



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Sättigungswirkung durch Peptide“

Verfasserin ODER Verfasser

Daniela Maria Toure-Demmerer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt.
Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ. Prof. Dr. Jürgen König

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ. Prof. Dr. J. König für die freundliche Betreuung und vor allem für die rasche und unkomplizierte Themenvergabe an mich.

Danken möchte ich auch meiner besten Freundin Jeannette, auf die ich mich immer verlassen konnte und die immer für mich da war, wenn ich sie brauchte.

Michi danke ich für seine tatkräftige und geduldige Unterstützung beim Formatieren meiner Diplomarbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Ehemann bedanken, der mir während des gesamten Studiums immer zur Seite stand, mich in schwierigen Zeiten immer wieder motivierte, immer an mich glaubte und mir durch seine Liebe stets die notwendige Kraft gab.

I. INHALTSVERZEICHNIS:

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS:..... III

III. TABELLENVERZEICHNIS: IV

IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:..... V

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....1

2. REGULATION DER NAHRUNGSAufNAHME.....3

2.1 HUNGER UND SÄTTIGUNG3

2.2 ZENTRALNERVENSYSTEM (ZNS).....5

2.3 GASTROINTESTINALTRAKT (GI-TRAKT).....10

2.4 VERBINDUNGSSIGNALE ZWISCHEN VERDAUUNGSTRAKT UND GEHIRN11

3. PEPTIDE, DIE MEHR KÖNNEN ALS GEAHNT13

3.1. BIOAKTIVE PEPTIDE13

3.2. OPIOID-REZEPTOR-SYSTEM15

3.2.1 ENDOGENE OPIOIDE16

3.2.2 EXOGENE OPIOIDE17

3.3 NAHRUNGSMITTELQUELLEN VON OPIOIDPEPTIDEN18

3.3.1. OPIOIDPEPTIDE IN DER MILCH19

3.3.1.1 KUHMITLCH21

3.3.1.1.1 GENETISCHE POLYMORPHISMEN DES B-CASEINS21

3.3.1.1.2 DIE BILDUNG DER BCMs WÄHREND DER LEBENSMITTELVERDAUUNG *IN VITRO*23

3.3.1.1.3 DIE BILDUNG DER BCMs WÄHREND DER LEBENSMITTELVERARBEITUNG ...26

3.3.1.2 HUMANE MITLCH.....27

3.3.1.3 EIN BEISPIEL FÜR DIE FREISETZUNG VON OPIOIDEN WÄHREND SGID, DIE SICH28

3.4 MOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN, ABSORPTION UND TRANSPORTSYSTEME VON30

NAHRUNGSMITTELPEPTIDEN30

3.4.1 MOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN30

3.4.2 GRUNDLAGEN DES PEPTIDTRANSPORTS	31
3.4.2.1 EPITHELIALER MEMBRANTRANSPORT	31
3.4.2.2 DAS EPITHEL DES DARMS	33
3.4.2.3 ABSORPTION VON PEPTIDEN IM ALLGEMEINEN	34
3.4.2.4 ABSORPTION VON OPIOIDPEPTIDEN	35
3.4.2.4.1 METHODEN, DIE LAUT LITERATUR FÜR DIE <i>IN VITRO</i> - BESTIMMUNG ANGEWANDT WURDEN	38
3.4.2.4.1.1. CACO-2 ZELLINIE – EIN MODELLSYSTEM FÜR DAS DÜNNDARMEPITHEL ..	38
3.4.2.4.1.2 USSING CHAMBERS (USSINGKAMMER)	40
3.4.2.4.2 <i>IN VIVO</i> -BESTIMMUNGEN	45
3.4.2.5 PEPTIDTRANSPORT ÜBER DEN BLUTWEG	46
3.4.2.6 ÜBERTRAGUNG VON PEPTIDEN ÜBER DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE	47
3.5 SPEZIFISCHE WIRKUNGEN DER B-CASOMORPHINE AUF BESTIMMTE GEWEBE BZW. 49 ORGANE	49
3.5.1 AUSWIRKUNGEN AUF DEN GASTROINTESTINALTRAKT	49
3.5.1.1 GASTROINTESTINALE MOTILITÄT UND MAGENENTLEERUNG.....	51
3.5.1.2 SCHLEIMSEKRETION IM DARM.....	53
3.5.1.3 GASTROINTESTINALE TRANSITZEIT	57
3.5.1.4 EINFLUSS AUF DAS SÄTTIGUNGSEMPFINDEN	58
3.5.2 EFFEKTE AUF DAS ZENTRALNERVENSYSTEM.....	59
3.5.2.1 FUNKTIONSTÖRUNGEN UND KRANKHEITSBILDER	63
3.5.2.1.1 PLÖTZLICHER KINDSTOD (SIDS)	63
3.5.2.1.2 AUTISMUS	63
3.5.3 KARDIOVASKULÄRE KRANKHEITEN.....	66
3.5.3.1 KARDIOVASKULÄRE GESUNDHEIT	70
3.5.4 DIABETES MELLITUS TYP I	70
3.5.4.1 EINFLUSS DER B-CASEIN-VARIANTEN	71
4. SCHLUSSBETRACHTUNG	75
5. ZUSAMMENFASSUNG	79
6. SUMMARY	80
LITERATURVERZEICHNIS:.....	81

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS:

Abb.1: Produktionsbereiche endogener, das Essverhalten regulierender Faktoren.....	4
Abb.2: Neurohormonale Regulation der Energiebilanz.....	6
Abb.3: Hypothalamus, zentrale Schaltstelle für Regulationsvorgänge der Nahrungsaufnahme.....	8
Abb.4: Mögliche physiologische Funktionen bioaktiver Nahrungsmittelpeptide.....	14
Abb.5: Diffusion durch Membranen.....	32
Abb.6: Schematische Darstellung einer Caco-2-Permeabilitäts Prüfung.....	38
Abb.7: Darstellung eines Caco-2 Monolayers im polarisierten Transwell-System.....	38
Abb.8: Schemazeichnung der Ussing-Kammer.....	41
Abb.9: Schaltzeichnung einer Ussingkammer inklusive Epithel.....	41
Abb.10: Messkammer, mit mukosaler und serosaler Hälfte.....	43
Abb.11: Die Blut-Hirn-Schranke.....	48
Abb.12: Der Magen-Darm-Trakt.....	50
Abb.13: Verteilung von Opioidrezeptoren im Gehirn.....	59

III. TABELLENVERZEICHNIS:

Tab.1: Physiologische Regulation der Nahrungsaufnahme.....	3
Tab.2: Nahrungsmittelproteinquellen von Opioidrezeptor-Liganden/Peptiden.....	18
Tab.3: Opioidrezeptorliganden der Hauptmilchproteine.....	19
Tab.4: Opioidpeptid-Sequenzen verschiedener Milchproteinquellen, speziell der β -Casomorphine.....	20
Tab.5: Aminosäuresubstitutionen im Rinder- β -Casein.....	22
Tab.6: Theoretischer Ertrag einiger Opioidagonisten- und antagonisten aus Kuhmilchproteinen.....	23
Tab.7: Zusammenfassung der Studien hinsichtlich der Absorption von Opioidpeptiden.....	46
Tab.8: Effekte des ZNS, die mit β -Casomorphinen in Verbindung gebracht werden.....	61

IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

A

ACE

Angiotensin Converting Enzyme

AS

Aminosäure

AgCl

Silberchlorid

Arg

Arginin

E

ELISA

Enzyme linked Immunosorbent Assay

ESI

Electrospray ionization

G

Gly

Glycin

Glu

Glutaminsäure

Gln

Glutamin

GHRF

Growth hormone-releasing factor

H

HPLC

High-performance liquid chromatography

HDL

High Density Lipoproteins

His

Histidin

I

i.v.

intraventrikulär

Ile

Isoleucin

IgG

Immunglobulin G

K

KCl

Kaliumchlorid

L

LC

Liquid Chromatography

LDL

Low Density Lipoproteins

Leu

Leucin

Lys

Lysin

M

MALDI/TOF

Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization/
Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry

Met

Methionin

MS

Massenspektroskopie

P

Phe

Phenylalanin

Pro

Prolin

PEPT 1

Peptidtransporter 1

S

Ser

Serin

T

Tyr

Tyrosin

Thr

Threonin

U

UHT

Ultrahocherhitzt

V

Val

Valin

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Proteine sind eine sehr große Familie von organischen Verbindungen, die an vielen wichtigen biologischen Prozessen im menschlichen Organismus beteiligt sind.

Anschließend an deren enzymatischen Hydrolyse während der Lebensmittelverarbeitung oder der Lebensmittelverdauung können Proteine Fragmente ihrer primären Aminosäuresequenz freisetzen. Diese Bruchstücke werden als Peptide bezeichnet, und viele dieser sind physiologisch aktiv.

Innerhalb der letzten 30 Jahre wurden viele dieser sogenannten bioaktiven Peptide, die latent in der Primärstruktur verschiedener Nahrungsproteine (insbesondere der Milch) vorhanden sind, in unterschiedlichen Nahrungsmitteln identifiziert.

Unter diesen wurden u.a. die sogenannten β -Casomorphine (BCMs) erwähnt, Peptidsequenzen im Milchprotein β -Casein.

Da diese biologisch aktiven Peptide eine gewisse Affinität zu Opioidrezeptoren aufweisen, stellen sie eine Gruppe von sogenannten Opioidpeptiden dar.

Zur Entfaltung physiologischer Wirkungen (*in vivo*) ist es notwendig, dass diese oral aufgenommenen bioaktiven (Vorläufer-) Peptide das jeweilige Zielgewebe (u.a. Gastrointestinaltrakt, Leber, Gehirn, Blutsystem) intakt erreichen. Hierfür müssen BCMs den Verdauungstrakt intakt passieren, sich somit zum Teil als Hydrolyse-resistent gegenüber Verdauungs-, Plasma- und Leberenzymen erweisen und anschließend über die Pfortader und Leber in den systemischen Blutkreislauf und schließlich zum Wirkungsort gelangen.

Einerseits wurden in den letzten Jahren möglichen positiven Effekten der β -Casomorphine vermehrt Beachtung und Interesse geschenkt. Demnach sollen sie regulatorische Auswirkungen auf gastrointestinale Hormone, die gastrointestinale Motilität, die gastrointestinale Transitzeit, die Schleimsekretion im Darm, die Magenentleerung, die Modulation der Magen- und Pankreassekretion, wie auch auf immunmodulatorische und antioxidative Mechanismen ausüben [Daniel et al., 1990; Hara et al., 1992; Mahe et al., 1995, 1996; Claustre et al., 2002; Trompette et al., 2003; Mihatsch et al., 2005].

Andererseits weisen aber auch Untersuchungen daraufhin, dass die β -Casomorphine die menschliche Gesundheit nachteilig beeinflussen können.

So werden diese in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Krankheiten gebracht, wie kardiovaskulären Krankheiten, Diabetes mellitus Typ 1, psychischen Störungen wie Autismus oder Schizophrenie oder auch Atherosklerose [Elliott et al., 1999; McLachlan, 2001; Barbaresi et al., 2006; Cass et al., 2006; Cass et al., 2008].

Bis heute wurde viel Arbeit dafür investiert, die Natur dieser Opioidpeptide sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Proteinen besser zu charakterisieren. [Clare and Swaisgood, 2000; FitzGerald and Meisel, 2003; Meisel, 2004; Korhonen and Pihlanto, 2006; Korhonen and Pihlanto, 2007; Morris and FitzGerald, 2008].

Nun gilt es zu klären, welche tatsächlichen Effekte von diesen β -Casomorphinen ausgehen können bzw. zu erwarten sein dürfen, und ob diese im Zuge der Nahrungsaufnahme sogar einen Einfluss auf das Sättigungsempfinden des Menschen ausüben zu vermögen.

Im Zuge dessen müssen einige Aspekte betrachtet werden:

1. Mögliche Nahrungsmittelquellen von β -Casomorphinen
2. Polymorphismen des β -Caseins
3. Die Bildung der β -Casomorphine während der Lebensmittelverdauung und –verarbeitung
4. Etwaige molekulare Wechselwirkungen, Absorption von Opioidpeptiden
5. Mögliche Transportmechanismen der β -Casomorphine über die Darmmucosa, die Blut-Hirn-Schranke oder über den Blutweg
6. Spezifische Wirkungen der β -Casomorphine auf bestimmte Gewebe bzw. Organe

2. REGULATION DER NAHRUNGSAufNAHME

2.1 Hunger und Sättigung

Unter normalen Bedingungen ist die Nahrungsaufnahme eines Organismus seinem Energiebedarf angepasst [Elmadfa et al., 1998].

Weil Essen für den Menschen absolut lebensnotwendig ist, sind wir mit einem sehr effizienten und komplexen Regulationssystem ausgestattet, das Hunger- und Sättigungsgefühle verursacht und so Appetit und Nahrungsaufnahme reguliert.

Langfristig ist dieses Regulationssystem darauf ausgerichtet, die Energiebilanz ausgeglichen und damit das Körpergewicht konstant zu halten.

Kurzfristige Signalnetzwerke, die aktuelle Hunger- und Sättigungszustände vermitteln, müssen daher mit langfristigen Signalnetzwerken, die unsere Körperenergiereserven und deren Veränderungen messen, verschaltet werden [Ernährungsinformation der CMA 03/2005].

Tabelle 1: Physiologische Regulation der Nahrungsaufnahme [Elmadfa et al., 1998]

Afferente Kontrolle:

Orosensorik	Aussehen, Geruch, Geschmack, Textur, Speichelfluss, Füllung des Verdauungstraktes	
Rezeptoren	In Verdauungstrakt, Leber, Fettgewebe	
Metaboliten	Glucose Freie Fettsäuren Glycerin	Aminosäuren Nucleoside
Hormone	Insulin-Glucagon Corticosteron Östrogen-Progesteron CCK Sekretin Somatotropin	Gastrin Neurotensin Substanz P Prolactin

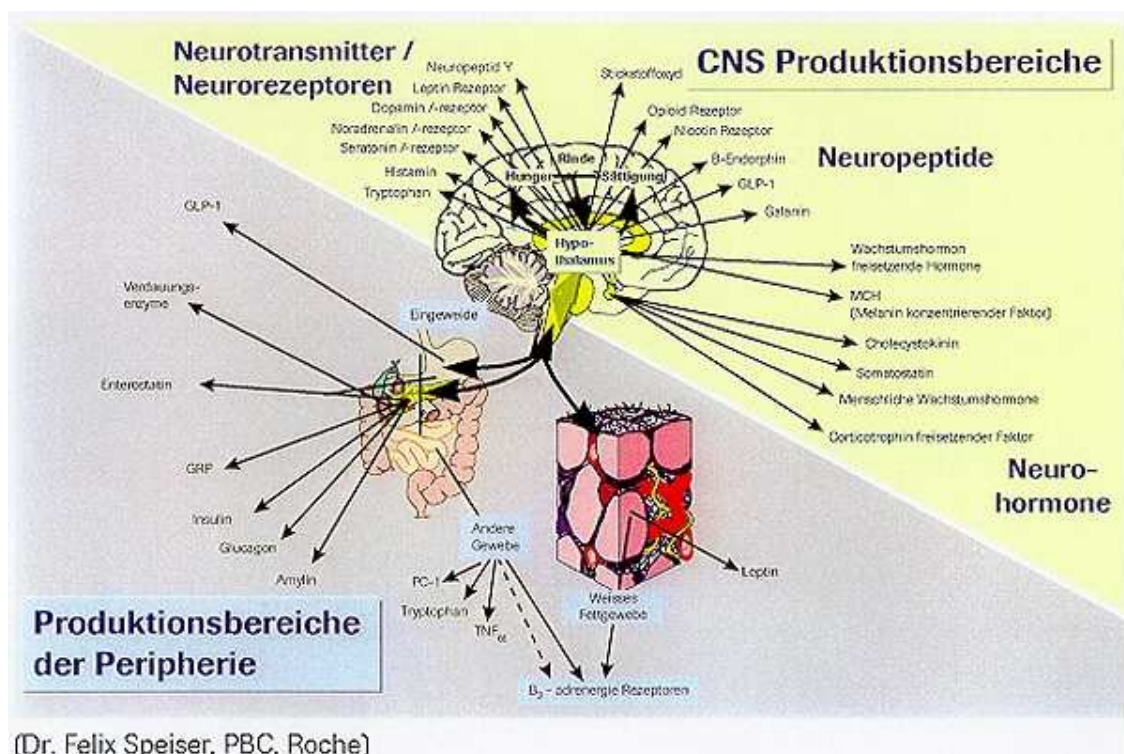
Zentralnervöse Regulation:

Neurotransmitter und Neurohormone	Serotonin Noradrenalin Opioide CRF Vasopressin	Dopamin Acetylcholin GHRF Calcitonin
Neuropeptide	Neuropeptid Y	Galanin
Rezeptoren	Im Hypothalamus u.a. Gehirnstrukturen	

Efferente Kontrolle:

Autonomes Nervensystem	Parasympathikus	Nahrungsinduzierte Thermogenese
------------------------	-----------------	---------------------------------

Die Information über die Nahrungszufuhr und die Körperspeicher der Nährstoffe gelangt über afferente Signale (Nährstoffe selbst, Hormone, etc.) zum Zentralnervensystem, wobei ihre Verarbeitung vor allem im Hypothalamus unter Beteiligung von Neurohormonen und Aminen vor sich geht [Elmadfa et al.,1998].



(Dr. Felix Speiser, PBC, Roche)

Abb.1: Produktionsbereiche endogener, das Essverhalten regulierender Faktoren [Speiser, PBC, Roche, 2011].

2.2 Zentralnervensystem (ZNS)

Als zentrales Steuerungselement dient das Gehirn, wo alle Informationen über den Ernährungszustand integriert werden und eine koordinierte Antwort auf die eingehenden Signale erfolgt. Die integrierten peripheren Signale werden dann über efferente Prozesse (Aktivierung bzw. Hemmung des autonomen Nervensystems, Beeinflussung peripherer endokriner Systeme) zur Peripherie vermittelt. Der Hypothalamus ist die zentrale Schaltstelle für die komplexen Regulationsvorgänge der Nahrungsaufnahme. Dort werden externe Reize, wie optische, olfaktorische und gustatorische Sinneseindrücke mit internen Signalen, wie dem Blutglucosespiegel oder Peptiden gastrointestinalen Ursprungs verarbeitet. Langfristiges Ziel ist dabei die Sicherstellung einer ausreichenden Nährstoffzufuhr und darüber hinaus das Anlegen von Energiespeichern, um so stets ein Überleben des Individuums gewährleisten zu können.

Bereits Mitte des vergangenen Jahrhunderts konnte anhand eines Tiermodells demonstriert werden, dass bilaterale Läsionen der ventromedialen

Hypothalamusregion zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme und schließlich zur Adipositas führen [Hetherington et al., 1940], während mit der Zerstörung der lateralen Hypothalamusanteile eine entgegengesetzte Wirkung erzielt werden kann [Morgane, 1961]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde dem ventromedialen Hypothalamus (VMH) ein Sättigungszentrum und dem lateralen Hypothalamus (LH) ein Hungerzentrum zugeordnet, die sich gegenseitig beeinflussen. Einem weiteren Areal des Hypothalamus, dem Nucleus dorsomedialis (DMN) [Wirth, 1961] und dem an der basalen Seitenwand des dritten Ventrikels liegenden Nucleus paraventricularis (PVN) wurden ebenfalls hemmende Einflüsse auf den Appetit zugeschrieben [Woods et al., 1998].

Anliegend am dritten Ventrikel, wo die Blut-Hirn-Schranke am durchgängigsten ist, befindet sich der Nucleus arcuatus (ARC). Zirkulierende Sättigungsfaktoren beeinflussen die Aktivität der dort befindlichen Neuronen, welche mit den verschiedenen hypothalamischen Nuclei in Verbindung stehen.

Diese Kernareale bilden wiederum ein eigenes neuronales Netzwerk und geben Rückmeldung an den Nucleus arcuatus.

