
Zellchemische Untersuchungen der Wirkung von Peptiden und Proteinhydrolysaten auf Humanzellen

Kurzfassung zur Dissertation von Dipl. oec. troph. Anne-Kathrin Pentzien

Dr.-Vater: Prof. Dr. Hans Meisel

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. Kollagen-Hydrolysaten 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, Neutralrotfärbung, 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 DPP IV Bestimmung und die TEER-Messung. Die nicht-invasive Methode der TEER-Messung wurde außerdem zur kontinuierlichen Überprüfung der Wirkung bioaktiver Substanzen auf adhärenzte 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 Kollagen-Hydrolysate 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 Kollagen-Hydrolysate 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.

Erster Berichtstatter: Prof. Dr. H. Meisel