\pm 0,027$	$\pm 0,024$	$\pm 0,028$
10,00	0,680	0,490	0,370	$\pm 0,036$	$\pm 0,031$	$\pm 0,020$

Tabelle A-22: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit HPLC-Analysenpuffer auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) und Proliferation (BrdU-Test) von PML

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktion (WST-1 Test: $\lambda = 450 \text{ nm}$, BrdU-Test: $\lambda = 370 \text{ nm}$) und Standardfehler ($\pm \text{S. E. M.}$) aus jeweils fünf Messwiederholungen. Pufferkonzentration: A) 0,2 bzw. B) 0,5 mol/L je 10 $\mu\text{L/Kavität}$. $\text{Al}_{\text{WST-1}}$ s. Abbildung 4-6. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer.

I. [h]	Metabolische Aktivität (WST-1 Test)				Proliferation (BrdU-Test)			
	MW der Extinktion		$\pm \text{S. E. M.}$		MW der Extinktion		$\pm \text{S. E. M.}$	
	48	72	48	72	24	48	24	48
K_N	0,361	0,631	$\pm 0,005$	$\pm 0,268$	0,132	0,031	$\pm 0,025$	$\pm 0,027$
A:	0,338	0,418	$\pm 0,011$	$\pm 0,009$	0,080	0,234	$\pm 0,037$	$\pm 0,009$
B:	0,285	0,339	$\pm 0,014$	$\pm 0,026$	0,399	0,185	$\pm 0,039$	$\pm 0,005$

Tabelle A-23: Effekte einer Inkubation mit N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin auf den TEER [W cm^2] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Berechnung der Mittelwerte (MW) und Standardfehler ($\pm \text{S. E. M.}$) aus jeweils drei Messwiederholungen. TEER-Werte der Negativ-Kontrollen (K_N) s. Tabelle A-25. W_{TEER} s. Abbildung 4-7. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer.

C [mmol/L]	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	5×10^{-2}	10^{-1}	5×10^{-1}	10^0
10+4h	141,17	176,37	149,97	146,30	142,63	143,73	118,80
11	188,10	234,30	187,73	186,63	203,13	375,83	94,60
12	245,30	282,70	249,70	252,27	257,40	308,73	34,47
13	262,53	274,63	259,97	250,07	246,03	294,07	18,70
14	315,70	414,70	352,37	292,60	293,70	368,50	15,03
17	356,77	271,33	334,77	359,70	333,67	477,77	13,93
19	393,80	326,33	351,63	370,33	376,57	495,00	8,80
21	411,03	389,40	409,20	434,87	370,70	411,77	9,17
24	496,83	376,57	471,53	371,80	353,47	401,13	9,17
26	461,63	395,27	473,37	444,77	406,27	394,17	6,97
28	410,30	411,03	492,07	498,30	453,20	410,67	8,80
31	481,43	452,47	477,40	539,73	448,43	400,77	9,17
I. [d]	TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] MW ($\pm \text{S. E. M.}$ s. Tabelle A-24)						

Tabelle A-24: Ergänzung zu Tabelle A-23: Angabe der S. E. M.

C [mmol/L]	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	5 x 10 ⁻²	10 ⁻¹	5 x 10 ⁻¹	10 ⁰
10+4h	± 4,45	± 7,49	± 3,54	± 6,06	± 2,91	± 3,97	± 4,58
11	± 2,20	± 5,04	± 7,32	± 0,64	± 2,29	± 3,86	± 3,30
12	± 7,07	± 11,76	± 1,68	± 0,64	± 1,27	± 1,91	± 0,64
13	± 10,68	± 11,76	± 6,63	± 8,96	± 6,25	± 6,06	± 3,30
14	± 0,64	± 8,89	± 10,08	± 7,73	± 3,18	± 9,92	± 2,77
17	± 8,73	± 4,58	± 2,20	± 2,54	± 5,72	± 7,21	± 2,29
19	± 6,25	± 4,40	± 3,30	± 40,15	± 4,58	± 8,11	± 2,54
21	± 2,20	± 8,40	± 4,16	± 4,45	± 5,20	± 9,48	± 2,77
24	± 11,76	± 6,87	± 4,16	± 2,54	± 1,10	± 7,07	± 1,10
26	± 3,54	± 9,92	± 4,16	± 3,36	± 4,45	± 6,25	± 0,64
28	± 7,96	± 2,91	± 3,54	± 4,45	± 9,86	± 4,45	± 0,64
31	± 2,91	± 7,49	± 7,07	± 1,91	± 3,97	± 10,22	± 0,64
Inkubation[d]	± S. E. M. (MW der Extinktionen s. Tabelle A-23)						

Tabelle A-25: Zeit-abhängige Veränderung des TEER [$W\ cm^2$] von Caco-2 Zellen (Negativ-Kontrolle)

Berechnung der TEER-Mittelwerte [$\Omega\ cm^2$] der Negativ-Kontrolle (K_N) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen; Berechnungsgrundlage der Ergebnisse aus Tabelle A-23 und WI_{TEER} (s. Abbildung 47).
Abkürzung: l.: Inkubationsdauer.

l. [$d_{10} + h$, d]	MW TEER [$W\ cm^2$] ± S. E. M.	l. [$d_{10} + h$, d]	MW TEER [$W\ cm^2$] ± S. E. M.
4 h	141,17 ± 2,57	9	393,80 ± 3,61
1	188,10 ± 1,27	11	411,03 ± 1,27
2	245,30 ± 4,08	14	496,83 ± 6,79
3	262,53 ± 6,17	16	461,63 ± 2,04
4	315,70 ± 0,37	18	410,30 ± 4,59
7	356,77 ± 5,04	21	481,43 ± 1,68

Tabelle A-26: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit N6-(2-Isopentenyl)-Adenosin auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Berechnung der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen. Messwerte der Negativ-Kontrollen (K_N) s. Tabelle A-27. Berechnungsgrundlage für AI_{WST-1} (s. Abbildung 4-7).
Abkürzung: l.: Inkubationsdauer.

Cip6Ado[mmol/L]	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	5x10 ⁻²	10 ⁻¹	5x10 ⁻¹	10 ⁰
$d_{10} + 4$	1,283	1,271	1,320	0,698	0,601	0,423	0,422
$d_{10} + 24$	0,494	0,612	0,606	0,430	0,293	0,178	0,145
$d_{10} + 72$	0,569	0,603	0,577	0,325	0,204	0,135	0,131
l. [$d_{10} + h$]	MW der Extinktion (l = 450 nm)						
$d_{10} + 4$	± 0,052	± 0,120	± 0,108	± 0,135	± 0,106	± 0,043	± 0,032
$d_{10} + 24$	± 0,055	± 0,097	± 0,046	± 0,053	± 0,025	± 0,010	± 0,009
$d_{10} + 72$	± 0,045	± 0,105	± 0,078	± 0,025	± 0,036	± 0,021	± 0,026
l. [$d_{10} + h$]	± S. E. M.						

Tabelle A-27: Zeit-abhängige Veränderung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test, Extinktionen) von Caco-2 Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden (Negativ-Kontrolle)

Berechnung der Mittelwerte (MW) von drei Messwiederholungen (Absorption) und der Standardfehler (\pm S. E. M.); Berechnungsgrundlage der Ergebnisse aus Tabelle A-26 und WI_{TEER} (s. Abbildung 4-7).

Inkubationsdauer [h]	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$
	1,155	0,799	0,449	± 0,051	± 0,053	± 0,018
	MW der Extinktion (l = 450 nm)					
	± S. E. M.					

Tabelle A-28: Photometrische Messwerte einer 72 h Inkubation mit DMEM (Negativ-Kontrollen) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

Zellaussaat (13. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), Zellkultivierung unter Standardbedingungen und 72 h Exposition (ab t_0) in DMEM bzw. mit Testsubstanz (s. 3.6), die in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen (VS) eingesetzt wurden (s. Tabelle 3-12) und die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein pro mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen. Die Proteingehalte sind in Tabellen 3-2 bis 3-4 aufgeführt. Nachfolgend Durchführung des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.). Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktion ($\lambda = 450$ nm) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen. Diese und die Messergebnisse der Tabelle A-29 dienen als Berechnungsgrundlage der AI_{WST-1} (Substrat, s. Tabelle 4-1). Mittels dieser Ergebnisse wurden außerdem die AI_{WST-1} (Hydrolysate, s. Tabelle A-34 bis Tabelle A-39) berechnet.

#Enzyme: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten.

	Extinktion der K_N		Substrate/Enzyme [#] zur Produktion der Hydrolysate, die auf der jeweiligen MTP eingesetzt wurden:
	MW	\pm S.E.M.	
MTP 1	0,549	$\pm 0,051$	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / TPCK-Trypsin
MTP 2	0,583	$\pm 0,034$	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Alcalase
MTP 3	0,532	$\pm 0,072$	WPC 75 / TPCK-Trypsin
MTP 4	0,453	$\pm 0,047$	WPC 75 / TPCK-Trypsin, Alcalase
MTP 5	0,372	$\pm 0,032$	WPC 75 / Alcalase
MTP 6	0,516	$\pm 0,021$	WPC 75 / Corolase PNL
MTP 7	0,469	$\pm 0,055$	WPC 75 / Corolase PP
MTP 8	0,526	$\pm 0,016$	WPC 75 / Corolase PP
MTP 9	0,553	$\pm 0,029$	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Protamex
MTP 10	0,491	$\pm 0,022$	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Corolase 7089
MTP 11	0,550	$\pm 0,072$	Natrium-Caseinat / Corolase PNL
MTP 12	0,442	$\pm 0,028$	Natrium-Caseinat / Protamex
MTP 13	0,489	$\pm 0,016$	Natrium-Caseinat / Corolase 7089
MTP 14	0,421	$\pm 0,101$	Natrium-Caseinat / Corolase L 10

Tabelle A-29: Photometrische Messwerte nach 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen (Substrate) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktionen ($\lambda = 450$ nm) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen (drei Kavitäten). Die Berechnung der AI_{WST-1} (s. Tabelle 4-1) erfolgte mittels dieser Messergebnisse (Test) und denen der Negativ-Kontrolle (s. Tabelle A-28 sowie Angaben zur Testdurchführung).

Abkürzungen: sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 321), β -Lg.: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75, Na-CN: Natrium-Caseinat.

		Mit sGIV VS 2		Mit sGIV VS 1		Ohne sGIV VS 2		Ohne sGIV VS 1	
MTP 1	b-Lg.	0,420	$\pm 0,007$	0,073	$\pm 0,016$	0,536	$\pm 0,028$	0,108	$\pm 0,008$
MTP 2	b-Lg.	0,357	$\pm 0,035$	0,109	$\pm 0,032$	0,196	$\pm 0,045$	0,102	$\pm 0,035$
MTP 3	WPC 75	0,576	$\pm 0,078$	0,408	$\pm 0,021$	-	-	-	-
MTP 4	WPC 75	0,439	$\pm 0,010$	0,187	$\pm 0,021$	0,445	$\pm 0,029$	0,264	$\pm 0,010$
MTP 5	WPC 75	-	-	-	-	0,336	$\pm 0,010$	0,178	$\pm 0,029$
MTP 6	WPC 75	0,410	$\pm 0,014$	0,304	$\pm 0,019$	0,434	$\pm 0,059$	0,104	$\pm 0,012$
MTP 7	WPC 75	0,353	$\pm 0,020$	0,162	$\pm 0,009$	0,363	$\pm 0,079$	0,262	$\pm 0,013$
MTP 8	WPC 75	-	-	-	-	-	-	-	-
MTP 9	b-Lg.	0,382	$\pm 0,007$	0,091	$\pm 0,019$	0,383	$\pm 0,013$	0,096	$\pm 0,025$
MTP 10	b-Lg.	0,450	$\pm 0,005$	0,211	$\pm 0,009$	0,381	$\pm 0,030$	0,217	$\pm 0,013$
MTP 11	Na-CN	0,551	$\pm 0,029$	0,322	$\pm 0,014$	0,689	$\pm 0,063$	0,429	$\pm 0,039$
MTP 12	Na-CN	0,508	$\pm 0,028$	0,290	$\pm 0,045$	0,342	$\pm 0,083$	0,376	$\pm 0,042$
MTP 13	Na-CN	0,529	$\pm 0,067$	0,308	$\pm 0,033$	0,734	$\pm 0,040$	0,469	$\pm 0,021$
MTP 14	Na-CN	0,324	$\pm 0,026$	0,294	$\pm 0,028$	0,571	$\pm 0,022$	0,335	$\pm 0,042$

MW der Extinktionen \pm S.E.M.

Tabelle A-30: Photometrische Messwerte nach einer 72 h Inkubation mit DMEM (Negativ-Kontrollen) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Zellaussaat (10. Passage) in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), Zellkultivierung unter Standardbedingungen und 72 h Exposition (ab d_{10}) in DMEM bzw. mit Testsubstanz (s. 3.6), die in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen (VS) eingesetzt wurden (s. Tabelle 3-12) und die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein pro mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen. Die Proteingehalte sind in Tabellen 3-2 bis 3-4 aufgeführt. Nachfolgend Durchführung des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.). Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktionen ($\lambda = 450$ nm) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen. Diese und die Messergebnisse der Tabelle A-31 dienen als Berechnungsgrundlage der Al_{WST-1} (Substrat, s. Tabelle 4-2). Mittels dieser Ergebnisse wurden außerdem die Al_{WST-1} (Hydrolysate, s. Tabelle A-40 bis Tabelle A-45) berechnet.

#Enzyme: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten.

	Extinktion der K_{λ}		Substrate/Enzyme [#] zur Produktion der Hydrolysate, die auf der jeweiligen MTP eingesetzt wurden:
	MW	\pm S.E.M.	
MTP 1	0,542	\pm 0,026	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / TPCK-Trypsin
MTP 2	0,658	\pm 0,095	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Alcalase
MTP 3	0,479	\pm 0,035	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / TPCK-Trypsin
MTP 4	0,504	\pm 0,044	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / TPCK-Trypsin, Alcalase
MTP 5	0,634	\pm 0,085	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / Alcalase
MTP 6	0,745	\pm 0,061	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / Corolase PNL
MTP 7	0,596	\pm 0,047	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / Corolase PP
MTP 8	0,563	\pm 0,061	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / Corolase PP
MTP 9	0,594	\pm 0,044	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Protamex
MTP 10	0,522	\pm 0,025	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Corolase 7089
MTP 11	0,418	\pm 0,025	Natrium-Caseinat / Corolase PNL
MTP 12	0,359	\pm 0,039	Natrium-Caseinat / Protamex
MTP 13	0,395	\pm 0,026	Natrium-Caseinat / Corolase 7089
MTP 14	0,489	\pm 0,021	Natrium-Caseinat / Corolase L 10

Tabelle A-31: Photometrische Messwerte nach einer 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen (Substrate) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktionen ($\lambda = 450$ nm) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen (drei Kavitäten). Die Berechnung der Al_{WST-1} (s. Tabelle 4-2) erfolgte mittels dieser Messergebnisse (Test) und denen der Negativ-Kontrolle (s. Tabelle A-30).

Abkürzungen: sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), β -Lg.: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75, Na-CN: Natrium-Caseinat.

		Mit sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV		Ohne sGIV	
		VS 2		VS 1		VS 2		VS 1	
MTP 1	b-Lg.	0,495	\pm 0,022	0,338	\pm 0,024	0,493	\pm 0,009	0,427	\pm 0,012
MTP 2	b-Lg.	0,401	\pm 0,047	0,413	\pm 0,018	0,473	\pm 0,063	0,245	\pm 0,050
MTP 3	WPC 75	0,505	\pm 0,041	0,359	\pm 0,028	0,457	\pm 0,058	0,302	\pm 0,023
MTP 4	WPC 75	0,523	\pm 0,084	0,347	\pm 0,033	0,437	\pm 0,058	0,302	\pm 0,023
MTP 5	WPC 75	-	-	-	-	0,590	\pm 0,062	0,424	\pm 0,034
MTP 6	WPC 75	0,548	\pm 0,052	0,389	\pm 0,046	0,584	\pm 0,047	0,233	\pm 0,011
MTP 7	WPC 75	0,437	\pm 0,039	0,321	\pm 0,009	0,594	\pm 0,067	0,234	\pm 0,007
MTP 8	WPC 75	-	-	-	-	-	-	-	-
MTP 9	b-Lg.	0,507	\pm 0,020	0,349	\pm 0,008	0,401	\pm 0,058	0,308	\pm 0,008
MTP 10	b-Lg.	0,446	\pm 0,051	0,236	\pm 0,039	0,404	\pm 0,023	0,300	\pm 0,025
MTP 11	Na-CN	0,386	\pm 0,037	0,312	\pm 0,042	0,343	\pm 0,024	0,282	\pm 0,020
MTP 12	Na-CN	0,389	\pm 0,020	0,224	\pm 0,023	0,184	\pm 0,010	0,234	\pm 0,017
MTP 13	Na-CN	0,218	\pm 0,026	0,223	\pm 0,043	0,385	\pm 0,020	0,340	\pm 0,071
MTP 14	Na-CN	0,210	\pm 0,013	0,253	\pm 0,025	0,724	\pm 0,012	0,240	\pm 0,036

MW der Extinktionen \pm S.E.M.