Orexigene Effekte wurden nachgewiesen für:

- Neuropeptide Y (NPY) [Clark et al., 1984; Edwards et al., 1999; Jain et al., 2000; Stanley et al., 1984]
- Melanin concentrating hormone (MCH) [Edwards et al., 1999; Fan et al., 1997; Lu et al., 1994; QU et al., 1996]
- Agouti related peptide (AGRP) [Fan et al., 1997; Lu et al., 1994; Ollmann et al., 1997; Rossi et al., 1998]
- Galanin [Edwards et al., 1999]
- Orexin A und B [Edwards et al., 1999; Jain et al., 2000]
- Endogene Opioide / β -Endorphin [Appleyard et al., 2003; Brands et al., 1979; Grandison et al., 1977; Jackson et al., 1985; McKay et al., 1981; Stanley et al., 1989]
- Noradrenalin (α 2-Rezeptor) [Ramos et al., 2005]
- γ -Aminobutyrat (GABA) [Grandison et al., 1977; Kelly et al., 1977]
- Ghrelin [Kalra et al., 1999; Nakazato et al., 2001; Wren et al., 2000]
- Anandamid [Hao et al., 2000; Williams et al., 1999]

Anorexigene Effekte zeigten:

- α -Melanocyte stimulation hormone (α -MSH) [Poggioli et al., 1986; Ramos et al., 2005; Tsuji et al., 1989]
- Corticotropin releasing factor (CRF)
- Cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) [Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1997; Lambert et al., 1998]
- Glucagon like peptide 1 (GLP-1) [Lambert et al., 1993; Tang-Christensen et al., 1996; Turton et al., 1996]
- Glucagon
- Thyrotropin releasing hormone (TRH)
- Interleukin β (IL- β)
- Cholecystokinin (CCK) [Schick et al., 1990; Schick et al., 1991; Schick et al., 1986]
- Urocortin

- Neurotensin
- Enterostatin
- Amylin
- Oxytocin
- Bombesin
- Serotonin [Blundell, 1984]
- Dopamin [Leibowitz et al., 1982]
- Histamin
- Noradrenalin (α 1-Rezeptor, β 1- Rezeptor) [Leibowitz, 1986; Leibowitz et al., 1983; Ramos et al., 2005]

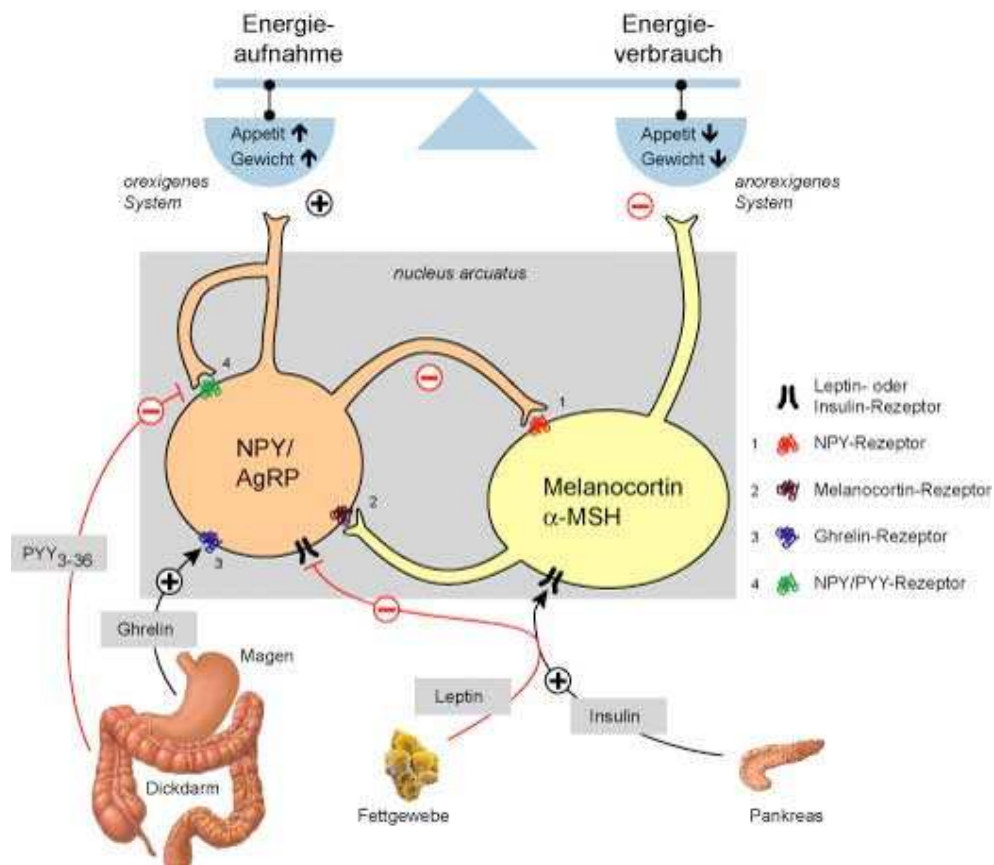


Abb.3: Neurohormonale Regulation der Energiebilanz [Spinas and Heitz, 2004].

Aus der Gruppe der orexigen wirksamen Botenstoffe soll an dieser Stelle exemplarisch das Neuropeptid Y (NPY) genannt sein. Zu den zahlreichen bisher bekannten peripheren Wirkungen wie Modulation von Insulinfreisetzung und Magen-Darm-Motilität, konnte eine zentrale Unterdrückung der Sättigungssignale und damit eine umfangreichere Nahrungsaufnahme, insbesondere von Kohlenhydraten, beobachtet werden [Stanley et al., 1985].

Noradrenalin wiederum kann als einziger Transmitter sowohl die Nahrungsaufnahme steigern als auch hemmen, abhängig von der Art des Rezeptors, an den gebunden wird.

Im Nucleus paraventricularis stimuliert er nicht nur das Fressverhalten, sondern steigert selektiv die Aufnahme von Kohlenhydraten [Meister, 2007].

Bei diesen Botenstoffen muss unterschieden werden, dass neben direkt nachgewiesenen Wirkungen, z.B. durch Instillation in die Liquorräume, indirekte Effekte, z.B. durch Blockade spezifischer Rezeptoren, beobachtet wurden, die zu diesen Erkenntnissen geführt haben.

Darüber hinaus arbeitet auch hier der Organismus so ökonomisch, dass nicht ausschließlich einem Transmitter allein eine bestimmte Funktion zugeteilt ist, sondern dass das konkrete Wirkungsergebnis zumeist ein Resultat agonistischer und/oder antagonistischer Wirkungsbeziehungen verschiedener Teilsysteme ist. Dabei spielen Signale aus der Peripherie, z.B. der Zustand der Magendehnung, eine bedeutende Rolle. Weiters zeigten zahlreiche Versuche am Tiermodell, insbesondere anhand von Knock-out-Mäusen, dass die isolierte Ausschaltung eines Regulators zumeist durch andere, weiterhin funktionierende physiologische Stellsysteme kompensiert wird, welches einen Tod des Individuums durch Verhungern in Folge eines fehlenden Fressantriebes verhindern soll.

Längst sind noch nicht alle molekularen Einflussgrößen und Regelsysteme identifiziert.

Sicher ist jedoch, dass die Nahrungsaufnahme über mannigfaltige Kurz- und Langzeitsignale aus dem Körper und der Umwelt gesteuert wird und dass der Hypothalamus als zentrale Schaltstelle dieser komplexen Vorgänge angesehen werden kann.

2.3 Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt)

Unmittelbar im Anschluss an die sogenannte cephale Phase der Nahrungsaufnahme, in der bereits Geruch und taktile Reize beim Kauen eine Erhöhung der Magensaftsekretion bewirken, werden mit dem Vollzug des Schluckaktes dehnungssensible Rezeptoren des Pharynx und des Ösophagus stimuliert. Über einen Reflexbogen des Nervus vagus wird der gastrale Ruhetonus gesenkt (rezeptive Relaxation) und der Magen füllt sich sukzessive. Die damit einhergehende Dehnung der Magenwand führt zur Aussendung von Sättigungssignalen über Vagusafferenzen [Anand and Pillai, 1967].

Versuche am Tiermodell zeigten, dass das Ausmaß der Magendehnung entscheidenden Einfluss auf Dauer und Umfang der Futteraufnahme hat [Geliebter et al., 1986; Share et al., 1952; Young et al., 1974]. Im Humanexperiment konnte mit Hilfe eines beliebig füllbaren Magenballons ab einem Volumen von 400 ml ebenfalls eine deutliche Reduktion der Nahrungsaufnahme nachgewiesen werden [Benjamin et al., 1988; Geliebter, 1988; Kramer et al., 1989; Meshkinpour et al., 1988]. Wasser allein kann, unabhängig von zugeführter Menge und damit verbundener gastral Dehnung, keinen Sättigungseffekt erzeugen, da sich der Magen rasch wieder entleert. Hingegen hat Wasser als Volumen gebender Bestandteil von Lebensmitteln im Zusammenhang mit einer längeren gastral Verweildauer Einfluss auf das Sättigungsgefühl [Hunt et al., 1985; Malagelada, 1977; Rolls et al., 1999; Schick et al., 2003].

Die Höhe der mit der Mahlzeit zugeführten Energie scheint nicht von Bedeutung zu sein, jedoch haben die relative Nährstoffzusammensetzung und die Konsistenz bzw. Darreichungsform der Kost Einfluss auf die Zeitdauer bis zum Erreichen bzw. das Ausmaß des Sättigungsempfindens [Hulshof et al., 1993; Porrini et al., 1995; Tournier and Louis-Sylvestre, 1991].

Die Bedeutung der in einer Mahlzeit anteilig enthaltenen Nährstoffkombination aus Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten für die Induktion der akuten Sättigung mit Beenden des Essvorgangs wird bis heute kontrovers diskutiert.

Sicher ist, dass je höher die Nährstoffdichte und damit der Energiegehalt im Chymus ist, desto verzögert erfolgt die Magenentleerung in das Duodenum und

umso länger registrieren gastrale Dehnungsrezeptoren einen erhöhten Füllstand [Hunt and Stubbs, 1975].

Zusammenfassend scheint beim Menschen der Magen den für die periphere Regulation des Sättigungsempfindens einflussreichsten Abschnitt des Gastrointestinaltraktes darzustellen [Gonzalez and Deutsch, 1981].

2.4 Verbindungssignale zwischen Verdauungstrakt und Gehirn

Der größte Nerv des Parasympathikus, der Nervus vagus, stellt den bedeutsamsten Verbindungsweg zwischen Gastrointestinaltrakt und Zentralnervensystem dar.

Die zum Teil gegensätzlichen Wirkungen der den Verdauungstrakt versorgenden Efferenzen werden in der Medulla oblongata koordiniert. Die zugehörigen afferenten Leitungsbahnen leiten für die Regulation der Nahrungsaufnahme bedeutsame Informationen, z.B. über das Ausmaß der Magendehnung, zum Gehirn. Seine Gegenspieler bilden die dem Grenzstrang (Truncus sympathicus) entstammenden Nervi splanchnici mit dem Plexus coeliacus.

Durch zahlreiche Verbindungen mit dem benachbarten Ganglion mesentericum superius werden beide als Plexus solaris zusammengefasst, in den auch parasympathische Fasern des Nervus vagus einstrahlen. Von dort ziehen die Nervenfasern mit den Blutgefäßen zu den lokalen Geflechten der Oberbauchorgane. Die erste zentrale Signalverarbeitungsstelle außerhalb des ZNS stellt das Ganglion coeliacum dar. Zugehörige afferente Fasern leiten viszerosensible Informationen der Bauchorgane an das Ganglion, dort erfolgt eine Modulation durch Verstärkung oder Hemmung dieser Impulse. Mittels Verbindungen zu efferenten Neuronen können wiederum entsprechende Impulse ausgelöst werden, sodass u.a. gastrointestinale Motorik und Durchblutung koordiniert werden können.

Bei afferent vagotomierten Ratten war die durch jene Leitungsbahnen neuronal vermittelte Induktion von Sättigung bei volumetrischer Dehnung der Magenwand aufgehoben, die nährstoffabhängigen Effekte blieben jedoch erhalten [Gonzalez and Deutsch, 1981]. Im Rahmen einer weiteren Versuchsreihe wurde Ratten operativ ein Zweitmagen angelegt.

Obwohl dieser keine Verbindung zum Nervensystem des Tieres hatte, konnte durch Instillation einer Nährlösung in das Magentransplantat eine vergleichbare Hemmung der Nahrungsaufnahme erreicht werden, wie nach Applikation der gleichen Menge in den natürlichen Magen [Koopmans, 1983].

Weiters fielen bei diesen Tieren nach bilateraler afferenter Vagotomie kaum Änderungen im Fressverhalten auf, sogar das Körpergewicht blieb mittelfristig beinahe konstant [Schick and Schusdziarra, 1994]. Diese Beobachtungen deuten auf hormonelle Regulationsmechanismen hin, die möglicherweise den Ausfall neuronaler Signale kompensieren können.

Bereits Ende der 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts fanden sich im Tierversuch erste konkrete Anhaltspunkte für hormonbedingte Einflüsse auf das Sättigungsempfinden, als man Blut satt gefressener in nüchterne Ratten transfundierte, welches daraufhin bei diesen Tieren zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme geführt hatte [Davis et al., 1967, 1969].

3. PEPTIDE, DIE MEHR KÖNNEN ALS GEAHNT

3.1. Bioaktive Peptide

Proteine stellen eine große Gruppe an organischen Verbindungen dar, die eine Hauptrolle in der Struktur und Funktionalität aller lebenden Organismen spielen.

Sie sind ein grundsätzlicher Bestandteil der tierischen und menschlichen Ernährung als Quelle für Energie, Stickstoff, essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren.

Außerdem können Nahrungsmittelproteine auch eine Quelle sogenannter biologisch aktiver Peptide (BAPs) zur Verfügung stellen, welche ihre Wirkung *in vivo* nur dann entfalten, wenn sie ihren Zielort intakt erreichen. Dazu ist es zumeist notwendig, dass diese bzw. Vorläuferpeptide nach der oralen Aufnahme den Verdauungstrakt intakt passieren und über die Blutbahn zum Wirkungsort transportiert werden. Freigesetzt werden können diese bioaktiven Peptide durch die Hydrolyse während der Lebensmittelverarbeitung oder durch die Lebensmittelverdauung.

Solche BAPs sind in der Lage, außer der normalen Ernährung regulatorische Funktionen im menschlichen System zu beeinflussen, wie u.a. die Modulation der Eingeweidesekretion und die Motilität, die Abstimmung von Verzehr, Appetit und des endokrinen Metabolismus, wie auch immunmodulatorische und antioxidative Mechanismen.

Allgemein werden sich Fachleute, Lebensmittelhersteller und Verbraucher immer mehr bewußt, dass das schnell zunehmende Vorherrschen von Erkrankungen wie kardiovaskuläre Krankheiten, Adipositas, Hypertonie, Diabetes oder sogar Krebs mit ernährungsbedingten Faktoren in Zusammenhang steht [Elliot et al., 1999].

Diese Tatsache hat zu einem vermehrten Interesse an den potenziellen Gesundheitseffekten von bioaktiven Bestandteilen in der Nahrung geführt.

Nahrungsmittelproteine enthalten in ihren Primärstrukturen verschiedene verschlüsselte Peptidsequenzen, die potenzielle biologische Aktivität besitzen.

Diese sogenannten bioaktiven Peptide entstehen aus einer Reihe verschiedener Quellen inklusive Tieren, Fischen, Pflanzen und Bakterien

[Mine and Shahidi, 2006] und werden entweder während der Lebensmittelverarbeitung und/oder während der gastrointestinalen Verdauung freigesetzt.

Zur Entfaltung der erwünschten physiologischen Wirkungen (*in vivo*) ist es nötig, dass diese Peptidsequenzen das jeweilige Zielgewebe (u.a. Darm, Gehirn) intakt erreichen, sich somit zum Teil als Hydrolyse-resistent gegenüber Verdauungs- und Plasmaenzymen erweisen und durch die intestinale Barriere transportiert werden.

Erreichen Vorläuferpeptide ihren Zielort, so muss dort ihre Aktivierung durch gezielte Hydrolyse stattfinden [Rubio and Seiquer, 2002].

Bioaktive Peptide von einer Größe von 2 bis 50 Aminosäurerückständen scheinen mehrere physiologische Funktionen auszuüben.

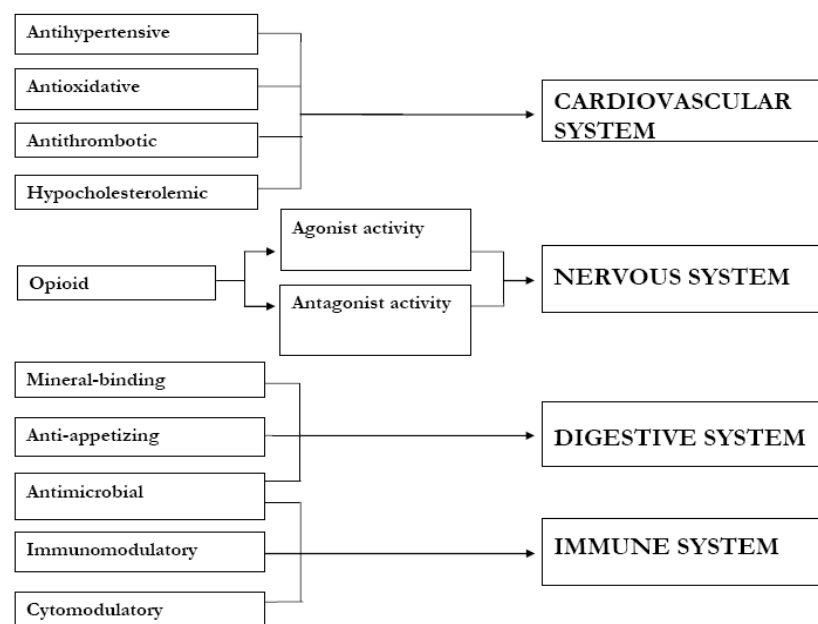
Umfassend beschrieben wurden die von der Milch abgeleiteten bioaktiven Peptide [Clare and Swaisgood, 2000; FitzGerald and Meisel, 2003; Korhonen and Pihlanto, 2003; Meisel, 2004; Walsh and FitzGerald, 2004; Korhonen and Pihlanto, 2006; Gobbetti et al., 2007; Morris and FitzGerald, 2008].

Diese Informationen deuten daraufhin, dass diese Peptide mögliche Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System, das nervale System, das Verdauungs- und Immunsystem haben.

Aus verschiedenen Milchproteinen wurden Peptide mit antihypertensiver, antithrombotischer, opioider, zyto- bzw. immunmodulierender oder antibakterieller Aktivität sowie mineralbindende Peptide identifiziert (siehe Abb.3), die durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt wurden.

Abb.4: Mögliche physiologische Funktionen bioaktiver Peptide aus Milchproteinen

[Korhonen and Pihlanto, 2007]



Einige dieser Effekte werden durch die Wechselwirkung mit dem Opioidsystem vermittelt [Mine und Shahidi, 2006].

3.2. Opioid-Rezeptor-System

Dieses Opioid-Rezeptor-System ist von besonderem Interesse, seit es als eine von mehreren möglichen Verbindungen zwischen den physiologischen Effekten und der Aufnahme von BAPs angesehen wird.

Die Opioidrezeptoren leiten ihren Namen von den klassischen Effekten der aktiven Bestandteile von Opium, insbesondere Morphin, ab.

Nach der Entdeckung des ersten Opioidrezeptoren 1973 [Keck and Snyder, 1973] wurden die ersten zwei endogenen Liganden im Gehirn des Rindes identifiziert [Hughes et al., 1975].

Opioidrezeptoren gehören der großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), den sogenannten 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren an.

Verschiedene Zellprozesse wie solche unter Beteiligung der Adenylcyclase, der Ca- oder K- Kanäle oder der Phospholipase C können zu einer Aktivierung dieser Rezeptoren beitragen [Waldhoer et al., 2004].

Es werden mehrere unterschiedliche Typen und Subtypen von Opioidrezeptoren unterschieden:

<u>Typ</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Wirkungen</u>
μ1 und μ2	Gehirn	Analgesie, Atemdepression nur μ2, Herz-Kreislauf-Wirkungen
μ2	spinal, supraspinal	Analgesie, Magen-Darm-Wirkung, Euphorie, Sucht
μ	peripher	Analgesie, Magen-Darm-Wirkung
κ	Gehirn, spinal	Analgesie, Sedierung, Dysphorie
δ	Gehirn, spinal, peripher	Magen-Darm-Wirkung, modulierende Wirkung

Es wurde auch ein vierter opioidartiger Rezeptor entdeckt, der Orphan Rezeptor benannt wurde, jedoch im Gegensatz zu herkömmlichen Opioidrezeptoren eine andere Pharmakologie aufweist [Alexander et al., 2008].

Im Zentralnervensystem sind die Rezeptoren vor allem im limbischen System, in der Medulla oblongata und im Hinterhorn des Rückenmarks lokalisiert [Abbadie et al., 2002].

