

# Wider die Barriere: Der vektorielle Transport von Nährstoffen und Fremdstoffen durch die Zellmembran

■ Von Hannelore Daniel, Uwe Wenzel und Martina Herget

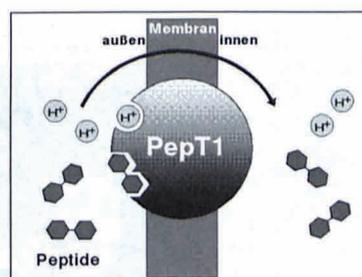
**Jeder mit der Nahrung zugeführte Stoff, sei er Nährstoff oder Fremdstoff, muß bei seiner Aufnahme in den Organismus, bei seiner Verteilung auf verschiedene Gewebe und seiner Ausscheidung eine Vielzahl von Kompartimenten durchqueren, die jeweils von einer Zellmembran umschlossen werden. Durch spezifische Membranproteine wird der gerichtete Transport von Nährstoffen und Fremdstoffen durch die Zellmembran ermöglicht. Damit kommt diesen Proteinen gleichermaßen unter nutritiven wie toxiologischen Aspekten eine große Bedeutung zu.**

Damit einerseits Nährstoffe gezielt durch die Membran in die Zelle und andererseits Fremdstoffe auch aus der Zelle befördert werden können, sind spezifische Proteine in die Lipidschicht der Zellmembran eingelagert. Mit der Struktur, Funktion und Regulation dieser Membranproteine die den vektoriellen Nährstoff und Fremdstofftransport vermitteln, beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe.

## Ein vielseitiger Nährstofftransporter

Im Dünndarm werden alle Nahrungsproteine durch spezielle Enzyme des Pankreas, sogenannte Proteinasen, in Bruchstücke

(Peptide) gespalten. An der Oberfläche der resorbierenden Dünndarmepithelzellen erfolgt dann der weitere Abbau der Peptide durch Peptidasen, die in der zum Darmlumen gerichteten Bürstensaummembran der Darmepithelzellen verankert sind. Diese Peptidasen setzen kleinere Peptide frei, die nur noch aus zwei oder drei Aminosäuren (Di- und Tripeptide) bestehen. Solche Peptide können aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften normalerweise nicht durch die Lipidmembran der Darmepithelzellen dringen. Die kurzkettigen Peptide werden mittels eines aktiven, das heißt, vom Zellstoffwechsel abhängigen Transportvorgangs durch die Bürstensaummembran der Dünndarmepithelzellen transportiert. Zur großen Überraschung entpuppte sich dieser Peptidtransporter als eine Besonderheit unter den Transportsystemen für Nährstoffe in den Zellmembranen von Säugetieren. Der Transport der Peptide in die Zelle ist nämlich an die Gegenwart eines zelleinwärts gerichteten Protonengradienten ( $H^+$ -Gradienten) gekoppelt, das heißt, daß der Transporter für die Ausnutzung seiner maximalen Transportkapazität unterschiedliche  $H^+$ -Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Zellmembran benötigt. In diesem Fall benutzt der Peptidtransporter die extrazellulär höhere Konzentration an  $H^+$ -Ionen, bzw. den extrazellulär vorherrschenden niedrigen pH-Wert, als treibende



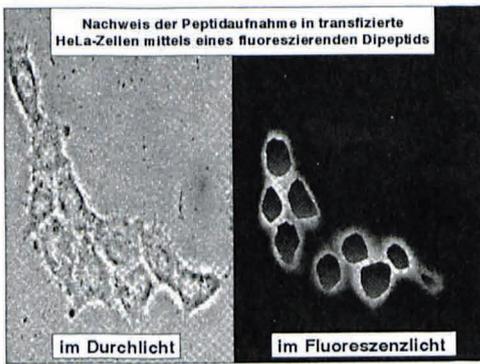
Kraft. Daß ein Protonengradient die treibende Kraft für die Aufnahme von Nährstoffen darstellen kann, war bisher nur für Bakterien, Hefen und Pflanzenzellen beschrieben. Somit wird der Peptidtransporter unter Aspekten der Evolution der Nährstofftransportsysteme möglicherweise ein Bindeglied zwischen den Speziesklassen. Interessant ist weiterhin, daß ein ähnliches protonengekoppeltes Transportsystem für Peptide bei Säugetieren und Menschen nicht nur in Dünndarmepithelzellen, sondern auch in Tubuluszellen der Niere nachweisbar ist. Nach der Aufnahme von Di- und Tripeptiden in die Epithelzellen der Dünndarmschleimhaut oder der Niere 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 Darm- bzw. Nierenvenen und die Pfortader in die Leber und können dort verstoffwech-