Tabelle A-32: Photometrische Messwerte nach einer 72 h Inkubation mit DMEM (Negativ-Kontrolle) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten

Zellaussaat in 96-Kavitäten-MTP (2×10^4 /Kavität), Zellkultivierung unter Standardbedingungen und 72 h Exposition (ab d_0) mit HL-1 Medium bzw. Testsubstanz (s. 3.6), die in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen (VS) eingesetzt wurden (s. Tabelle 3-12) und die einem Proteingehalt von ca. 1 bzw. 0,1 mg Protein pro mL (VS 1 bzw. 2) entsprachen. Die Proteingehalte sind in Tabellen 3-2 bis 3-4 aufgeführt. Nachfolgend Durchführung des WST-1 Tests (s. 3.7.1.1.). Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktion ($\lambda = 450$ nm) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen. Diese und die Messergebnisse der Tabelle A-33 dienen als Berechnungsgrundlage der Al_{WST-1} (Substrat, s. Tabelle 4-3). Mittels dieser Ergebnisse wurden außerdem die Al_{WST-1} (Hydrolysate, s. Tabelle A-46 bis Tabelle A-51) berechnet.

#Enzyme: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten.

	Extinktion der K_v		Substrate/Enzyme [#] zur Produktion der Hydrolysate, die auf der jeweiligen MTP eingesetzt wurden:
	MW	\pm S.E.M.	
MTP 1	0,778	\pm 0,044	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / TPCK-Trypsin
MTP 2	0,810	\pm 0,050	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Alcalase
MTP 3	0,824	\pm 0,046	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / TPCK-Trypsin
MTP 4	0,943	\pm 0,028	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / TPCK-Trypsin, Alcalase
MTP 5	0,940	\pm 0,023	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / Alcalase
MTP 6	1,057	\pm 0,017	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / Corolase PNL
MTP 7	0,931	\pm 0,051	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / Corolase PP
MTP 8	0,713	\pm 0,005	Molkenproteinkonzentrat 75 (WPC 75) / Corolase PP
MTP 9	0,736	\pm 0,053	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Protamex
MTP 10	0,651	\pm 0,078	β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein / Corolase 7089
MTP 11	0,465	\pm 0,010	Natrium-Caseinat / Corolase PNL
MTP 12	0,499	\pm 0,043	Natrium-Caseinat / Protamex
MTP 13	0,504	\pm 0,003	Natrium-Caseinat / Corolase 7089
MTP 14	0,605	\pm 0,057	Natrium-Caseinat / Corolase L 10

Tabelle A-33: Photometrische Messwerte nach einer 72 h Inkubation mit Milchproteinfraktionen (Substrate) auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktionen ($\lambda = 450$ nm) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen (drei Kavitäten). Die Berechnung der Al_{WST-1} (s. Tabelle 4-3) erfolgte mittels dieser Messergebnisse (Test) und denen der Negativ-Kontrolle (s. Tabelle A-32).

Abkürzungen: sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), β -Lg.: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75, Na-CN: Natrium-Caseinat.

		Mit sGIV		Mit sGV		Ohne sGIV		Ohne sGIV	
		VS 2		VS 1		VS 2		VS 1	
MTP 1	b-Lg.	0,723	\pm 0,240	0,659	\pm 0,032	0,653	\pm 0,051	0,543	\pm 0,015
MTP 2	b-Lg.	0,756	\pm 0,043	0,743	\pm 0,026	0,672	\pm 0,058	0,578	\pm 0,023
MTP 3	WPC 75	0,683	\pm 0,050	0,645	\pm 0,035	-	-	-	-
MTP 4	WPC 75	0,685	\pm 0,011	0,733	\pm 0,022	0,708	\pm 0,044	0,776	\pm 0,109
MTP 5	WPC 75	-	-	-	-	0,671	\pm 0,026	0,604	\pm 0,015
MTP 6	WPC 75	0,854	\pm 0,033	0,882	\pm 0,004	0,770	\pm 0,040	0,818	\pm 0,028
MTP 7	WPC 75	0,743	\pm 0,013	0,822	\pm 0,048	0,664	\pm 0,043	0,525	\pm 0,062
MTP 8	WPC 75	-	-	-	-	-	-	-	-
MTP 9	b-Lg.	0,732	\pm 0,018	0,684	\pm 0,048	0,738	\pm 0,044	0,635	\pm 0,026
MTP 10	b-Lg.	0,740	\pm 0,014	0,806	\pm 0,053	0,546	\pm 0,011	0,663	\pm 0,060
MTP 11	Na-CN	0,505	\pm 0,018	0,442	\pm 0,021	0,131	\pm 0,112	0,399	\pm 0,020
MTP 12	Na-CN	0,538	\pm 0,024	0,505	\pm 0,012	0,027	\pm 0,011	0,619	\pm 0,035
MTP 13	Na-CN	0,511	\pm 0,018	0,314	\pm 0,016	0,510	\pm 0,027	0,579	\pm 0,044
MTP 14	Na-CN	0,541	\pm 0,025	0,655	\pm 0,033	0,491	\pm 0,008	0,550	\pm 0,052

MW der Extinktionen \pm S.E.M.

In Tabelle A-34 bis Tabelle A-51 werden die AI_{WST-1} des Screenings der ACE-inhibitorischen Milchproteinhydrolysate aufgeführt, die zur Berechnung der im Kapitel 4.1.2 aufgeführten Relativen-Zytotoxizitäts-Indices grundlegend waren.

Tabelle A-34: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-28. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,11) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase 7089			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,66	0,14***	0,63	0,17***	0,89	0,22***	0,89	0,31***
2	0,60	0,23***	0,55	0,21***				
3	0,64	0,20***	0,64	0,19***				
4	0,63	0,19***	0,65	0,25***	0,90	0,25***	0,97	0,47***
5	0,72	0,23***	0,57	0,23***				
6					0,77	0,26***	0,79	0,36***
7	0,61	0,20***	1,00	0,23***				
8					1,00	0,55***	0,78	0,21***
9					1,20	0,50***	0,68	0,26***
10	0,52	0,21***	0,70	0,25***	1,02	0,51**	0,73	0,32***
12,85	0,78	0,23***	0,70	0,24***				
Substrat	0,61	0,19***	0,34***	0,17***	0,92	0,43***	0,78	0,44***
					$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$			

Tabelle A-35: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-28. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,11) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Protamex				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,82	0,24***	0,73	0,14***	0,83	0,27***	0,87	0,30***
2					0,86	0,27***	0,96	0,40***
3					0,94	0,23***	0,74	0,25***
4	0,53	0,33***	0,75	0,23***	0,86	0,19***	0,82	0,19***
5					0,97	0,19***	0,94	0,30***
6	0,91	0,24***	0,73	0,20***	0,97	0,23***	0,89	0,17***
6,69					0,82	0,19***	0,78*	0,25***
8	0,72	0,15***	0,73	0,26***				
9	0,64	0,40***	0,55	0,21***				
10	0,72	0,14***	0,47***	0,19***				
Substrat	0,69	0,16***	0,69	0,17***	0,76	0,13***	0,98	0,20***
					$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$			

Tabelle A-36: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (III)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-28. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,11) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase PNL			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
3					0,83	0,49***	0,77	0,05***
4	1,09*	0,46***	1,04	0,70				
5					0,92	0,41***	0,78	0,36***
7					0,98	0,52	0,77	0,32***
8	0,87	0,32***	1,08	0,76				
10	0,86	0,38***	1,19	0,64	1,00	0,56	0,86	0,36**
12	0,69	0,37***	1,27**	0,73	1,14	0,46***	0,77	0,55
14	0,96	0,49***	0,94	0,52				
15					0,80	0,28***	0,65	0,25***
16	0,87	0,65	1,34*	0,56				
18	1,22**	0,43***	1,26**	0,54				
20	1,24*	0,74	1,21**	0,50***				
Substrat	0,97	0,41***	0,98	0,48***	0,80	0,59	0,84	0,20***
					$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$			

Tabelle A-37: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (IV)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-28. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,11) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase PP				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1					1,14	0,63	1,11	0,65
2					0,89	0,60	1,02	0,81
3	0,90	0,34***	1,01	0,35***	1,02	0,44***	1,05	0,66
4					1,03	0,48***	0,93	0,61
5	0,73	0,64	0,75	0,46***	0,97	0,41***	0,85	0,43***
6					0,83	0,37***	0,78	0,69
7	1,03	0,55	1,11*	0,72				
8					1,04	0,63	1,06	0,72
10	0,68	0,30***	1,00	0,37***				
12	0,97	0,50***	0,79	0,63				
14	0,84	0,27***	0,81*	0,38***				
16	1,00	0,37***	1,01	0,61				
18	0,84	0,33***	1,13	0,43***				
22	0,78	0,27***	1,16	0,21***				
Substrat	0,75	0,35***	0,77	0,56	1,10	0,78	0,98	0,58
					$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$			

Tabelle A-38: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (V)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-28. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,16) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase 7089				Enzym Corolase L 10			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,29**	0,50***	1,26**	0,50**	0,56	0,45***	1,14	0,22***
2					0,84	0,53	1,05	0,18***
3					0,60	0,34***	1,22	0,20***
4	0,97	0,47***	1,32**	0,45***				
4,095					1,01	0,54	1,02	0,38***
6	1,25	0,44***	1,15*	0,55				
10	0,55	0,46***	1,17*	0,65				
12	1,29***	0,50***	1,06	0,53				
16,78	1,00	0,24***	1,25*	0,74				
Substrat	1,22**	0,63	1,50**	0,96	0,77	0,66	1,35**	0,80

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-39: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen (VI)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-28. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,16) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase PNL				Enzym Protamex			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,03	0,39***	1,32**	0,66	1,30**	0,59	1,15**	0,82
4	1,08	0,74	1,19	0,55	0,17*	0,67	0,99	0,46***
6	1,08	0,65	1,09	0,41***	1,26**	0,79	0,77	0,01***
8	1,31**	0,79	1,02	0,22***				
10	1,05	0,54	1,26**	0,33***	1,21*	0,38***	0,86	0,17***
12	1,01	0,78	0,98	0,40***	1,27***	0,40***	1,13**	0,19***
15					0,05***	0,70	1,16*	0,27***
Substrat	1,00	0,59	1,14***	0,78	1,15	0,66	0,59	0,85

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-40: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-30. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,12) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase 7089			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,82	0,62	0,77	0,44***	0,81	0,37***	0,97	0,61
2	1,06	0,63	0,75	0,45***				
3	1,13	0,39***	0,92	0,40***				
4	0,54	0,70	0,58	0,68	0,66	0,56	0,72	0,22***
5	0,77	0,69	1,06	0,57				
6					0,90	0,57	0,84	0,54
7	0,94	0,52	1,00	0,86				
8					0,96	0,66	0,93	0,30***
9					0,77	0,44***	0,93	0,40**
10	1,08	0,45***	1,02	0,68	0,68	0,53	0,80	0,16***
12.85	0,65	0,33***	0,54	0,67				
Substrat	0,61	0,63	0,72	0,37***	0,76	0,45***	0,77	0,57
	$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$							

Tabelle A-41: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit b-Lactoglobulin (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-30. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,12) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Protamex				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,83	0,37***	0,84	0,57	1,08	0,71	1,28***	0,93
2					1,16	0,57	1,17	0,59
3					0,83	0,67	0,55	0,53
4	0,53	0,55	0,71	0,46***	0,79	0,80	0,82	0,67
5					1,02	0,72	1,10	0,54
6	0,80	0,49***	0,77	0,52	1,26***	0,67	0,70	0,68
6,69					0,72	0,58	0,87	0,39***
8	0,75	0,59	0,79	0,54				
9	0,77	0,38***	0,76	0,47***				
10	0,62	0,59	0,79	0,43***				
Substrat	0,85	0,59	0,77	0,52	0,91	0,62	0,91	0,79
	$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$							

Tabelle A-42: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) (III)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-30. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,11) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase PNL			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
3					0,61	0,38***		
4	0,87	0,69	1,10***	0,44***			0,87	0,69
5					0,70	0,52		
7					0,63	0,47***	0,60	0,39***
8	0,94	0,76	0,57	0,63				
10	0,89	0,63	0,98	0,59	0,74	0,41***	0,75	0,36***
12	1,00	0,62	0,94	0,49***	0,47	0,41***	0,74	0,45***
14	0,74	0,44***	0,96	0,53				
15					0,51	0,44***	0,81	0,33***
16	1,08	0,53	0,85	0,58				
18	0,75	0,63	0,85	0,58				
20	1,02	0,59	0,95	0,59				
Substrat	0,87	0,69	0,93	0,67	0,74	0,53	0,87	0,69

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-43: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) (IV)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-30. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,11) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase PP				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1					1,01	0,73	0,85	0,74
2					0,80	0,61	1,10	0,79
3	0,68	0,44***	0,74**	0,52	0,62	0,47**	1,02*	0,80
4					0,75	0,61	0,90	0,72
5	0,73	0,59	0,86	0,44***	0,84	0,64	0,85	0,67
6					0,90	0,63	0,88	0,69
7	0,86	0,60	0,94	0,53				
8					1,01	0,76	1,01	0,89
10	0,76	0,51	0,91	0,54				
12	0,72	0,41	0,96	0,48***				
14	0,55	0,42***	0,62**	0,54				
16	0,71	0,39***	0,99	0,56				
18	0,69	0,44***	1,00	0,53				
22	0,70	0,35***	0,88	0,39***				
Substrat	0,73	0,54	1,00	0,39***	1,05	0,75	1,02	0,60

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-44: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) (V)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-30. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $_{WST-1} \pm$ S.E.M. (max. 0,14) aus jeweils drei Messwiederholungen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase 7089				Enzym Corolase L 10			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,62	0,37***	1,06	0,74	0,20***	0,40***	0,57	0,63
2					0,48***	0,64	0,83	0,56
3					0,54	0,60	0,91	0,57
4	0,87	0,81	1,01	0,54				
4,095					0,51	0,64	0,85	0,39***
6	0,87	0,41***	0,96	0,77				
10	0,49***	0,36***	0,98	0,61				
12	0,95	0,31***	0,56	0,56				
16,78	0,79	0,54	0,74	0,55				
Substrat	0,55	0,67	0,97	0,70	0,43***	0,47**	0,87	0,49**
	$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$							

Tabelle A-45: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) (VI)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-30. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $_{WST-1} \pm$ S.E.M. (max. 0,14) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase PNL				Enzym Protamex			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,88	0,57	0,57	0,63	1,01	0,46***	0,66	0,69
4	0,65	0,79	0,84	0,44***	0,70	0,67	0,69	0,35***
6	0,81	0,65	0,77	0,48***	1,09	0,74	0,99	0,71
8	0,88	0,61	0,76	0,61				
10	0,87	0,38***	0,82	0,66	0,93	0,80	0,99	0,80
12	0,63	0,68	0,79	0,18***	1,15	0,60	1,12	0,67
15					0,75	0,72	1,15	0,57
Substrat	0,92	0,75	0,82	0,67	1,09	0,62	0,51	0,65
	$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$							

Tabelle A-46: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (I)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-32. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,14) aus jeweils drei Messwiederholungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase 7089			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,87	0,99	0,84	0,81	0,93	1,11	0,99	0,99
2	0,92	1,12	1,05	0,79				
3	0,83	0,87	0,84	0,85				
4	0,83	1,02	0,88	0,82	1,06	1,06	1,02	0,97
5	0,93	1,01	0,83	0,80				
6					1,09	1,07	1,08*	1,09**
7	0,86	0,99	0,85	0,88				
8					1,02	1,02	0,97	0,98
9					1,06***	1,02	1,04	1,23*
10	0,84	1,04	0,87	0,84	1,11	1,04	1,08	1,32**
12,85	0,82	1,02	0,95	0,76				
Substrat	0,93	0,92	0,83	0,71	1,23	1,24	0,90	1,02

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-47: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit β -Lactoglobulin (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (II)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-32. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,14) aus jeweils drei Messwiederholungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Protamex				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,92	1,08	1,31*	1,11	0,99	0,81	0,84	0,88
2					0,86	0,73	0,84	0,71
3					0,78	0,86	0,89	0,73
4	0,97	0,91	1,14***	1,25**	0,78	0,76	0,93	0,60
5					0,86	0,87	0,93	0,81
6	0,95	0,92	1,09**	1,27**	0,87	0,84	0,83	0,81
6,69					0,79	0,82	0,82	0,77
8	1,15***	0,97	1,00	0,98				
9	0,97	0,98	1,06	1,05*				
10	0,89	0,73	1,01	0,97				
Substrat	0,99	0,93	1,00	0,86	0,93	0,85	0,84	0,70

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-48: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (III)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-32. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,12) aus jeweils drei Messwiederholungen. Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Alcalase				Enzym Corolase PNL			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
3					0,86	0,83	0,71	0,92
4	0,67	0,64	0,75	0,87				
5					0,80	0,80	0,75	0,73
7					0,88	0,82	0,83	0,72
8	0,73	0,61	0,81	0,90				
10	0,76	0,60	0,73	0,83	0,81	0,86	0,75	0,91
12	0,68	0,65	0,73	0,81	0,83	0,81	0,76	0,90
14	0,82	0,85	0,71	0,91				
15					0,73	0,80	0,82	0,98
16	0,71	0,72	0,77	0,79				
18	0,80	0,68	0,78	0,75				
20	0,76	0,67	0,68	0,79				
Substrat	0,73	0,78	0,71	0,64	0,81	0,83	0,73	0,77

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-49: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit WPC 75 (Substrat) und –hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (IV)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-32. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,12) aus jeweils drei Messwiederholungen. *** $p < 0,001$ kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase PP				Enzym TPCK-Trypsin			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1					0,85	0,68	0,75	0,89
2					0,89	0,83	0,70	0,91
3	0,66	0,90	0,70	0,79	0,85	0,74	0,79	0,70
4					0,84	0,74	0,74	0,68
5	0,72	0,71	0,69	0,81	0,83	0,73	0,69	0,87
6					0,82	0,86	0,69	0,83
7	0,77	0,78	0,68	0,89				
8					0,77	0,75	0,68	0,73
10	0,74	0,80	0,90	1,04				
12	0,68	0,91	0,82	1,15***				
14	0,75***	0,76***	0,97	1,08				
16	0,70	0,80	0,91	0,95				
18	0,73	0,78	0,85	0,93				
22	0,74	0,83	0,91	0,87				
Substrat	0,80	0,88	0,71	0,56	0,83	0,78	0,75	0,94

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-50: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (V)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-32. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,15) aus jeweils drei Messwiederholungen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase 7089				Enzym Corolase L 10			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	1,05	1,12	0,16***	0,41	1,00	1,07	0,91	0,85
2					0,95	0,00***	0,01***	1,05
3					0,92	0,90	0,26	1,03
4	0,89	0,96	1,04	1,15**				
4,095					0,99	0,82	1,00	0,73
6	0,89	0,94	1,41**	1,12				
10	1,05	1,05	0,04***	1,15				
12	1,08	1,16	0,03***	0,02***				
16,78	1,05	1,07	0,02***	1,22				
Substrat	1,01	0,93	1,01	1,15	0,89	1,07	0,81	0,91

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-51: Effekte (AI_{WST-1}) einer 72 h Inkubation mit Natrium-Caseinat (Substrat) und -hydrolysaten auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) von PML (VI)

Angaben zur Testdurchführung s. Tabelle A-32. Mittelwertberechnung der Aktivitäts-Indices $WST-1 \pm S.E.M.$ (max. 0,15) aus jeweils drei Messwiederholungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Negativ-Kontrolle ($K_N = 1$, s. 3.8). Abkürzungen: Enzym: Bezeichnung der Enzyme die die im Test eingesetzten Hydrolysate produzierten, sGIV: simulierte gastrointestinale Verdauung, VS: Verdünnungsstufe (s. Tabelle 3-21), HG: Hydrolysegrad.

