

„Piraten“ eines Nährstofftransportsystems

Der intestinale Transport von Peptiden und Peptidpharmaka

Von Uwe Wenzel, Michael Boll und Hannelore Daniel

Pro Tag nehmen wir mit unserer Nahrung etwa 100 g Protein auf. Dieses besteht aus 20 verschiedenen Aminosäuren, die zu unterschiedlich langen Peptidketten verknüpft sind. Nahrungsproteine werden im Magen-Darm-Trakt durch Enzyme der Bauchspeicheldrüse und der Darmschleimhaut gespalten, um dann in Form ihrer Bestandteile durch die Epithelzellen des Dünndarms in den Körper aufgenommen zu werden. Dabei bestand lange Zeit die Meinung, daß alle Proteine bis auf die Stufe der freien Aminosäuren abgebaut würden, bevor sie von den Epithelzellen resorbiert werden. Heute weiß man, daß auch Peptide, die aus zwei oder drei Aminosäuren bestehen und die in großen Mengen bei der Verdauung anfallen, als intakte Moleküle in die Epithelzellen der Darmschleimhaut des Dünndarms gelangen. Für die Resorption von Di- und Tripeptiden gibt es in der Bürstensaummembran dieser Epithelzellen ein spezielles Transportprotein, das aktiv, d.h. unter Verbrauch zellulärer Energie, den Durchtritt der kurzkettigen Peptide in die Zelle vermittelt. Besondere Bedeutung erlangt dieses Transportprotein nicht zuletzt dadurch, daß es neben den Peptiden aus dem Abbau der Nahrungsproteine auch Pharmaka mit peptidähnlicher Struktur transportiert.

Die exzellente Bioverfügbarkeit einer Reihe von Antibiotika ist darauf zurückzuführen, daß diese Substanzen mit Hilfe des Peptidtransporters über die Bürstensaummembran in die Dünndarmepithelzelle transportiert werden. Angesichts der steigenden Zahl von Peptidpharmaka erlangt der intestinale Peptidtransporter damit zunehmendes Interesse für die Arzneimittelforschung, da durch ihn Peptidpharmaka über den Magen-Darm-Trakt – z. B. als Tablette oder Kapsel zugeführt – effizient in den Körper aufgenommen werden können. Die Kenntnis der Struktur des Transportproteins und seiner Substratbindungsstelle, d. h. der Stelle des Transportproteins, an welche die Peptide und ihre Abkömmlinge binden, ist für die Entwicklung resorbierbarer Peptidpharmaka unbedingte Voraussetzung. Wir beschreiben im folgenden Untersuchungen zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit solcher Peptidpharmaka in einem Zellkulturmodell mit Darmepithelzellen und die molekularbiologische Charakterisierung des intestinalen Peptidtransporters.

Aktiver Transport von Di- und Tripeptiden

Im Dünndarm werden die Nahrungsproteine durch spezielle Enzyme des Pankreas, sog. Proteinasen, bis auf die Stufe von Peptiden gespalten. An der Oberfläche der resorbierenden Dünndarmepithelzellen erfolgt dann der weitere Abbau dieser Proteinbruchstücke durch eine Klasse von Enzymen, die in der Bürstensaummembran verankert sind. Diese sog. Peptidasen spalten die Peptide bis hin zu Tri- und Dipeptiden. Ob die resultierenden Di- und

Tripeptide an der Zellmembran weiter bis zu Aminosäuren abgebaut werden, hängt sehr stark von der Spezifität der jeweiligen Peptidasen gegenüber ihren Substraten, den Tri- und Dipeptiden, ab. So ist z. B. das Dipeptid Glycyl-Glycin sehr resistent sowohl gegenüber den Peptidasen der Bürstensaummembran als auch gegenüber den intrazellulär lokalisierten Peptidasen, so daß es nach oraler Gabe hoher Dosen intakt im peripheren Blut nachgewiesen werden kann. Natürlich vorkommende Peptide, die resistent sind gegenüber der Spaltung durch Peptidasen, sind neben dem Glycyl-Glycin auch das Carnosin und Peptide mit Prolin und Hydroxyprolin als carboxyterminaler Aminosäure. Erst diese stabilen Peptide ermöglichen den Nachweis eines aktiven Transports intakter Peptide durch die Bürstensaummembran der Dünndarmepithelzellen (MATTHEWS et al. 1976).

Zur großen Überraschung entpuppte sich dieser Peptidtransporter als eine Besonderheit unter den Transportsystemen für Nährstoffe in den Zellmembranen von Säugetieren (GANAPATHY & LEIBACH, 1991). Der Transport der Peptide in die Zelle ist nämlich an die Gegenwart eines zelleinwärts gerichteten Protonengradienten (H^+ -Gradienten) gekoppelt, d. h. daß der Transporter für die Ausnutzung seiner maximalen Transportkapazität unterschiedliche H^+ -Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Bürstensaummembran benötigt. In diesem Fall benutzt der Peptidtransporter die extrazellulär vorliegende höhere Konzentration an H^+ -Ionen, bzw. den extrazellulär vorherrschenden niedrigeren pH-Wert, als treibende Kraft. Daß ein Protonengradient die treibende Kraft für die Aufnahme von Nährstoffen darstellen kann, war bisher

nur für Bakterien, Hefen und Pflanzenzellen beschrieben. Somit wird der Peptidtransporter unter Aspekten der Evolution der Nährstofftransportsysteme möglicherweise zum Bindeglied zwischen Prokaryoten und Eukaryoten (FEI et al., 1994). Entwicklungsgeschichtlich interessant ist weiterhin, daß ein protonengekoppeltes Transportsystem für Peptide bei Säugetieren und Menschen nicht nur in Dünndarmepithelzellen, sondern auch in Tubuluszellen der Niere nachweisbar ist (DANIEL, 1993).