In der Peripherie finden sich Rezeptoren u.a. in vegetativen Nerven, im Plexus myentericus und im Plexus submucosus der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts [Fickel et al., 1997].

3.2.1 Endogene Opiode

Die endogenen Opiode sind körpereigene Peptide (Neuropeptide), die bei Säugetieren in Hypothalamus und Hypophyse produziert und im Rahmen der Stressantwort durch emotionale Stimuli oder durch UV-Licht ausgeschüttet werden.

Sie dienen zur akuten Schmerz – und Hungerunterdrückung, aber interagieren auch mit den Sexualhormonen und sind an der Entstehung von Euphorie sowie der Regulation von gastrointestinalen Funktionen, Atmung, Thermoregulation und Immunreaktionen (als hemmende Neurotransmitter und Neurohormone) beteiligt.

Angeblich ist die Sekretion endogener Opiode auch bei psychischen Störungen, wie Schizophrenie und Autismus verändert, jedoch fehlen für diese komplexen Regulationsvorgänge bisher eindeutige Beweise.

Diese endogenen Liganden lassen sich in drei Gruppen unterteilen:

1. Endorphine: das Vorläuferpeptid dieser Gruppe ist das Proopio-melanocortin, aus dem die Endorphine α , β und γ hervorgehen.
2. Enkephaline: bei diesen sind die Varianten Met-, Leu- und Met-Arg-Phe-Enkephalin bekannt, die sich durch die N-terminalen Aminosäuren unterscheiden und die eine besondere Affinität zu δ -Opioidrezeptoren vorweisen.
3. Dynorphine: diese unterteilen sich in Dynorphin A und B sowie α - und β -Neoendorphin und tendieren zu κ -Opioidrezeptoren [Rowbotham, 2001].

3.2.2 Exogene Opioide

Es ist bereits seit beinahe dreißig Jahren bekannt, dass mehrere Proteine, die in unserer Nahrung vorhanden sind, Sequenzen enthalten, die nach deren Freisetzung zumindest theoretisch mit Opioidrezeptoren interagieren können.

Über die Entdeckung solcher exogenen Opioidliganden wurde erstmals 1979 berichtet [Zioudrou et al., 1979]. Auch die ersten pharmakologischen Beschreibungen von den mit der Milch abgeleiteten Peptide, die später als β -Casomorphine (BCMs) bezeichnet wurden, gehen auf das Ende der 1970er Jahre zurück [Brantl et al., 1979; Zioudrou et al., 1979; Brantl et al., 1982; Koch et al., 1985].

Von Lebensmittel abgeleitete Peptide, die an Opioidrezeptoren binden und somit in einer direkten Wechselwirkung mit diesen stehen, sind als exogene Opioidpeptide bzw. Exo(mo)rphine bekannt [Teschemacher, 2003].

Milch- und Molkeproteine stellen eine Quelle vieler Peptide mit opioiden Aktivitäten dar, inklusive der Casomorphine.

Unter Verwendung pharmakologischer Standardanalysen konnte beim Meerschweinchen herausgefunden werden, dass sowohl BCMs des Rindes als auch die des Menschen vorwiegend an den μ -Opioidrezeptortyp binden [Koch et al., 1985].

Verglichen mit den Opioidpeptiden, die sich von der Milch ableiten, ist die Pharmakologie von diätetischen Exorphinen aus anderen Nahrungsmittelquellen nur sehr wenig untersucht worden, und die physiologischen Effekte dieser Peptide müssen vor allem in *in vivo*-Untersuchungen noch vollständig aufgeklärt werden.

Es liegen auch Berichte über potenziell ungünstige Auswirkungen für die Gesundheit von Opioidpeptiden aus Nahrungsmitteln vor.

Einige ökologische Studien weisen daraufhin, dass die von der Milch abgeleiteten BCM-7 (Beta-Casomorphine-7) und verwandte Zusammensetzungen an der Entwicklung verschiedener menschlicher Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I, ischämischen Herzkrankheiten, Autismus oder Schizophrenie beteiligt sein können [Elliott et al., 1999; Mc Lachlan, 2001]. Die mögliche Freisetzung der BCM-7 während der Proteinverdauung scheint prinzipiell von der Anwesenheit spezifischer genetischer Varianten des Rinder- β -Caseins abzuhängen, nämlich der spezifischen Variante A¹ und B [Hartwig, 1997; Jinsmaa and Yoshikawa, 1999].

3.3 Nahrungsmittelquellen von Opioidpeptiden

Viele verschiedene Nahrungsmittelproteine enthalten Peptidsequenzen, die sich als Liganden von Opioidrezeptoren verhalten [Zioudrou et al., 1979; Brantl et al., 1986a; Teschemacher, 2003; Guesdon et al., 2006].

Es ist bekannt, dass Opioidpeptide aus einer Reihe von Lebensmittelquellen gebildet werden können.

Tabelle 2: Nahrungsmittelproteinquellen von Opioidrezeptor-Liganden/Peptiden
[Teschemacher, 2003]

<u>Nahrungsmittel</u>	<u>Vorläuferprotein</u>	<u>Referenz</u>
Milch und Milchprodukte	α -Casein β -Casein κ -Casein α -Lactalbumin β -Lactoglobulin Lactoferrin	(Zioudrou et al. 1979) (Brantl et al., 1979) (Chiba et al., 1989) (Yoshikawa et al., 1986) (Yoshikawa et al., 1986) (Tani et al., 1990)
Weizen	Gluten	(Fukudome and Yoshikawa, 1992)
Reis	Albumin	(Takahashi and Yoshikawa, 1994)
Soja	α -Protein	(Agui et al., 2006)
Ei	Ovalbumin	(Zioudrou et al.1979)

Von der Nahrung abgeleitete Opioidpeptide werden als exogene Opioide klassifiziert. Sie besitzen gewöhnlich einen Tyrosinrest am N-Terminus ihrer Aminosäuresequenz. Endogene Peptide hingegen weisen meist die Aminosäurefolge Tyr-Gly-Gly-Phe an deren N-Terminus auf [Teschemacher, 2003].

In den meisten Fällen sind exogene Opioide isoliert und anschließend anhand der enzymatischen Verdauung ihres ursprünglichen Proteins identifiziert worden.

3.3.1. Opioidpeptide in der Milch

Milchproteine wurden am häufigsten in Bezug auf die Anwesenheit von Opioidpeptid-Sequenzen untersucht, und sind in der Literatur umfassend nachgeprüft worden [Meisel, 1997; Teschemacher et al., 1997; Meisel and FitzGerald, 2000; Guesdon et al., 2006].

Die meisten Studien sind mit Kuhmilchproteinen durchgeführt worden; es gibt nur eine begrenzte Anzahl von Untersuchungen mit humaner Milch [Brantl, 1984; Ferranti et al., 2004].

Wie Tabelle 3 veranschaulicht, enthalten die Hauptmilchproteine Opioidrezeptorliganden.

Daraus ergeben sich abhängig von deren Ableitung folgende Benennungen:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Ableitung von</u>
Exorphine, Casoxin D	α -Casein
β -Casomorphine, β -Casorphine	β -Casein
Casoxine (A, B, C)	κ -Casein
α -Lactorphine	α -Lactalbumin
β -Lactorphine	β -Lactoglobulin
Lactoferroxine	Lactoferrin

Die Mehrheit der Milchpeptide wurde bis dato als Opioid-Agonisten identifiziert, während sich Casoxine und Lactoferroxine hingegen als Opioid-Antagonisten verhalten.

Tabelle 4: Opioidpeptid-Sequenzen verschiedener Milchproteinquellen, speziell der β -Casomorphine

[Meisel and FitzGerald, 2000; Teschemacher, 2003; Chessa et al., 2008]

<u>Kuhmilch</u>	<u>Struktur</u>
BCM-4, β -cn f(60-63)	Tyr-Pro-Phe-Pro
BCM-5, β -cn f(60-64)	Tyr-pro-Phe-Pro-Gly
BCM-7, β -cn f(60-66)	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile
BCM-8, β -cn f(60-67)	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro/His
<u>Humane Milch</u>	<u>Struktur</u>
BCM (1-4), β -cn f(51-54)	Tyr-Pro-Phe-Val
BCM (1-5), β -cn f(51-55)	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu
BCM (1-7), β -cn f(51-57)	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile
BCM (1-8), β -cn f(51-58)	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro
<u>Schafmilch</u>	<u>Struktur</u>
BCM-8, β -cn f(60-67)	Tyr-Pro-Phe-Thr-Gly-Pro-Ile-Pro
<u>Büffelmilch</u>	<u>Struktur</u>
BCM-7, β -cn f(60-66)	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile

[cn = casein; f = fragment]

3.3.1.1 Kuhmilch

3.3.1.1.1 Genetische Polymorphismen des β -Caseins

Die Primärsequenz aller Nahrungsmittelproteine ist einer genetischen Schwankung unterworfen. Dies gilt auch im Falle der Kuhmilchproteine.

Überdies können genetische Polymorphismen den Typ bioaktiver Peptide, die von Milchproteinen freigesetzt werden, diktieren.

Z.B. kommt im β -Casein eine Aminosäuresubstitution an der Position 67 in verschiedenen Varianten vor:

...-Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶-(His⁶⁷)-... β -Casein A¹ und B

Variante

...-Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶-(Pro⁶⁷)-... β -Casein A² Variante

Bei der A¹- und B- Variante im β -Casein kommt Histidin in der Position 67 vor, wohingegen bei der A²- Variante des β -Caseins Prolin in derselben Position präsent ist. Diese genetische Substitution scheint die enzymatische Hydrolyse der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 66 und 67 in der A²-Variante des β -Caseins zu verhindern und somit auch die Freisetzung von BCM-7 (β -Casein f(60-66)) aus der A²-Variante des β -Caseins [Jinsmaa et al., 1999].

Da ein genetischer Polymorphismus mit der Art/Gattung zusammenhängt, hat sich viel Interesse auf die Charakterisierung der β -Casein-Variabilität bei Rindergattungen fokussiert, speziell in Hinblick auf mögliche Gesundheitseffekte von β -Casomorphinen.

Die ersten Beweise von genetischem Polymorphismus stammen von Aschaffenburg (1961), der unter Verwendung einer Papierelektrophorese in Gegenwart von 6,0 Mol Harnstoff bei einem Citrat-Phosphat-Puffer mit pH 7,5 feststellte, dass β -Casein aus drei Polymorphen besteht, in der Größenordnung von der abnehmenden Beweglichkeit als β -Casein A, B und C benannt.

1966 entdeckten Peterson und Kopfler unter Anwendung einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese, dass β -Casein A in drei zusätzliche Varianten unterteilt werden kann, die als β -Casein A¹, A² und A³ nun bezeichnet werden.

Diese Varianten unterscheiden sich voneinander durch die Zahl positiv beladener Histidintrückstände in der Primärsequenz, d.h. 6, 5 und 4.

In jüngster Zeit wurden durch die Anwendung u.a. DNA-basierender Techniken eine Reihe anderer β -Casein-Varianten entdeckt, die spezifische Aminosäuresubstitutionen aufweisen.

Tabelle 5: Aminosäuresubstitutionen im Rinder- β -Casein

[Ng-Kwai-Hang and Grosclaude, 2003]

Variante	Aminosäureposition bzw. -substitution
A ¹ →A ²	⁶⁷ His→Pro
A ² →A ³	¹⁰⁶ His→Gln
A ¹ →B	¹²² Ser→Arg
A ¹ →C	³⁷ Glu→Lys ³⁵ SerP→Ser
A ² →D	¹⁸ SerP→Lys
A ² →E	³⁵ Glu→Lys

Jedoch ist die Variante der Proteinzusammensetzung von Milch und Milchbestandteilen ebenso wie die tatsächliche Aufnahme spezifischer Milchprotein-Varianten durch verschiedene Bevölkerungsgruppen zurzeit nicht bekannt.

Lediglich Dev et al. (1994) und auch Steinerova et al. (2004) konnten zeigen, dass humane Milch kein β -Casein A¹ enthält.

3.3.1.1.2 Die Bildung der BCMs während der Lebensmittelverdauung *in vitro*

Viele wissenschaftliche Berichte befassen sich mit dem Vorkömmnis der Opioidpeptide in Milchprodukten vor oder nach sogenannter simulierter gastrointestinaler Digestion (SGID).

Zur Identifizierung und Quantifizierung von β -Casomorphinen wurden analytische Techniken wie die Flüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion oder Massenspektroskopie angewandt, für die mögliche Freisetzung der BCMs unterschiedliche Digestionsprotokolle herangezogen (Isolierung durch enzymatische Verdauung), bei denen eine oder mehrere Magen- und Darmproteasen verwendet wurden.

Es scheint offensichtlich, dass die Art der Herangehensweise, die für die Isolation, die Identifizierung und die Quantifizierung der β -Casomorphine gewählt wird, auf die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von Resultaten einwirkt.

Aus den veröffentlichten Daten ergeben sich jedoch Unklarheiten, ob reale Molkereinehrungsmittelsysteme oder Modelle dieser verwendet wurden.

Der theoretische Ertrag verschiedener Opioidpeptide des entsprechenden Proteins wird in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Theoretischer Ertrag einiger Opioidagonisten und – antagonisten aus Kuhmilchproteinen [Meisel and FitzGerald, 2000].

Bioaktive Peptide	Ursprüngliches Protein	Maximaler theoretischer Ertrag (mg/g Protein)
Opioidagonisten		
BCM-7	β -Casein	33,0
BCM-5	β -Casein	24,2
α -Lactorphin	α -Lactalbumin	35,2
β -Lactorphin	β -Lactoglobulin	30,2
Opioidantagonisten		
Casoxin A	κ -Casein	51,4
Casoxin B	κ -Casein	31,8
Casoxin C	κ -Casein	65,8

Die potenzielle Freisetzung von β -Casomorphinen während der SGID von Milchprodukten *in vitro* ist in mehreren Studien untersucht worden.

Die Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit dieser Untersuchungen hängen sowohl vom enzymatischen System als auch von physiologischen Faktoren ab.

Besonders relevant erscheinen hier, insbesondere bei Säuglingen, die Parameter des Verdauungsprozesses, einschließlich der Rate der Magenleerung sowie Änderungen des pH-Wertes im Magen.

Um zu veranschaulichen, was während des gastrointestinalen Transportweges geschehen kann, so sollte im Allgemeinen die Verwendung von hydrolytischen Enzympräparaten, die mehrere Amino- und Carboxyl-Peptidase-Formulierungen enthalten, zu zuverlässigeren und vergleichbaren Ergebnissen führen.

Wenn man die unterschiedlichen Studien miteinander vergleicht, scheint es, dass eine anfängliche Hydrolyse durch das Enzym Pepsin eine Schlüsselrolle während der SGID des β -Caseins spielt.

Jinsmaa et al. (1999) konnten zeigen, dass BCM-9, -13 und -21 oder (Val⁵⁹)-BCMs nach der anfänglichen Spaltung durch das Pepsin der Leu⁵⁸-Val⁵⁹-Bindung im β -Casein freigesetzt wurden und darauf der weitere Abbau durch Darmproteinasen erfolgte.

Wenn die einleitende Behandlung mit Pepsin bei einem pH-Wert von 2,0 weggelassen wurde, fand man nur sehr niedrige Gehalte von BCM-7 (17mmol BCM-7/mol β -Casein) im Elastase-Leucin-Aminopeptidase-Digest des β -Caseins.

Auch die Rolle der Pankreasenzyme wurde untersucht. Dabei wurde kein BCM-7 freigesetzt, wenn Chymotrypsin oder Trypsin anstatt des Pankreatins für die β -Casein-Verdauung nach einer Pepsin-Behandlung verwendet wurden.

Macaud et al. (1999) entdeckten zwar unter Anwendung von Ableitungsspektren der zweiten Ordnung und UV-Spektren BCM-3 aber kein BCM-7 in einem Pepsinhydrolysat von Casein.

Laut Schmelzer et al. (2007) ist die Freisetzung bekannter bioaktiver Peptide aus den A¹- oder den A²-Varianten des β -Caseins im Anschluss an eine peptische Digestion unter SGID unwahrscheinlich.

Es konnte keine Bildung von β -Casomorphin-7 im Anschluss an eine 10-60minütige Digestion mit Pepsin bei einem pH-Wert von 2,0 bestätigt werden.

Der Abbau des β -Caseins wurde mittels LC-MS kontrolliert, und es schien, dass die Eiweißspaltung hauptsächlich durch die Aminosäuresequenz des β -Caseins bestimmt wird.

Im selben Jahr gelang es Cieslinska et al. (2007) über die Freisetzung von BCM-7 aus einer homozygoten A²-Milch im Anschluss an die Digestion (24 Stunden bei einem pH-Wert von 2,0) mit Pepsin zu berichten. Die Quantifizierung von BCM-7 erfolgte mittels HPLC/UV und wie sich zeigte, war die Freisetzung von BCM-7 aus homozygoter A²-Milch viermal niedriger als aus homozygoter A¹-Milch.

Jedoch muss erwähnt werden, dass die genauen Mengen von β -Casomorphin- 7 in diesen Milchproben unbekannt sind, da sich die berichteten Daten nur auf Milchextrakte bezogen haben.

Auch De Noni (2008) untersuchte unter Verwendung von LC-MS/MS die Freisetzung von BCM-5 und BCM-7 während der SGID von Rindermilchvarianten des β -Caseins (A¹, A² und B). Dabei wurde eine Pepsin-Digestion bei einem pH-Wert von 2,0; 3,0 und 4,0 angewandt, gefolgt von einer Hydrolyse mit dem Enzym Corolase PPTM.

Die Varianten des β -Caseins wurden aus unverarbeiteter Milch extrahiert und nach der Auflösung in ultrafiltrierter Rindermilch verdaut. BCM-7 wurde während der anfänglichen peptischen Digestion von keiner der untersuchten Varianten des β -Caseins gebildet. Jedoch setzten die B-Varianten des β -Caseins während SGID unabhängig vom pH-Wert die höchste Menge an BCM-7 (5-176mmol BCM-7/mol β -Casein) frei, gefolgt von der A¹-Variante.

Aus den verschiedenen A²-Varianten wurde während keiner Schritte des SGID-Prozesses BCM-7 freigesetzt.

Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass β -Casomorphin-5 in Hydrolysaten ohne Rücksicht auf die genetische Variante des ursprünglichen β -Caseins oder des während SGID verwendeten pH-Wertes nicht gebildet wurde.

Des weiteren konnte De Noni (2008) auch keine BCM-5 oder BCM-7 in peptischen Digests (pH-Wert 2,0 oder 3,5) von auf Milch basierenden Säuglingsanfangsnahrungen im Anschluss an SGID entdecken. Diese Produkte enthielten zwar sowohl A¹- als auch A²-Varianten des β -Caseins, aber nur wegen der weiteren Verdauung durch die Corolase PPTM waren Mengen von BCM-7 in einem Bereich von 0,02 bis 0,37mmol/ml feststellbar.

Eine Reihe von Studien berichtet über die Bildung und das weitere Schicksal der β -Casomorphine-7 in fermentierten Milchprodukten, einschließlich Käse, fermentierter Milch und Joghurt.

Jedoch ergibt sich dabei eine Lücke quantifizierbarer Daten bezüglich des tatsächlichen Gehalts an BCM-7 in diesen Produkten durch die Schwierigkeit der Identifizierung und Quantifizierung in derartig komplexen Nahrungsmittelmatrizes, die aus vielen Peptiden als Resultat der Milchproteinhydrolyse bestehen.

Die Bildung und der Abbau von β -Casomorphin-7 wurden hauptsächlich anhand von gereinigten Caseinen oder synthetischen BCMs als Substrate, einzelner Bakterienstämme oder deren assoziierten Proteinasen-bzw. Peptidasensysteme untersucht.

3.3.1.1.3 Die Bildung der BCMs während der Lebensmittelverarbeitung

Keine Studie kann eine Wirkung von Milchverarbeitungsbedingungen während nachfolgender Fermentation auf die Freisetzung von β -Casomorphinen bestätigen.

Es ist sehr wohl bekannt, dass intensive Wärmebehandlungen (90-95°C für 5-20min), die bei der Joghurtherstellung angewandt werden, eine thermische Modifizierung des Proteins verursachen, welche zu gewünschten Eigenschaften wie z.B. der Viskosität im Endprodukt beitragen kann.

Eine Erwärmung führt zu einer Entfaltung von Proteinmolekülen und modifiziert folglich deren sekundäre und tertiäre Struktur. In dieser Beziehung gelten Caseine nicht als empfindlicher gegenüber der Hitzedenaturierung.