HG [%]	Enzym Corolase PNL				Enzym Protamex			
	Mit sGIV		Ohne sGIV		Mit sGIV		Ohne sGIV	
	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1	VS 2	VS 1
1	0,97	1,04	1,21	1,06	1,04	1,17*	0,92	1,02
4	1,06	1,04	1,16	1,02	1,08	0,98	1,06	1,00
6	1,33**	1,14	1,09	0,98	1,03	1,14*	1,20*	1,03
8	0,02***	1,17***	1,07	0,98				
10	1,09	1,05	0,50	1,04	1,03	1,00	1,27*	1,09
12	0,98	0,82	0,67	1,15	1,13	1,08	1,14	0,97
15					1,09	1,09*	1,06	0,97
Substrat	1,09	0,95	0,28	0,86	1,08	1,01	0,05***	1,24*

$AI_{WST-1} [MW_{Test}/MW_{Kontrolle}]$

Tabelle A-52: WST-1 Test: Photometrische Messwerte nach Kultivierung proliferierenden Caco-2 Zellen in DMEM (K_N) und Zuordnung der Testsubstanzen

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktion ($\lambda = 450$ nm) und Standardfehler ($\pm S. E. M.$) aus jeweils fünf Messwiederholungen (Kavitäten). Diese Messergebnisse (MW) dienen als Berechnungsgrundlage der AI_{WST-1} s. Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9. Abkürzungen: I.: Inkubationsdauer, β -Lactoglobulin: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75.

MTP	I. [h]	MW	$\pm S.E.M.$	Testsubstanzen die auf dieser MTP eingesetzt wurden:
MTP 1	4	0,241	$\pm 0,013$	β -Lactoglobulin, WPC 75 und deren Hydrolysat-Permeate
MTP 2	4	0,225	$\pm 0,012$	Natrium-Caseinat und dessen Hydrolysat-Permeate
MTP 3	24	0,537	$\pm 0,010$	β -Lactoglobulin, WPC 75 und deren Hydrolysat-Permeate
MTP 4	24	0,413	$\pm 0,013$	Natrium-Caseinat und dessen Hydrolysat-Permeate
MTP 5	72	0,457	$\pm 0,008$	β -Lactoglobulin, WPC 75 und deren Hydrolysat-Permeate
MTP 6	72	0,472	$\pm 0,022$	Natrium-Caseinat und dessen Hydrolysat-Permeate

Tabelle A-53: Messwerte des TEER von Caco-2 Monolayern (Negativ-Kontrollen)

Berechnung des TEER [$\Omega \text{ cm}^2$] und Bildung der Mittelwerte (MW) sowie Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils drei Messwiederholungen. Diese Ergebnisse (MW) dienen als Berechnungsgrundlage des WI_{TEER} [Test/Kontrolle], s. Abbildung 4-10, Abbildung 4-11.

Inkubation [h] ab d ₁₀	MTP 1		MTP 2		MTP 3	
	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.
4	228,07	$\pm 4,68$	244,57	$\pm 1,91$	243,47	$\pm 5,17$
24	268,03	$\pm 1,47$	273,53	$\pm 0,64$	245,67	$\pm 7,68$
48	284,17	$\pm 4,45$	286,73	$\pm 2,57$	284,53	$\pm 3,72$
72	305,07	$\pm 5,13$	292,97	$\pm 5,48$	287,83	$\pm 2,57$
96	326,70	$\pm 7,94$	315,33	$\pm 5,54$	342,83	$\pm 6,39$
168	506,73	$\pm 0,97$	451,37	$\pm 1,27$	446,97	$\pm 1,91$

Tabelle A-54: WST-1 Test: Photometrische Messwerte nach Inkubation differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) unter Standardbedingungen (Negativ-Kontrollen) und Zuordnung der Testsubstanzen

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktion ($\lambda = 450 \text{ nm}$) und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils vier bzw. fünf Messwiederholungen (MTP 1-6 bzw. 7-9). Diese Ergebnisse (MW) dienen als Berechnungsgrundlage des $AI_{\text{WST-1}}$ [Test/Kontrolle] s. Abbildung 4-13. Abkürzungen: I.: Inkubationsdauer, β -Lactoglobulin: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75.

MTP	I. [d ₁₀ + h]	MW	\pm S.E.M.	Testsubstanzen die auf dieser MTP eingesetzt wurden:
1	4	1,044	$\pm 0,030$	β -Lactoglobulin, WPC 75 und deren Hydrolysat-Permeate
2	4	0,787	$\pm 0,051$	Natrium-Caseinat und dessen Hydrolysat-Permeate
3	24	0,765	$\pm 0,037$	β -Lactoglobulin, WPC 75 und deren Hydrolysat-Permeate
4	24	1,015	$\pm 0,082$	Natrium-Caseinat und dessen Hydrolysat-Permeate
5	72	0,469	$\pm 0,015$	β -Lactoglobulin, WPC 75 und deren Hydrolysat-Permeate
6	72	0,390	$\pm 0,035$	Natrium-Caseinat und dessen Hydrolysat-Permeate
7 [#]	4	0,628	$\pm 0,065$	alle Testsubstanzen
8 [#]	24	0,557	$\pm 0,039$	alle Testsubstanzen
9 [#]	72	0,654	$\pm 0,040$	alle Testsubstanzen

[#] Zellaussaat auf PE-Membranen und WST-1 Test in 96-Kavitäten-MTP.

Tabelle A-55: A) WST-1 Test und B) BrdU-Test: Photometrische Messwerte nach Inkubation polymorphkerniger Leukozyten unter Standardbedingungen (Negativ-Kontrollen) und Zuordnung der Testsubstanzen

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktion (A) $\lambda = 450 \text{ nm}$, B) $\lambda = 370 \text{ nm}$ und Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils vier Messwiederholungen (Kavitäten). Diese Ergebnisse (MW) dienen als Berechnungsgrundlage des $AI_{\text{WST-1}}$ bzw. AI_{BrdU} [Test/Kontrolle] s. Abbildung 4-14. Abkürzungen: I.: Inkubationsdauer, β -Lg.: β -Lactoglobulin angereichertes Molkenprotein, WPC 75: Molkenproteinkonzentrat 75, Na-CN: Natrium-Caseinat, HP: Hydrolysat-Permeat, n. u.: nicht untersucht

MTP	I. [h]	A) $MW_{\text{Extinktion}} \pm$ S. E. M.	B) $MW_{\text{Extinktion}} \pm$ S. E. M.	Testsubstanz/MTP
1	4	1,730 $\pm 0,006$	0,156 $\pm 0,019$	β -Lg., Na-CN + HP
2	4	2,337 $\pm 0,014$	0,214 $\pm 0,023$	WPC 75 + HP
3	24	1,604 $\pm 0,082$	0,128 $\pm 0,009$	β -Lg., Na-CN + HP
4	24	1,704 $\pm 0,148$	0,206 $\pm 0,030$	WPC 75 + HP
5	48	1,014 $\pm 0,045$	n. u.	β -Lg., Na-CN + HP
6	48	0,820 $\pm 0,059$	n. u.	WPC 75 + HP
7	72	0,933 $\pm 0,064$	0,131 $\pm 0,008$	β -Lg., Na-CN + HP
8	72	1,075 $\pm 0,115$	0,110 $\pm 0,022$	WPC 75 + HP

Tabelle A-56: Effekte (Extinktionen) einer 24 h Inkubation mit Natrium-Caseinat und -hydrolysaten auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender bzw. differenzierter Caco-2 Zellen und PML

Berechnung der Mittelwerte (MW) der Extinktionen \pm Standardfehler (\pm S. E. M.) aus jeweils sechs Messwiederholungen. Testsubstanzen: Natrium-Caseinat (Na-CN) Hydrolysate produziert durch Corolase PNL (Hydrolysegrad 8 bzw. 10 % entsprechen H I bzw. H II) sowie durch Corolase 7089 (Hydrolysegrad 17 % entspricht H III). Darstellung der A_{Apoptose} sowie Angaben zur Testdurchführung s. Abbildung 4-16.

	Caco-2 Zellen						PML	
	Proliferierende Lysate			Differenzierte Lysate			Lysate	
			Überstände					
K _P	0,991	$\pm 0,031$	1,498	$\pm 0,028$	1,481	$\pm 0,015$	0,941	$\pm 0,057$
K _N	0,117	$\pm 0,002$	0,287	$\pm 0,028$	1,689	$\pm 0,171$	0,000	$\pm 0,000$
Na-CN	0,142	$\pm 0,011$	0,201	$\pm 0,022$	2,048	$\pm 0,148$	0,000	$\pm 0,000$
H I	0,141	$\pm 0,009$	0,372	$\pm 0,013$	1,635	$\pm 0,177$	0,000	$\pm 0,000$
H II	0,191	$\pm 0,042$	0,440	$\pm 0,035$	1,493	$\pm 0,118$	0,000	$\pm 0,000$
Na-CN	0,141	$\pm 0,017$	0,278	$\pm 0,011$	1,261	$\pm 0,073$	0,000	$\pm 0,000$
H III	0,161	$\pm 0,010$	0,288	$\pm 0,028$	0,915	$\pm 0,082$	0,000	$\pm 0,000$
MW der Extinktionen \pm S. E. M.								

Tabelle A-57: Effekte einer Inkubation mit 0,01 und 1 mmol/L synthetischer Peptide auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) – Ergänzung der Tabelle 4-25: S. E. M -

* Kennzeichnet in DMSO gelöste Peptide; ¹ bis ⁴ kennzeichnet die Nummerierung der Mikrotiterplatten der Zellkultivierung; Angabe der Messwerte (Absorption) der Negativ-Kontrolle (K_N) s. Tabelle A-58, der W_{TEER} s. Tabelle 4-25. Abkürzung: n. d.: nicht detektiert.

Synthetische Peptide	\pm S. E. M. (MW der W _{TEER} s. Tabelle 4-25)					
	Konzentration	0,01 mmol/L			1,00 mmol/L	
Inkubation [d]	d ₁₀ + 2	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 7	d ₁₀ + 2	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 7
Ala-Leu ¹	0,032	0,035	0,014	0,018	0,028	0,006
Ala-Pro ¹	0,017	0,021	0,018	0,039	0,044	0,018
Ala-Pro-Leu ¹	0,027	0,030	0,017	0,024	0,034	0,008
Ala-Trp ¹	0,007	0,014	0,009	0,025	0,018	0,003
Gly-Pro ¹	0,009	0,014	0,016	0,003	0,010	0,008
Gly-Tyr ⁴	0,020	0,015	0,016	0,023	0,018	0,019
Ile-Arg ²	0,024	0,030	0,038	0,027	0,037	0,018
Ile-Pro-Ile ²	0,016	0,031	0,027	0,022	0,034	0,024
Leu-Gly ²	0,019	0,024	0,016	0,023	0,091	0,025
Leu-Pro ²	0,011	0,017	0,017	0,009	0,029	0,020
Leu-Val ²	0,006	0,005	0,014	0,006	0,008	0,011
Met-His ³	0,024	0,049	0,049	0,016	0,042	0,023
Pro-Pro ³	0,015	0,045	0,039	0,025	0,044	0,024
Ser-Phe ³	0,020	0,034	0,027	0,024	0,038	0,019
Ser-Tyr ³	0,019	0,030	0,021	0,024	0,038	0,026
Tyr-Gly ⁴	0,017	0,016	0,018	0,008	0,007	0,012
Val-Phe ³	0,009	0,030	0,038	0,003	0,028	0,003
Val-Tyr ⁴	0,019	0,031	0,025	0,026	0,030	0,001
Val-Tyr-Val ⁴	0,022	0,032	0,023	0,033	0,047	0,017
Ala-Val ⁶	0,022	0,056	0,036	0,021	0,058	0,029
Ala-Tyr ⁶	0,019	0,041	0,028	0,029	0,040	0,028
His-Leu ⁶	0,023	0,030	0,021	0,022	0,042	0,023
Ile-Pro ⁶	0,024	0,029	0,015	0,017	0,021	0,012
Leu-Trp ⁷	n. d.	n. d.	n. d.	0,023	0,051	0,002
Phe-Tyr ⁷	0,013	0,034	0,016	0,040	0,073	0,032
Val-Ala ⁷	0,043	0,061	0,017	0,038	0,063	0,022
Val-Pro ⁷	0,029	0,042	0,028	0,032	0,053	0,020
Val-Trp ⁷	0,019	0,047	0,008	0,026	0,052	0,016

Tabelle A-58: Zeitabhängige Effekte auf den TEER differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) (K_N)
Berechnungsgrundlage für Ergebnisse Tabelle 4-25.

Inkubation [d ₁₀ + d]	MW TEER [W cm ²]			± S. E. M.		
	d ₁₀ + 2	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 7	d ₁₀ + 2	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 7
MTP 1	433,03	482,17	559,17	± 14,29	± 11,00	± 11,14
MTP 2	451,37	500,87	654,50	± 10,37	± 14,29	± 14,89
MTP 3	430,83	500,13	577,87	± 8,19	± 20,87	± 19,17
MTP 4	409,93	540,47	654,87	± 10,26	± 26,67	± 14,19
MTP 5	424,97	490,97	526,53	± 10,49	± 28,92	± 8,84
MTP 7	429,37	460,53	594,73	± 6,94	± 22,90	± 6,77

Tabelle A-59: Effekte einer Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) – Ergänzung der Tabelle 4-26: S. E. M. -

¹ bis ⁴ kennzeichnet die Nummerierung der MTP der Zellkultivierung; Angabe der Messwerte (Absorption) der Negativ-Kontrolle (K_N) s. Tabelle A-60. Die Al_{WST-1} werden in Tabelle 4-26 aufgeführt.

Synthetische Peptide Konzentration Inkubation [h]	± S. E. M. (MW der Al _{WST-1} s. Tabelle 4 -26)							
	0,01 mmol/L				1,00 mmol/L			
	d ₁₀ +4	d ₁₀ +24	d ₁₀ +72	d ₁₀ +96	d ₁₀ +4	d ₁₀ +24	d ₁₀ +72	d ₁₀ +96
Ala-Leu ¹	0,075	0,012	0,063	0,090	0,025	0,027	0,019	0,017
Ala-Pro ¹	0,151	0,145	0,116	0,087	0,079	0,033	0,034	0,022
Ala-Pro-Leu ¹	0,070	0,122	0,036	0,070	0,013	0,055	0,074	0,037
Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg ²	0,025	0,074	0,039	0,147	0,001	0,006	0,039	0,000
Ala-Trp ¹	0,030	0,104	0,046	0,039	0,041	0,077	0,076	0,059
Gly-Pro ¹	0,075	0,022	0,052	0,066	0,054	0,089	0,040	0,058
Ile-Arg ¹	0,089	0,153	0,069	0,071	0,070	0,119	0,089	0,066
Ile-Pro-Ile ¹	0,030	0,101	0,114	0,049	0,024	0,109	0,081	0,046
Leu-Gly ¹	0,092	0,044	0,014	0,049	0,015	0,071	0,095	0,051
Leu-Pro ¹	0,054	0,114	0,028	0,072	0,048	0,094	0,015	0,057
Leu-Val ¹	0,128	0,020	0,046	0,077	0,051	0,117	0,056	0,032
Lys-Phe ⁴	0,030	0,060	0,040	n. d.	0,070	0,110	0,030	n. d.
Met-His ¹	0,032	0,097	0,019	0,080	0,109	0,133	0,027	0,079
Pro-Pro ¹	0,072	0,136	0,083	0,048	0,067	0,016	0,045	0,019
Ser-Phe ¹	0,032	0,026	0,045	0,055	0,065	0,025	0,019	0,039
Ser-Tyr ¹	0,138	0,113	0,095	0,027	0,059	0,143	0,043	0,015
Val-Phe ¹	0,135	0,051	0,060	0,054	0,089	0,122	0,010	0,008
Val-Tyr ²	0,166	0,057	0,083	0,094	0,049	0,037	0,046	0,010
Val-Tyr-Val ^F	0,081	0,056	0,097	0,072	0,057	0,069	0,134	0,047
Ala-Val ⁺²	0,034	0,068	0,101	0,061	0,038	0,032	0,115	0,027
Ala-Tyr ⁺²	0,026	0,023	0,035	0,063	0,064	0,066	0,054	0,076
Gly-Tyr ⁺²	0,068	0,159	0,048	0,015	0,058	0,070	0,027	0,097
His-Leu ⁺²	0,029	0,060	0,074	0,018	0,061	0,066	0,071	0,050
Ile-Pro ⁺²	0,095	0,060	0,014	0,088	0,083	0,077	0,136	0,025
Leu-Trp ⁺²	0,071	0,059	0,129	0,125	0,096	0,060	0,124	0,037
Phe-Tyr ⁺³	0,011	0,028	0,008	0,034	0,022	0,017	0,012	0,098
Tyr-Gly ⁺³	0,041	0,083	0,074	0,125	0,013	0,027	0,040	0,107
Val-Ala ⁺³	0,153	0,034	0,068	0,085	0,104	0,035	0,072	0,041
Val-Pro ⁺³	0,077	0,116	0,035	0,064	0,021	0,047	0,012	0,099
Val-Trp ⁺³	0,080	0,108	0,040	0,131	0,045	0,108	0,080	0,032

Tabelle A-60: Zeit-abhängige Effekte auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer), die unter Standardbedingungen kultiviert wurden (K_N)

Berechnungsgrundlage für Ergebnisse Tabelle 4-26.