Der Transport von Peptiden in die Zelle zusammen mit Protonen bedingt, daß die Peptide gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden können. Das bedeutet: Die Aufnahme der Peptide in die Zelle findet solange statt, bis der gleichzeitige Transport der Protonen (Cotransport) die unterschiedlichen Protonenkonzentrationen auf beiden Seiten der Bürstensaummembran ausgleicht und damit die treibende Kraft für die weitere Peptidaufnahme wegnimmt. Für die Aufnahme der Peptide in die Zelle bedeutet das, daß diese solange in der Zelle akkumulieren können, wie ein Protonengradient besteht. Der für die Peptidaufnahme notwendige pH-Gradient bzw. Protonengradient wird durch einen in der Bürstensaummembran gelegenen Na^+/H^+ -Austauscher erzeugt, der wiederum durch den Na-Gradienten (extrazellulär hohe Na^+ -Konzentration, intrazellulär niedrige Na^+ -Konzentration) angetrieben wird. Für die Aufrechterhaltung des Na^+ -Gradienten sorgt die in der basolateralen Membran gelegene Na^+/K^+ -ATPase, die unter Verbrauch von Energie (ATP-Spaltung), den Na^+ -Ionengradienten erzeugt.

Abbildung 1 stellt das gegenwärtige Konzept dar, mit dem die Peptidaufnahme in die Epithelzelle erklärt wird. Es handelt sich somit bei unserem als „Peptid/ H^+ -Symporter“ bezeichneten Transportprotein um einen tertiär aktiven Carrier, also einen Transporter, der primär über die Na^+/K^+ -ATPase und sekundär über den Na^+/H^+ -Austauscher energetisiert wird. Nach der Aufnahme von Di- und Tripeptiden in die Epithelzellen der Dünndarmschleimhaut erfolgt in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung die mehr oder weniger schnelle intrazelluläre Aufspaltung in die freien Aminosäuren. Die freien Aminosäuren können schließlich über Aminosäuretransporter der basolateralen Membran die Epithelzellen verlassen und gelangen so über die Darmvenen und die Pfortader in die Leber

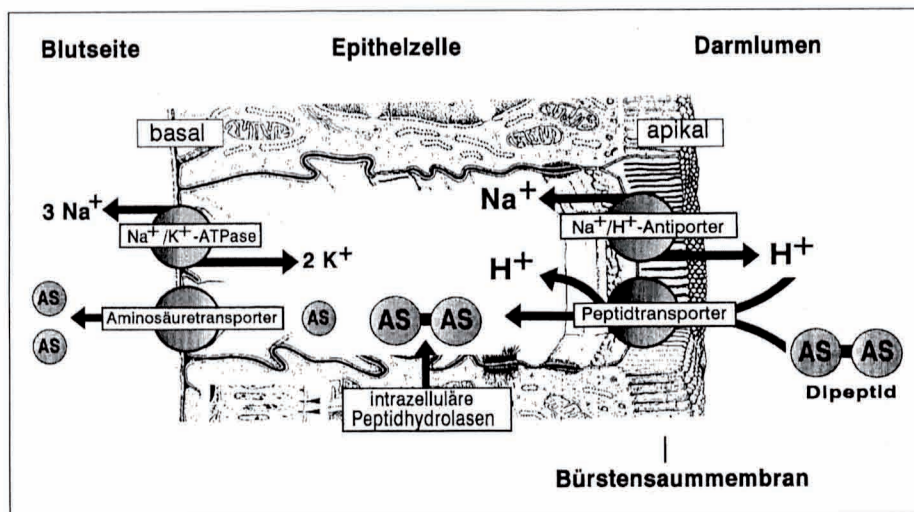


Abb. 1: Modell des intestinalen Transports von Di- und Tripeptiden. Die Aufnahme von Di- und Tripeptiden sowie von Substraten, welche diese Strukturen nachahmen, wie z. B. β -Lactamantibiotika, erfolgt im Dünndarm über einen in der Bürstensaummembran lokalisierten Peptidtransporter im Cotransport mit Protonen. Der Protonengradient wird durch den, ebenfalls in der apikalen Membran gelegenen, Na^+/H^+ -Austauscher generiert. Dieser wiederum ist von dem zelleinwärts gerichteten Na^+ -Gradienten abhängig, der durch die in der basolateralen Membran gelegene Na^+/K^+ -ATPase erzeugt wird. Di- und Tripeptide bestehend aus L- α -Aminosäuren werden intrazellulär rasch durch dort vorhandene, cytosolische Peptidasen gespalten, so daß freie Aminosäuren die Zelle über Aminosäuretransporter der basolateralen Membran verlassen und ins Blut gelangen.

und können dort verstoffwechselt oder aber in den systemischen Kreislauf abgegeben werden.