β -Casein scheint nur kurze Längen von α -Spiralen zu bilden, und hat eine weniger ausgeprägte tertiäre Struktur. Deshalb kann β -Casein nicht oder nur kaum denaturiert werden, und wie erwartet, ändert sich dessen Gestalt aufgrund thermischer Behandlung nicht.

Schmelzer et al. (2007) untersuchten die Eiweißspaltung von β -Casein während der peptischen Digestion unter simulierter gastrointestinaler Digestion.

Dabei wurden keine bevorzugten Pepsin-Zellteilungslokalisationen auf der Grundlage von der vorausgesagten sekundären Struktur gefunden.

Diese Entdeckung unterstützt die Hypothese, dass das Enzym Pepsin am wahrscheinlichsten auf eine ähnliche Weise entweder wie das native oder die erhitzten Formen von β -Casein agiert.

Eine starke Wärmebehandlung von Milch erhöht die Bildung von stabilen β -Lactoglobulin – Komplexen auf der Oberfläche von Caseinmicellen (κ -Casein) deutlich. Wie angenommen wird, reduzieren diese Komplexe die Caseinproteolyse, da diese den Zugang von Proteinasen erschweren [Enright et al., 1999].

Almaas et al. (2006) zeigten zwar anhand der Digestion von Kuh- und Ziegenmilch auf, dass erhitzte Milch im Allgemeinen resistenter gegenüber der Hydrolase ist als unverarbeitete Milch, aber dennoch konnte bis heute noch nicht bestätigt werden, dass thermische Behandlungen eine entscheidende Rolle beim Verhindern oder Fördern der Freisetzung von BCMs spielen.

Ebenso wurde bis dato keine Studie bezüglich der Wirkung von UHT-behandelte Milch auf die Freisetzung von β -Casomorphinen während der Verdauung veröffentlicht.

In der jüngsten Studie von De Noni (2008) konnte demonstriert werden, dass UHT-behandelte Milch die Freisetzung von BCM-7 auch in hitzebehandelten Säuglingsanfangsnahrungen nicht beeinflussen kann.

3.3.1.2 Humane Milch

Es gibt nur wenige Berichte über Opioidpeptide, die in humaner Milch identifiziert wurden. Diese wurden anfänglich 1984 durch Brantl et al. und 1985 durch Koch et al. untersucht, aktueller 2004 durch Ferranti et al.

Ferranti et al. (2004) verwendeten für seine Untersuchung MALDI/TOF/MS und ESI/MS und berichteten, dass das Casein der Humanmilch für die Proteolyse empfänglicher agiere als das Casein der Rindermilch.

Die meisten Peptide mit niedrigerem und mittlerem Molekulargewicht der humanen Milch sammeln sich während der ersten Woche der Laktation an und entstehen durch endogene Hydrolyse des β -Caseins. Zwei korrespondierende Opioidpeptide wurden hierbei identifiziert: β -Casomorphin (1-8) und β -Casorphin (1-4).

Angeblich nimmt die Größe dieser Peptide als eine Funktion der Zunahme der Gestation- und Laktation-Periode ab.

Tatsächlich sind größere Vorläuferfragmente der BCMs (51-73, 48-73 und 35-73) sowohl in der „Früh Milch“ als auch in der „Normalen Milch“ vorhanden, wohingegen kürzere Sequenzen (einschließlich β -Casomorphin 1-8) nur nach der normalen Gestationsperiode gefunden wurden.

Jarmolowska et al. (2007a) bestimmten unter Verwendung von HPLC/UV-Methoden den Gehalt an endogenen BCM-5 und BCM-7 in Humanmilch während der unterschiedlichen Stufen der Laktation. Dabei wurde festgestellt, dass der BCM-Gehalt während der Laktationsfolge abnimmt.

Weiters konnte aufgezeigt werden, dass der Gehalt von BCMs der Kolostralmilch fünfmal höher an BCM-5 und achtmal höher an BCM-7 war, verglichen mit dem Gehalt dieser Peptide in der reifen Milch..

Es wird vermutet, dass diese Peptidfragmente, die vom Säugling über die Humanmilch aufgenommen werden, intakt resorbiert werden und das Immunsystem positiv beeinflussen.

Außerdem gelangen die β -Casomorphine aus den Milchdrüsen, in denen diese u.a. gebildet werden, in die maternale Blutbahn und zeigen positive Effekte auf das Kardiovaskularsystem.

Allerdings ist die physiologische Signifikanz dieser Effekte noch unklar.

3.3.1.3 Ein Beispiel für die Freisetzung von Opioiden während SGID, die sich nicht von Milch ableiten

Diätetische Opioidpeptide sind in einer Reihe von Proteinquellen (siehe Tabelle 2) wie Weizen, Gerste, Sojabohne, Spinat oder auch im Blut vorhanden.

Fukudome und Yoshikawa (1992) entdeckten die Gluten-Exorphine A4, A5, B4 und B5 in einem *in vitro* - Digest mit Pepsin und Thermolysin des Weizenglutens.

Dieselben Peptide wurden jedoch nach einer alleinigen Pepsin-Digestion oder auch in einem Pepsin/Trypsin/Chymotrypsin – Digest nicht gebildet.

Sehr wohl konnten aber Gluten-Exorphine nach einer weiteren Hydrolyse der peptischen Auswahl mit mikrobiellen neutralen Proteinasen auf *Aspergillus oryzae* oder *Bacillus subtilis* nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse wiesen daraufhin, dass die *in vivo* Freisetzung der Glutenexorphine A und B des Weizenglutens durch das Zusammenspiel des Pepsins und enterobakterieller Proteinase erfolgen könnte.

Fukudome und Yoshikawa (1993) gelang es dann sogar, das Opioidpeptid Exorphin C aus einer Pepsin/Trypsin/Chymotrypsin – Digest des Weizenglutens zu isolieren.

In einer nachfolgenden Studie 1997 konnten Fukudome et al. schließlich über eine Freisetzung der Glutenexorphine A und B aufgrund des Zusammenwirkens des Pepsins und der Pankreaselastase berichten. Diese Exorphine könnten deswegen potenziell *in vivo* freigesetzt werden und zwar durch die Aktivität gastrointestinaler Proteinase nach der Nahrungsaufnahme des Weizenglutens.

3.4 Molekulare Wechselwirkungen, Absorption und Transportsysteme von Nahrungsmittelpeptiden

3.4.1 Molekulare Wechselwirkungen

Aus den vorherigen Aufzeichnungen geht klar hervor, dass Proteine in Nahrungsmittelprodukten Peptide enthalten, die Reaktionen hervorrufen können, die typische metabolische Funktionen oder Ernährungsfunktionen übertreffen.

In einigen dieser Fälle kann die direkte Wechselwirkung mit einem Enzym, wie z.B. die Hemmung des ACE (Angiotensin-Converting-Enzym) vorliegen, weshalb bioaktive Peptide u.a. auch als ACE-inhibitorische Peptide bezeichnet werden. Dieses Enzym 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 [Foltz et al., 2008].

Es kann aber ebenfalls eine direkte Wechselwirkung mit einem oder mehreren Rezeptoren vorliegen, wie z.B. die Bindung zu Opioid – oder anderen Rezeptoren.

Auf der anderen Seite können Peptide auch auf eine indirekte Weise agieren, wie z.B. über das Immunsystem oder durch eine Bindung reaktiver Zwischenprodukte aus biologischen Prozessen.

Wie bereits im Kapitel 3.2.2 der Exogenen Peptide erwähnt wurde, stehen diese in einer direkten Wechselwirkung vor allem mit μ -Opioidrezeptortypen. Diesbezüglich ist es wichtig zu bemerken, dass die von exogenen Peptiden hervorgerufenen Effekte nicht immer über diese Wechselwirkung erklärt werden können.

Es ist allgemein von großer Bedeutung, dass besonders pharmakologische und toxikologische Mechanismen gut fundierte experimentelle Beweisuntersuchungen erfordern, wobei Daten, die von *in vitro*-Studien oder Studien, die in spezifischen Tiermodellen durchgeführt wurden, nicht auf den Menschen übertragbar sein können.

3.4.2 Grundlagen des Peptidtransports

3.4.2.1 Epithelialer Membrantransport

Epithelien gestatten oder verhindern selektiv die Passage von Substanzen, d.h. ihre Hauptaufgaben sind die Barrierefunktion und der Transport.

Die Zellen von Trennepithelien besitzen eine polare Struktur und sind miteinander über Schlussleisten (tight junctions) verbunden. Diese Schlussleisten sind frei durchlässig für Substanzen bis zu einem Durchmesser von 0,8 nm, jedoch weniger- oder undurchlässig für hochmolekulare Stoffe wie Peptide.

Das Epithel besitzt demnach für solche Substanzen die Eigenschaften einer semipermeablen Membran. Die apikale Zellmembran ist definitionsgemäß der funktionellen Außenseite zugewandt und bildet fingerartige Ausstülpungen (Mikrovilli). Sie wird daher als Bürstensaummembran bezeichnet.

Die basolaterale Membran besteht aus der basalen Zellmembran, die direkt der Blutseite zugewandt ist, und den lateralen Zellmembranen. Beide Membranen sind strukturell und funktionell identisch.

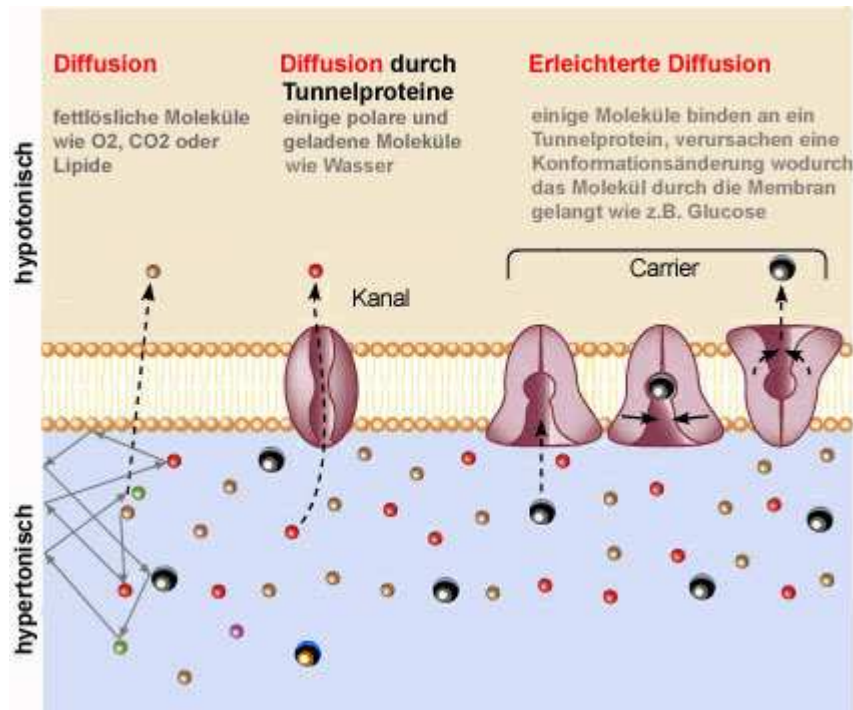
Die Resorption von Substanzen über epitheliale Barrieren erfolgt in Abhängigkeit von ihren physikochemischen Eigenschaften entweder parazellulär (eingeschränkt durch die tight junctions) oder transzellulär [Shimizu et al., 1997].

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 Potentials wird durch Interaktion zwischen Peptiden und der Bürstensaummembran katalysiert, aufgrund einer resultierenden intramolekularen Konformationsänderung [Pauletti, 1997].

Beim transzellulären Transport wird zwischen aktiven und passiven Transportmechanismen unterschieden. Antriebskräfte von aktiven Transportern können zum einen die ATP-Hydrolyse und zum anderen elektrochemische Gradienten sein. Beim passiven transzellulären Transport diffundieren Substanzen immer in Richtung des Konzentrationsgradienten entweder direkt durch die Phospholipidmembran (hydrophobe Substanzen, wie u.a. Opioidpeptide; einfache Diffusion) oder bei hydrophileren Substanzen mit Hilfe von Kanälen oder Transportproteinen

(erleichterte Diffusion). Dagegen kann ein aktiver Transport auch gegen einen Konzentrationsgradienten verlaufen, d.h. es kommt zu einer Anreicherung der transportierten Substanzen in der Zelle.

Abb.5: Diffusion durch Membranen [Patlak, 1999].



Man unterscheidet zwischen primär, sekundär und tertiär aktivem Transport.

Primär aktiver Transport erfolgt immer unter direktem Verbrauch von ATP. Ein Beispiel hierfür ist die Na^+/K^+ -ATPase, die bei Epithelien in der basolateralen Membran lokalisiert ist und pro ATP-Molekül drei Na^+ nach außen und zwei K^+ in die Zelle transportiert. Auf diese Weise wird ein Na^+ -Gradient erzeugt, der z.B. vom Na^+/H^+ -Austauscher oder vom Na^+ -abhängigen Glucose-Transporter als treibende Kraft genutzt wird. Diese Transporter arbeiten daher sekundär aktiv, da sie vom aufgebauten Na^+ -Gradienten der Na^+/K^+ -ATPase abhängig sind.

Der Na^+/H^+ -Austauscher baut mit Hilfe des Na^+ -Gradienten einen H^+ -Gradienten auf, der z.B. vom H^+ /Peptidsymporter oder vom H^+ -abhängigen Aminosäure-Transporter genutzt wird. Diese Transporter sind also tertiär aktiv.

Die Bedeutung aktiver Transportvorgänge steigt u.a. mit abnehmender intraluminarer Nährstoffkonzentration an [Madara and Pappenheimer, 1987].

Des Weiteren kann der Transport von Substanzen oder Flüssigkeiten auch über rezeptorvermittelte Endozytose, Transzytose, Pinozytose oder Pothozytose erfolgen [Rehner and Daniel, 2002].

3.4.2.2 Das Epithel des Darms

Der Gastrointestinaltrakt dient der Verdauung und Aufnahme von Nährstoffen.

Die Resorption im Dünndarm wird insbesondere durch spezielle morphologische Strukturen (zirkuläre Kerckringfalten, Darmzotten und Mikrovilli des Darmepithels) zur Vergrößerung der Oberfläche (Faktor 600) erhöht. Jede Darmzotte ist mit einer einfachen Schicht von zylindrischem Epithelgewebe bedeckt, das mit schleimbildenden Becherzellen durchsetzt ist. Ab der Mitte der Zotte ist die Diffundierung der Epithelzellen abgeschlossen, d.h. die Mikrovilli sind ausgebildet und alle für die Resorption spezifischen Enzyme und Transportsysteme sind exprimiert.

Die Epithelschicht ist außerdem von einer Schleimschicht (Mucus) bedeckt, in der ein Mikroklima mit einem pH-Wert von 6,1 bis 6,8 herrscht. Sie kann von Substanzen mittels einfacher Diffusion überwunden werden.

Die luminal Proteinverdauung beginnt im Magen durch Vermischen mit gastralem Sekret. 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 Großteil der hydrolytischen Spaltungen erfolgt im Jejunum und Doudenum durch Pankreaspeptidasen (Endo- und Exopeptidasen) zu Oligopeptiden und Aminosäuren. Die Oligopeptide werden durch membranständige Peptidasen weiter zu Tri- und Dipeptiden und Aminosäuren abgebaut.

Diese werden in die Epithelzellen mittels epithelialer Transporter aufgenommen, wo die meisten Tri- und Dipeptide weiter zu Aminosäuren gespalten werden.

Die Aminosäuren und die restlichen Dipeptide werden mittels anderer Transporter über die basolaterale Membran in den extrazellulären Raum und letztlich ins Blut transportiert [Van Dyke, 1989].

3.4.2.3 Absorption von Peptiden im Allgemeinen

Damit Peptide systemisch agieren können, sollten diese vom GI-Trakt in einer aktiven Form absorbiert werden.

Die Peptidasen in der Membran des Bürstensaums sind an der Einschränkung der Absorption von kleinen Peptiden über die Darmmucosa aktiv beteiligt, denn sie sind hauptsächlich gegenüber tri-, tetra- und höhere Peptide (bis zu 10 Aminosäurerückstände) aktiv, wohingegen intrazelluläre Peptidasen vorwiegend Dipeptide spalten [Pauletti et al., 1996].

Die Magenentleerung und der intestinale Transport können die Zeit, die ein Peptid im GI-Trakt verweilt, wesentlich modifizieren und somit eine Absorption beeinträchtigen. Außerdem könnte, unabhängig vom pKa des Peptids, der Magen-pH den Peptidtransport hemmen oder forcieren.

Der weitere Abbau kann dann durch Peptidasen der Leber, im Blutstrom und in anderen Geweben stattfinden.

Eine Voraussetzung für Peptide, um im ZNS eine Rolle spielen zu können, ist ihre Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, worauf im Kapitel 3.4.2.6 näher eingegangen wird.

Wie bereits erwähnt, existieren ein parazellulärer beziehungsweise ein transzellulärer Transportweg für Substanzen, um das Darmepithel zu durchqueren.

Einen anderen Mechanismus der Übertragung könnten auch die Peyer-Plaques im Magen-Darm-Trakt, ein eigenes immunkompetentes Lymphgewebe im Dünndarm, darstellen [Des Rieux et al., 2006; Foltz et al., 2008].

Bei gesunden Erwachsenen ist die Absorption von Peptiden, die größer sind als Di- oder Tripeptide, für gewöhnlich sehr eingeschränkt.

In speziellen Situationen, die beispielsweise durch Stress oder bestimmte Krankheiten bedingt sein können [Kuge et al., 2006], vergrößert sich jedoch sowohl beim Tier als auch beim Menschen die Darmpermeabilität.

Beim menschlichen Neugeborenen ist die Frage, ob ein Peptid absorbiert werden kann, weitaus komplizierter [Vaarala et al., 1998, 2008].

Wie bekannt ist, sind die Eingeweide von Neugeborenen für Proteine relativ durchlässig, aber mit zunehmendem Alter nimmt diese Permeabilität für Proteine und Makromoleküle ab.

Bei einer Untersuchung mit Ferkeln, die physiologisch menschlichen Neugeborenen nahe liegen, hat sich gezeigt, dass die Transportkapazität von Makromolekülen innerhalb der ersten Tage nach der Geburt rapide abnimmt. Somit scheint eine enge Beziehung zwischen dem Reifegrad und den Absorptionsfunktionen des Darms zu bestehen [Pacha, 2000].

Der Transport von Proteinen spielt eine wichtige Rolle während des frühen postnatalen Lebens, da dieser die Absorption von Wachstumsfaktoren und Immunglobulinen, die in der Muttermilch vorhanden sind, erleichtert.

Dies ist z.B. für Ferkel oder Kälber, die beinahe ohne Gammaglobuline geboren werden, ausschlaggebend. Dennoch erhalten andere Säugetiere, die mehr oder weniger mit niedrigen Globulingehalten geboren werden, wie z.B. Ratten oder Mäuse, auch IgG und zwar passiv von der Muttermilch durch die Absorption im proximalen Dünndarm [Kuge et al., 2006].

3.4.2.4 Absorption von Opioidpeptiden

Die physikochemischen Eigenschaften von Peptiden wie Molekulargröße, Wasserstoffbindungsvermögen, Konformation, Hydrophilie, Lipophilie oder auch das elektrostatische Potential können die Permeation von Peptiden beeinflussen bzw. modifizieren.

Unabhängig von den beschriebenen Barrieren und den potenziellen Transportmechanismen ist mittlerweile die Tatsache anerkannt worden, dass die Darmmucosa keine absolute Barriere darstellt, die ein Durchdringen von Peptiden total verhindern würde.

Es konnte anhand verschiedener Beispiele biologisch aktiver Peptide, wie z.B. dem Hexarelin [Roumi et al., 2001], einem Pentapeptid des β -Caseins [Quiros et al., 2008] oder dem Octreotid (ein synthetisches Octapeptid, ein Analogon des Somatostatins; Dorkoosh et al., 2004) gezeigt werden, dass diese Peptide imstande sind, das Darmepithel zu durchqueren (unter Verwendung von *in vitro*- bzw. *in vivo*-Modellen). Dennoch scheinen in allen Untersuchungen bis dato Peptide normalerweise eine eher schlechte und variable Bioverfügbarkeit aufzuweisen.

Opioidpeptide gelten generell als sehr hydrophob, wodurch ihre Übertragung durch das Darmepithel erschwert wird, die abhängig von deren Hydrophilie eher über Diffusion oder den parazellulären Transportweg abläuft [Iwan et al., 2008].