selt oder aber in den systemischen Kreislauf abgegeben werden. Neben den Peptiden aus dem Abbau der Nahrungsproteine vermag der intestinale Peptidtransporter auch Pharmaka mit Peptidstruktur zu transportieren. Der Peptid/H<sup>+</sup>-Symporter wird damit zum Ziel für das Design sogenannter Peptidmimetika, also biologisch wirksamer Substanzen, welche die Struktur von Peptiden simulieren und damit zu maskierten Substraten

transporters resorbiert werden. Neben den  $\beta$ -Lactamantibiotika werden auch Hemmstoffe für das Angiotensin-Converting-Enzym, die sog. ACE-Hemmer, vom Peptidtransporter in den Körper transportiert. ACE-Hemmer finden als Blutdrucksenker breite therapeutische Anwendung.

Kürzlich gelang es unserer Arbeitsgruppe die Peptidtransporter aus der Dünndarmschleimhaut und dem Nierentubulus zu klonieren.

Das heißt, wir konnten die für die Transportproteine codierenden Nukleotidsequenzen der Desoxyribonucleinsäure (DNA) identifizieren und entschlüsseln. Damit sind wir nicht nur in der Lage, die Struktur der Transportproteine aufzuklären, sondern können auch ihre Funkti-



dieses Nährstofftransportsystems werden. Welche Bedeutung der Peptidtransporter für die intestinale Resorption von Peptidpharmaka hat, wird am Beispiel von  $\beta$ -Lactamantibiotika – dazu gehören die Penicilline und Cephalosporine – deutlich. Fast alle oral wirksamen  $\beta$ -Lactamantibiotika die in Form von Tabletten zur Behandlung von bakteriellen Infektionen eingenommen werden, können im Darm nur aufgrund des Peptid-

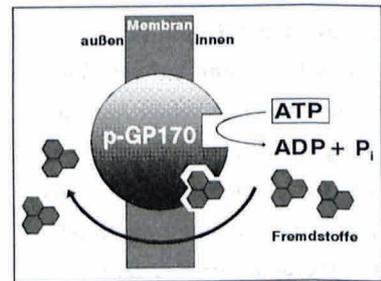
on genau studieren. Als Werkzeuge hierzu dienen uns verschiedene Zellen, die selbst keine Peptidtransporter besitzen. Durch Transfektion mit der cDNA der Peptidtransporter oder durch Injektion ihrer cRNA werden die Zellen veranlaßt, die Peptidtransporter zu bilden, die wir danach mit biophysikalischen Methoden untersuchen können. Nebenstehende Abbildung zeigt HeLa-Zellen, in denen nach Transfektion mit der DNA des intestinalen Peptidtransporters PepT1 die Peptidaufnahme durch ein fluoreszierendes Peptidanalogsichtbar gemacht werden kann.

Mittels Gensonden gelang es uns nachzuweisen, daß die Peptidtransporter auch in Gehirn, Leber, Lunge und eine Reihe anderer Organe sowie in Tumoren vorkommen, wobei über ihre Rolle in diesen Geweben noch keine Erkenntnisse vorliegen. Zur genauen Lokalisierung der Transporter in diesen Geweben werden wir die in situ-PCR und

verschiedene immunologische Techniken unter Verwendung von spezifischen Antikörpern einsetzen.