Ernährungsphysiologische und klinische Bedeutung

Die Bedeutung des intestinalen Peptidtransporters für die Versorgung des Körpers mit Aminosäuren wird besonders durch Erkrankungen des Dünndarmes, die mit Funktionsverlusten der Schleimhaut einhergehen, deutlich. So führen z. B. die ulzerativen Veränderungen bei Zöliakie, einer allergischen Reaktion gegen eine Weizenweißfraktion, und Morbus Crohn zu einer verminderten Resorptionskapazität der Schleimhaut für freie Aminosäuren. Im Gegensatz zu den Aminosäuren scheint aber die Aufnahme von Peptiden davon weniger betroffen zu sein (MATTHEWS et al., 1976). Auch akute Infektionen oder ernährungsbedingte Mangelzustände (Malnutrition) beeinträchtigen offensichtlich die Aufnahme freier Aminosäuren stärker als die von Peptiden. Hieraus ergibt sich ein entscheidender Vorteil von Diäten, die bei gestörter Verdauungsfunktion angewendet werden, auf der Grundlage von kurzkettigen Peptiden im Vergleich zu solchen mit freien Aminosäuren. Bei nahezu allen modernen Flüssigdiäten, die als Trink- oder Sondennahrung der Ernährung von Patienten mit eingeschränkter Funktion des Magen-Darm-Trakts dienen, werden heute Proteinhydrolysate mit hohem Anteil an kurzkettigen

Peptiden als Eiweißquelle eingesetzt. Da solche Peptidlösungen auch einen geringeren osmotischen Wert besitzen und die Aminosäuren aus Peptiden schneller von der Darmschleimhaut resorbiert werden, ergeben sich weitere Vorteile, die besonders auch bei der Vorbeugung und Behandlung von Durchfallerkrankungen in der klinischen Ernährung genutzt werden können (VAZQUES et al. 1993).

Bei der Hartnup-Krankheit wird die Bedeutung des intestinalen Peptid/ H^+ -Symporters besonders deutlich. Die Krankheit ist durch ein defektes Transportsystem für freie Aminosäuren in der Darmschleimhaut und der Niere gekennzeichnet. Hierdurch ist vor allem die Resorption der Aminosäuren Tryptophan, Arginin und Cystein betroffen. Bei solchen Patienten läßt sich zeigen, daß sie diese freien Aminosäuren nicht aufnehmen können. Bietet man jedoch dieselben Aminosäuren in Form eines Di- oder Tripeptids an, so ist die Erscheinensrate der freien Aminosäuren im Blut normal (MATTHEWS et al., 1976). D. h., die Gegenwart des Peptidtransporters verhindert, daß die Patienten an einer Malabsorption dieser Aminosäuren leiden. Dadurch wird der Transporter für kurzkettige Peptide für diese Patienten zu einem überlebenswichtigen Transportsystem.

Ein nicht zu unterschätzender Aspekt bei der oralen Gabe kurzkettiger Peptide ist ihr Geschmack. Dieser ist im Vergleich zu dem freier Aminosäuren viel besser. Flüssigdiäten mit freien Aminosäuren wurden aus diesem Grund

von den Patienten nicht angenommen, im Gegensatz zu Peptidlösungen. Während freie Aminosäuren der Nahrung häufig einen sehr bitteren Geschmack verleihen, können Peptide sogar als Geschmacksverbesserer eingesetzt werden. Als Beispiel sei hier der Süßstoff Aspartam genannt, der aus einem mit Methanol veresterten Dipeptid (Aspartyl-Phenylalanyl-Methylester) besteht und heute in vielen „Light“-Produkten Anwendung findet.

Pharmakologische Bedeutung des Peptid/ H^+ -Symporters

Wie bereits erwähnt, vermag der intestinale Peptidtransporter auch Pharmaka mit Peptidstruktur zu transportieren. Der Peptid/ H^+ -Symporter wird damit zum Ziel für das Design sogenannter Peptidmimetika, also biologisch wirksamer Substanzen, welche die Struktur von Peptiden simulieren und damit zu „Piraten“ dieses Nährstofftransportsystems werden. Solche Peptidpharmaka weisen häufig ungünstige Eigenschaften für den Durchtritt durch die Lipiddoppelschicht der Bürstensaummembran von Dünndarmepithelzellen auf. Daher versucht man, durch Einführung bestimmter molekularer Eigenschaften die Pharmaka so zu verändern, daß sie vom Peptidtransporter erkannt und damit in die resorbierende Epithelzelle aufgenommen werden können.