Es konnte nämlich demonstriert werden, dass Opioidpeptide nicht durch Translokation über Zellmembrane transportiert werden, ein Mechanismus, der von den sogenannten Zellpenetrierenden Peptiden genutzt wird [Patel et al., 2007].

Ebenfalls berichteten Ganapathy und Miyauchi (2005), dass der PEPT 1, der erste identifizierte humane intestinale Wasserstoff-gekoppelte Protonen-Oligopeptid-Transporter, der im Darmepithel vorhanden ist, nur Di- und Tripeptide befördern kann. Neben diesem wurde auch noch der renale Peptidtransporter (PEPT 2) identifiziert, der sowohl im GI-Trakt als auch in verschiedenen anderen Geweben exprimiert wird.

Die Oligopeptidtransporter weisen eine breite sowie überlappende Substratspezifität auf, wodurch die Aufklärung der Transportmechanismen erschwert ist [Yang et al., 1999].

Die PEPT 1-Expression wird u.a. durch Insulin reguliert [Urtti, 2001] und durch verschiedene Faktoren moduliert. Eine Protein-reiche Nahrung bzw. eine parenterale Ernährung erhöht die Expression, durch Fasten wird sie gesenkt [Katsura and Inui, 2003].

Der H^+ /Oligopeptid Transporter PEPT 1 wird im Dünndarm ausschließlich in differenzierten Enterozyten, in der apikalen Membran, exprimiert [Walker et al., 1997]. Dieser Transporter ist ein tertiär-aktives System, welches einen zelleinwärts gerichteten Protonengradienten für einen elektrogenen und gegen einen Konzentrationsgradienten 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 Mikroklima (pH 6,1 bis 6,8) der Bürstensaummembran, dass durch den Na^+/H^+ -Austauscher aufrechterhalten wird [Ganapathy and Leibach, 1983; Daniel and Herget, 1997; Kennedy et al., 2002].

Als Transportmechanismus postulierten Mackenzie et al.(1996), dass zunächst ein Proton und anschließend das Peptid an den Transporter binden und beide die Membran danach passieren, aber dennoch liegen noch wenige Kenntnisse bezüglich eines Oligopeptid-Transports durch die basolaterale Membran vor.

Es ist zwar ein neuer Natrium-abhängiger aktiver Transport (ARPE-19) in einer Zelllinie des Retinalen Pigmentepithels (RPE) entdeckt worden, der Opioidpeptide, die 4 bis 13 Aminosäuren enthalten, akzeptiert, aber das Verteilungsmuster dieses Transportsystems ist in anderen Geweben als dem RPE bei Säugetieren noch unbekannt [Hu et al., 2003].

D.h. mögliche Mechanismen der aktiven Übertragung von Opioidpeptiden über das Darmepithel konnten nicht eindeutig festgestellt werden.

Die Bewertung der Bioverfügbarkeit von Peptiden in Bezug auf spezielle *in vivo*-Fragestellungen beruht prinzipiell auf biologischen Testsystemen (Zell-, Gewebekulturen, Tierversuche oder Humanstudien).

3.4.2.4.1 Methoden, die laut Literatur für die *in vitro*- Bestimmung angewandt wurden

3.4.2.4.1.1. Caco-2 Zelllinie – ein Modellsystem für das Dünndarmepithel

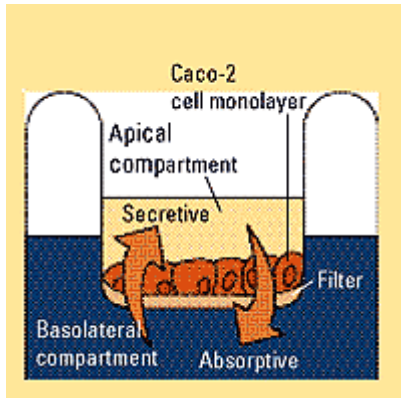


Abb.6: Schematische Darstellung einer Caco-2-Permeabilitäts-Prüfung [Modern drug discovery, 2000]

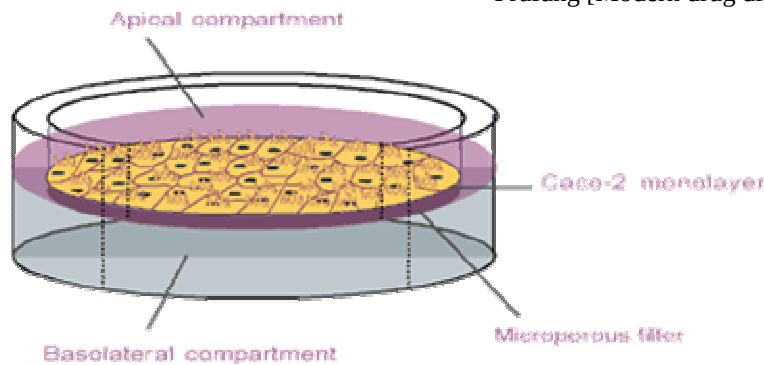


Abb.7: Darstellung eines Caco-2 Monolayers im polarisiertem Transwell-System [Advancell, 2011]

Humane Enterozyten überleben *in vitro* nur kurzzeitig und verlieren ihre Differenzierungsmerkmale während der Kultivierung. Vergleichbare Nachteile wurden auch nach Einsatz von intestinalen Gewebekulturen beobachtet.

Charakteristische Enterozytenmerkmale wurden hingegen nach Isolierung und Etablierung verschiedener Dickdarm-Tumorzellen beobachtet [Hidalgo et al., 1989].

Caco-2 Zellen weisen im Vergleich zu allen anderen humanen Tumorzellen den höchsten Grad der Differenzierung auf [Wilson et al., 1990], wobei charakteristische Merkmale unterschiedlicher Entwicklungsstadien (fetale, adulte Enterozyten) bzw. von Tumoren ausgebildet werden [Pinto et al., 1983].

Im Jahr 1974 isolierte der dänische Arzt J.Fogh die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2, die sich zu einem weit verbreiteten *in vitro*-Modell im Bereich der intestinalen Zellbiologie entwickelt hat [Zweibaum et al., 1991].

Caco-2 Zellen stammen ursprünglich von einem primären kolorektalen Adenokarzinom eines 72-jährigen, männlichen Kaukasiers ab [Fogh et al., 1977], und gelten als das aussichtsreichste Modell, um das humane Dünndarmepithel, die intestinale Barriere, zu simulieren, und die Erforschung modulierender Effekte bioaktiver Substanzen (z.B. Nahrungspeptide) auf die Aktivität reifer und entarteter Enterozyten (differenzierte und proliferierende Caco-2 Zellen) zu ermöglichen [Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989; Rubio and Seiquer, 2002].

Hidalgo et al. (1989) und Boulenc et al. (1992) zeigten, dass Caco-2 Zellen für das Darmepithel typische Eigenschaften wie polare Differenzierung, eine Ausbildung hochprismatischer Zellgestalt, eine Abgrenzung der apikalen von der basolateralen Membrandomäne durch die Ausbildung von tight junctions, sowie Desmosomen und Mikrovillistrukturen aufweisen.

Postkonfluente Caco-2 Monolayer (konfluente, einschichtige, dichte Epithelien) zeichnen sich durch polarisierte Zellen aus, die sowohl morphologisch als auch biochemisch Eigenschaften ausgereifter Enterozyten des Dünndarmepithels zeigen.

Ebenso konnte die Expression unterschiedlicher Proteine und Enzyme (u.a. Bürstensaumhydrolasen, AS-Transporter) nachgewiesen werden.

Für Permeationsversuche hat sich ein Modell etabliert, auf dem die Zellmonolayer auf künstlichen Trägermembranen aus Polycarbonat wachsen und somit die biologische Barriere simuliert und versuchstechnisch sowohl von der apikalen als auch von der basalen Seite zugänglich ist [Artusson, 1990].

Shimizu et al. (1997) demonstrierten einen Transepithelial-Transport von Rinder-BCM-5 anhand humaner Caco-2 Darmzellen und konnten zeigen, dass der Verhältnisfluss von BCM-5 zunahm.

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Iwan et al. (2008), die eine deutlich erkennbare Übertragung von BCM-7 durch die Caco-2 Zellen beschreiben konnten.

Unter der Annahme des passiven Transports über die Caco-2 Monolayer, wiesen die Permeabilitätskoeffizienten von der apikalen zur basolateralen und von der basolateralen zur apikalen Membrandomäne keine signifikanten Unterschiede auf.

Jedoch ist hier eines der Hauptprobleme aller auf Zellen basierenden *in vitro*-Modelle der Mangel an Muzinen (Schleim), die beim Menschen von den Becherzellen u.a. im Zottenepithel des Dün- und Dickdarms gebildet werden und das Epithel wie eine Schutzschicht (zusammenhängender Schleimfilm) bedecken.

Außerdem besteht ein praktisches Problem darin, dass die in verschiedenen Laboratorien erhaltenen Daten der Permeabilität hinsichtlich der Schwankungen bei der Zellliniendifferenzierung und der Auswahl von Subpopulationen schwierig zu vergleichen sind [Hayeshi et al., 2008].

3.4.2.4.1.2 Ussing chambers (Ussingkammer)

Die Ussingkammer wurde in den 1940er Jahren vom dänischen Physiologen Hans Ussing (1911-2000) erfunden. Mit diesem wissenschaftlichen Instrument ist es möglich, auf relativ einfachem Wege den aktiven Ionentransport und den Widerstand von Epithelien in Bezug auf Konzentration und Ionenspezies zu bestimmen bzw. Barriere- und Transportfunktionen des lebenden Gewebes zu messen.

Die Ussing –Kammer besteht prinzipiell aus zwei Halbzellen, zwischen denen ein Epithel (a) nach Präparation dicht eingespannt wird. Die Halbzellen werden mit einer Ringerlösung (b), die auf das untersuchte Epithel abgestimmt ist, gefüllt, um eine physiologische Umgebung für das Gewebe zu schaffen. Zuleitungen von oben ermöglichen beispielsweise eine Änderung der Ionenkonzentration in der entsprechenden Halbzelle.

Eine dünne Agar-Ringerbrücke (c) stellt auf jeder Seite elektrischen Kontakt zwischen der Ringerlösung in unmittelbarer Nähe zum Epithel und einer gesättigten KCl-Kalomel-Elektrode (h) her. Zwischen diesen Elektroden wird mittels Voltmeter (i) die Potentialdifferenz gemessen.

Ein anderes Elektrodenpaar, bestehend aus Silber, taucht in zwei Gefäße mit gesättigter KCl-AgCl-Lösung (e). Jeder dieser Becher ist elektrisch über eine Agar-Ringer-Brücke (d) mit der Ringerlösung verbunden, wobei diese Brücken in größtmöglicher Entfernung zum Epithel eintauchen.

Diese Elektroden sind an eine variable Gleichstromquelle (f) angeschlossen, außerdem ist ein Amperemeter (g) in Reihe geschaltet.

Modernere Ussing chambers können z.B. über Zuleitungen verfügen, mit denen die Ringerlösung begast werden kann. Geläufig ist außerdem die regelbare Beheizung der Halbzellen.

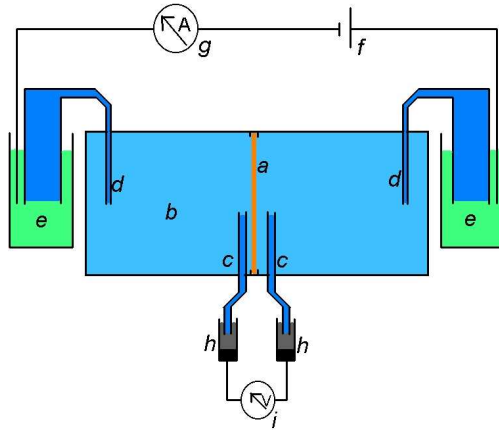


Abb.8: Schemazeichnung der Ussing-Kammer [Hemlin et al., 1988].

Das Epithel kann als elektrische Schaltung aufgefasst werden. Erstens weist ein Epithel Eigenschaften eines Stromgenerators auf: durch Ionenpumpen werden elektrische Ladungsträger aktiv von einer Epithelseite auf die andere transportiert (=Stromfluss; Gleichstromquelle c).

Zweitens ist das Epithel nicht absolut dicht für die transportierten Ionen, es existieren Lecks, die den Stromfluss über das Epithel verhindern (=Widerstandseigenschaft des Epithels; Widerstand a). Drittens stellt das Epithal einen dünnen Isolator mit angrenzendem leitfähigen Material dar (=Kondensatoreigenschaft; Kondensator b).

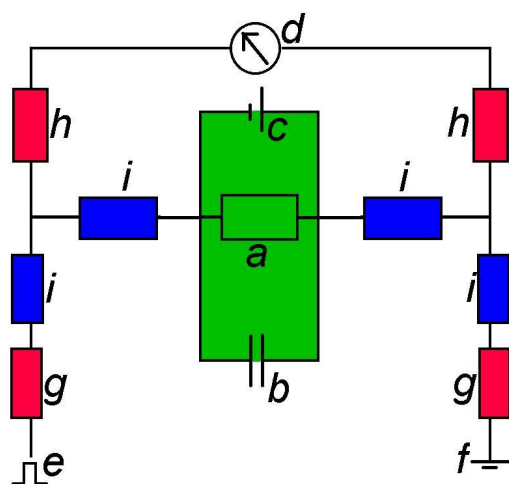


Abb.9: Schaltzeichnung einer Ussingkammer inklusive Epithel (grün) [Ussing, 1950].

Findet nun ein Ionentransport über dem untersuchten Gewebe statt, so wird durch das Voltmeter eine Spannung über dem Gewebe abgegriffen. Über das andere Elektrodenpaar lässt man einen Strom fließen, der so groß ist, dass die Potentialdifferenz über dem Gewebe gleich null ist (totaler Kurzschluss des Potentials). Dieser eingestellte, sogenannte Kurzschlussstrom kann über das Amperemeter abgelesen werden.

Das Problem im Grundaufbau der Kammer besteht darin, dass zusätzlich zum epithelialen Widerstand verschiedene weitere Widerstände die Messung beeinträchtigen: Übergangswiderstände an den Elektroden, Widerstände der Ringerlösung und der Agar-Ringer-Brücken. Zwar können diese Widerstände durch Leerlaufmessungen ohne Gewebe ermittelt und kompensiert werden, man erhält jedoch große relative Messfehler, da der epitheliale Widerstand im Vergleich zu den gemessenen Gesamtwiderständen (mit und ohne Gewebe) sehr klein ist.

Außerdem ist eine exakte Wiederherstellung identischer Kammerbedingungen nach Einsetzen des Gewebes und Wiederbefüllen der Kammer kaum möglich.

Der Widerstand ist ein wichtiges Charakteristikum für Epithelien. Der Stromfluss, der durch Ionenpumpen erzeugt wird, ist ein Maß für die Ionenpumpenaktivität im untersuchten Epithel.

Es können somit mit diesem Instrument verschiedene Epithelien verschiedener Organismen miteinander verglichen werden.

Auch kann der Einfluss unterschiedlicher Substanzen auf verschiedene Epitheltypen in Abhängigkeit von der Applikationsseite (serosal/mukosal) im Hinblick auf die Beeinflussung bestimmter Ionenpumpen untersucht werden [Ussing, 1950; Hemlin et al., 1988].

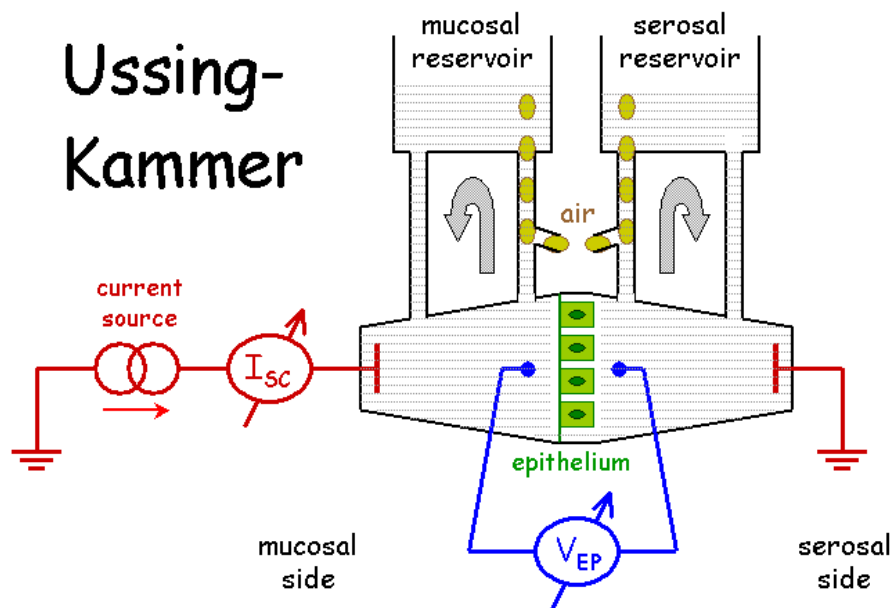


Abb.10: Messkammer, mit mukosaler und serosaler Hälfte [Gitter et al., 1997].

Föger et al. (2008) zeigten, dass der Gebrauch der Ussing chambers-Technik bei *in vitro/in vivo*- Korrelationen zu bevorzugen ist, um die Bioverfügbarkeit von Peptiden vorauszusagen.

Die Möglichkeit in einer kontrollierten Umgebung lebendiges Darmgewebe aufrechtzuerhalten und somit auch verschiedene Kompartimente des GI-Trakts, vom Magen bis zum Mastdarm, zur gleichen Zeit zu untersuchen, hat Wissenschaftler dazu veranlasst, diese Ussingkammer-Technik zu verwenden, um die Permeabilität des Darmgewebes verschiedener Moleküle wie u.a. Ionen, Nährstoffe, Pharmaka, Rauschgifte oder Makromoleküle zu studieren [Boudry, 2005].

Tome et al. (1987) veranschaulichten, dass BCM-5, BCM-4 und das Analogon β -[DA1a2, 4, Tyr5]-CM5-NH₂ eine Naloxon-reversible Reduktion im Kurzschlussstrom nach dem Hinzufügen auf die serosale Seite der Darmmucosa verursachten.

Nur das Analogon hatte eine Wirkung nach dem Hinzufügen auf die mukosale Seite.

Im Gegensatz zu dem Analogon wurde kein intakter Durchgang von BCM-5 und BCM-4 beobachtet.

Unter Verwendung eines Kaninchens-Ileum anhand der Ussing chambers-Methodik zeigten Mahe et al. (1989a), dass Morphiceptin (β -CM4-NH₂) durch die Darmmucosa

abgebaut werden konnte, wohingegen das β -[DA1a2, 4, Tyr5]-CM5-NH₂-Peptid der Hydrolyse widerstand und das Epithel intakt durchqueren konnte.

Die Bürstensaum-Peptidasen schienen der Begrenzungsschritt für den Morphiceptin-Transfer zu sein, wobei das Enzym Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV) die Hauptrolle spielte.

Durch die Vorbehandlung des Ileums mit einem Inhibitor dieses Enzyms konnte die Übertragung von Morphiceptin über dieses Epithel vergrößert werden.

Die DPP IV ist ein multifunktionales, ubiquitär vorkommendes Zelloberflächenenzym, welches u.a. in Endothel-, Nieren-, Leber- und Immunzellen exprimiert wird.

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 (DPP IV spaltet N-terminale Dipeptide von Oligopeptiden ab), einem Hormon, welches u.a. die Sättigung, den Appetit und die Magenperistaltik reguliert, und verschiedene Serumpeptide, die den Glucosestoffwechsel regulieren [Hildebrandt et al., 2000].

3.4.2.4.2 *In vivo*-Bestimmungen

Umbach et al. (1985) demonstrierten die Anwesenheit von BCM - immunreaktivem Materials (BCMIR) im Plasma von neugeborenen Kälbern nach deren Milchaufnahme. Dieses BCMIR war dem BCM-7 nicht ident, denn dessen Auflösungsprofil während der Chromatographie wies daraufhin, dass es sich um ein beträchtlich größeres Peptid handeln musste, das zwar die Aminosäuren-Sequenz von BCM-7 enthielt, aber eher einen Vorgänger des β -Casomorphin-7 darstellte.

In der Studie von Singh et al. (1989) wurde der Gehalt von BCM-7- immunreaktivem Materials im Plasma von zwei- und vier-Wochen alten Hundewelpen und ausgewachsenen Hunden verglichen und zwar nach der Aufnahme von Rindercasein- und Sojaprotein-basierenden Formulas und der von Hundemilch.