Inkubation [d ₁₀ + h]	d ₁₀ +4	d ₁₀ +24	d ₁₀ +72	d ₁₀ +96	d ₁₀ +4	d ₁₀ +24	d ₁₀ +72	d ₁₀ +96
MTP 1	1,438	0,681	0,339	0,287	± 0,114	± 0,060	± 0,047	± 0,030
MTP 2	1,187	0,871	0,424	0,270	± 0,089	± 0,082	± 0,158	± 0,029
MTP 3	1,427	0,797	0,362	0,327	± 0,028	± 0,015	± 0,035	± 0,042
	MW der Extinktionen (l = 450 nm)				± S. E. M.			

Tabelle A-61: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) proliferierender Caco-2 Zellen

WST-1 Test: Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Abbildungen 4-16 und 4-17). K_P : 1 μ mol/L SDS. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	Ala-Pro		Ala-Trp		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	0,285	0,287	0,284	0,281	0,281	0,305	0,220	0,337
0,025	0,228	0,287	0,200	0,272	0,281	0,314	0,175	0,338
0,050	0,252	0,271	0,186	0,315	0,256	0,325	0,234	0,268
0,075	0,249	0,285	0,196	0,333	0,335	0,257	0,204	0,328
0,100	0,326	0,343	0,239	0,374	0,250	0,312	0,195	0,336
0,250	0,186	0,292	0,185	0,227	0,169	0,266	0,139	0,276
0,500	0,152	0,207	0,151	0,190	0,103	0,212	0,140	0,221
0,750	0,078	0,114	0,090	0,141	0,045	0,141	0,079	0,169
1,000	0,008	0,066	0,002	0,055	0,011	0,035	n. d.	0,025
K_N	0,229	0,375	0,312	0,332	0,229	0,375	0,339	0,375
K_P	0,014	0,001	0,023	0,019	0,014	0,001	0,046	0,001
C [mmol/L]	MW der Extinktionen (I = 450 nm) \pm S. E. M.							
0,010	\pm 0,024	\pm 0,026	\pm 0,023	\pm 0,024	\pm 0,029	\pm 0,027	\pm 0,016	\pm 0,051
0,025	\pm 0,018	\pm 0,031	\pm 0,025	\pm 0,032	\pm 0,021	\pm 0,011	\pm 0,002	\pm 0,035
0,050	\pm 0,034	\pm 0,031	\pm 0,046	\pm 0,018	\pm 0,018	\pm 0,045	\pm 0,015	\pm 0,008
0,075	\pm 0,043	\pm 0,038	\pm 0,019	\pm 0,022	\pm 0,006	\pm 0,011	\pm 0,039	\pm 0,031
0,100	\pm 0,051	\pm 0,033	\pm 0,028	\pm 0,024	\pm 0,018	\pm 0,021	\pm 0,017	\pm 0,040
0,250	\pm 0,021	\pm 0,010	\pm 0,062	\pm 0,005	\pm 0,020	\pm 0,019	\pm 0,003	\pm 0,014
0,500	\pm 0,010	\pm 0,008	\pm 0,019	\pm 0,023	\pm 0,022	\pm 0,019	\pm 0,028	\pm 0,045
0,750	\pm 0,005	\pm 0,003	\pm 0,009	\pm 0,015	\pm 0,022	\pm 0,003	\pm 0,014	\pm 0,026
1,000	\pm 0,004	\pm 0,008	\pm 0,002	\pm 0,002	\pm 0,011	\pm 0,010	n. d.	\pm 0,006
K_N	\pm 0,006	\pm 0,032	\pm 0,136	\pm 0,020	\pm 0,006	\pm 0,032	\pm 0,049	\pm 0,032
K_P	\pm 0,006	\pm 0,001	\pm 0,004	\pm 0,012	\pm 0,006	\pm 0,001	\pm 0,008	\pm 0,001
I. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-62: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen

Neutralrot-Färbung: Mittelwert (MW) aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. (s. Tabelle A-63, s. Abbildungen 4-16 und 4-17). K_P : 1 μ mol/L ip6Ado. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW der Extinktionen (I = 450 nm)							
	Ala-Pro		Ala-Trp		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	0,340	0,355	0,308	0,816	0,400	0,413	0,457	0,421
0,025	0,372	0,531	0,302	0,949	0,422	0,447	0,453	0,345
0,050	0,543	0,494	0,399	0,697	0,493	0,413	0,539	0,276
0,075	0,373	0,370	0,554	0,980	0,442	0,296	0,142	0,168
0,100	0,598	0,700	0,501	0,732	0,279	0,551	0,295	0,264
0,250	0,258	0,386	0,153	0,789	0,311	0,445	0,263	0,216
0,500	0,334	0,490	0,045	0,975	0,291	0,343	0,150	0,170
0,750	0,244	0,401	0,027	0,793	0,093	0,299	0,017	0,000
1,000	0,000	0,356	0,063	0,768	0,000	0,152	0,063	0,000
K_N	0,325	0,617	0,375	0,942	0,325	0,617	0,325	0,617
K_P	0,000	0,000	0,041	0,134	0,000	0,000	0,000	0,000
I. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-63: Effekte einer 4 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen – Ergänzung der Tabelle A-62: S. E. M. -

Weitere Angaben s. Tabelle A-62. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	± S. E. M.							
	Ala-Pro		Ala-Trp		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	± 0,057	± 0,011	± 0,022	± 0,046	± 0,063	± 0,074	± 0,057	± 0,023
0,025	± 0,086	± 0,061	± 0,003	± 0,045	± 0,045	± 0,081	± 0,151	± 0,016
0,050	± 0,073	± 0,062	± 0,035	± 0,210	± 0,021	± 0,034	± 0,092	± 0,108
0,075	± 0,137	± 0,035	± 0,141	± 0,059	± 0,028	-	± 0,091	± 0,019
0,100	± 0,161	± 0,103	± 0,054	± 0,112	± 0,019	± 0,016	± 0,025	± 0,031
0,250	± 0,037	± 0,045	± 0,095	± 0,213	± 0,030	± 0,023	± 0,031	± 0,085
0,500	± 0,022	± 0,067	± 0,027	± 0,096	± 0,074	± 0,022	± 0,066	± 0,170
0,750	± 0,036	± 0,008	± 0,008	± 0,061	± 0,071	± 0,051	± 0,009	± 0,000
1,000	± 0,000	± 0,048	± 0,011	± 0,102	± 0,000	± 0,034	± 0,025	± 0,000
K _N	± 0,087	± 0,081	± 0,069	± 0,146	± 0,087	± 0,081	± 0,087	± 0,081
K _P	± 0,000	± 0,000	± 0,011	± 0,043	± 0,000	± 0,000	± 0,000	± 0,000
I. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-64: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung proliferierender Caco-2 Zellen

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen ± S. E. M.; folgende Extinktionen ± S. E. M. wurden für die Kontrollen berechnet: Negativ-Kontrolle: 0,943 ± 0,173, Positiv-Kontrolle: 1,289 ± 0,046. # IC₅₀ der ACE-inhibitorischen Aktivität des jeweiligen Peptids (s. Tabelle 2-8), Angabe der AI_{Apoptose} s. Tabelle 4-27.

C [mmol/L]	Mittelwerte der Extinktionen (l = 450 nm) ± S. E. M.			
	Ala-Pro	Ala-Trp	Val-Phe	Val-Tyr
0,01	0,814 ± 0,070	0,918 ± 0,199	0,824 ± 0,023	0,764 ± 0,080
IC ₅₀ [#]	0,910 ± 0,082	0,966 ± 0,332	0,715 ± 0,029	0,760 ± 0,187
1,00	0,599 ± 0,090	0,627 ± 0,176	0,811 ± 0,060	0,676 ± 0,058

Tabelle A-65: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

WST-1 Test: Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei bzw. fünf (Lys-Phe) Messwiederholungen ± S. E. M. (s. Tabelle A-66), Angabe der AI_{WST-1} s. Abbildung 4-18 bis 4-20. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW der Extinktionen (l = 450 nm)									
	Ala-Pro		Ala-Trp		Lys-Phe		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	0,606	0,747	0,552	0,750	2,164	1,251	0,519	0,842	0,626	0,817
0,025	0,701	0,675	0,633	0,740	1,678	1,326	0,504	0,813	0,630	0,722
0,050	0,535	0,833	0,572	0,796	1,591	1,312	0,605	0,827	0,544	0,671
0,075	0,437	0,822	0,499	0,921	1,939	1,583	0,463	0,563	0,659	0,759
0,100	0,496	0,718	0,472	0,913	1,884	1,692	0,704	0,876	0,497	0,654
0,250	0,675	0,602	0,508	0,724	2,008	1,568	0,578	0,530	0,458	0,548
0,500	0,434	0,465	0,599	0,579	1,841	1,563	0,403	0,453	0,443	0,409
0,750	0,352	0,325	0,402	0,424	1,698	1,337	0,254	0,311	0,452	0,250
1,000	0,123	0,149	0,134	0,259	1,908	1,489	0,128	0,096	0,092	0,098
K _N	0,663	0,627	0,544	0,705	2,145	1,365	0,663	0,627	0,663	0,627
K _P	0,093	0,137	0,149	0,230	0,536	0,154	0,093	0,137	0,093	0,137
I. [d ₁₀ + h]	4	24	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-66: Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)– Ergänzung der Tabelle A-65: S. E. M. -

WST-1 Test: Mittelwert (MW) der Extinktionen s. Tabelle A-65. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	± S. E. M.									
	Ala-Pro		Ala-Trp		Lys-Phe		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	0,025	0,051	0,036	0,059	0,075	0,086	0,032	0,038	0,034	0,032
0,025	0,025	0,073	0,050	0,088	0,148	0,180	0,055	0,003	0,057	0,042
0,050	0,036	0,065	0,046	0,105	0,066	0,046	0,037	0,010	0,101	0,014
0,075	0,123	0,050	0,020	0,113	0,109	0,075	0,064	0,019	0,148	0,057
0,100	0,084	0,021	0,062	0,033	0,365	0,087	0,017	0,061	0,102	0,018
0,250	0,128	0,041	0,055	0,156	0,115	0,079	0,048	0,021	0,082	0,037
0,500	0,053	0,016	0,029	0,045	0,161	0,063	0,057	0,064	0,056	0,050
0,750	0,026	0,005	0,022	0,049	0,144	0,176	0,019	0,063	0,003	0,012
1,000	0,025	0,010	0,025	0,015	0,153	0,143	0,028	0,010	0,016	0,012
K _N	0,125	0,112	0,101	0,047	0,070	0,140	0,125	0,112	0,125	0,112
K _P	0,011	0,034	0,029	0,150	0,022	0,013	0,011	0,034	0,011	0,034
I. [d ₁₀ + h]	4	24	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-67: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Neutralrot-Färbung: Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen ± S. E. M., Angabe der A_{Neutralrot} S. Abbildung 4-18 und Abbildung 4-20. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW der Extinktionen (l = 450 nm)									
	Ala-Pro		Ala-Trp		Lys-Phe		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	0,452	0,523	0,452	0,80	0,280	0,507	0,473	0,327		
0,025	0,604	0,505	0,604	0,66	0,646	0,448	0,746	0,552		
0,050	0,629	0,491	0,629	0,90	0,605	0,452	0,634	0,685		
0,075	0,687	0,506	0,687	0,80	0,556	0,630	0,483	0,371		
0,100	0,727	0,599	0,727	0,80	0,737	0,565	0,440	0,352		
0,250	0,502	0,533	0,502	0,77	0,628	0,473	0,787	0,447		
0,500	0,648	0,576	0,648	0,67	0,220	0,372	0,613	0,246		
0,750	0,525	0,439	0,525	0,45	0,355	0,301	0,878	0,337		
1,000	0,308	0,377	0,308	0,61	0,324	0,267	0,487	0,402		
K _N	0,609	0,492	0,663	0,334	0,609	0,492	0,609	0,492		
K _P	0,129	0,221	0,187	0,000	0,129	0,221	0,129	0,221		
C [mmol/L]	± S. E. M.									
	0,010	± 0,028	± 0,064	± 0,028	± 0,009	± 0,013	± 0,046	± 0,072	± 0,160	
0,025	± 0,044	± 0,047	± 0,044	± 0,102	± 0,007	± 0,064	± 0,023	± 0,039		
0,050	± 0,010	± 0,052	± 0,010	± 0,035	± 0,021	± 0,128	± 0,050	± 0,049		
0,075	± 0,009	± 0,035	± 0,009	± 0,018	± 0,022	± 0,040	± 0,073	± 0,088		
0,100	± 0,061	± 0,084	± 0,061	± 0,090	± 0,049	± 0,060	± 0,063	± 0,154		
0,250	± 0,057	± 0,094	± 0,057	± 0,102	± 0,231	± 0,192	± 0,077	± 0,122		
0,500	± 0,018	± 0,038	± 0,018	± 0,063	± 0,049	± 0,084	± 0,072	± 0,068		
0,750	± 0,021	± 0,059	± 0,021	± 0,081	± 0,103	± 0,219	± 0,057	± 0,227		
1,000	± 0,099	± 0,007	± 0,099	± 0,082	± 0,089	± 0,126	± 0,085	± 0,082		
K _N	± 0,047	± 0,054	± 0,105	± 0,126	± 0,047	± 0,054	± 0,047	± 0,054		
K _P	± 0,031	± 0,019	± 0,064	± 0,000	± 0,031	± 0,019	± 0,031	± 0,019		
I. [d ₁₀ + h]	4	24	4	24	4	24	4	24		

Tabelle A-68: Effekte einer 4 bis 192 h Inkubation mit Ala-Pro auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER [$\Omega \times cm^2$] aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der W_{TEER} s. Abbildung 4-21. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW TEER [$W\ cm^2$]					\pm S. E. M.				
0,010	502,70	534,60	533,13	594,37	567,23	\pm 4,85	\pm 1,68	\pm 10,93	\pm 0,00	\pm 5,48
0,025	500,87	535,33	473,73	543,40	585,20	\pm 2,57	\pm 0,37	\pm 11,80	\pm 3,50	\pm 12,69
0,050	469,33	505,27	419,83	486,57	514,80	\pm 3,18	\pm 1,83	\pm 9,72	\pm 2,20	\pm 4,58
0,075	474,10	529,10	419,10	457,97	496,83	\pm 5,09	\pm 0,64	\pm 7,80	\pm 1,91	\pm 3,67
0,100	522,13	553,67	455,40	506,37	518,10	\pm 5,04	\pm 2,64	\pm 5,64	\pm 3,30	\pm 9,48
0,250	508,20	548,53	474,47	484,73	508,20	\pm 0,37	\pm 5,73	\pm 11,10	\pm 3,83	\pm 13,22
0,500	482,17	525,80	405,17	462,00	512,97	\pm 1,94	\pm 1,10	\pm 5,17	\pm 4,77	\pm 7,76
0,750	492,80	524,70	399,67	435,60	450,27	\pm 1,60	\pm 0,64	\pm 5,40	\pm 7,76	\pm 2,93
1,000	569,43	586,67	485,83	628,10	603,90	\pm 1,68	\pm 0,97	\pm 3,72	\pm 2,23	\pm 9,00
K_N	496,83	539,73	501,60	614,53	653,03	\pm 10,61	\pm 1,60	\pm 13,31	\pm 3,67	\pm 5,48
K_P	427,53	24,57	9,53	5,50	2,57	\pm 2,77	\pm 0,37	\pm 1,32	\pm 1,94	\pm 1,47
l. [d₁₀ + h]	4	24	96	144	192	4	24	96	144	192

Tabelle A-69: Effekte einer 4 – 96 h Inkubation mit Lys-Phe auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER [$\Omega\ cm^2$] aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; Angabe der W_{TEER} s. Abbildung 4-21. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW TEER [$W\ cm^2$]					\pm S. E. M.				
0,010	124,67	170,87	239,43	246,40	286,73	\pm 1,27	\pm 0,37	\pm 0,37	\pm 3,50	\pm 4,40
0,050	101,57	171,23	213,77	239,80	287,47	\pm 0,64	\pm 1,32	\pm 1,60	\pm 0,97	\pm 2,23
0,100	111,83	189,57	239,43	261,07	309,47	\pm 0,97	\pm 0,97	\pm 1,94	\pm 2,64	\pm 2,23
0,500	128,70	171,23	255,20	297,00	324,50	\pm 2,40	\pm 0,37	\pm 1,91	\pm 1,32	\pm 1,47
1,000	132,00	171,23	241,27	271,33	298,10	\pm 0,73	\pm 0,37	\pm 0,97	\pm 2,91	\pm 1,60
K_N	122,47	169,77	239,07	248,23	273,53	\pm 0,00	\pm 0,73	\pm 1,32	\pm 2,54	\pm 4,58
l. [d₁₀ + h]	4	24	48	72	96	4	24	48	72	96