Welche Bedeutung der Peptidtransporter für die intestinale Resorption von Peptidphar-

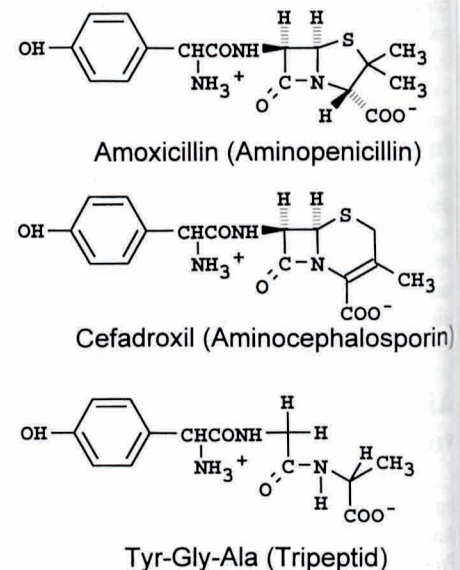


Abb. 2: Schematische Darstellung der chemischen Strukturen eines Aminopenicillins (Amoxicillin), eines Aminocephalosporins (Cefadroxil) und eines Tripeptids (Tyrosyl-Glycyl-Alanin) zur Verdeutlichung der strukturellen Ähnlichkeit der Moleküle.

maka hat, wird am Beispiel der Amino- β -Lactamantibiotika – dazu gehören die Penicilline und Cephalosporine – deutlich. Abbildung 2 zeigt die strukturelle Ähnlichkeit der Aminocephalosporine und Aminopenicilline mit Tripeptiden anhand eines Vertreters aus jeder Substanzklasse. Neben den β -Lactamantibiotika werden auch Hemmstoffe für das Angiotensin-Converting-Enzym, die sog. ACE-Hemmer, vom Peptidtransporter in die Zellen transportiert (BAI & AMIDON, 1992). ACE-Hemmer finden als Antihypertensiva (Blutdrucksenker) therapeutische Anwendung.

Eine Gemeinsamkeit der Antibiotika und ACE-Hemmer ist ihre Resistenz gegenüber der Spaltung durch Peptidasen. Diese Hydrolysesistenz ist eine Voraussetzung für die Wirkung der Substanzen. Bei der sog. „Peptide-Prodrug“-Strategie nutzt man im Gegensatz dazu gezielt die unterschiedliche Hydrolysesistenz von bestimmten Peptidpharmaka gegenüber extra- und intrazellulären Peptidasen aus, um die Bioverfügbarkeit des Arzneimittels zu erhöhen. So ist es möglich, die orale Verfügbarkeit von L-Dopa, einem Mittel zur Behandlung der Parkinsonkrankheit (Schüttellähmung), durch Verabreichung in Dipeptidform auf mehr als das zehnfache zu steigern. Hierbei bietet sich besonders die Verknüpfung des L-Dopa mit Prolin an, da aus dem über den Dipeptidtransporter aufgenommenen L-Dopa-Prolin durch die im Innern der Epithelzelle vorkommende Prolidase das L-Dopa freigesetzt wird. Andererseits kann durch die Verknüpfung des L-Dopa mit Prolin die Spaltung des Dipeptids an der Bürstensaummembran deutlich reduziert werden, was zusammen mit der gezielten intrazellulären Hydrolyse zu einer effizienteren intestinalen Resorption dieses Therapeutikums beiträgt.

In vitro-Modell zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit

Die Entwicklungen von Zell- und Gewebekulturen stellen neue, vielversprechende Instrumente zur Untersuchung des Stofftransports über spezielle biologische Membranen dar. Solche Zellsysteme ermöglichen z. B. die schnelle Beurteilung der Verfügbarkeit für Pharmaka, erlauben es, die Transportmechanismen zu definieren und können somit zur Entwicklung von Arzneimitteln beitragen, die effizienter über biologische Membranbarrieren transportiert werden. Für die Untersuchung intestinaler Transportprozesse hat sich besonders eine menschliche Dickdarmkrebs-Zelllinie (CaCo-2) bewährt. Diese differenziert unter standardisierten Kulturbedingungen spontan zu polarisierten Epithelzellen und bildet dabei einen geschlossenen Zellrasen (Monolayer).

Obwohl die CaCo-2 Zellen aus dem Dickdarm abstammen, entwickeln sie während ihrer Differenzierung innerhalb von zwei Wochen typische Charakteristika von Dünndarmepithelzellen. Es konnte gezeigt werden, daß CaCo-2 Zellen, ähnlich den normalen Epithelzellen des Dünndarms, Lipoproteinpartikel synthetisieren und Rezeptoren für verschiedene gastrointestinale Hormone ausbilden. Auch hinsichtlich ihrer Fähigkeiten zur Aufnahme von Nährstoffen weisen CaCo-2 Zellen viele der für Dünndarmepithelzellen typischen Transportsysteme auf.

Bei der Aufnahme von Peptidpharmaka in die CaCo-2 Zellen haben wir uns zunächst mit den Aminocephalosporinen beschäftigt, die, wie bereits erwähnt, eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit aufweisen. Als Modellsubstanz diente uns ein radioaktiv markiertes Aminocephalosporin, das ^3H -Cefadroxil. Entsprechend dem vorgestellten Modell in Abbildung 1 zeigt die Aufnahme von Cefadroxil in CaCo 2 Zellen eine ausgeprägte Abhängigkeit vom pH-Gradienten (Abb. 3) mit einem extrazellulären pH-Optimum bei pH 6,2–6,5. Daß die Aufnahme des Cefadroxils tatsächlich durch den Peptidtransporter vermittelt ist, zeigt der Zusatz des Dipeptids Glycyl-Sarko-