Bei der Fütterung mit der auf Rindercasein-basierenden Formula erhöhte sich das BCMIR im Plasma der zwei- und vier-Wochen alten Hundewelpen aber nicht in dem der ausgewachsenen Hunde.

Nach der Fütterung der Sojaprotein-basierenden Formula wurde bei keinen Hunden BCMIR gefunden, doch bei der Verabreichung der Hundemilch stieg das BCMIR im Plasma der Hundewelpen an.

Die Autoren stellten nun die Vermutung an, dass die Darmmucosa von Neugeborenen für relativ große Peptide durchlässiger ist, aufgrund deren noch unreifen tight junctions, welche die Peptide durchqueren und dadurch der Hydrolyse entgehen.

Laut Singh et al. (1989) ist das BCMIR länger als das Heptapeptid (BCM-7)-Molekül und besteht wahrscheinlich aus 12 bis 13 Aminosäurerückständen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass zu Plasma hinzugefügtes BCM-7 schnell abgebaut wurde, wohingegen das BCMIR im Plasma stabil blieb.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Studien hinsichtlich der Absorption von Opioidpeptiden

<u>Peptide/Moleküle</u>	<u>Modell</u>	<u>Transfer</u>	<u>Referenzen</u>
BCM-5, BCM-7	Caco-2	ja (transzellulär)	Iwan et al., 2008; Shimizu et al., 1997
β -CM-4-NH ₂ (Morphiceptin)	Ussing chambers	nein (ja mit Inhibitor der DPP IV)	Mahe et al., 1989a
Tyr-D-Ala-Phe-DAla-Tyr-NH ₂		ja	
Casein-basierende Formula	<i>In vivo</i> (Plasma von Hundewelpen)	ja (BCM 7 immun= reaktives Material)	Singh et al. 1989
Unmodifizierte β -CMs	Ussing chambers	nein	
β -[D-Ala _{2,2} , Tyr ₅]CM-5-NH ₂		ja (transepithelial)	Tome et al., 1987
Aufnahme von Milch	<i>In vivo</i> (neugeborene Kälber)	ja (Vorgänger von BCM-7)	Umbach et al., 1985

3.4.2.5 Peptidtransport über den Blutweg

Die Angelegenheit des Peptidtransports in der Blutzirkulation erweist sich als komplex. Blut enthält wesentliche Aktivitäten von Peptidaseenzymen, wobei die Halbwertszeit bestimmter Peptide im Plasma bei der Größenordnung von einer Minute sehr kurz ist [Gardner et al., 1998]. Der Abbau des Angiotensin II erfolgt sogar innerhalb von Sekunden [Moskowitz, 2002, 2003].

Dennoch können Peptide, da sie an Transportproteine, welche Peptide zu schützen vermögen, schwach gebunden werden können, auch gegen die Hydrolyse im Blut widerstandsfähiger sein.

Wie gezeigt werden konnte, hat eine nicht-kovalente Bindung mit Albumin die Halbwertszeit von kurzlebigen Proteinen verlängert [Dennis et al., 2002].

Transferrin, ein eisentransportierendes Glykoprotein, scheint auch ein passender Kandidat als ein Peptidtransporter zu sein und zwar beim transzellulären Transport, aufgrund der hohen Expression des Transferrinrezeptors sowohl im Gehirnendothel als auch im gastrointestinalen Epithel [Tuma and Hubbard, 2003].

In Bezug auf die β -Casomorphine konnten bei den bisherigen Untersuchungen keine *in vivo* Halbwertszeiten gemessen werden.

3.4.2.6 Übertragung von Peptiden über die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine physische und metabolische Barriere, welche die Mikroumgebung des ZNS von der peripheren Zirkulation trennt.

Die Kapillaren des Gehirns sind anders gebaut als im übrigen Körper.

Die Endothelzellen der Hirnkapillaren, auch endotheliale Mikrogefäßzellen genannt, bilden unter dem Einfluss von Astrozyten dichte Schlussleisten (tight junctions), die den Durchtritt von im Blut gelösten Substanzen (Elektrolyten, Proteinen) oder Zellen prinzipiell unterbinden, wodurch eine parazelluläre Diffusion verhindert wird. Dies bewirkt, dass die BHS gegenüber dem peripheren mikrovaskulären System 50-100 mal weniger permeabel ist [Abbott, 2002].

Die Funktion der Blut-Hirn-Schranke als eine metabolische Barriere zeigt sich insofern, da sie mit mehreren proteolytischen Enzymen, wie der Aminopeptidase A und M oder dem ACE ausgestattet ist, die, wie bekannt ist, Peptide abbauen [Egleton and Davis, 2005].

Die Menge eines Peptids, die verfügbar ist, um tatsächlich ins Gehirn zu gelangen, hängt u.a. von dessen jeweiliger Eliminierungshalbwertszeit ab.

Somit zeigt sich, dass die Anwesenheit von Peptidasen und Proteinasen im Blut die Bioverfügbarkeit vieler Peptide wesentlich beeinflusst.

Dazu zählen u.a. Enzyme wie die Dipeptidyl (Amino)-Peptidase IV, die Aminopeptidase A und M, das ACE und die Carboxypeptidase [Egleton and Davis, 1997].

Die BHS verfügt allerdings über spezielle Transportmechanismen.

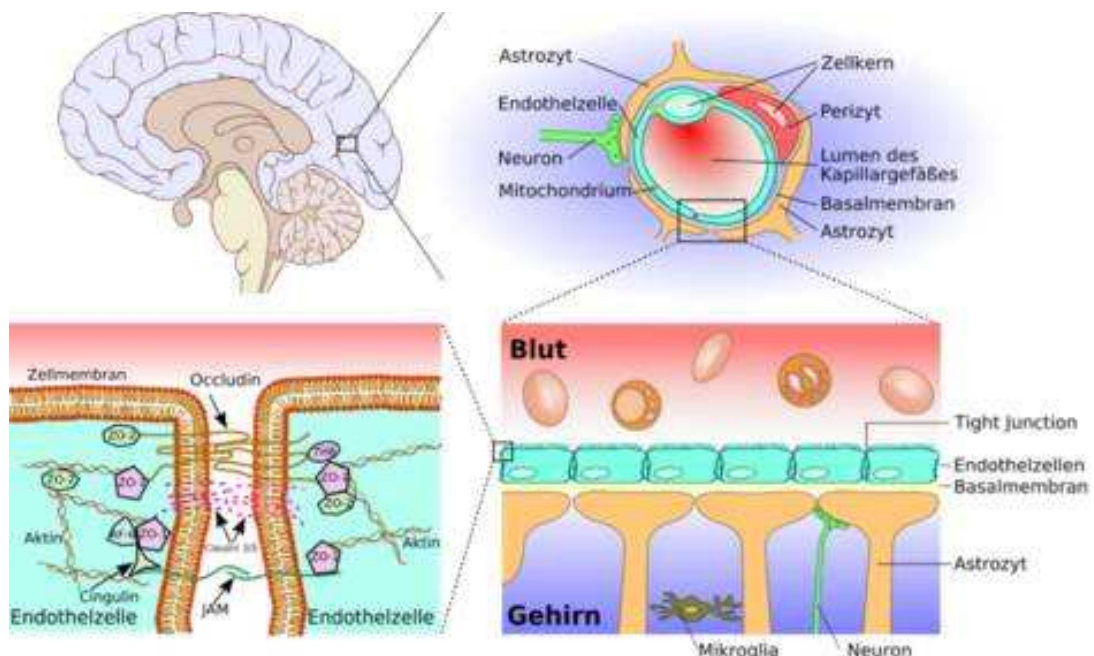
Vier verschiedene Peptid-Transportsysteme (PTS) konnten für die Übertragung von Peptiden über die BHS beschrieben werden. Diese werden als PTS-1, PTS-2, PTS-3 und PTS-4 bezeichnet [Ganapathy and Miyauchi, 2005].

Unter diesen vermag lediglich PTS-1 Opioidpeptide zu erkennen. Die Substrate des PTS-1 schließen Tyr-MIF-1, Met-enkephalin, Leu-enkephalin, BCM-7 und Dynorphin 1-8 ein [Ganapathy and Miyauchi, 2005].

Turner et al. (1998) hatten gezeigt, dass Dynorphin 1-13 die BHS einer Katze passieren konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Hypothese, laut der ein Opioidpeptid, welches im Blut vorkommt und verfügbar ist, die Blut-Hirn-Schranke durchqueren kann, möglich erscheint.

Abb.11: Die Blut-Hirn-Schranke [Lynch, 2006]



3.5 Spezifische Wirkungen der β -Casomorphine auf bestimmte Gewebe bzw. Organe

3.5.1 Auswirkungen auf den Gastrointestinaltrakt

Bioaktiven Peptiden wie auch den β -Casomorphinen wird nachgesagt, u.a. an der Regulation digestiver und metabolischer Prozesse beteiligt zu sein.

Diesbezüglich wurden mehrere Vermutungen und Hypothesen aufgestellt, wobei einige dieser anhand von Untersuchungen, die vorwiegend an Ratten durchgeführt wurden, bestätigt und nachgewiesen werden konnten. Dennoch werden noch weitere Studien erforderlich sein, um einerseits mehr Beweise für vermutliche physiologische Wirkungen erbringen zu können, und um andererseits erhaltene Ergebnisse aus den vorliegenden bzw. künftigen Studien auch auf den Menschen beziehen zu können, damit geklärt werden kann, in wieweit diese Daten für den Menschen tatsächlich relevant erscheinen.

Demzufolge sollen die β -Casomorphine die Freisetzung von gastrointestinalen Hormonen, wie z.B. von Gastrin, Cholecystokinin, Sekretin oder auch die des GIP (gastric inhibitory peptide) abstimmen, die Schleimsekretion im Darm stimulieren [Daniel et al., 1990; Mahe et al., 1995, 1996], den Darmtransport von Aminosäuren [Claustre et al., 2002; Zoghbi et al., 2006], wie auch die Wasser- und Elektrolytabsoption modulieren und somit regulatorische Wirkungen auf die gastrointestinale Motilität, die gastrointestinale Transitzeit, die Magenentleerung, auf die Modulation der Magen- und Pankreassekretion [Hara et al., 1992] ausüben und auch den postprandialen Metabolismus [Takahashi et al., 1997] beeinflussen können.

Diese Effekte werden zum Teil aufgrund der Anwesenheit von Aminosäuren im Darmlumen und in der Darmmucosa nach deren Absorption vermittelt, sie können aber auch mit der Freisetzung spezifischer Nahrungsmittelpeptide während der Lebensmittelverdauung in Verbindung gebracht werden [Daniel et al., 1990], wobei speziell die BCMs aufgrund ihrer direkten Wechselwirkung mit dem Opioid-Rezeptor-System im GI-Trakt sowohl bei Neugeborenen als auch bei Erwachsenen noch spezifischer agieren können sollen [Baldi et al., 2005].

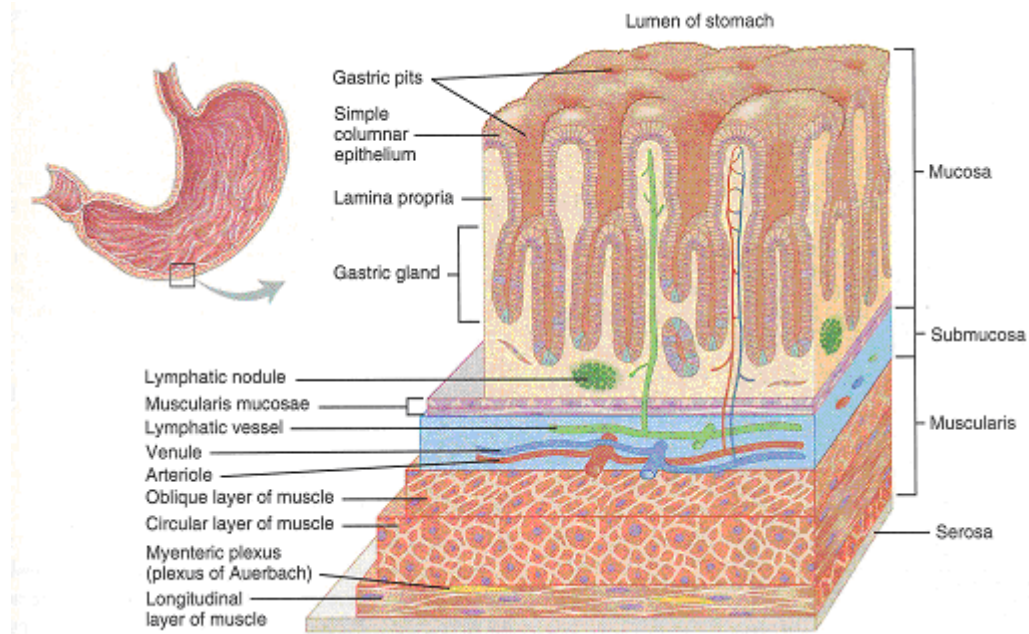


Abb.12: Der Magen-Darm-Trakt [Stefanovic, 2008].

Bezüglich der Wasser- und Elektrolytaborption konnte bewiesen werden, dass eine Erhöhung des Nettowassergehaltes und eine Erhöhung der Elektrolytaborption durch die BCMs im Dünndarm der Hauptgrund für deren vermutete antidiarrhoische Wirkung ist, welche entweder über subepithelische Opioidrezeptoren oder über spezifische luminal Bindungsstellen an der Bürstensaummembran vermittelt werden kann [Tome et al., 1987, 1988; Mahe et al., 1989b].

Weiters konnte bereits in mehreren Studien demonstriert werden, dass das Casein die Darmsekretion effizient stimuliert und deswegen vermutet werden kann, dass sowohl bei Tieren als auch bei Menschen spezifische Peptide, die sich vom Casein ableiten, in gastrointestinale Prozesse als bioaktive Peptide eingreifen [Daniel et al., 1990; Mahe et al., 1995, 1996].

Anhand von 3 Studien, die sich als aussagekräftig erwiesen haben, soll nun genauer auf die angesprochenen Effekte eingegangen werden.

3.5.1.1 Gastrointestinale Motilität und Magenentleerung

Das Ziel der Studie von Daniel et al., 1990, bei der Fütterungsversuche an Ratten durchgeführt worden sind, war es zu klären, ob Rindercasein im Vergleich zu Molkeprotein als ein Vorläufer für β -Casomorphine angesehen werden kann, und ob, wenn dies der Fall ist, diese Opioidpeptide eine regulatorische Wirkung auf die gastrointestinale Motilität ausüben vermögen.

Unter Verwendung von 141 Cerium, einem nicht-absorptiven Marker (Tracer), wurde bei dieser Untersuchung die gastrointestinale Motilität anhand der Kinetik der Magenentleerung sowie durch die Einschätzung der gastrointestinalen Transitzeit (GIT) charakterisiert.

Weiters wurde für die Identifizierung der potenziellen Opioidaktivitäten der Testsubstanzen, Rindercasein und Molkeprotein, der Opioidrezeptor-Antagonist Naloxon eingesetzt.

Das Gewicht der Ratten betrug pro Tier 28 ± 3 g, jedes Tier erhielt 0,5 ml der CAS bzw. der WPS. Die Menge an Naloxon, welches 15min vor der jeweiligen Suspension intraperitoneal (i.p.) appliziert wurde, betrug 1 mg/kg Körpergewicht.

Wie sich zeigte, führte die Fütterung der Ratten mit einer Caseinsuspension (CAS) zu einer deutlich reduzierten Magenentleerung des Markers verglichen mit einer Suspension des Molkeproteins (WPS):

<u>Zeit</u>	<u>WPS-Ratten</u>	<u>CAS-Ratten</u>
T50%	21 ± 3 min	78 ± 9 min
T25%	$12,5 \pm 4$ min	21 ± 4 min
T75%	51 ± 6 min	114 ± 7 min

(T50% = mittlere Halbwertszeit, davon abgeleitet T25% und T75%)

Wegen der hemmenden Wirkung von Morphinum auf die gastrointestinale Motilität, die schon in früheren Studien bestätigt werden konnte, wurde vermutet, dass dieser beobachtete Effekt der Reduzierung auch durch die Aktivität von Opioidpeptiden, wie sie bei der Verdauung von Rindercasein entstehen, zurückzuführen ist.

Die Injektion von Naloxon vor dem Experiment führte zu einer signifikanten Erhöhung der Magenentleerung des Tracers aus CAS-Ratten nach einer Zeitspanne von 60min, mit einer anschließenden Reduzierung: T50% betrug nun 51 ± 5 min, T75% 86 ± 5 min.

Hinsichtlich der Magenentleerung des Markers aus WPS-Ratten zeigte Naloxon keinen Effekt.

Aufgrund dieses Ergebnisses konnte man annehmen, dass β -Casomorphine oder ähnliche Peptide mit Opioidaktivität im Darm freigesetzt wurden.

Bezüglich der GIT wurde Cerium bei CAS-Ratten langsamer ausgeschieden ($T_{50\%} = 10,8 \pm 1,8$ Stunden) als bei WPS-Ratten ($T_{50\%} = 6,5 \pm 1,1$ Stunden).

Naloxon führte zu einer deutlichen Reduktion der GIT des Tracers bei CAS-Ratten, $T_{50\%} = 5,9 \pm 1,0$ Stunden, aber nicht bei WPS-Ratten.

Um nun die Wirkung dieser Opioidpeptide auf die gastrointestinale Motilität durch die Wechselwirkung mit gastrischen Opioidrezeptoren zu erklären, ist die wesentliche Voraussetzung, dass die Peptide, wenn sie einmal freigesetzt wurden, als intakte Verbindungen oder aktive Fragmente über die Darmmucosa absorbiert werden müssen.

Da im Zuge dieser Studie keine Opioidrezeptoren auf der mucosalen Seite des Darmepithels identifiziert werden konnten, schien einerseits ein transepithelialer Transport notwendig zu sein und andererseits, dass β -Casomorphine mit Opioidrezeptoren im Dünndarm interagieren können.

Dennoch konnte sehr wohl anhand von Tiermodellen mit Kätzchen, Lämmern und Ferkeln demonstriert werden, dass das natürliche amidierte BCM-4, das D-Ala- β -casomorphin-4-amid und das D-Ala-Tyr- β -casomorphin-5-amid als intakte Verbindungen ins Blut junger Tiere absorbiert werden, jedoch der Hauptanteil dieser Peptide im luminalen Bereich und im Blut, hier vor allem durch die Exopeptidase DPP IV, einem schnellen Abbau unterliegt und inaktiviert wird.

Da bei der Fütterung der Ratten mit der Caseinsuspension eine deutliche Reduzierung der Magenentleerung gezeigt werden konnte, wurde demzufolge ebenfalls die GIT signifikant herabgesetzt.

Bis zu einem gewissen Grad ließ sich dieses Resultat auch durch die unterschiedlichen Ausfällungseigenschaften von Caseinen und Molkeproteinen interpretieren.

Casein wurde im Magen als eine Art „harter Topfen“ gefunden und deswegen vermutlich ähnlich wie eine feste Mahlzeit verdaut, wohingegen eine quasi „flaumige Konsistenz“ der Molkeproteine eher als flüssige Mahlzeit den Verdauungstrakt passiert und sich aufgrund dessen die GIT der beiden Testsubstanzen unterscheidet.

3.5.1.2 Schleimsekretion im Darm

In der Studie von Trompette et al., 2003 sollten anhand von Fütterungsversuchen an Ratten die regulatorischen Wirkungen von bioaktiven Peptiden der Milch, der β -Casomorphine, auf die Schleimsekretion des Darms untersucht werden.

Die Darmschleimhaut verdankt ihre Eigenschaften abgesonderten Muzinen, Glykoproteine mit einem hohen Molekulargewicht, die durch die Becherzellen des Darmepithels erzeugt werden.

Die Schutzrolle des Darmschleims verlangt die Regulierung der Muzinabsonderung, und jede quantitative Änderung in der Schleimsekretion kann diese Schutzbarriere modifizieren.

Insbesondere Wechselwirkungen von Ernährungsfaktoren mit der sekretorischen Tätigkeit von Schleimzellen können neue, interessante Möglichkeiten für eine Manipulation dieser wichtigen Schutzfunktion präsentieren.

Im Hinblick auf diese Tatsache konnte bereits in einer früheren Studie demonstriert werden, dass eine luminale Verabreichung eines Caseinhydrolysats bzw. die von β -Casomorphin-7 eine deutliche jejunale Schleimsekretion veranlasste.