Tabelle A-70: Effekte einer 4 – 192 h Inkubation mit Val-Phe auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER [$\Omega\ cm^2$] aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der W_{TEER} s. Abbildung 4-21. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW TEER [$W\ cm^2$]					\pm S. E. M.				
0,010	475,93	417,63	361,53	483,63	530,20	\pm 1,94	\pm 6,12	\pm 3,83	\pm 5,54	\pm 5,04
0,025	479,60	408,10	358,97	456,50	456,13	\pm 2,20	\pm 5,48	\pm 7,33	\pm 7,14	\pm 5,90
0,050	458,70	405,53	338,07	450,27	445,50	\pm 3,97	\pm 5,43	\pm 5,55	\pm 5,87	\pm 4,45
0,075	486,93	467,50	389,77	477,40	436,70	\pm 0,97	\pm 6,17	\pm 8,04	\pm 7,36	\pm 2,91
0,100	474,47	431,20	369,60	455,03	459,07	\pm 1,32	\pm 9,43	\pm 5,04	\pm 6,12	\pm 3,00
0,250	464,20	421,67	381,70	446,97	441,10	\pm 2,20	\pm 2,40	\pm 2,29	\pm 0,97	\pm 4,45
0,500	479,97	427,90	378,03	457,60	453,20	\pm 2,40	\pm 5,76	\pm 5,76	\pm 6,23	\pm 4,79
0,750	469,33	414,70	367,77	449,53	433,03	\pm 3,61	\pm 6,42	\pm 4,23	\pm 3,86	\pm 6,17
1,000	523,97	477,77	406,27	522,13	535,70	\pm 0,73	\pm 1,32	\pm 0,97	\pm 1,27	\pm 2,20
K_N	470,80	427,17	356,77	525,80	576,03	\pm 3,30	\pm 7,84	\pm 7,44	\pm 7,36	\pm 3,26
K_P	462,37	20,53	12,10	12,83	9,90	\pm 3,00	\pm 0,64	\pm 1,27	\pm 1,10	\pm 1,68
l. [d₁₀+h]	4	24	96	144	192	4	24	96	144	192

Tabelle A-71: Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Ala-Trp und Val-Tyr auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER [$\Omega\ cm^2$] aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P : 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der W_{TEER} s. Abbildungen 4-21 und 4-22. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW TEER [$W\ cm^2$] \pm S. E. M.				MW TEER [$W\ cm^2$] \pm S. E. M.					
	Ala-Trp				Val-Tyr					
0,010	494,63	491,70	$\pm 2,93$	$\pm 7,22$	459,80	503,80	412,13	$\pm 8,40$	$\pm 9,51$	$\pm 7,58$
0,050	452,10	475,57	$\pm 8,54$	$\pm 7,07$	440,37	488,03	404,43	$\pm 5,40$	$\pm 8,99$	$\pm 5,90$
0,100	440,00	456,87	$\pm 8,54$	$\pm 5,04$	460,53	490,60	426,80	$\pm 3,50$	$\pm 1,60$	$\pm 8,04$
0,500	452,47	443,67	$\pm 4,51$	$\pm 2,29$	465,67	473,37	382,80	$\pm 8,39$	$\pm 3,36$	$\pm 3,26$
1,000	476,67	479,60	$\pm 4,81$	$\pm 4,51$	478,87	517,00	460,90	$\pm 10,93$	$\pm 3,13$	$\pm 6,49$
K_N	495,73	514,43	$\pm 11,19$	$\pm 6,79$	492,43	595,83	559,17	$\pm 7,58$	$\pm 0,73$	$\pm 3,30$
K_P	418,00	19,43	$\pm 4,79$	$\pm 2,04$	492,43	5,87	0,00	$\pm 20,93$	$\pm 2,29$	$\pm 0,00$
I. [d ₁₀ +h]	4	24	4	24	4	24	96	4	24	96

Tabelle A-72: Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Ala-Pro auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P : 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der A_{DPPIV} s. Abbildung 4-21. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

$C_{Ala-Pro}$ [mmol/L]	MW der Extinktionen ($l = 405\ nm$)			\pm S. E. M.		
0,010	1,083	1,061	1,369	$\pm 0,036$	$\pm 0,076$	$\pm 0,086$
0,025	1,004	1,068	1,266	$\pm 0,043$	$\pm 0,008$	$\pm 0,005$
0,050	1,090	1,142	1,292	$\pm 0,015$	$\pm 0,017$	$\pm 0,037$
0,075	1,080	1,182	1,265	$\pm 0,038$	$\pm 0,027$	$\pm 0,054$
0,100	1,126	1,083	1,147	$\pm 0,023$	$\pm 0,088$	$\pm 0,073$
0,250	1,109	1,010	1,193	$\pm 0,031$	$\pm 0,091$	$\pm 0,032$
0,500	1,012	0,947	1,123	$\pm 0,047$	$\pm 0,042$	$\pm 0,028$
0,750	1,099	0,961	1,133	$\pm 0,032$	$\pm 0,074$	$\pm 0,072$
1,000	1,141	0,894	1,160	$\pm 0,013$	$\pm 0,044$	$\pm 0,009$
K_N	1,123	1,116	1,259	$\pm 0,025$	$\pm 0,037$	$\pm 0,063$
K_P	0,419	0,200	0,064	$\pm 0,067$	$\pm 0,066$	$\pm 0,024$
I. [d ₁₀ +h]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A-73: Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Ala-Trp auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P : 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der A_{DPPIV} s. Abbildung 4-21. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

$C_{Ala-Trp}$ [mmol/L]	MW der Extinktionen ($l = 405\ nm$)			\pm S. E. M.		
0,010	0,995	0,967	1,144	$\pm 0,003$	$\pm 0,031$	$\pm 0,019$
0,025	0,997	1,034	1,265	$\pm 0,020$	$\pm 0,078$	$\pm 0,020$
0,050	1,063	1,108	1,220	$\pm 0,028$	$\pm 0,053$	$\pm 0,084$
0,075	0,997	1,068	1,122	$\pm 0,059$	$\pm 0,009$	$\pm 0,016$
0,100	1,042	0,898	1,083	$\pm 0,045$	$\pm 0,022$	$\pm 0,014$
0,250	1,022	0,893	1,043	$\pm 0,036$	$\pm 0,036$	$\pm 0,015$
0,500	1,058	0,814	1,090	$\pm 0,007$	$\pm 0,019$	$\pm 0,023$
0,750	1,055	0,858	1,144	$\pm 0,061$	$\pm 0,060$	$\pm 0,044$
1,000	0,996	0,837	1,113	$\pm 0,055$	$\pm 0,052$	$\pm 0,101$
K_N	1,123	1,116	1,259	$\pm 0,025$	$\pm 0,037$	$\pm 0,063$
K_P	0,419	0,200	0,064	$\pm 0,067$	$\pm 0,066$	$\pm 0,024$
I. [d ₁₀ +h]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A74: Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Lys-Phe auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der A_{DPPIV} s. Abbildung 4-21. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C _{Lys-Phe} [mmol/L]	MW der Extinktionen (l = 405 nm)			\pm S. E. M.		
0,010	0,935	0,838	1,161	\pm 0,040	\pm 0,019	\pm 0,019
0,025	1,023	1,080	1,248	\pm 0,023	\pm 0,058	\pm 0,003
0,050	1,006	1,102	1,185	\pm 0,040	\pm 0,015	\pm 0,080
0,075	1,007	0,956	1,245	\pm 0,017	\pm 0,050	\pm 0,061
0,100	0,972	0,905	1,287	\pm 0,027	\pm 0,037	\pm 0,009
0,250	0,881	0,881	1,177	\pm 0,029	\pm 0,034	\pm 0,035
0,500	0,915	0,863	1,164	\pm 0,015	\pm 0,063	\pm 0,049
0,750	0,847	0,859	1,142	\pm 0,034	\pm 0,016	\pm 0,040
1,000	0,914	0,864	1,092	\pm 0,029	\pm 0,058	\pm 0,059
K _N	1,049	1,059	1,155	\pm 0,097	\pm 0,088	\pm 0,015
K _P	0,289	0,094	0,037	\pm 0,086	\pm 0,059	\pm 0,021
I. [d _{10+h}]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A75: Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Val-Phe auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der A_{DPPIV} s. Abbildung 4-21. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C _{Val-Phe} [mmol/L]	MW der Extinktionen (l = 405 nm)			\pm S. E. M.		
0,010	1,031	0,892	1,255	\pm 0,036	\pm 0,012	\pm 0,005
0,025	1,096	1,041	1,345	\pm 0,033	\pm 0,088	\pm 0,019
0,050	1,100	1,076	1,176	\pm 0,026	\pm 0,029	\pm 0,005
0,075	1,031	0,887	1,090	\pm 0,009	\pm 0,054	\pm 0,033
0,100	1,017	0,871	1,108	\pm 0,030	\pm 0,045	\pm 0,081
0,250	1,080	0,942	1,178	\pm 0,046	\pm 0,083	\pm 0,034
0,500	1,056	0,965	1,238	\pm 0,001	\pm 0,073	\pm 0,054
0,750	1,016	0,890	1,104	\pm 0,027	\pm 0,068	\pm 0,039
1,000	1,026	0,896	1,278	\pm 0,023	\pm 0,065	\pm 0,037
K _N	1,123	1,116	1,259	\pm 0,025	\pm 0,037	\pm 0,063
K _P	0,419	0,200	0,064	\pm 0,067	\pm 0,066	\pm 0,024
I. [d _{10+h}]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A-76: Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Val-Tyr auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der A_{DPPIV} s. Abbildung 4-22. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C _{Val-Tyr} [mmol/L]	MW der Extinktionen (l = 405 nm)			\pm S. E. M.		
0,010	1,018	1,079	0,720	\pm 0,105	\pm 0,129	\pm 0,161
0,025	1,016	1,084	1,081	\pm 0,054	\pm 0,101	\pm 0,008
0,050	0,922	1,150	1,030	\pm 0,077	\pm 0,035	\pm 0,299
0,075	1,036	1,217	1,256	\pm 0,086	\pm 0,028	\pm 0,046
0,100	0,965	1,029	1,089	\pm 0,135	\pm 0,056	\pm 0,034
0,250	1,018	0,977	1,092	\pm 0,013	\pm 0,055	\pm 0,017
0,500	0,969	0,942	1,091	\pm 0,017	\pm 0,012	\pm 0,045
0,750	0,866	0,893	1,099	\pm 0,062	\pm 0,043	\pm 0,060
1,000	0,790	0,834	1,124	\pm 0,109	\pm 0,051	\pm 0,056
K _N	1,049	1,059	1,155	\pm 0,097	\pm 0,088	\pm 0,015
K _P	0,289	0,094	0,037	\pm 0,086	\pm 0,059	\pm 0,021
I. [d _{10+h}]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A-77: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; folgende Extinktionen \pm S. E. M. wurden für die Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle berechnet: K_N : $1,452 \pm 0,187$ bzw. K_P : $1,782 \pm 0,218$. # IC_{50} der ACE-inhibitorischen Aktivität des jeweiligen Peptids (s. Tabelle 2-8), Angabe der $AI_{Apoptose}$ s. Tabelle 4-28.

C [mmol/L]	Mittelwerte der Extinktionen ($l = 450$ nm) \pm S. E. M.			
	Ala-Pro	Ala-Trp	Val-Phe	Val-Tyr
0,01	$1,342 \pm 0,137$	$1,246 \pm 0,076$	$1,427 \pm 0,062$	$1,361 \pm 0,197$
$IC_{50}^{\#}$	$1,321 \pm 0,031$	$1,148 \pm 0,042$	$1,267 \pm 0,066$	$1,484 \pm 0,127$
1,00	$0,936 \pm 0,099$	$0,890 \pm 0,020$	$0,789 \pm 0,065$	$1,131 \pm 0,043$

Tabelle A-78: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten

WST-1 Test: Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen, Angabe der S. E. M.: s. Tabelle A-79, Angabe der AI_{WST-1} : s. Abbildungen 4-23 und 4-24. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW der Extinktionen ($l = 450$ nm)							
	Ala-Pro		Ala-Trp		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	1,628	0,760	1,425	0,569	1,565	0,708	1,623	0,643
0,025	1,584	0,727	1,446	0,599	1,686	0,665	1,573	0,639
0,050	1,654	0,785	1,481	0,644	1,625	0,620	1,528	0,795
0,075	1,595	0,793	1,519	0,630	1,616	0,837	1,483	1,067
0,100	1,543	0,900	1,439	0,698	1,507	0,702	1,525	0,688
0,250	1,492	0,668	1,392	0,618	1,396	0,604	1,422	0,592
0,500	1,450	0,560	1,322	0,546	1,331	0,536	1,256	0,539
0,750	1,270	0,533	1,238	0,458	1,273	0,511	1,242	0,475
1,000	1,335	0,482	1,203	0,368	1,167	0,372	1,183	0,440
K_N	1,597	0,810	1,467	0,711	1,597	0,810	1,597	0,810
K_P	0,024	0,000	0,018	0,012	0,024	0,000	0,024	0,000
l. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-79: Effekte einer Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test) polymorphkerniger Leukozyten – Ergänzung der Tabelle A-78: S. E. M. -

Weitere Angabe s. Tabelle A-78. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C [mmol/L]	\pm S. E. M.							
	Ala-Pro		Ala-Trp		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	$\pm 0,055$	$\pm 0,022$	$\pm 0,023$	$\pm 0,013$	$\pm 0,028$	$\pm 0,023$	$\pm 0,062$	$\pm 0,016$
0,025	$\pm 0,052$	$\pm 0,034$	$\pm 0,023$	$\pm 0,045$	$\pm 0,003$	$\pm 0,006$	$\pm 0,011$	$\pm 0,008$
0,050	$\pm 0,046$	$\pm 0,006$	$\pm 0,048$	$\pm 0,019$	$\pm 0,044$	$\pm 0,012$	$\pm 0,033$	$\pm 0,029$
0,075	$\pm 0,030$	$\pm 0,102$	$\pm 0,016$	$\pm 0,046$	$\pm 0,012$	$\pm 0,106$	$\pm 0,035$	$\pm 0,146$
0,100	$\pm 0,056$	$\pm 0,074$	$\pm 0,023$	$\pm 0,037$	$\pm 0,024$	$\pm 0,013$	$\pm 0,015$	$\pm 0,050$
0,250	$\pm 0,035$	$\pm 0,001$	$\pm 0,021$	$\pm 0,035$	$\pm 0,016$	$\pm 0,030$	$\pm 0,007$	$\pm 0,032$
0,500	$\pm 0,032$	$\pm 0,036$	$\pm 0,025$	$\pm 0,010$	$\pm 0,023$	$\pm 0,024$	$\pm 0,013$	$\pm 0,015$
0,750	$\pm 0,036$	$\pm 0,027$	$\pm 0,021$	$\pm 0,015$	$\pm 0,024$	$\pm 0,004$	$\pm 0,020$	$\pm 0,008$
1,000	$\pm 0,007$	$\pm 0,010$	$\pm 0,010$	$\pm 0,005$	$\pm 0,098$	$\pm 0,015$	$\pm 0,021$	$\pm 0,004$
K_N	$\pm 0,025$	$\pm 0,059$	$\pm 0,003$	$\pm 0,076$	$\pm 0,025$	$\pm 0,059$	$\pm 0,025$	$\pm 0,059$
K_P	$\pm 0,012$	$\pm 0,000$	$\pm 0,008$	$\pm 0,010$	$\pm 0,012$	$\pm 0,000$	$\pm 0,012$	$\pm 0,000$
l. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-80: Effekte (Extinktionen) einer Inkubation mit Dipeptiden auf die metabolische Aktivität (Neutralrot-Färbung) polymorphkerniger Leukozyten

Neutralrot-Färbung: Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M., K_P : 1 μ mol/L SDS, Angabe der $A_{Neutralrot}$ s. Abbildungen 4-23 und 4-24. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C[mmol/L]	MW der Extinktionen (l = 540 nm)							
	Ala-Pro		Ala-Trp		Val-Phe		Val-Tyr	
0,010	0,204	0,681	0,220	0,794	0,166	0,532	0,252	0,446
0,025	0,184	0,624	0,205	0,759	0,199	0,798	0,221	0,373
0,050	0,237	0,887	0,231	0,937	0,184	0,636	0,234	0,542
0,075	0,253	0,594	0,248	0,781	0,223	0,776	0,107	0,369
0,100	0,205	0,510	0,257	0,828	0,233	0,788	0,281	0,760
0,250	0,286	0,748	0,267	0,825	0,239	0,520	0,226	0,403
0,500	0,249	0,785	0,249	0,789	0,188	0,367	0,193	0,641
0,750	0,249	0,549	0,184	0,529	0,140	0,425	0,169	0,504
1,000	0,141	0,414	0,118	0,300	0,120	0,284	0,168	0,460
K_N	0,255	0,905	0,262	1,116	0,255	0,905	0,255	0,905
K_P	0,623	0,559	0,494	0,514	0,623	0,559	0,623	0,559
C[mmol/L]	\pm S. E. M.							
0,010	\pm 0,031	\pm 0,086	\pm 0,004	\pm 0,078	\pm 0,012	\pm 0,068	\pm 0,010	\pm 0,017
0,025	\pm 0,016	\pm 0,063	\pm 0,025	\pm 0,028	\pm 0,001	\pm 0,072	\pm 0,016	\pm 0,012
0,050	\pm 0,024	\pm 0,061	\pm 0,010	\pm 0,050	\pm 0,014	\pm 0,055	\pm 0,015	\pm 0,021
0,075	\pm 0,026	\pm 0,021	\pm 0,014	\pm 0,040	\pm 0,022	\pm 0,073	\pm 0,004	\pm 0,077
0,100	\pm 0,011	\pm 0,237	\pm 0,044	\pm 0,077	\pm 0,004	\pm 0,040	\pm 0,020	\pm 0,081
0,250	\pm 0,019	\pm 0,085	\pm 0,022	\pm 0,015	\pm 0,029	\pm 0,020	\pm 0,028	\pm 0,045
0,500	\pm 0,007	\pm 0,034	\pm 0,030	\pm 0,055	\pm 0,010	\pm 0,031	\pm 0,015	\pm 0,070
0,750	\pm 0,026	\pm 0,074	\pm 0,026	\pm 0,030	\pm 0,028	\pm 0,007	\pm 0,005	\pm 0,034
1,000	\pm 0,022	\pm 0,084	\pm 0,016	\pm 0,040	\pm 0,005	\pm 0,005	\pm 0,040	\pm 0,033
K_N	\pm 0,002	\pm 0,080	\pm 0,030	\pm 0,029	\pm 0,002	\pm 0,080	\pm 0,002	\pm 0,080
K_P	\pm 0,018	\pm 0,090	\pm 0,048	\pm 0,083	\pm 0,018	\pm 0,090	\pm 0,018	\pm 0,090
I. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-81: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Dipeptiden auf die Proliferation (BrdU-Test) polymorph kerniger Leukozyten