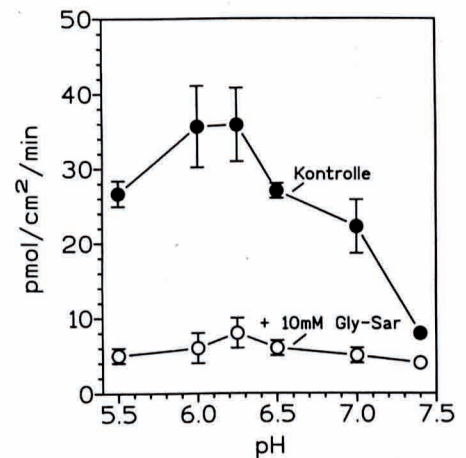


Abb. 3: Die Aufnahme von ^3H -Cefadroxil (1mM) in CaCo-2 Zellen in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert. Cefadroxil wurde in diesen Versuchen von der apikalen Seite (Darmlumen) in Gegenwart verschiedener pH-Werte angeboten. Durch gleichzeitiges Anbieten des Dipeptids Glycyl-Sarkosin (10 mM) läßt sich die Aufnahme des Cefadroxils bei allen pH-Werten fast vollständig hemmen. Dies weist darauf hin, daß das Antibiotikum und das Dipeptid das gleiche Transportsystem benutzen können.

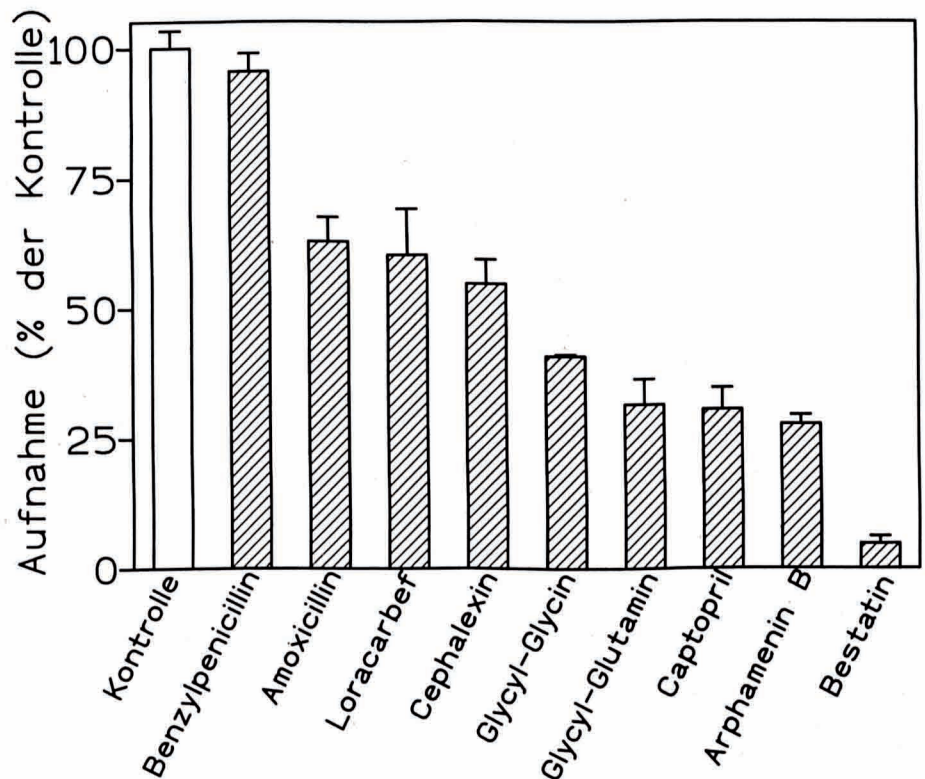


Abb. 4: Hemmung der ^3H -Cefadroxil-Aufnahme in CaCo-2 Zellen durch Peptide und Peptidmimetika. Die Konzentration des Cefadroxils betrug 1 mM, die der Hemmstoffe 10 mM. Um die treibende Kraft des Peptidtransporters zu gewährleisten, wurden die Substrate von der apikalen Seite bei einem pH-Wert von 6,5 angeboten. Es wird deutlich, daß die verschiedenen Substrate, abhängig von ihrer Affinität zum Peptidtransporter, unterschiedlich stark die Aufnahme von Cefadroxil hemmen. Benzylpenicillin scheint als einziges Substrat nicht an das Transportsystem zu binden.

sin. Durch gleichzeitige Gabe dieses nicht hydrolysierbaren Dipeptids in 10fachem Überschuß läßt sich die Aufnahme des Cefadroxils bei allen pH-Werten fast vollständig hemmen (Abb. 3). Bietet man bei pH 6.5 im apikalen Medium neben dem Cefadroxil zusätzlich andere Peptidmimetika oder Peptide an, so verdrängen diese in Abhängigkeit von ihrer Affinität zum Peptidtransporter das Cefadroxil, was zu einer Hemmung der Cefadroxilaufnahme in die CaCo-2 Zellen führt. Abbildung 4 zeigt, wie verschiedene Aminocephalosporine und Aminopenicilline, ebenso wie das Captopril, ein ACE-Hemmer, die Aufnahme des Cefadroxils unterschiedlich stark hemmen. Interessanterweise vermag das Benzylpenicillin dies nicht. Der Verlust der α -Aminogruppe im Benzylpenicillin führt offensichtlich zum Verlust seiner Affinität zum Transportprotein. Dieses Resultat im CaCo-2 in vitro Modell stimmt mit der Beobachtung überein, daß Benzylpenicillin beim Menschen auch sehr schlecht oral verfügbar ist. Als hervorragende Hemmstoffe der Cefadroxilaufnahme erwiesen sich weiterhin die Wirkstoffe Arphenamin B und Bestatin, die als vielversprechende Pharmaka in der Tumor- und AIDS-Therapie experimentell erprobt werden.