Caseinproteine an sich verfügen über keine bioaktive Rolle, denn die bioaktiven Peptide werden erst während der Caseinverdauung erzeugt, wie bereits erwähnt wurde.

Wie sich gezeigt hat, sind im Dünndarm von erwachsenen Menschen und im Plasma von neugeborenen Kälbern nach der Aufnahme von Rindermilch β -Casomorphine entdeckt worden, die anscheinend gegen den Angriff von proteolytischen Enzymen des GI-Trakts resistent sind, da diese Peptide einen hohen Gehalt an Prolinrückständen aufweisen.

Die BCM -4, -5, -6 und -7 besitzen bevorzugt eine an den μ -Opioidrezeptor gekoppelte agonistische Aktivität und können so physiologische Effekte hervorrufen.

Da diese Rezeptoren hauptsächlich im nervalen Plexus von Ratteneingeweiden gefunden worden sind, scheint es erforderlich zu sein, dass die β -Casomorphine als aktive Sequenzen über die Darmmucosa absorbiert werden müssen, worauf im Laufe dieser Studie noch näher eingegangen werden wird.

Bei dieser Untersuchung wurden nun die Effekte von BCMs auf die Darmschleimabsonderung nach luminaler bzw. arterieller Verabreichung von Rinder-BCM-7, -6, -4, amidiertes-4 und -3 an männlichen Wistar-Ratten (Gewicht pro Tier

betrug 250-350 g) beobachtet und zur gleichen Zeit diese Effekte mit denjenigen von Opioid-Neuropeptiden verglichen.

Dabei handelte es sich um jeweils einen Vertreter der drei bekannten endogenen Opioidpeptidfamilien: das β -Endorphin (Proopio-melanocortin-Familie), das Met-enkephalin (Proenkephalin-Familie) und das Dynorphin-A (Prodynorphin-Familie).

Weiters wurde für die Identifizierung möglicher Opioidaktivitäten das Naloxon (10^{-5} mol/L) eingesetzt.

Für die Untersuchung wurde ein Präparat eines isolierten Rattenjejunums verwendet.

Die Bewertung der Schleimsekretion erfolgte mittels ELISA.

Bei luminaler Verabreichung der β -Casomorphine ergab sich, dass das BCM-7 eine starke Muzinsekretion veranlasste ($555 \pm 54\%$ der Regelkreise).

Eine Vorbehandlung mit arteriellem Naloxon wirkte dieser BCM-7 bedingten Muzinfreisetzung entgegen, woraus sich schlussfolgern ließ, dass die Aktivität von β -Casomorphin-7 anscheinend durch Opioidrezeptoren vermittelt wird und BCMs als Agonisten der μ -Rezeptoren anzusehen sind, da das Naloxon ja als ein Opioidrezeptor-Antagonist bekannt ist.

Außerdem ist anzumerken, dass in Experimenten ohne BCM-7 sich Naloxon allein nicht auf die Schleimsekretion auswirkte.

Das BCM-4, amidiertes -4 und -6 führten zu keiner Schleimabsonderung.

Bei arterieller Verabreichung hatte β -Casomorphin-7 eine große stimulierende Wirkung auf die Muzinsekretion:

<u>Menge an BCM-7</u>	<u>Muzinsekretion (% der Regelkreise)</u>
$1,2 \times 10^{-8}$ mol/L	134 ± 17
$1,2 \times 10^{-7}$ mol/L	291 ± 60
$1,2 \times 10^{-6}$ mol/L	420 ± 72

Dasselbe galt auch für BCM-4 und amidiertes -4 ($445 \pm 75\%$ der Regelkreise), wobei beim letzteren auch eine Hemmung der Kontraktilität der glatten Muskulatur des GI-Trakts im Plexus myentericus beobachtet werden konnte.

Das BCM-3, das im Allgemeinen nicht als ein Opioidagonist angesehen wird, zeigte keinen Effekt.

Der Vergleich mit den verwendeten Opioid-Neuropeptiden führte nach deren intraarteriellen Perfusion zu den Ergebnissen, dass das β -Endorphin einen deutlichen Anstieg der Muzinsekretion veranlasste ($509 \pm 111\%$ der Regelkreise), wohingegen das Met-enkephalin wie auch das Dynorphin-A keinerlei Schleimfreisetzung bewirkten.

Zusätzlich ließen diese Resultate daraufhin schließen, dass diese endogenen Opioid-Neuropeptide aufgrund der Aktivierung ihrer μ -Rezeptoren bei Abwehrmechanismen des GI-Trakts beteiligt sein könnten.

Somit konnte anhand dieser Studie demonstriert werden, dass eine luminale Verabreichung eines enzymatischen Caseinhydrolysats von Rindermilch signifikant die intestinale Schleimsekretion bei Ratten stimuliert, welche durch die Aktivierung des μ -Rezeptors vermittelt wurde.

Als sogenannter Stimulant für die Muzinfreisetzung konnte letztlich nur das β -Casomorphin-7 eindeutig bestätigt werden.

Aufgrund dieses Resultats scheint das BCM-7 darin einzigartig zu sein, einerseits die minimale Sequenz, welche für die luminale Stimulation der Schleimfreisetzung erforderlich ist, zu enthalten und andererseits auch ein inhibitorisches Peptid des Enzyms Cathepsin B, das dem 61-66 Fragment des Rindercaseins entspricht.

Das Cathepsin B ist allgemein eine lysosomale Hauptprotease, die in gastrointestinalen Epithelzellen weit verbreitet ist. Dieses Enzym weist sowohl die Eigenschaften einer Endo- als auch einer Exopeptidase mit einer starken proteolytischen Aktivität auf, und ist somit an der intrazellulären Proteolyse beteiligt.

Man vermutet, dass das Cathepsin B eine Rolle bei der Verdauung von Milchproteinen spielt und dass Milchpeptide, die gegen eine enzymatische Hydrolyse resistent sind, mittels Transzytose der Enterozyten transportiert werden und einem lysosomalen Abbau unterworfen sind.

Aufgrund dessen sehen die Wissenschaftler dieser Studie auch speziell die Wirkung von BCM-7 auf die Schleimsekretion erklären zu können, da dieses Opioidpeptid eine hemmende Sequenz zu seiner intrazellulären Hydrolyse aufweist.

Wie bereits in der Studie von Daniel et al. (1990) stellten die Beteiligten dieser Untersuchung wiederum fest, dass eine physiologische Aktivität der β -Casomorphine nur aufgrund deren Passierens als aktive Sequenzen vom Darmlumen zur basolateralen

Seite des Epithels erfolgen kann, da μ -Opioidrezeptoren hauptsächlich im myenterischen und submucosalen Plexus des Rattendarms entdeckt worden sind.

Dies erklärte wiederum die eingeschränkte Wirkung von luminal verabreichten BCMs und die eindeutige Aktivität des β -Casomorphins-7 auf die Schleimsekretion, denn der Zugang der BCMs befindet sich in der submucosalen Epithelschicht.

Somit konnten mit dieser Studie Beweise dafür erbracht werden, dass Opioidpeptide aus Nahrungsmitteln und auch endogene Opioid-Neuropeptide an der Regulierung der Darmschleimabsonderung teilnehmen können, aber auch weiters wird anhand der erhaltenen Daten auf die Wichtigkeit des BCM-7 als ein sogenanntes Nahrungshormon für Darmfunktionen verwiesen.

Weil die Darmmucosa die erste Barriere für enterale Pathogene darstellt, können diese Ergebnisse über bioaktive Peptide aus Milchprodukten neue diätetische Aussichten und Möglichkeiten zur Verfügung stellen, um den gastrointestinalen Schutz zu verbessern.

3.5.1.3 Gastrointestinale Transitzeit

In der Studie von Mihatsch et al., 2005 sollte die Annahme, dass ein Proteinhydrolysat die gastrointestinale Transitzeit (GIT) beschleunigt, nachgewiesen werden.

Man wusste u.a. aus der Studie von Daniel et al. (1990) bereits, dass in jungen Ratten Opioidrezeptor-Agonisten, wie die β -Casomorphine, die während der Verdauung des Caseins freigesetzt werden, die GIT verlangsamen. Nun stellten die Wissenschaftler die Hypothese auf, dass eine Hydrolyse des Caseins diese Opioidaktivität reduziert und dadurch die GIT verglichen zu nativem Casein beschleunigt werden würde.

Das Ziel dieser Studie war somit nachzuforschen und Beweise dafür zu finden, ob ein Caseinhydrolysat im Vergleich zu nativem Casein die GIT tatsächlich beschleunigt, und ob eine Vorbehandlung mit Naloxon diesem Effekt in jungen Ratten entgegenwirkt.

In einer randomisierten, kontrollierten Studie wurden 216 weibliche junge Wistar-Ratten mit Pellets gefüttert, die auf hydrolysiertem bzw. nativem Casein basierten.

Nach einer Vorbehandlung mit Naloxon wurde dann der Farbstoff Kaminrot als ein Marker (Tracer) für das Geschwindigkeitsmaß der GIT mittels einer „orogastric Magensonde“ den jungen Ratten verabreicht.

Vier Stunden danach wurden die Tiere getötet, ihre Eingeweide entfernt und die Länge des Kolons (von der „cecocolonic Kreuzung“ bis zum After) gemessen.

Die gastrointestinale Transitzeit wurde als Prozentsatz der totalen Länge des Kolons (als Prozentsatz des Kolonstransits), der von Kaminrot durchströmt wurde, angesehen und zur Messung herangezogen.

Die Resultate zeigten, dass die GIT bei verabreichtem hydrolysierten Casein signifikant höher war als bei nativem Casein.

Nach der Vorbehandlung mit Naloxon war jedoch kein Unterschied zu erkennen.

Diese Daten weisen somit daraufhin, dass eine Hydrolyse des Caseins über eine Reduktion der Opioidaktivität, die durch die BCMs während der Caseinverdauung freigesetzt wird, die gastrointestinale Transitzeit beschleunigt, d.h. verkürzt.

Um diese erhaltenen Ergebnisse der Studien auch auf Menschen, besser gesagt auf Frühgeborene, da deren Darmpermeabilität wie bereits erwähnt noch größer ist als bei Erwachsenen, beziehen zu können, um zu klären, in wieweit diese Daten für diese relevant zu sein scheinen, sind auf jeden Fall weitere Studien erforderlich.

3.5.1.4 Einfluss auf das Sättigungsempfinden

Anhand dieser Fütterungsversuche an Tiermodellen [Daniel et al., 1990; Trompette et al., 2003; Mihatsch et al., 2005] konnte nun zwar einerseits bewiesen werden, dass β -Casomorphine aufgrund ihrer direkten Wechselwirkung mit μ -Opioidrezeptoren des GI-Trakts imstande sind, die gastrointestinale Motilität zu hemmen, die Magenentleerung zu reduzieren und somit in weiterer Folge die gastrointestinale Transitzeit zu verlängern und auch andererseits, dass das Casein selbst aufgrund dessen Konsistenz länger im GI-Trakt verweilt, aber dennoch existieren für einen möglichen Einfluss der BCMs auf das Sättigungsempfinden des Menschen keine wissenschaftlich fundierten Beweise.

Man kann in Bezug auf diese Ergebnisse höchstens Vermutungen aufstellen.

3.5.2 Effekte auf das Zentralnervensystem

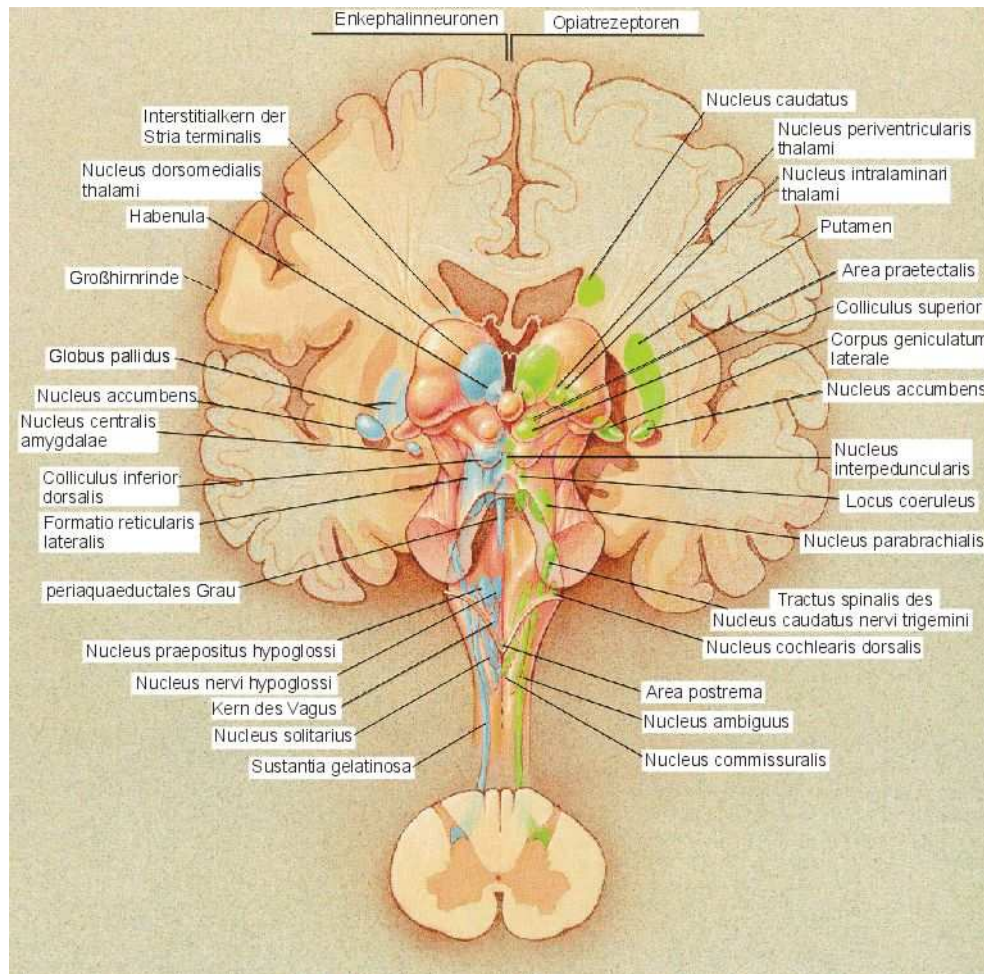


Abb. 13: Verteilung von Opioidrezeptoren im Gehirn [Synder, 1988].

Wie bereits im Kapitel 3.2. erwähnt wurde, sind Opioidrezeptoren im Gehirn weit verbreitet, sie sind aber auch im Rückenmark und in peripheren sensorischen und autonomen Nerven zu finden [Wittert et al., 1996; IUPHAR, 2008].

Innerhalb des ZNS sind Opioidrezeptoren an mehreren unterschiedlichen Effekten und Aktionen beteiligt: dazu zählen Analgesie, Sedierung, Euphorie, Dysphorie, Appetit- und Essverhalten, Atemnot, Hustenreflexe, Emesis oder Pupillenverengung.

Der μ -Rezeptor, an den die β -Casomorphine bevorzugt binden [Brantl et al., 1981; Brantl et al., 1982; Koch et al., 1985), zeigt eine hohe Expression im Thalamus, Nucleus caudatus, Neokortex, Nucleus accumbens, Amygdala, Nucleus interpeduncularis und in inferior und superior Colliculi [IUPHAR, 2008].

μ -Rezeptoren sind aber auch in den oberflächlichen Schichten des Rückenmarks im Rückenmark (im periaquäduktalem Grau und in Raphe-Kernen) gefunden worden.

Diese Gehirnregionen spielen eine Hauptrolle bei Schmerz und Analgesie.

Morphium und andere Opiat-Analgetika, wie z.B. Fentanyl, zählen zu den meist bekannten Agonisten der μ -Rezeptoren.

Andere physiologische Funktionen, die durch diese Rezeptoren geregelt werden, sind weiters kardiovaskuläre und Atmungsfunktionen, Darmtransit, Nahrungsaufnahme, Stimmungslage, Thermoregulation, Hormonsekretion und Immunfunktionen.

Es gibt durchaus ein paar Studien an Versuchstieren über Effekte des ZNS, die sich auf β -Casomorphine beziehen bzw. in Verbindung mit diesen gebracht werden.

Mit Ausnahme der Studie über die Sojamorphine [Ohinata et al., 2007] wurden die Kombinationspräparate in allen überlieferten Studien der Literatur parenteral verabreicht.

Brantl et al. (1981) und Grecksch et al. (1981) waren die ersten, die über analgetische Aktivitäten der BCMs nach einer intracerebroventrikulären (i.c.v.) Injektion bei Ratten berichteten.

Sie fanden heraus, dass alle vier BCMs (BCM-4,-5,-7 und -8) eine Analgesie auslösten, der Naloxon, als Opioidantagonist, völlig entgegenwirken konnte.

Im Vergleich zu den anderen BCMs zeigte β -Casomorphin-7 den langsamsten Wirkungseintritt, aber seine Wirkungsdauer war mit 90 Minuten am längsten, sogar viel länger als die der endogenen Peptide (u.a. der Enkephaline), welche die Autoren im Zuge ihrer Untersuchung getestet hatten.

Nach diesen ersten Aufzeichnungen konnten mehrere Studien bestätigen, dass Effekte des ZNS mit β -Casomorphinen in Verbindung gebracht werden können, nachdem diese Tieren parenteral verabreicht worden sind, wie Tabelle 8 zusammenfassend veranschaulicht.

Tabelle 8: Effekte des ZNS, die mit BCMs in Verbindung gebracht werden

Verbindungen	Tiermodell	Verabreichungsart	Effekte	Literatur
BCM-4,-5,-7,-8	Ratte	i.c.v.	Analgetische Wirkung, der Naloxon entgegenwirkte	Brantl et al., 1981
BCM-5	Ratte	i.c.v.	Dosisabhängige analgetische Wirkung in 2 verschiedenen Tests, der Naltrexon* entgegenwirkte	Grecksch et al., 1981
BCM-4,-5,-7	Junge Hühner	i.c.v.	BMCs reduzierten den Abstand von Distressäußerungen; BCM-5 war stärker als BCM-4 oder BCM-7, wobei BCM-7 eine längere Wirkung aufwies; Effekte wurden teilweise durch Naloxon antagonisiert	Panksepp et al., 1984
BCM-5 und halbsynthetische Derivate	Ratte	i.c.v. und i.v.	Analgesie, BCM-5 > 20-mal weniger wirksam als Morphin nach i.c.v. Verabreichung	Matthies et al., 1984
BCM-7	Junge Ratten	i.p. (1-100mg/kg)	BCM-7 hatte keinen Effekt auf das Gehen; Bei 100mg/kg Anzeichen von Schlafänderungen; Keine Anzeichen für eine Atemnot; Eine Vorbehandlung mit Naloxon (1mg/kg i.p.) kehrte die Effekte von BMC-7 auf den Schlaf um	Taira et al., 1990
BCM-7	Ratte	i.p. (1 und 5mg/kg)	Beschleunigung des Lernens bei der Lebensmittelbeschaffung in einem T-Labyrinth; Verzögertes Lernen bei aktiver Vermeidung der Antwort, verstärkt unter Verwendung eines schmerzhaften Reizes	Maklakova et al., 1995
BCM-4,-5,-7	Ratte	i.c.v.	Nur BCM-7 stimulierte die Nahrungsaufnahme einer sehr fetten Mahlzeit; Antagonisiert durch Enterostatin und Naloxon.	Lin et al., 1998

BCM-5	Maus und Neuroblastom - Zellen	i.c.v. und i.p.	BCM-5 (i.c.v.) induzierte dosisabhängig eine Amnesie bei Mäusen; i.p. Verabreichung von BCM-5 (0,1-20mg/kg) hatte weder einen Effekt auf spontanes Verhalten noch auf passive Antwortvermeidung. Allerdings ergab eine Reihe von Kombinationsstudien, dass eine niedrige Dosis von BMC-5 i.p. eine Störung des Lernens und Gedächtnisses verbessert, resultierend aus einer cholinergen Dysfunktion durch zentrale Vermittlung von μ 1-Rezeptoren. BCMs, einschließlich BCM-7, zeigten eine Stimulierung auf das Neuritenwachstum von Neuroblastom-Zellen.	Sakaguchi et al., 2003a; Sakaguchi et al., 2003b; Sakaguchi et al., 2006
BCM-7, Rubiscolin-5 und Exorphin C	Junge Ratten	i.p.	Postnatales Lernen. Die drei Exorphine verbesserten die Entwicklung des konditionierten Reflexes der Futtersuche in einem komplexen Labyrinth. Nur BCM-7 wirkte (negativ) auf passive Vermeidungskonditionierung. Fazit: Exorphine, insbesondere BCMs, können erhebliche und langfristige Auswirkungen auf die Umweltadaption junger Säugetiere ausüben.	Dubynin et al., 2008
BCM-7	Neugeborene Ratten	i.p.	Ex-vivo-Aktivierung (DNA-Synthese) proliferativer Prozesse im Myocard und im ektodermalen und endodermalen Epithel neugeborener Ratten.	Maslennikova et al., 2008

(Naltrexon* wie Naloxon ein Opioidantagonist)

3.5.2.1 Funktionsstörungen und Krankheitsbilder

3.5.2.1.1 Plötzlicher Kindstod (SIDS)

In der Studie von Sun et al. (2003) sollte der angebliche Zusammenhang zwischen β -Casomorphinen und dem SIDS (sudden infant death syndrome) nachgeprüft werden. Diese Untersuchung beruht auf der Annahme, dass BCMs vom GI-Trakt des Säuglings intakt absorbiert werden, und diese Peptide aufgrund des noch unreifen ZNS auch leicht die Blut-Hirn-Schranke passieren können.