### ... und ein multispezifischer Fremdstofftransporter

Bestimmte Moleküle, darunter auch Substanzen, die den Zelltod herbeiführen, können aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften ungehindert durch die Lipidphase einer Zellmembran dringen. Gezielt werden solche Cyto-



toxika in der Behandlung von Tumoren eingesetzt. Dabei entwickeln die Tumorzellen oft im Laufe der Behandlung eine Resistenz gegenüber dem Zellgift und gleichzeitig gegenüber einer ganzen Reihe anderer Cytostatika. Bei der Suche nach der Ursache dieses als Vielfachresistenz oder „multidrug resistance“ genannten Phänomens stieß man auf ein Membranprotein (MDR1-Genprodukt), das die Fremdstoffe unter Energieverbrauch wieder aus der Zelle ausschleust und daher als multispezifische Transport ATPase bezeichnet wird.

Wir beschäftigen uns mit dem MDR-Genprodukt (dem p-GP 170), da es außer in Tumorzellen auch in normalen Epithelzellen von Darm und Niere vorkommt. Uns interessiert besonders wie und in welchem Umfang p-GP 170 am Export von toxischen Nahrungsinhaltsstoffen beteiligt ist. Bietet man menschlichen Epithelzellen aus Darm und Niere in der Zellkultur das in der Tumorbildung eingesetzte Daunomycin auf beiden Zellseiten an, wird ein gerichteter Transport von der Blutseite zur

JUSTUS-LIEBIG-

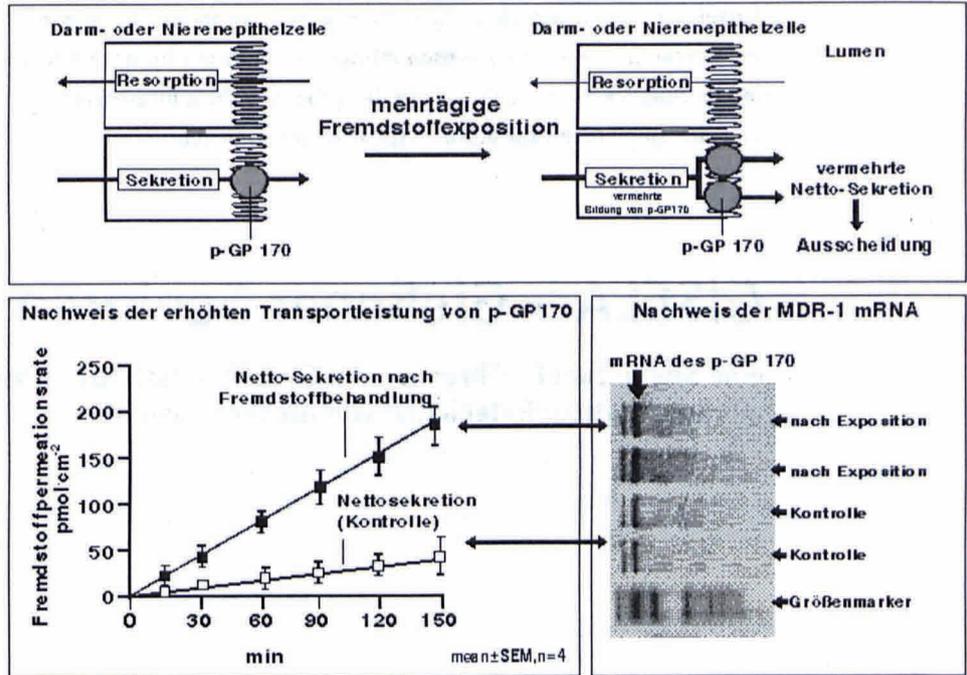


Prof. Dr. Hannelore Daniel  
Dr. Martina Herget  
Dr. Uwe Wenzel

Institut für Ernährungswissenschaft  
Wilhelmstraße 20  
35392 Gießen  
Telefon (06 41) 99-39040  
e-mail hannelore.daniel@ernaehrung.unigiessen.de