Da wir für Cefadroxil eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit seines Transports zeigen kön-

nen, ist entsprechend dem Modell in Abbildung 1 ein Cotransport mit H^+ -Ionen in die Zelle anzunehmen. Wie kann dieser Cefadroxil/ H^+ -Symport nun experimentell nachgewiesen werden?

Nach dem Modell müßte die Aufnahme des Antibiotikums zum Absinken des intrazellulären pH-Wertes führen, da H^+ -Ionen verstärkt in die Zelle einströmen. Diese werden erst dann mittels des Na^+/H^+ -Austauschers wieder eliminiert, wenn der pH-Wert in der Zelle einen bestimmten Wert unterschritten hat. Die pH-Veränderungen in lebenden Zellen können heute durch fluoreszenzoptische Methoden nachgewiesen werden. Hierzu haben wir CaCo-2 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(6)-carboxy-fluorescein (BCECF) beladen, der in Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert seine spektralen Eigenschaften ändert. Die Beladung der Zellen erfolgt mit dem lipophilen Ester des BCECF, der nach Diffusion in die Zellen durch dort vorkommende Esterasen gespalten wird und damit aufgrund der Freilegung zahlreicher Ladungen seine membranpermeierenden Eigenschaften verliert und das Innere der Zelle nicht verlassen kann. Durch die Eichung der pH-abhängigen Fluoreszenz kann der intrazelluläre pH-Wert genau bestimmt werden (THWAITES et al., 1993).

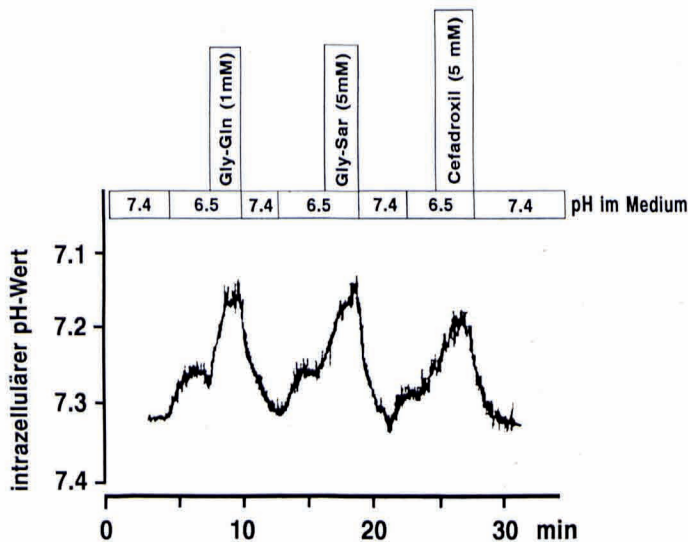


Abb. 5: Bestimmung des intrazellulären pH-Werts in CaCo-2 Zellen durch die Dipeptide Glycyl-Glutamin und Glycyl-Sarkosin sowie durch das Tripeptidmimetikum Cefadroxil mit Hilfe des in die Zellen eingebrachten pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs BCECF. Die CaCo-2 Zellen wurden apikal mit Puffer pH 7.4 oder 6.5 perfundiert und der intrazelluläre pH-Wert durch kontinuierliche Messung der resultierenden Fluoreszenz des BCECF bestimmt. Die Zugabe von Substraten des Peptidtransporters bei pH 6.5 (pH-Gradient) führt zu einem deutlichen Absinken des intrazellulären pH-Wertes. Nach Entfernen des Substrates durch Waschen der apikalen Seite mit Puffer pH 7.4 kehrt der intrazelluläre pH-Wert wieder auf den Ausgangswert zurück. Diese Experimente zeigen, daß die Aufnahme der Substrate in die Zelle tatsächlich mit einem Einstrom von Protonen (H^+ -Ionen) vergesellschaftet ist.

Abbildung 5 zeigt ein solches Experiment zum Einfluß von Substraten des Peptidtransporters auf den intrazellulären pH-Wert. Zunächst haben wir die CaCo-2 Zellen mit einem Puffermedium (pH 6.5) perfundiert, was zu einem leichten Absinken des intrazellulären pH-Werts führt, werden danach aber Substrate des Peptidtransporters, wie die Dipeptide Glycyl-Glutamin und Glycyl-Sarkosin oder aber das Cefadroxil zugesetzt, sinkt, wie erwartet, der intrazelluläre pH-Wert stark ab. Die Veränderung des pH-Wertes in der Zelle wird dabei ausschließlich von der maximalen Transportgeschwindigkeit des Peptidtransporters bestimmt. Wir haben diese Untersuchun-

gen mittlerweile für eine ganze Reihe interessanter Peptide und Peptidmimetika durchgeführt und können bereits einige, wenngleich nicht alle, Strukturmerkmale von Substraten definieren, die ihnen die Nutzung des Peptidtransporters möglich machen.