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; Angabe der A_{BrdU} : s. Abbildungen 4-25, 4-26. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

C[mmol/L]	MW der Extinktionen (l = 450 nm)							
	Ala-Pro		Ala-Trp		Val-Phe		Val-Tyr	
0,01	0,202	0,136	0,229	0,156	0,175	0,107	0,231	0,107
1,00	0,158	0,171	0,142	0,077	0,148	0,083	0,152	0,089
K_N	0,187	0,123	0,187	0,123	0,187	0,123	0,187	0,123
C[mmol/L]	\pm S. E. M.							
0,01	\pm 0,010	\pm 0,009	\pm 0,004	\pm 0,006	\pm 0,032	\pm 0,007	\pm 0,010	\pm 0,009
1,00	\pm 0,010	\pm 0,059	\pm 0,010	\pm 0,017	\pm 0,013	\pm 0,006	\pm 0,002	\pm 0,009
K_N	\pm 0,008	\pm 0,036	\pm 0,008	\pm 0,036	\pm 0,008	\pm 0,036	\pm 0,008	\pm 0,036
I. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-82: Effekte (Extinktionen) einer 4 h Inkubation mit synthetischen Peptiden auf die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung polymorphkerniger Leukozyten, untersucht A) in Zellkultur-Überständen und B) in Zell-Lysaten.

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M., # IC₅₀ der ACE-inhibitorischen Aktivität des jeweiligen Peptids (s. Tabelle 2-8), Angabe der AI_{Apoptose}: s. Abbildungen 4-25, 4-26. Abkürzung: K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

	C [mmol/L]	Mittelwerte der Extinktionen (l = 450 nm) \pm S. E. M.			K _N	K _P
		0,01	IC ₅₀ [#]	1,00		
A)	Ala-Pro	0,011 \pm 0,009	0,023 \pm 0,018	0,034 \pm 0,031	0,005 \pm 0,002	2,077 \pm 0,09
	Ala-Trp	0,017 \pm 0,016	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000		
	Val-Phe	0,007 \pm 0,003	0,006 \pm 0,006	0,000 \pm 0,000		
	Val-Tyr	0,218 \pm 0,176	0,000 \pm 0,000	0,024 \pm 0,024		
B)	Ala-Pro	0,694 \pm 0,016	0,749 \pm 0,042	0,686 \pm 0,010	0,736 \pm 0,022	1,899 \pm 0,051
	Ala-Trp	0,731 \pm 0,023	0,713 \pm 0,017	0,705 \pm 0,020		
	Val-Phe	0,710 \pm 0,017	0,730 \pm 0,036	0,716 \pm 0,029		
	Val-Tyr	0,726 \pm 0,037	0,728 \pm 0,039	0,683 \pm 0,004		

Tabelle A-83: Effekte (Extinktionen bzw. TEER [W cm²]) einer Inkubation mit Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg auf verschiedenen Funktionen von Humanzellen: proliferierende Caco-2 Zellen, differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer) und PML

Methoden (M.): A) Bestimmung der metabolischen Aktivität (WST-1 Test, s. 3.7.1.1), B) Messung des TEER (bei RT, s. 3.7.3), C) Bestimmung der Zellproliferation (s. 3.7.7), D) Nachweis von Apoptose (s. 3.7.8)

Zellaussaat in 96-Kavitäten-MTP (2x10⁴/Kavität, A, C, D) bzw. in 12-Kavitäten-MTP mit Transwell®-Clear-PE-Membranen (10⁵/cm²) und Zellkultivierung unter Standardbedingungen (s. 3.6). Exposition der Zellen mit ALPMHIR vom Tag der Aussaat an (ab d₀: proliferierende Caco-2 Zellen, PML) bzw. nach 10 d Vorkultivierung (ab d₁₀: Caco-2 Monolayer), nachfolgend Durchführung der verschiedenen Tests (s. o.). Diese Messergebnisse waren grundlegend für die Berechnung der verschiedenen Aktivitäts-Indices und des Widerstands-Index (s. Tabelle 4-29).

Zelltyp	M.	Inkubation [h]	Negativ-Kontrolle		Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg			
					0,01 mmol/L		1,00 mmol/L	
			MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.
Proliferierende Caco-2 Zellen	A)	24	0,808	\pm 0,166	0,846	\pm 0,059	0,075	\pm 0,030
		48	0,553	\pm 0,017	0,500	\pm 0,069	0,056	\pm 0,019
		72	0,375	\pm 0,008	0,415	\pm 0,033	0,072	\pm 0,043
	D)	24	0,943	\pm 0,173	1,095	\pm 0,079	0,482	\pm 0,048
		d ₁₀ + 48	409,93	\pm 10,26	434,13	\pm 7,23	423,87	\pm 7,84
		d ₁₀ + 96	540,47	\pm 26,67	509,67	\pm 16,90	529,83	\pm 11,68
Caco-2 Monolayer	B)	d ₁₀ + 168	654,87	\pm 14,19	584,83	\pm 11,24	574,93	\pm 10,12
		d ₁₀ + 4	0,350	\pm 0,002	1,146	\pm 0,030	0,124	\pm 0,001
		d ₁₀ + 24	0,873	\pm 0,082	0,914	\pm 0,065	0,006	\pm 0,006
	A)	d ₁₀ + 72	0,424	\pm 0,158	0,428	\pm 0,017	0,016	\pm 0,016
		d ₁₀ + 96	0,270	\pm 0,029	0,258	\pm 0,040	0,000	\pm 0,000
		d ₁₀ + 24	1,452	\pm 0,187	1,177	\pm 0,211	1,003	\pm 0,029
PML	A)	48	0,375	\pm 0,022	0,368	\pm 0,007	0,149	\pm 0,004
		72	0,631	\pm 0,268	0,429	\pm 0,031	0,166	\pm 0,017
		96	0,366	\pm 0,041	0,385	\pm 0,019	0,103	\pm 0,006
	168	0,361	\pm 0,005	0,304	\pm 0,004	0,074	\pm 0,021	
	C)	24	0,096	\pm 0,024	0,123	\pm 0,015	0,044	\pm 0,006
		48	0,098	\pm 0,015	0,010	\pm 0,010	0,000	\pm 0,000
24		0,005	\pm 0,002	0,015	\pm 0,015	0,010	\pm 0,005	

Tabelle A-84: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf die metabolische Aktivität (Wst-1 Test und Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 μ mol/L SDS, Angabe der Aktivitäts-Indizes: s. Abbildung 4-27. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C _{LA 70} [mg Protein/mL]	WST-1 Test				Neutralrot-Färbung			
	MW d. Extinktionen \pm S. E. M.				MW d. Extinktionen \pm S. E. M.			
0,1	0,177	0,295	$\pm 0,003$	$\pm 0,032$	0,310	0,667	$\pm 0,010$	$\pm 0,017$
0,5	0,216	0,418	$\pm 0,025$	$\pm 0,030$	0,237	0,915	$\pm 0,050$	$\pm 0,050$
1,0	0,230	0,358	$\pm 0,016$	$\pm 0,013$	0,283	0,890	$\pm 0,025$	$\pm 0,004$
3,0	0,243	0,325	$\pm 0,013$	$\pm 0,017$	0,301	0,796	$\pm 0,036$	$\pm 0,039$
7,0	0,201	0,212	$\pm 0,022$	$\pm 0,008$	0,025	0,479	$\pm 0,002$	$\pm 0,006$
K _N	0,316	0,608	$\pm 0,023$	$\pm 0,027$	0,375	0,942	$\pm 0,069$	$\pm 0,146$
K _P	0,028	0,000	$\pm 0,004$	$\pm 0,000$	0,041	0,134	$\pm 0,011$	$\pm 0,043$
l. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-85: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test und Neutralrot-Färbung) proliferierender Caco-2 Zellen

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 μ mol/L SDS, Angabe der Aktivitäts-Indizes: s. Abbildung 4-27. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C _{U 35} [mg Protein/mL]	WST-1 Test				Neutralrot-Färbung			
	MW d. Extinktionen \pm S. E. M.				MW d. Extinktionen \pm S. E. M.			
0,1	0,258	0,363	$\pm 0,026$	$\pm 0,014$	0,417	0,717	$\pm 0,038$	$\pm 0,034$
0,5	0,149	0,312	$\pm 0,015$	$\pm 0,017$	0,394	0,711	$\pm 0,017$	$\pm 0,023$
1,0	0,057	0,221	$\pm 0,005$	$\pm 0,014$	0,349	0,572	$\pm 0,027$	$\pm 0,122$
3,0	0,071	0,163	$\pm 0,018$	$\pm 0,004$	0,149	0,142	$\pm 0,037$	$\pm 0,035$
K _N	0,316	0,608	$\pm 0,023$	$\pm 0,027$	0,375	0,942	$\pm 0,069$	$\pm 0,146$
K _P	0,028	0,000	$\pm 0,004$	$\pm 0,000$	0,041	0,134	$\pm 0,011$	$\pm 0,043$
l. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-86: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test und Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 μ mol/L SDS, Angabe der Aktivitäts-Indizes: s. Abbildung 4-28. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C _{LA 70} [mg Protein/mL]	WST-1 Test				Neutralrot-Färbung			
	MW d. Extinktionen \pm S. E. M.				MW d. Extinktionen \pm S. E. M.			
0,1	0,578	1,026	$\pm 0,017$	$\pm 0,105$	0,580	0,079	$\pm 0,074$	$\pm 0,047$
0,5	0,547	0,837	$\pm 0,049$	$\pm 0,066$	0,491	0,638	$\pm 0,080$	$\pm 0,047$
1,0	0,602	0,705	$\pm 0,034$	$\pm 0,103$	0,604	0,299	$\pm 0,151$	$\pm 0,043$
3,0	0,471	0,468	$\pm 0,055$	$\pm 0,046$	0,522	0,173	$\pm 0,040$	$\pm 0,042$
7,0	0,254	0,215	$\pm 0,022$	$\pm 0,029$	0,445	0,007	$\pm 0,014$	$\pm 0,007$
K _N	0,544	0,705	$\pm 0,101$	$\pm 0,047$	0,663	0,334	$\pm 0,105$	$\pm 0,126$
K _P	0,149	0,230	$\pm 0,029$	$\pm 0,150$	0,187	0,000	$\pm 0,064$	$\pm 0,000$
l. [h]	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24

Tabelle A-87: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test und Neutralrot-Färbung) differenzierter Caco-2 Zellen

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.; K_P: 1 μ mol/L SDS, Angabe der Aktivitäts-Indizes s. Abbildung 4-28. Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle.

C _{U 35} [mg Protein/mL]	WST-1 Test				Neutralrot-Färbung			
	MW d. Extinktionen \pm S. E. M.				MW d. Extinktionen \pm S. E. M.			
0,1	0,502	0,684	$\pm 0,014$	$\pm 0,073$	0,768	0,224	$\pm 0,066$	$\pm 0,048$
0,5	0,551	0,571	$\pm 0,031$	$\pm 0,124$	0,489	0,012	$\pm 0,043$	$\pm 0,012$
1,0	0,473	0,619	$\pm 0,084$	$\pm 0,096$	0,631	0,176	$\pm 0,089$	$\pm 0,008$
3,0	0,211	0,433	$\pm 0,009$	$\pm 0,047$	0,284	0,167	$\pm 0,060$	$\pm 0,049$
K _N	0,544	0,705	$\pm 0,101$	$\pm 0,047$	0,663	0,334	$\pm 0,105$	$\pm 0,126$
K _P	0,149	0,230	$\pm 0,029$	$\pm 0,150$	0,187	0,000	$\pm 0,064$	$\pm 0,000$
l. [h]	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24	d ₁₀ + 4	d ₁₀ + 24

Tabelle A88: Effekte einer 4 - 96 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf den TEER [$W\text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M., PK: 1 mmol/L m6,2Ado, Angabe der W_{TEER} s. Abbildung 4-29. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

CL_{A70} [mg Protein/mL]	MW TEER [$W\text{ cm}^2$] \pm S. E. M.					
0,1	462,73	520,67	458,70	$\pm 8,17$	$\pm 1,68$	$\pm 6,61$
0,5	465,67	489,50	414,33	$\pm 3,26$	$\pm 1,60$	$\pm 3,72$
1,0	512,23	531,30	463,47	$\pm 6,79$	$\pm 2,40$	$\pm 3,97$
K_N	492,43	595,83	559,17	$\pm 7,58$	$\pm 0,73$	$\pm 3,30$
K_P	492,43	5,87	0,00	$\pm 20,93$	$\pm 2,29$	$\pm 0,00$
I. [h]	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 96$	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 96$

Tabelle A-89: Effekte einer 4 – 72 h Inkubation mit rekonstituierter Magermilch auf den TEER [$W\text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M. Angabe der W_{TEER} s. Abbildung 4-29. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

C [mg Protein/mL]	MW TEER [$W\text{ cm}^2$] \pm S. E. M.					
1	251,90	255,93	266,93	$\pm 7,52$	$\pm 2,29$	$\pm 6,10$
3	252,63	290,40	288,20	$\pm 1,94$	$\pm 2,64$	$\pm 3,72$
5	246,03	290,40	290,03	$\pm 3,50$	$\pm 0,37$	$\pm 4,85$
9	184,43	335,87	286,00	$\pm 0,97$	$\pm 2,86$	$\pm 6,73$
12	99,37	340,27	275,00	$\pm 2,54$	$\pm 2,23$	$\pm 5,90$
15	59,40	188,83	188,47	$\pm 0,37$	$\pm 1,10$	$\pm 1,10$
K_N	220,00	238,70	265,83	$\pm 6,00$	$\pm 1,94$	$\pm 5,73$
I. [h]	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$

Tabelle A-90: Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M., PK: 1 mmol/L ip6Ado, Angabe der $A_{\text{DPP IV}}$ s. Abbildung 4-30. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

CL_{A70} [mg Protein/mL]	MW der Extinktionen ($\lambda = 405\text{ nm}$) \pm S. E. M.					
0,1	0,993	1,035	1,109	$\pm 0,043$	$\pm 0,038$	$\pm 0,026$
0,5	1,032	1,057	1,315	$\pm 0,020$	$\pm 0,031$	$\pm 0,037$
1,0	0,937	0,917	1,166	$\pm 0,020$	$\pm 0,044$	$\pm 0,055$
3,0	0,918	1,110	1,203	$\pm 0,039$	$\pm 0,148$	$\pm 0,041$
7,0	0,928	0,976	1,096	$\pm 0,032$	$\pm 0,075$	$\pm 0,033$
K_N	1,049	1,059	1,155	$\pm 0,097$	$\pm 0,088$	$\pm 0,015$
K_P	0,289	0,094	0,037	$\pm 0,086$	$\pm 0,009$	$\pm 0,021$
I. [h]	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$

Tabelle A-91: Effekte (Extinktionen) einer 4 – 72 h Inkubation mit Ultralact 35 auf die DPP IV-Aktivität differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M., PK: 1 mmol/L ip6Ado, Angabe der $A_{\text{DPP IV}}$ s. Abbildung 4-30. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C_{U35} [mg Protein/mL]	MW der Extinktionen ($\lambda = 405\text{ nm}$) \pm S. E. M.					
0,1	0,951	0,887	1,211	$\pm 0,034$	$\pm 0,056$	$\pm 0,028$
0,5	0,923	0,919	1,051	$\pm 0,005$	$\pm 0,054$	$\pm 0,054$
1,0	0,945	0,982	1,109	$\pm 0,063$	$\pm 0,066$	$\pm 0,036$
3,0	0,936	1,155	1,093	$\pm 0,013$	$\pm 0,019$	$\pm 0,018$
K_N	1,049	1,059	1,155	$\pm 0,097$	$\pm 0,088$	$\pm 0,015$
K_P	0,289	0,094	0,037	$\pm 0,086$	$\pm 0,009$	$\pm 0,021$
I. [h]	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$	$d_{10} + 4$	$d_{10} + 24$	$d_{10} + 72$

Tabelle A-92: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Lactalbumin 70 auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test und Neutralrot-Färbung) polymorphkerniger Leukozyten

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M., PK: 1 μ mol/L SDS, Angabe der Al_{WST-1} bzw. $Al_{Neutralrot}$ s. Abbildung 4-31. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C_{LA70} [mg Protein/mL]	WST-1 Test				Neutralrot-Färbung			
	MW der Extinktionen \pm S. E. M.				MW der Extinktionen \pm S. E. M.			
0,1	1,222	0,573	$\pm 0,021$	$\pm 0,017$	0,219	0,415	$\pm 0,011$	$\pm 0,064$
0,5	0,774	0,456	$\pm 0,008$	$\pm 0,007$	0,147	0,282	$\pm 0,017$	$\pm 0,129$
1,0	0,660	0,391	$\pm 0,021$	$\pm 0,020$	0,066	0,107	$\pm 0,008$	$\pm 0,014$
3,0	0,527	0,343	$\pm 0,028$	$\pm 0,050$	0,011	0,060	$\pm 0,003$	$\pm 0,007$
7,0	1,396	0,183	$\pm 0,010$	$\pm 0,027$	0,254	0,560	$\pm 0,013$	$\pm 0,059$
K_N	1,467	0,711	$\pm 0,003$	$\pm 0,076$	0,262	1,116	$\pm 0,030$	$\pm 0,029$
K_P	0,018	0,012	$\pm 0,008$	$\pm 0,010$	0,494	0,514	$\pm 0,048$	$\pm 0,083$
I. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

Tabelle A-93: Effekte (Extinktionen) einer 4, 24 h Inkubation mit Ultralact 35 auf die metabolische Aktivität (WST-1 Test und Neutralrot-Färbung) polymorphkerniger Leukozyten

Mittelwert (MW) der Extinktionen aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M., PK: 1 μ mol/L SDS, Angabe der Al_{WST-1} bzw. $Al_{Neutralrot}$ s. Abbildung 4-31. Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle.