Lumenseite beobachtet, der den Transport in umgekehrter Richtung um ein mehrfaches übersteigt. Diese Nettosekretion wird spezifisch von p-GP 170 vermittelt, da seine Hemmung die Nettosekretion des Fremdstoffs vollständig blockiert. Damit kommt dem MDR1-Genprodukt wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Schutz des Körpers zu, da es im Darm bereits die Aufnahme von hydrophoben toxischen Stoffen reduziert und gleichzeitig in der Niere zu einer schnellen Elimination dieser Fremdstoffe beiträgt. In unseren Untersuchungen konnten wir tatsächlich zeigen, daß p-GP 170 eine ganze Reihe toxischer Nahrungsinhaltstoffe aus den Epithelzellen heraus transportiert, unabhängig davon wie sie in die Zellen aufgenommen wurden.

Kommen wir zurück zur „multi-drug-resistance“. Hierbei vermag ein toxischer Fremdstoff (Cytostatikum) in Tumorzellen nach einer bestimmten Zeit durch eine erhöhte Expression des MDR1 Gens, das heißt, vermehrte Bildung des p-GP 170 Proteins, zu einer verstärkten Elimination des Fremdstoffs zu führen. In der Folge sinkt der zelluläre Spiegel des Cytostatikums unter seine kritische Wirkstoffkonzentration, so daß die Tumorzelle wieder wachsen kann. Aufgrund der erhöhten p-GP170 Transportleistung ist sie nun gegen eine erneute Wirkstoffgabe des selben oder auch eines anderen Fremdstoffs unempfindlich. Aufgrund dieses Phänomens haben wir uns mit der Frage beschäftigt, ob die Expression des MDR1 Gens in Darmepithelzellen auch durch eine alimentäre Zufuhr toxischer Nahrungsinhaltstoffe erhöht werden kann und dadurch p-GP 170 in den Epithelzellen als Eintrittsbarriere für solche Stoffe fungiert. Durch den Nachweis der Boten-RNA in den Zellen kann geprüft werden, ob nach einer Fremdstoffgabe das MDR1 Gen vermehrt transkribiert (abgeschrieben) wird und



danach mehr seiner spezifischen RNA in der Zelle vorliegt.

Mittels der sog. RT-PCR (reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) und Northern-Blot Analyse konnten wir eine vermehrte Bildung der spezifischen mRNA des MDR1 Gens in Epithelzellen des Darmes nach Fremdstoffexposition nachweisen (siehe Abbildung). Untersuchten wir danach die Transportleistung des MDR1-Genprodukts in den exponierten Zellen, so war auch dessen Kapazität zur Elimination des Fremdstoffs um ein mehrfaches erhöht. Unsere Hypothese, wonach die Expression des MDR1 Gens in Zellen von Darm und Niere von der Zufuhr toxischer Stoffe abhängt, scheint damit belegt. Dies eröffnet jedoch auch die Perspektive, daß das MDR1 Gen bzw. das p-GP 170 beim Schutz vor Tumoren, vor allem dem sehr häufigen Dickdarmkarzinom, eine wichtige Rolle spielt. Die Beteiligung von p-GP 170 an der durch Fremdstoffzufuhr ausgelösten oder beschleunigten Entstehung

von Dickdarmkarzinomen ist gegenwärtig ein wichtiger Forschungsaspekt in unserer Arbeitsgruppe.

#### LITERATUR:

- M. Boll, D. Markovich, W.M. Weber, H. Korte, H. Daniel, H. Murer  
Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides,  $\beta$ -lactam antibiotics and ACEinhibitors  
Pflügers Archiv Eur. J. Physiol. 429, 146-149, 1994
- M. Boll, M. Herget, M. Wagener, W.M. Weber, D. Markovich, J. Biber, W.Clauß, H. Murer, H. Daniel  
Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high affinity proton-coupled peptide transporter. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 284-289, 1996
- H. Bartels, E. Korasiak, H. Daniel  
Transport activity of the MDR1-gene product in monolayers of CaCo2 cells  
Z. Gastroenterol. German J. Gastroenterology 32, 1518, 1994