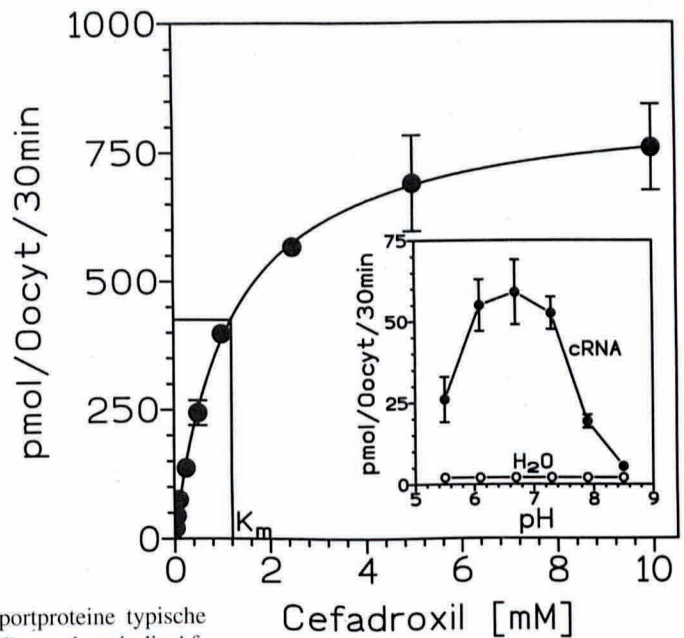
Diese Strukturmerkmale lassen sich möglicherweise im Sinne eines rationalen „Drug-Designs“ auf andere Substrate übertragen, um so deren Aufnahme in die Darmschleimhaut bzw. ins Blut günstig zu beeinflussen. So stellt z. B. die orale Verfügbarkeit von Peptidpharmaka mit Wirkung auf das Renin, ein Enzym, das für die Steuerung des Blutdrucks mitverantwortlich ist, nach wie vor ein Problem dar. Aufgrund der physiologischen Rolle des Renins bei der Regulation des Extrazellulärvolumens und damit des Blutdruckes, ist die Hemmung dieses Enzyms ein vielversprechendes Ziel für die kardiovaskuläre Therapie. Besonders vorteilhaft erscheint die Verwendung von Renin-Inhibitoren als Antihypertensiva deshalb, weil bislang für Renin keine andere Funktion nachgewiesen wurde als die Katalyse des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes bei der Blutdruckregulation. Die Hemmung einer einzigen spezifischen Reaktion durch die Renin-Inhibitoren ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber den ACE-Hemmern, die außer der Einwirkung auf die Blutdruckregulation auch andere Wirkungen haben, indem sie mit weiteren hormonähnlichen Substraten (Bradykinin, Enkephaline, Substanz P, Neurotensin, LHRH) interagieren. Diese Beteiligung an zahlreichen Stoffwechselprozessen birgt das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen.

Neue und erfolgversprechende Entwicklungen von Renin-Inhibitoren zeigen, daß deren Aufnahme nach oraler Gabe stark erhöht werden kann, wenn sie eine Di- oder Tripeptidstruktur aufweisen.

Die Molekularbiologie hält Einzug

Kürzlich gelang es einem Mitglied unserer Arbeitsgruppe (M. Boll), zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Murer an der Universität Zürich, das Peptidtransportsystem aus der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens zu klonieren. D. h., wir konnten die für das Transportprotein codierende Nukleotidsequenz der Desoxyribonucleinsäure (DNA) identifizieren und entschlüsseln. Damit sind wir nicht nur in der Lage, die Struktur dieses Transportproteins zu bestimmen, sondern können auch seine Funktion genau studieren. Als Werkzeuge hierzu dienen uns Eier (Oocyten) des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*, deren Größe (ca. 1 mm) es erlaubt, mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) mit Mikrokapsillaren zu injizieren. Die für den Peptidtransporter codierende RNA dient in den Oocyten als Matrize für die Synthese des Pep-

Abb. 6: Die Aufnahme von ^3H -Cefadroxil in *Xenopus laevis* Oocyten nach Expression des Peptidtransporters aus der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens. Nach Injektion von 5 ng der Peptidtransporter-mRNA und anschließender Expression des entsprechenden Transportproteins sind die Froscheier in der Lage, in starkem Maße das Antibiotikum Cefadroxil aufzunehmen. Die von der Cefadroxilkonzentration abhängige Aufnahme folgt dabei einer Sättigungskinetik, was charakteristisch ist für ein durch ein Transportprotein vermittelter Prozeß. Inset: Abhängigkeit der Aufnahme von ^3H -Cefadroxil in die Oocyten als Funktion des pH-Werts. Hierzu wurde der Transport von ^3H -Cefadroxil (25 μM) sowohl in Oocyten, in die Peptidtransporter-mRNA injiziert, als auch in Kontroll-Oocyten, in die Wasser injiziert wurde, bei verschiedenen pH-Werten im Inkubationsmedium gemessen. Für den Transport zeigt sich in den Oocyten, die den Transporter exprimieren, die erwartete ausgeprägte pH-Abhängigkeit, die der in CaCo-2 Zellen ähnlich ist.



tidtransporters, den wir danach funktionell in der Zellmembran der Oocyten untersuchen können.