C_{U35} [mg Protein/mL]	WST-1 Test				Neutralrot-Färbung			
	MW der Extinktionen \pm S. E. M.				MW der Extinktionen \pm S. E. M.			
0,1	1,738	0,600	$\pm 0,062$	$\pm 0,029$	0,324	0,677	$\pm 0,025$	$\pm 0,089$
0,5	1,765	0,607	$\pm 0,034$	$\pm 0,028$	0,216	0,486	$\pm 0,018$	$\pm 0,007$
1,0	1,600	0,492	$\pm 0,050$	$\pm 0,019$	0,315	0,382	$\pm 0,036$	$\pm 0,050$
3,0	0,709	0,308	$\pm 0,023$	$\pm 0,029$	0,001	0,042	$\pm 0,000$	$\pm 0,008$
K_N	1,467	0,711	$\pm 0,003$	$\pm 0,076$	0,262	1,116	$\pm 0,030$	$\pm 0,029$
K_P	0,018	0,012	$\pm 0,008$	$\pm 0,010$	0,494	0,514	$\pm 0,048$	$\pm 0,083$
I. [h]	4	24	4	24	4	24	4	24

A 4 Peptid-Transportstudien

Tabelle A-94: Mittelwerte der Leerwerte [W] - Ergebnisse der TEER Messung (I)

Die Messung des TEER (37 °C, 3.7.3) erfolgte in den Kavitäten ohne Zellen (Leerwerte Ω). Nachfolgend Berechnung der Mittelwerte (MW) aus drei Messwiederholungen. Diese Ergebnisse dienten der Berechnung des TEER in allen Kavitäten (K_N und P_T , s. Tabellen 4-30 bis 4-32). Abkürzung: n. d.: nicht detektiert.

Test	MTP Nr.	$d_{9/10}$	d_{14}	$d_{14} + X$ [h]	X [h]
1	1	77,00	81,00	79,00	82,00
1	2	75,00	74,00	72,00	72,00
1	3	79,00	79,00	78,00	80,00
1	4	71,00	73,00	68,00	69,00
2	1	78,00	78,00	74,00	70,00
3	1	80,00	80,00	73,00	74,00
4	1	67,00	65,00	66,00	68,00
5	1	75,00	75,00	72,00	75,00
6	1	86,00	87,00	86,00	85,00
6	2	79,00	81,00	80,00	81,00
6	3	82,00	80,00	81,00	83,00
7	1	n. d.	n. d.	86,00	82,00
8	1	n. d.	n. d.	78,00	72,00

Tabelle A-95: Mittelwerte der Leerwerte [W] - Ergebnisse der TEER Messung (II)

Die Messung des TEER (37 °C, 3.7.3) erfolgte in den Kavitäten ohne Zellen (Leerwerte Ω). Nachfolgend Berechnung der Mittelwerte (MW) aus drei Messwiederholungen. Diese Ergebnisse dienten der Berechnung des TEER in allen Kavitäten (K_N und P_T , s. Tabellen 4-30 bis 4-32). # Die TEER-Messungen erfolgten an d_{21} .

Test	MTP Nr.	$d_{9/10}$			d_{14}			$d_{14} + X [h]$			X [h]
1	1	85,00	84,00	82,00	81,00	84,00	83,00	86,00	83,00	88,00	2
1	2	85,00	85,00	85,00	82,00	81,00	82,00	81,00	82,00	82,00	2
1	3	86,00	84,00	87,00	83,00	80,00	83,00	81,00	88,00	84,00	2
1	4	83,00	84,00	84,00	83,00	82,00	84,00	80,00	82,00	83,00	2
2	1	86,00	82,00	82,00	79,00	81,00	82,00	81,00	84,00	82,00	2
2	2	82,00	82,00	82,00	82,00	83,00	81,00	82,00	85,00	87,00	2
3	1	80,00	81,00	82,00	79,00	80,00	78,00	77,00	80,00	80,00	4
3	2	82,00	83,00	81,00	76,00 [#]	70,00 [#]	71,00 [#]	80,00 [#]	83,00 [#]	82,00 [#]	4
4	A	80,00	80,00	80,00	80,00	75,00	73,00	79,00	81,00	77,00	4
4	B	82,00	83,00	83,00	77,00	78,00	78,00	80,00	80,00	80,00	4
4	C	82,00	83,00	81,00	80,00	78,00	80,00	81,00	84,00	82,00	4
4	D	81,00	80,00	82,00	80,00	80,00	80,00	80,00	78,00	79,00	4
4	E	83,00	80,00	82,00	79,00	80,00	79,00	81,00	80,00	81,00	4
4	F	80,00	81,00	82,00	80,00	82,00	82,00	81,00	80,00	82,00	4
5	1	81,00	79,00	80,00	80,00	80,00	80,00	79,00	80,00	79,00	4
5	2	80,00	80,00	81,00	83,00	81,00	80,00	80,00	81,00	83,00	1
6	1	80,00	82,00	82,00	80,00	80,00	80,00	81,00	83,00	80,00	4
7	1	81,00	82,00	81,00	80,00	79,00	78,00	79,00	81,00	81,00	3
7	2	80,00	81,00	81,00	78,00	80,00	79,00	81,00	78,00	79,00	3
MW der Leerwerte [W]											

Tabelle A-96: Effekte einer 4 – 96 h Inkubation mit Gly-Pro auf den TEER [$W \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.. Diese Ergebnisse waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-34 A). Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

C [mmol/L]	MW des TEER [$W \text{ cm}^2$]						\pm S. E. M.				
0,1	126,87	163,17	295,90	315,33	332,93	$\pm 1,68$	$\pm 1,68$	$\pm 1,60$	$\pm 2,40$	$\pm 2,86$	
0,5	144,47	199,10	303,60	335,87	277,93	$\pm 3,86$	$\pm 0,97$	$\pm 0,97$	$\pm 4,58$	$\pm 0,97$	
1,0	125,40	165,37	273,17	296,63	361,17	$\pm 2,57$	$\pm 2,91$	$\pm 0,97$	$\pm 5,76$	$\pm 1,94$	
2,0	119,90	154,37	230,27	265,10	287,47	$\pm 2,23$	$\pm 1,10$	$\pm 1,32$	$\pm 0,97$	$\pm 1,94$	
4,0	108,17	147,77	218,90	242,73	288,93	$\pm 0,64$	$\pm 1,10$	$\pm 1,32$	$\pm 1,83$	$\pm 2,04$	
10,0	127,60	169,40	232,83	294,43	329,63	$\pm 1,60$	$\pm 1,94$	$\pm 0,64$	$\pm 2,40$	$\pm 1,32$	
K_N	111,47	148,87	216,70	257,40	284,17	$\pm 1,68$	$\pm 1,10$	$\pm 1,83$	$\pm 3,13$	$\pm 0,37$	
I. [$d_{10} + h$]	4	24	48	72	96	4	24	48	72	96	

Tabelle A-97: Effekte einer 4 - 96 h Inkubation mit Bradykinin auf den TEER [$W \text{ cm}^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.. Diese Ergebnisse waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-34 B). Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

C [$\mu\text{g/mL}$]	MW des TEER [$W \text{ cm}^2$]						\pm S. E. M.				
200	114,03	177,10	239,07	264,37	280,50	$\pm 0,37$	$\pm 0,00$	$\pm 1,32$	$\pm 3,20$	$\pm 2,04$	
400	116,23	171,97	226,97	246,77	276,47	$\pm 0,37$	$\pm 0,37$	$\pm 3,50$	$\pm 2,64$	$\pm 4,93$	
800	112,93	176,73	222,57	251,17	283,80	$\pm 0,37$	$\pm 0,37$	$\pm 1,60$	$\pm 2,04$	$\pm 1,32$	
K_N	122,47	169,77	239,07	248,23	273,53	$\pm 0,00$	$\pm 0,73$	$\pm 1,32$	$\pm 2,54$	$\pm 4,58$	
I. [$d_{10} + h$]	4	24	48	72	96	4	24	48	72	96	

Tabelle A-98: Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Sol D auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.. Diese Ergebnisse waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-35). Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

$C_{Sol\ D}$ [mg/mL]	MW des TEER [$W\ cm^2$]			\pm S. E. M.		
10	135,30	182,60	345,40	$\pm 1,68$	$\pm 4,23$	$\pm 3,67$
20	158,03	231,73	368,50	$\pm 0,97$	$\pm 4,13$	$\pm 1,60$
40	159,50	203,50	327,43	$\pm 1,27$	$\pm 0,97$	$\pm 3,83$
80	181,87	209,00	278,67	$\pm 0,97$	$\pm 0,73$	$\pm 2,77$
100	189,93	207,90	269,50	$\pm 0,97$	$\pm 0,73$	$\pm 2,23$
K_N	130,53	195,43	312,03	$\pm 0,37$	$\pm 4,08$	$\pm 2,40$
l. [d_{10+h}]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A-99: Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Sol DA auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.. Diese Ergebnisse waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-35). Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

$C_{Sol\ DA}$ [mg/mL]	MW des TEER [$W\ cm^2$]			\pm S. E. M.		
10	148,87	237,60	417,27	$\pm 0,37$	$\pm 0,97$	$\pm 3,36$
20	153,27	211,20	313,50	$\pm 1,32$	$\pm 2,04$	$\pm 1,94$
40	156,57	271,33	448,43	$\pm 0,37$	$\pm 1,32$	$\pm 1,32$
80	165,73	194,33	277,20	$\pm 1,94$	$\pm 1,83$	$\pm 0,97$
100	203,87	258,87	379,50	$\pm 0,37$	$\pm 1,91$	$\pm 0,37$
K_N	130,53	195,43	312,03	$\pm 0,37$	$\pm 4,08$	$\pm 2,40$
l. [d_{10+h}]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A-100: Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Collagel A auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.. Diese Ergebnisse waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-35). Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

$C_{Collagel\ A}$ [mg/mL]	MW des TEER [$W\ cm^2$]			\pm S. E. M.		
10	149,60	253,37	343,20	$\pm 2,86$	$\pm 5,04$	$\pm 6,12$
20	157,30	276,10	404,43	$\pm 1,94$	$\pm 1,60$	$\pm 0,97$
40	139,70	234,30	303,60	$\pm 1,47$	$\pm 2,23$	$\pm 0,64$
80	148,50	242,37	309,10	$\pm 3,61$	$\pm 1,68$	$\pm 0,64$
100	155,83	256,67	341,37	$\pm 1,32$	$\pm 3,30$	$\pm 1,83$
K_N	132,00	181,50	268,40	$\pm 1,32$	$\pm 4,46$	$\pm 1,91$
l. [d_{10+h}]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A-101: Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Collagel BS auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.. Diese Ergebnisse waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-35). Abkürzung: l.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

$C_{Collagel\ BS}$ [mg/mL]	MW des TEER [$W\ cm^2$]			\pm S. E. M.		
10	147,40	212,30	301,03	$\pm 2,57$	$\pm 3,00$	$\pm 1,60$
20	151,07	231,00	365,93	$\pm 1,27$	$\pm 3,50$	$\pm 0,37$
40	170,87	236,13	310,20	$\pm 0,64$	$\pm 2,86$	$\pm 1,68$
80	185,90	256,30	317,17	$\pm 0,73$	$\pm 1,60$	$\pm 2,40$
100	213,40	273,90	359,70	$\pm 0,97$	$\pm 0,97$	$\pm 0,64$
K_N	132,00	181,50	268,40	$\pm 1,32$	$\pm 4,46$	$\pm 1,91$
l. [d_{10+h}]	4	24	72	4	24	72

Tabelle A102: Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Collagel BS-GA auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Mittelwert (MW) des TEER aus drei Messwiederholungen \pm S. E. M.. Diese Ergebnisse waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-36). Abkürzung: I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

$C_{Collagel\ BS-GA}$ [mg/mL]	MW des TEER [$W\ cm^2$]				\pm S. E. M.		
10	147,40	204,97	361,90	$\pm 1,60$	$\pm 4,23$	$\pm 1,32$	
20	160,60	220,00	344,30	$\pm 0,97$	$\pm 3,00$	$\pm 2,57$	
40	163,17	209,37	305,07	$\pm 2,04$	$\pm 1,47$	$\pm 0,64$	
80	187,37	207,53	294,43	$\pm 1,47$	$\pm 3,18$	$\pm 1,32$	
100	199,47	220,73	336,97	$\pm 1,32$	$\pm 2,20$	$\pm 1,27$	
K_N	135,30	191,03	345,40	$\pm 0,37$	$\pm 1,10$	$\pm 0,97$	
I. [d ₁₀ +h]	4	24	4	24	4	24	

Tabelle A-103: Effekte einer 4, 24 h Inkubation mit Kollagenhydrolysaten auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Diese Ergebnisse waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-37, A). Abkürzungen: K_N : Negativ-Kontrolle, I.: Inkubationsdauer.

	TEER [$W\ cm^2$]	\pm S. E. M.	TEER [$W\ cm^2$]	\pm S. E. M.
Sol D	217,80	$\pm 4,96$	178,57	$\pm 3,20$
Sol DA	222,57	$\pm 3,67$	188,47	$\pm 4,08$
Collagel A	210,83	$\pm 1,60$	195,43	$\pm 3,18$
Collagel BS	201,67	$\pm 4,23$	180,40	$\pm 0,97$
Collagel BS-GA	224,77	$\pm 1,60$	206,80	$\pm 1,32$
K_N	89,10	$\pm 0,64$	90,57	$\pm 0,97$
Leerwert	176,73	$\pm 1,60$	171,97	$\pm 2,57$
I. [d ₁₀ + h]	4		24	

Tabelle A-104: Effekte einer intervallartigen Inkubation mit Sol D auf den TEER [$W\ cm^2$] differenzierter Caco-2 Zellen (Monolayer)

Diese Ergebnisse des TEER [$\Omega\ cm^2$] waren grundlegend zur Berechnung der WI_{TEER} (s. Abbildung 4-37, B). Es wurden zwei verschiedene Caco-2 Monolayer (Kavität 1 bzw. 2) vom 10. Kulturtag an intervallartig 30 min mit Sol D (20 bzw. 100 mg/mL: * bzw. **) bzw. in DMEM kultiviert. Täglich wurden zwei TEER-Messungen (bei 37° C) durchgeführt: direkt vor bzw. 30 min nach Zugabe der Testsubstanz. Analog erfolgte die Messung in den beiden Kavitäten mit Kontroll-Monolayer (K_N 1 und 2). Diese Caco-2 Zellen wurden ausschließlich mit DMEM inkubiert, welches intervallartig ausgetauscht wurde. Abkürzung: K: Kavität, I.: Inkubationsdauer, K_N : Negativ-Kontrolle.

		MW des TEER [$W\ cm^2$] \pm S. E. M.						
K 1	DMEM	182,60	194,33	228,43	231,73	245,67	238,33	246,03
	Sol D*	169,77	232,10	220,73	231,37	253,73	237,97	235,77
K 2	DMEM	177,47	196,17	218,53	254,47	331,83	343,93	352,73
	Sol D**	199,83	257,40	258,50	286,00	346,87	375,83	394,90
K 3	K_N 1	213,77	210,10	217,80	224,77	221,10	217,07	236,13
K 4	K_N 2	192,87	206,80	214,50	211,57	215,23	222,57	220,37
K 1	DMEM	$\pm 1,27$	$\pm 1,10$	$\pm 1,27$	$\pm 0,73$	$\pm 4,59$	$\pm 0,73$	$\pm 0,97$
	Sol D*	$\pm 0,37$	$\pm 1,94$	$\pm 0,64$	$\pm 2,04$	$\pm 3,26$	$\pm 2,04$	$\pm 1,32$
K 2	DMEM	$\pm 2,64$	$\pm 3,20$	$\pm 3,26$	$\pm 1,47$	$\pm 2,40$	$\pm 2,40$	$\pm 1,91$
	Sol D**	$\pm 0,73$	$\pm 0,97$	$\pm 1,68$	$\pm 2,86$	$\pm 4,85$	$\pm 4,46$	$\pm 2,04$
K 3	K_N 1	$\pm 4,13$	$\pm 1,32$	$\pm 0,37$	$\pm 0,37$	$\pm 1,68$	$\pm 2,04$	$\pm 0,73$
K 4	K_N 2	$\pm 2,40$	$\pm 0,97$	$\pm 3,36$	$\pm 1,60$	$\pm 1,32$	$\pm 3,88$	$\pm 1,27$
	I. [d ₁₀ +h]	0,5	24	48	72	96	120	144

Tabelle A-105: Photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung: Messwiederholungen der Leerwerte und Standards

Die durch Fettdruck markierten Leerwerte (Reinstwasser) wurden von den Messwerten der jeweiligen Proben abgezogen. Die Messwerte der Standards wurden zur Berechnung der Kalibrierfunktionen (s. Tabelle A-106) eingesetzt (s. 4.2.4.2), die Messwerte der Standards der Tests 3 und 4 wurden nach Berechnung der Mittelwerte zur Berechnung der Nachweisgrenze von HyPro eingesetzt (s. 3.7.7).