Injizieren wir 5ng der Peptidtransporter-mRNA in die Oocyten, so nehmen diese nach drei Tagen etwa 60mal mehr ^3H -Cefadroxil auf, als Kontroll-Oocyten, in die Wasser injiziert wurde. Außerdem zeigt sich (Abb. 6, Inset) wie zu erwarten war, eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit der Cefadroxilaufnahme, mit einem pH-Optimum bei pH 6.5. Bestimmen wir die Aufnahme von Cefadroxil in Gegenwart steigender Cefadroxilkonzentrationen, erhal-

ten wir eine, für Transportproteine typische Sättigungskinetik (Abb. 6), aus der wir die Affinität des Cefadroxils zum Transportprotein bestimmen können. Der ermittelte Wert beträgt ca. 1,3 mM und stimmt damit sehr gut mit dem in CaCo-2 Zellen bestimmten Wert überein. Auch läßt sich die Aufnahme des Cefadroxils in Oocyten, die den Peptidtransporter exprimieren, durch alle Antibiotika und Peptide hemmen, die in den CaCo-2 Zellen mit Cefadroxil um den Transporter konkurrieren. Somit weist das klonierte Transportprotein alle von ihm erwarteten funktionellen Eigenschaften auf.

Mit der Klonierung des Peptidtransporters und seiner Expression in Oocyten, aber auch durch Einsatz der CaCo-2 Zellen, können wir nun eines der ungewöhnlichsten Transportsysteme für Nährstoffe in der Zellmembran von Dünndarmepithelzellen charakterisieren. Da es sowohl Peptide aus dem Abbau der Nahrungsproteine, als auch eine Reihe von Peptidpharmaka zu transportieren vermag, ist es gleichermaßen unter ernährungsphysiologischen wie pharmakologischen Aspekten interessant.

Zu den Autoren:



Prof. Dr. Hannelore Daniel, Jahrgang 1954, lehrt seit dem WS 92/93 Biochemie der Ernährung am Fachbereich Ernährungs- und Haushaltswissenschaften der Universität Gießen. Studium der Ernährungswissenschaften in Gießen und Promotion 1982. Habilitation 1989 für die Fächer Physiologie und Biochemie der Ernährung. Dreijähriger Forschungsaufenthalt an der School of Medicine der University of Pittsburgh/USA. 1992 Ruf auf die Professur für Ernährung des Menschen an der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Schwerpunkte der Forschungsaktivitäten der Arbeitsgruppe von Prof. Daniel sind die Transportvorgänge für Nährstoffe und Fremdstoffe an Zellmembranen von Darm, Niere und Placenta.

Dr. Uwe Wenzel, Jahrgang 1964, ist Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Daniel.



Michael Boll, Jahrgang 1968, ist ebenfalls Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Daniel. Er studierte Ernährungs- und Haushaltswissenschaften an der Universität Gießen und schrieb seine Diplomarbeit über „Bestrahlungsinaktivierung des renalen Oligopeptid/H⁺-Symporters“. Als Gastforscher in der Arbeitsgruppe von Professor Heini Murer am Institut für Physiologie der Universität Zürich hat er den Peptidtransporter aus der Dünndarmschleimhaut kloniert.



Literatur:

- DAVID M. MATTHEWS, F.R.C. PATH, SIAMAK A. ADIBI: Peptide absorption, *Gastroenterology* 71, 151–161, 1976.
- VADIVEL GANAPATHY, FREDERICK H. LEIBACH: Proton coupled solute transport in the animal cell plasma membrane. *Current opinion in cell biology* 3, 695–701, 1991.
- YOU-JUN FEI, YOSHIKATSU KANAI, STEPHAN NUSSBERGER, VADIVEL GANAPATHY, FREDERICK H. LEIBACH, MICHAEL F. ROMERO, SATISH K. SINGH, WALTER F. BORON, MATTHIAS A. HEDIGER: Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter *Nature* 368, 563–566, 1994.
- HANNELORE DANIEL: Transport von Oligopeptiden an Bürstensaummembranen von Dünndarm und Nierentubulus *Z. für Gastroenterologie* 33, 50–53, 1993.
- HANNELORE DANIEL, SIAMAK A. ADIBI: Transport of β -lactam antibiotics in kidney brush border membrane: Determinants of the affinity for the oligopeptide/H⁺-symporter. *J. Clin. Invest.* 92, 2215–2223, 1993.
- JORGE A. VASQUEZ, HANNELORE DANIEL, SIAMAK A. ADIBI: Dipeptides in nutrition: From basic science to clinical applications *Nutrition in clinical practice* 8, 95–105, 1993.
- JANE P.F. BAI, GORDON L. AMIDON: Structural specificity of mucosal-cell transport and metabolism of peptide drugs: implication for oral peptide drug delivery *Pharmaceut. Res.* 9, No. 8, 969–978, 1992.
- DAVID T. THWAITES, BARRY H. HIRST, NICHOLAS L. SIMMONS: Direct assessment of dipeptide/H⁺ symport in intact human intestinal (CaCo-2) epithelium: a novel method utilising continuous intracellular pH measurement *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 432–438, 1993.