Test	1	2	3 A	3 B	4 A	4 B/C	4 D/E	5	6/7
Leerwert	0,0486	0,0429	0,0327	0,0322	0,0528	0,0975	0,0439	0,0455	0,0520
Standard: Hydroxyprolin	MW der Extinktionen (l = 561 nm)								
6 µg	0,0877	0,0711	0,0706	0,0709	0,0670	0,0705	0,0710	0,0700	0,0747
	0,0900	0,0736	0,0678	0,0655	0,0663	0,0730	0,0721	0,0695	0,0730
48 µg	0,6621	0,5605	0,5230	0,5174	0,5475	0,5595	0,5601	0,5590	0,6250
	0,6437	0,5926	0,5133	0,5191	0,5301	0,5696	0,5632	0,5500	0,5145
120 µg	1,5192	1,3800	1,2427	1,1932	1,2648	1,2869	1,2852	1,2989	1,3449
	1,4675	1,3516	1,2340	1,1868	1,2754	1,2244	1,2453	1,3099	1,3926

Tabelle A-106: Kalibrierfunktionen der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung:

Die angegebenen Kalibrierfunktionen wurden unter Anwendung der Software Valoo[®] berechnet und zur Berechnung der Hydroxyprolin-Menge der jeweiligen Proben eingesetzt (s. 4.2.3.2).

Test	Kalibrierfunktionen	r	Test Nr.	Kalibrierfunktionen	r
1	$y = 0,0272 + 0,0122 x$	0,9990	4 MTP 2, 3	$y = 0,0333 + 0,0103 x$	0,9978
2	$y = 0,0217 + 0,0113 x$	0,9991	4 MTP 4, 5	$y = 0,0299 + 0,0104 x$	0,9986
3 MTP 1	$y = 0,0153 + 0,0102 x$	0,9998	5	$y = 0,0173 + 0,0108 x$	0,9996
3 MTP 2	$y = 0,0246 + 0,0098 x$	0,9993	6	$y = 0,0299 + 0,0113 x$	0,9984
4 MTP 1	$y = 0,0155 + 0,0105 x$	0,9996	7	$y = 0,0299 + 0,0113 x$	0,9984

Tabelle A-107: K_p: Berechnete Hydroxyprolin-Anteile in Sol D [%] (w/v)

Test	2	3	4	5	7
	10,65	10,41	11,69	10,91	11,21
	11,10	10,06	11,56	11,80	11,37
	9,89	10,01	11,69	11,00	10,92
	11,52	10,37	11,39		
	11,15	10,70	11,68		
MW ± S.E	10,86 ± 0,62	10,31 ± 0,28	11,60 ± 0,13	11,23 ± 0,28	11,17 ± 0,49

Tabelle A-108: K_D: Diffusion von 100 mg/mL Kollagenhydrolysaten durch PC-Membranen

Zusätzliche Informationen analog Tabelle A-109.

Test 4	P _T -BL (1,5 mL)		
	Hydroxyprolin [µg]	Anteile aus AP [%]	Kollagenhydrolysat [µg]
Sol DA	2066,32	38,63	19317,04
Collagel A	2308,80	40,86	20429,05
Collagel BS	2473,63	44,77	22383,83
Collagel BS-GA	2261,52	39,89	19945,62

Tabelle A-109: K_D : Diffusion von 100 mg/mL Sol D durch PC-Membranen (von AP nach BL)

In jeden Test der Transportstudie wurde eine Diffusionskontrolle (K_D) zur Überprüfung der Membran-Durchlässigkeit für die Testsubstanz integriert (s. 4.2.4.2). Dazu wurden u.a. 100 mg/mL Sol D (0,5 mL) in eins der apikalen Kompartimente (AP) einer jeden MTP pipettiert, direkt auf die Polycarbonatmembran. Die jeweilige Testsubstanz diffundierte während der Test-spezifischen Inkubationsdauer (15 – 180 min) ins basolaterale Kompartiment (BL: 1,5 mL). Nachfolgend wurde 1,4 mL der Probe (P_{T-BL}) zur photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung eingesetzt (s. 3.7.7). - Der Berechnung der Anteile an Hydroxyprolin [%], die aus dem apikalen ins basolaterale Kompartiment diffundierten, liegen folgende Überlegungen zu Grunde: Ein Kavität fasst 2 mL (4/4), wobei 0,5 mL (1/4) bzw. 1,5 mL (3/4) im apikalen bzw. basolateralen Kompartiment enthalten sind. Beide Kompartimente sind durch eine PC-Membran (0,4 μ m Porengröße) von einander getrennt, durch welche die apikal hinzugefügten Testsubstanzen diffundierten. Bei vollständiger Diffusion würden 75 % der applizierten Substanz in den basolateralen Proben enthalten sein: In 50 mg/0,5 mL Sol D sind 10860,96 μ g Hydroxyprolin (100 %, s. Tabelle 4-42) enthalten; 75 % davon sind 8145,72 μ g HyPro. Abkürzungen: P_{T-BL} : Probe aus dem basolateralen Kompartiment einer Testkavität, AP: apikales Kompartiment.

Test	Inkubationsdauer [min]	P_{T-BL} (1,5 mL)		
		Hydroxyprolin [μ g]	Anteile aus AP [%]	Sol D [μ g]
1	60	1336,66	24,61	12306,98
	15	1348,96	24,84	12420,25
2	30	1928,21	35,51	17753,55
	45	2096,64	38,61	19304,41
3	60	2481,92	45,70	22851,79
	90	1822,43	33,56	16779,60
4	90	2068,17	38,08	19042,21
	90	2866,28	52,78	26390,63
5	90	2808,75	51,72	25860,98
	120	2809,08	51,73	25864,06
6	180	2842,68	52,35	26173,42
	90	2453,78	45,19	22592,69

Tabelle A-110: K_N : Hydroxyprolin-Gehalt [μ L/ P_{T-BL}] der Proben von differenzierten Caco-2 Zellen

Zellaussaat ($10^5/cm^2$, 63. bis 84. Passage, s. Tabelle 3-21) auf PC-Membranen und 14 (21st) d Kultivierung in DMEM unter Standardbedingungen (s. 3.6). Nachweis intakter Caco-2 Monolayer durch TEER-Messung (bei 37 °C, an d_{14} (d_{21}), s. 3.7.3). Anschließend 90 min Inkubation mit MES-HBSS (pH 6,0). Probenentnahme aus basolateralen Kompartimenten. Nachfolgend Durchführung der HyPro-Bestimmung (s. 3.7.4, 3.7.7). Die HyPro-Menge [μ g] wurde mittels der jeweiligen Kalibrierfunktion (s. Tabelle A-106) berechnet, nachfolgend wurde die HyPro-Menge [μ g] je basolateralem Kompartiment (BL: 1,5 mL) ermittelt. Abkürzungen: P_{T-BL} : Probe aus dem basolateralen Kompartiment einer Testkavität.

Test	1	2	3_1	4_1	4_2	4_3	4_4	4_5,6	5_1	5_2	6	7	3_2 [#]
HyPro [μ g/ P_{T-BL}]	1,24											0,47	0,62
	1,31											1,33	0,63
												0,91	0,31
	1,28	0,06	-	1,41	1,18	0,65	0,79	0,19	1,13	1,41	0,90	0,90	0,52
												\pm 0,25	\pm 0,10

Tabelle A-111: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Transports von Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 1 (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse s. Tabelle 4-44. Abkürzungen: P_T : Probe aus einer Testkavität, K_N : Negativ-Kontrolle, K_D : Diffusionskontrolle.

Proben	MTP 2		MTP 1		MTP 1		MTP 2		
	K_N	K_D	Sol D [mg/mL]		Sol D [mg/mL]				
n			60	80	10	40	80	100	120
1	0,0837	0,0872	1,7663	2,1638	0,1364	0,1402	0,1524	0,2696	0,1791
2					0,1407		0,1195	0,1927	
3					0,1009		0,1560	0,2969	0,3048
K_P					0,1426	0,4112	0,7502	0,9616	1,1360

MW der Extinktionen ($l = 561$ nm)

Tabelle A-112: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Zeitabhängigen Transports von 100 mg/mL Sol D durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 2 (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse: s. Tabelle 445. Messwerte der 5 Proben der K_P : 0,5827 / 0,6237 / 0,6493 / 0,5810 / 0,6732 / 0,6520. Abkürzungen: P_T : Probe aus einer Testkavität, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle, K_D : Diffusionskontrolle, I.: Inkubationsdauer.

Proben	MW der Extinktionen (l = 561 nm)				
	15	30	45	60	90
P_T	0,4301	0,2913	0,0674	0,1417	0,8835
	0,2051	0,1064	0,2105	0,7642	0,5262
	0,0936	0,6461	0,3401	0,4481	0,4068
K_D		0,0679	0,5210	0,3025	
	0,4285	0,6032	0,6540	0,7702	
K_N				0,0243	
I. [min]	15	30	45	60	90

Tabelle A-113: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Sol D-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer nach 14-tägiger Zellkultivierung unter Standardbedingungen

Test 3 A (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse s. Tabelle 4-46 A. Abkürzungen: P_T : Probe aus einer Testkavität, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle, K_D : Diffusionskontrolle.

K_P	K_D	P_T
0,5124	0,5365	0,9828
0,5937	0,6050	0,2444
0,6296		0,2806
		0,2040
		0,2526
		0,3009
		0,3211
		0,4356
		0,1993
		0,2182
MW der Extinktionen (l = 561 nm)		

Tabelle A-114: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Sol D-Transports durch intakte Caco-2 Monolayer nach 21-tägiger Zellkultivierung unter Standardbedingungen

Test 3 B (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse s. Tabelle 4-46 B. Abkürzungen: P_T : Probe aus einer Testkavität, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle, K_D : Diffusionskontrolle.

K_P	K_D	K_N	P_T
1,1107	0,0028	0,0020	0,0360
1,1193		0,0477	0,0804
			0,1903
			0,0852
			0,2548
			0,0811
			0,0433
MW der Extinktionen (l = 561 nm)			

Tabelle A-115: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer (I)

Test 4 (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse: s. Tabelle 447 bis Tabelle 4-49. Abkürzungen: P_T : Probe aus einer Testkavität, K_N : Negativ-Kontrolle, K_P : Positiv-Kontrolle, K_D : Diffusionskontrolle.

Testsubstanz	K_P	K_D	K_N
Sol D [#]	0,5877	0,5851	0,6099
Sol DA [#]	0,0043	0,0025	0,0029
Sol DA ^{##}	0,6784	0,6460	0,5386
Collagen A [#]	0,0243	0,0319	0,0339
Collagen A ^{##}	0,6482	0,6060	0,5878
Collagen BS [#]	0,0108	0,0067	0,0123
Collagen BS ^{##}	0,6191	0,6136	0,5913
Collagen BS-GA [#]	0,0358	0,0400	0,0401
Collagen BS-GA ^{##}	0,6115	0,6223	0,6084
			0,6353
			0,6186
			0,5953
			0,0710
			0,0058
			0,0069
			0,4917
			0,6008
			0,0786
			0,0272
			0,6083
			0,6674
			0,0581
			0,0060
			0,6072
			0,7156
			0,0604
			0,0394
			0,6568
			0,0373
MW der Extinktionen (l = 561 nm)			

Unterscheidung der Proben in der Vorbereitung: # ohne, ## mit Hydrolyse

Tabelle A-116: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Transports von Kollagenhydrolysaten durch intakte Caco-2 Monolayer (II)

Test 4 (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse: s. Tabelle 4-47 bis Tabelle 4-49. Abkürzungen: P_T: Probe aus einer Testkavität.

Testsubstanz	P _T						
Sol D (MTP A)	0,2644	0,1917	0,2793	0,2766	0,2894	0,3134	0,5287
Sol D (MTP F)	0,2548	0,1428	0,1228	0,1775	0,2046	0,5532	0,1692
Sol DA	0,2069	0,1806	0,2012	0,3279	0,229	0,2028	0,1958
Collagen A	0,1300	0,0981	0,2715	0,1125		0,1138	0,1001
Collagen BS	0,1399	0,1423	0,2320	0,2760	0,3298	0,2528	0,1154
Collagen BS-GA	0,1187	0,5342	0,1089	0,0672	0,0897	0,3065	0,1461
MW der Extinktionen (l = 561 nm)							

Tabelle A-117: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Effekte einer Inkubation mit 0,5 µg/mL Cytochalasin D auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer (I)

Test 5 (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse: s. Tabelle 4-50. Abkürzungen: P_T: Probe aus einer Testkavität, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle, K_D: Diffusionskontrolle, Cyt: Cytochalasin.

K _P	K _D	K _N	K _N + Cyt	Sol D	P _T	Sol D + Cyt
0,6055	0,7425	0,0627	0,0738	0,3535		0,7762
0,6536			0,0600	0,3901		0,6272
0,6104			0,0500	0,4274		0,6699
MW der Extinktionen (l = 561 nm)						

Tabelle A-118: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Effekte einer Inkubation mit 0,1 mmol/L Palmitoyl-DL-Carnitin auf den Sol D-Transport durch intakte Caco-2 Monolayer (II)

Test 5 (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse: s. Tabelle 4-51. Abkürzungen: P_T: Probe aus einer Testkavität, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle, K_D: Diffusionskontrolle, PaC: Palmitoyl-DL-Carnitin.

K _P	K _D	K _N	K _N + PaC	Sol D	P _T	Sol D + PaC
0,6220	0,8417	0,0740	0,0833	0,3172		> 4,5
0,6304			0,0876	0,4732		> 4,5
0,6064			0,0612	0,2443		> 4,5
MW der Extinktionen (l = 561 nm)						

Tabelle A-119: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Effekte einer Inkubation mit *tight junctions*-Modulatoren auf den Sol D Transport durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 6 (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse: s. 4.2.4.2. Abkürzungen: P_T: Probe aus einer Testkavität, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle, K_D: Diffusionskontrolle, Cyt: Cytochalasin, PaC: Palmitoyl-DL-Carnitin.

K _D	K _N	K _N + Cyt	K _N + PaC	Sol D	P _T	Sol D + PaC
0,8742	0,0679	0,0652	0,0494	0,5011	0,9849	> 3
0,8743						
0,8844						
MW der Extinktionen (l = 561 nm)						

Tabelle A120: Photometrische Messergebnisse (Extinktionen): Untersuchung des Hydroxyprolin-Transports (freie und Peptid-gebundene Aminosäure aus Sol D) durch intakte Caco-2 Monolayer

Test 7 (s. Tabelle 3-21): Angaben zur Testdurchführung sowie Ergebnisse: s. Tabelle 4-52. Abkürzungen: P_T: Probe aus einer Testkavität, K_N: Negativ-Kontrolle, K_P: Positiv-Kontrolle, K_D: Diffusionskontrolle.

Test 7 A				Test 7 B			
K _P	K _D	K _N	P _T	K _P	K _D	K _N	P _T
- 0,0053	- 0,0060	- 0,0070	- 0,0021	0,7444	0,7675	0,0495	0,3741
- 0,0049		- 0,0059	- 0,0051	0,8370		0,0857	0,3092
- 0,0046		- 0,0052	- 0,0021	0,7372		0,0682	0,3978
			- 0,0010				0,3899
			- 0,0021				0,3915
MW der Extinktionen (l = 561 nm)							

Lebenslauf

Name: Sophie Anne-Kathrin Pentzien, geb. Dietrich

Geburtstag: 23. Juli 1969

Geburtsort: Jena

Staatsangehörigkeit: deutsch

Heirat: Holger Pentzien, am 28.12.1989, in Kiel

Mutter: einer Tochter, seit 28.10.2004

Schulbildung:

1976 – 1986 Polytechnische Oberschule in Jena

1992 – 1995 Fachgymnasium (Sozialwirtschaftlicher Zweig) in Rendsburg

Berufsausbildung:

1986 – 1989 Ausbildung zur Wirtschaftsdiakonin in Teltow

1989 – 1992 Ausbildung zur Arzthelferin in Kiel und Rendsburg

Berufstätigkeit:

02/1992 – 08/1992 Arbeitsverhältnis beim Dermatologen in Rendsburg

Studium:

10/1995 – 02/2001 Studium der Ökotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel, Schwerpunkt: Ernährungswissenschaft
Thema der Diplomarbeit: Wirkung von Ribonucleosiden auf intestinale Humanzellen (Caco-2)
Abschluss: Diplom

Wissenschaftliche Tätigkeit:

02/1999 – 04/2000 Volontärin im Institut für Chemie und Physik, BAfM, Kiel

12/2000 – 02/2001 Volontärin im Institut für Chemie und Physik, BAfM, Kiel bzw. im Institut für Chemie und Technologie der Milch (seit 01.2001)

03/2001 – 01/2004 Wissenschaftliche Angestellte im EU-Projekt Hypotensive Proteins from Milkprotein (HTMProt) (QLK1-2000-00043)

02/2004 – 10/2004 Volontärin im Institut für Chemie und Technologie der Milch, BFEL, Kiel

03/2001 Beginn der Arbeit an der Dissertation

Kiel, September 2005