Bekannt war bereits die Tatsache, dass Opioide die Atmung durch eine Reihe von Mechanismen und neuronalen Wirkorten zu unterdrücken vermögen, und eine Atemdepression durch den Gebrauch von Opioid-Analgetika begrenzt werden kann.

Laut dieser Studie könnten nun bei Säuglingen mit einer anormalen Atmungskontrolle die Opioidpeptide der Milch eine Depression der Atemzentren des Hirnstamms veranlassen, die zu Atemstillstand und letztlich zum Tod führen könnte, da die entsprechenden Opioidrezeptoren in denselben Nuclei lokalisiert sind, die auch bei der Atemregulierung eine Rolle spielen.

Da Rinder –BCM im Allgemeinen als potenter eingeschätzt werden als deren Analoge in der Humanmilch, könnte dies die Gefahr für SIDS vergrößern. Dennoch aber kam man bei dieser Untersuchung zu dem Schluss, dass Säuglinge, die entweder mit Säuglingsanfangsnahrung oder mit Humanmilch gefüttert werden, ein ähnliches Risiko haben, an dem plötzlichen Kindstod zu sterben.

3.5.2.1.2 Autismus

Die sogenannte Autismusspektrums-Störung umfasst gewöhnlich Autismus, atypischen Autismus, das Asperger-Syndrom und einige andere verwandte Störungen mit unterschiedlichen Schweregraden.

Autismus wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als eine tiefgreifende Entwicklungsstörung klassifiziert.

Sie wird als eine angeborene, unheilbare Wahrnehmungs- und Informationsverarbeitungsstörung des Gehirns beschrieben, die sich bereits im frühen Kindesalter bemerkbar macht [Cass et al., 2006].

Die Symptome und die individuellen Ausprägungen des Autismus sind vielfältig.

Allen autistischen Behinderungen sind Beeinträchtigungen des Sozialverhaltens, die Schwierigkeit, mit anderen Menschen zu kommunizieren, aber auch stereotype oder ritualisierende Verhaltensweisen gemeinsam [Barbaresi et al., 2006].

Dieser Autismusspektrums-Störung wurde in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit und Interesse zuteil, da auch öffentliche Sorgen über die offenbare Zunahme bei der Zahl der Kinder mit diesen Entwicklungsstörungen anstiegen.

Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist noch unklar und medizinische oder physiologische Behandlungsoptionen stellen häufig nur enttäuschende Ergebnisse zur Verfügung.

Wahrscheinlich wird auch infolge dessen Ernährungs- und anderen Umweltfaktoren und Ergänzungstherapien beträchtliche Aufmerksamkeit geschenkt [Barbaresi et al., 2006].

In diesem Zusammenhang wird der Begriff des Leaky-Gut-Syndroms, des sogenannten durchlässigen (undichten) Darms, immer wieder erwähnt und in die Untersuchungen im Bezug auf Autismus miteinbezogen.

Das Konzept des Leaky-Gut wurde insbesondere durch die Veröffentlichung von Cade et al. (2000) angetrieben, die auf der Zunahme von Peptiden in Peaks der Urinproben, die jedoch nur teilweise charakterisiert werden konnten, von autistischen und schizophrenen Patienten beruht.

Demzufolge ist die Integrität der Darmschleimhaut solcher Patienten beeinträchtigt, diese Schutzbarriere nicht mehr intakt, und ermöglicht somit, dass u.a. viele unvollständig abgebaute Proteine (Peptide) aus der Milch (Caseine) oder aus Getreideprodukten (Gluten) in die Blutbahn gelangen und Autoimmunerkrankungen sowie Allergien aber auch neurologische Erkrankungen verursachen können.

Das diätetische Eingreifen bei diesen Patienten mit einer Casein- und glutenfreien Ernährung führte augenscheinlich zu Verbesserungen der Magen-Darm-Problematik, und wurde vorerst die Basis von Diäten für Patienten, die an der Autismusspektrums-Störung leiden.

Reichelt und Knivsberg (2003) präsentierten ebenfalls ein sogenanntes Autismus-Modell, bei dem angenommen wurde, dass die Aufnahmemodulatoren der Exorphine und des Serotonins die Schlüsselvermittler in der Entwicklung des Autismus darstellen. Sie vermuteten, dass dies auf einen genetisch basierenden Peptidasemangel von mindestens zwei oder mehreren Peptidasen und/oder peptidaseregulierenden Proteinen zurückzuführen ist.

Seitdem ist diese Modell jedoch von vielen anderen Wissenschaftlern infrage gestellt worden.

In nachfolgenden Studien, bei denen empfindlichere und spezifischere LC/MS-Analysemethoden angewandt wurden, konnten die Peptide nicht entdeckt werden.

Bei der Untersuchung von Hunter et al. (2003) wurde weiters versucht, die Anwesenheit von Opioidpeptiden im Urin von autistischen Kindern zu bestätigen und zu bestimmen, ob bei diesen Kindern eine Fehlfunktion der DPP IV vorliegen und diese womöglich ursächlich sein könnte.

Auch in dieser Studie konnten weder Opioidpeptide entdeckt noch irgendwelche Beweise für einen tatsächlichen DPP IV-Mangel bei autistischen Kindern gefunden werden.

Christison und Ivany (2006) prüften die von Cade et al. (2000) propagierte Casein- und glutenfreie Diät nach, und kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass die bislang verfügbaren Daten sich als unzureichend erweisen, um etwaige Behandlungsempfehlungen aussprechen zu können.

Auch in einer weiteren Studie von Cass et al. (2008), bei der unter Verwendung von MALDI/TOF-MS Opioidpeptide im Urin von autistischen Kindern analysiert und bestätigt werden sollten, ergaben sich keinerlei Beweise für deren Anwesenheit.

Angesichts des Mangels an Beweisen können somit Opioidpeptide wie die β -Casomorphine weder als ein biomedizinischer Marker für Autismus dienen noch verwendet werden, um eine Antwort auf eine mögliche Wirkung von Casein- und/oder glutenfreien Ausschlußdiäten bei Patienten mit einer Autismusspektrums-Störung vorhersagen oder diese kontrollieren zu können [Cass et al., 2008].

3.5.3 Kardiovaskuläre Krankheiten

Die Prozesse, die zu den sogenannten kardiovaskulären Hauptkrankheiten, wie ischämische Herzerkrankungen und Schlaganfall führen, sind multifaktoriell und entwickeln sich gewöhnlich im Laufe mehrerer Jahre, bevor diese, meist nach einem Alter von 50 bis 60 Lebensjahren, diagnostiziert werden.

Die kardiovaskuläre Erkrankung wird als ein Lebensstil-Krankheitskomplex bezeichnet, der insbesondere in Ländern mit hohen Lebensstandards als eine der Hauptursachen der Mortalitätsrate angesehen wird [WHO, 2003].

Zu den Risikofaktoren zählen Hypertonie, hohes LDL-Cholesterin, niedriges HDL-Cholesterin, Entzündungsmarker, Homocysteine, Nikotin, Bewegungsmangel oder Adipositas, wobei in den letzten Jahren die zunehmende Prävalenz für Adipositas in jungen Bevölkerungsgruppen mit dem vergrößertem Vorherrschen des Diabetes Typ II unter jungen Leuten in Verbindung gebracht worden ist, und somit Diabetes Typ II eine zunehmende Gefahr für kardiovaskuläre Krankheiten darstellt.

Gegenwärtige wissenschaftliche Forschungen sehen die Zusammenhänge zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes Typ II in metabolischen und immunologischen Entzündungsstörungen verschiedener Organfunktionen. Die potenzielle Rolle der Nahrung bei der Regulierung der Entstehung und Entwicklung von Entzündungsprozessen im Organismus konnte bereits nachgeprüft werden [Nicklas et al., 2005].

In Bezug darauf wurde in einigen ökologischen Studien die Hypothese aufgestellt, dass es eine Verbindung zwischen dem geschätzten Pro-Kopf-Verbrauch an β -Casein A¹ und der kardiovaskulären Krankheitssterblichkeit (bezogen auf Daten der 1970er Jahre) gäbe [Seely, 1981; McLachlan, 2001].

Die zusammengestellten Daten beinhalteten u.a. den Proteingehalt und die Allelfrequenzverteilung des β -Caseins aus Milch verschiedener Kuhrassen ausgewählter Länder. Der berechnete Verbrauch an β -Casein A¹ wurde anschließend auf die Prävalenz der kardiovaskulären Krankheiten in denselben Ländern bezogen.

Generell gilt, dass die Hypothese, die einen möglichen Gesundheitseinfluss von β -Casomorphinen, insbesondere BCM-7, und verwandten Peptiden andeutet, größtenteils auf ökologischen Studien beruht, die einige Umweltfaktoren und die Prävalenz/Inzidenz von einigen nicht-übertragbaren Krankheiten aufeinander beziehen.

Eine allgemeine Rücksichtnahme auf humane Korrelationsstudien und zusätzliche Rücksicht auf deren Unklarheiten scheinen somit angebracht und auch notwendig zu sein, denn die Beziehung zwischen einer Krankheit und genetischen Verhaltens- oder Umweltfaktoren ist kompliziert [Morgenstern and Thomas, 1993].

Die Errichtung einer monokausalen Theorie, die Prävalenz/Inzidenz einer Krankheit zu erklären, erscheint deshalb als problematisch.

Der passendste Weg, eine Hypothese zu bestätigen, sollte das Studiendesign einer Kohortenstudie sein. Bei dieser werden definierte Gruppen von Menschen mit und ohne Exposition gegenüber einem Risikofaktor über einen längeren Zeitraum untersucht, und gleichzeitig sollten dabei individuelle Daten über Genetik, Ernährung, Lebensstil und Umgebung gesammelt und diese Daten auf die Krankheitsprävalenz/-inzidenz analysiert werden, indem sich die Studie auch an alle anderen möglichen Einflussfaktoren anpasst [Grimes and Schulz, 2002].

Aufgrund der großen Datenmenge, die gesammelt werden muss und auch der Zeit, die solch eine Studie in Anspruch nehmen würde, werden einige Annäherungen an andere Studientypen bezüglich Humanstudien in Erwägung gezogen.

Ein Beispiel dafür wäre eine Fall-Kontroll-Studie, bei der mindestens zwei Gruppen gebildet werden: die Gruppe der beobachteten „Fälle“ (Personen mit gesundheitlicher Einschränkung bzw. mit diagnostizierter Krankheit) und die Gruppe der „Kontrollen“ (Personen ohne gesundheitliche Einschränkung bzw. Krankheit).

Andere Einflussfaktoren wie Geschlecht, Alter, Zeitpunkt, Lebensregion oder sozialer Status sollten so ähnlich wie möglich zwischen den Fällen und Kontrollen sein.

Zur gleichen Zeit sollte die Schwankung des verdächtigten Einflussfaktors groß genug sein, um eine Wirkung zu beobachten, die von einer zufälligen Schwankung stammen könnte.

Fall-Kontroll-Studien dienen dem retrospektiven Nachweis von möglichen pathogenen Faktoren für gesundheitliche Störungen, die sich von der pränatalen Periode und dem Kleinkindesalter bis hin zum Erwachsenenalter ändern können, weshalb bei solchen Studien einiges an wichtiger Information nicht verfügbar sein kann und diese deswegen in der Evidenz-Hierarchie nicht sehr hoch rangieren [Scherfer, 2003].

Dasselbe Problem entsteht, wenn andere Einflussfaktoren angenommen, aber nicht bewertet werden können. Diese Faktoren, die unbekannt sind, aber sehr wohl einen Einfluss auf die Krankheit ausüben können, werden Störfaktoren genannt.

Diese Schwäche rechtfertigt die Tatsache, dass Fall-Kontroll-Studien weniger kreditiert werden, um Beweise für eine angenommene Beziehung zu zeigen.

Ein anderer Weg, eine Hypothese zu prüfen, wären die bereits erwähnten ökologischen Studien. Bei diesen werden zusammengefasste Daten am Gruppenniveau verwendet und verglichen, welche zwar leichter zugänglich sind, aber die implizierte Annahme der Gleichartigkeit am individuellem Niveau in den meisten Fällen nicht mit dem Gebrauch der Studienergebnisse vereinbar ist, um die Assoziation Ursache-Wirkung zu demonstrieren.

So gesehen, kann dies nur ein erster Schritt dafür sein, Beweise für eine Hypothese zu gewinnen.

Neben der aufgestellten Hypothese, dass es eine Verbindung zwischen dem geschätzten Pro-Kopf-Verbrauch an β -Casein A¹ und der kardiovaskulären Krankheitssterblichkeit gäbe, vermutete McLachlan (2001) weiters sogar, dass ein Zusammenhang zwischen dem Nikotinkonsum und der Aufnahme von β -Casein A¹ zu Todesfällen bedingt durch kardiovaskuläre Erkrankungen und Lungenkrebs besteht.

Diese Annahme wurde aber durch Laugesen und Elliot (2003a, b) widerlegt. Dennoch konnte in diesen Studien ebenfalls eine Korrelation zwischen dem berechneten Pro-Kopf-Verbrauch des β -Casein A¹ und der Prävalenz für ischämische Herzkrankheitssterblichkeit in mehreren Ländern bestätigt werden.

Dies verdeutlicht die Tatsache, dass sich ökologische Studien an etwaige Störfaktoren anpassen können.

Auch in der Studie von Hill et al. (2002) konnte die Verbindung des Verbrauchs an β -Casein A¹ mit der Prävalenz für kardiovaskuläre Krankheiten gezeigt werden, aber, da für diese Untersuchung gesammelte Daten aus den 1990er Jahren verwendet wurden, bei denen im Gegensatz zu den bisher angewandten Daten der 1970er Jahre dieser eindeutige angesprochene Zusammenhang sich nicht mehr so deutlich sondern eher schwach erwies, beschlossen bei der Studie von Hill et al. (2002) die Autoren, dass seitdem der relative Anteil der Aufnahme des β -Caseins A¹ aus der Milch anscheinend

über diesen Zeitabschnitt zwar in den relevanten Ländern zunahm, der Verbrauch dieses Proteins jedoch keine Wirkung auf ischämische Herzerkrankungen in Bezug auf die Mortalität hatte.

Im Gegensatz zu den vorhergenannten Studien haben neuere, größer angelegte Kohortenstudien eine vorteilhafte Rolle für den Milchkonsum in der Prävention von Herzkrankheiten und Schlaganfällen gezeigt [Elwood et al., 2004a, b; 2005a, b].

Zwei Interventionsstudien am Menschen sind über die mögliche Beziehung zwischen der Aufnahme an β -Casein A¹ bzw. A² und kardiovaskulären Krankheiten veröffentlicht worden.

Chin-Dusting et al. (2006) führten an 15 Probanden eine doppelblind Crossover-Studie durch, bei der 25g β -Casein A1/Tag und dieselbe Dosis an β -Casein A² für einen Zeitraum von 12 Wochen verabreicht wurden.

Im Zuge dessen ergaben sich aber weder Unterschiede in Endothel- noch in Funktionstests.

Venn et al. (2006) prüften nach, ob sich β -Casein A¹- und A²-Varianten auf die Plasmacholesterinkonzentrationen des Menschen unterschiedlich auswirken.

In einer randomisierten Crossover-Studie mit 62 Probanden, die für 9 Wochen angesetzt wurde, konnten keinerlei Beweise dafür gefunden werden, dass Milchprodukte, die β -Casein A¹- oder A²-Varianten enthalten, Differenzialeffekte ($P > 0,05$) auf Plasmacholesterinkonzentrationen ausüben.

Gemäß diesen Ergebnissen scheinen β -Casein A¹ und A² nicht in Verbindung mit kardiovaskulären Krankheiten gebracht werden zu können.

Auch wenn randomisierte Interventionsstudien prinzipiell aussagekräftiges Beweismaterial zur Verfügung stellen können, erlauben die vorhergenannten Studien aufgrund der begrenzten Probandenanzahl und kurzen Interventionsperioden keine wissenschaftlich fundierten Schlussfolgerungen.

Da bis heute keine endgültigen wissenschaftlichen Daten existieren, kann ein Zusammenhang zwischen dem Verbrauch bzw. der Aufnahme von β -Casein-Varianten aus Milchprodukten und einer dadurch vergrößerten Gefahr für kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen nicht bestätigt werden.

3.5.3.1 Kardiovaskuläre Gesundheit

Diesbezüglich hat sich der größte Teil der Aufmerksamkeit auf die bereits erwähnten antihypertensiven Eigenschaften der Nahrungsmittelpeptide konzentriert.

In Tiermodellen und humanen Interventionsstudien hat sich gezeigt, dass mehrere dieser bioaktiven Peptide, inklusive der β -Casomorphine, eine Reduktion des Blutdrucks bewirken können.

Die Eigenschaften und klinischen Effekte von sogenannten antihypertensiven Milchpeptiden wurden in einigen Studien nachgeprüft und bestätigt

[FitzGerald and Meisel, 2000; Korhonen and Pihlanto, 2006; Hong et al., 2008; Möller et al., 2008; Saito, 2008].

Der wichtigste Mechanismus, zumindest *in vitro*, scheint die Hemmung des ACE zu sein (siehe Kapitel 3.4.1).

Obwohl die Diskussion über die Relevanz und die langfristigen Effekte in Bezug auf klinische Endpunkte andauert, wird die Reduktion des Blutdrucks durch Nahrungsmittelpeptide allgemein durchaus als vorteilhaft betrachtet.

3.5.4 Diabetes mellitus Typ I

Der Typ-I-Diabetes (*engl.*: insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) ist eine Autoimmunerkrankung, die bei genetisch prädisponierten Personen einerseits durch Umweltfaktoren verursacht wird und andererseits aus der progressiven Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas durch autoreaktive T-Lymphozyten und Makrophagen resultiert [Atkinson and Maclaren, 1994].

Da die körpereigene Insulinproduktion dadurch vollständig eingestellt ist, können die Körperzellen keine Glucose mehr aufnehmen.

Mindestens die Hälfte der Patienten werden vor oder um die Pubertätszeit diagnostiziert, weshalb Diabetes m. Typ I auch als juveniler Diabetes bezeichnet wird.

Typ-I-Diabetes ist nach der Allergie weltweit die zweithäufigste chronische Erkrankung im Kindesalter, und die Inzidenz ist weltweit ansteigend, wobei große geographische Unterschiede vorliegen [Atkinson and Eisenbarth, 2001; Peter, 2007].

Dieser Anstieg in den letzten Jahren war vor allem bei sehr jungen Kindern zu beobachten [Pozzilli et al., 2007].

Die genetische Ätiologie des Diabetes m. Typ I ist klar, aber eine genetische Prädisposition allein reicht nicht aus, um diese Krankheit zu verursachen. Die pathologische Entwicklung ist viel mehr das Ergebnis einer Kombination von genetischen und umweltbedingten Risikofaktoren [Atkinson and Maclaren, 1994; Schrezenmeir and Jagla, 2000].

Umweltfaktoren haben einen großen Einfluss auf die Krankheitsentstehung, und die zunehmende Inzidenz und Prävalenz von Diabetes weltweit sind nur durch Veränderungen der Umwelt zu erklären [King et al., 1998].

Die möglichen Mechanismen, die durch umweltbedingte Risikofaktoren den IDDM auslösen können, sind in 3 Hauptkategorien (nicht exklusive) eingeteilt worden.

Dazu zählt erstens eine direkte Entstehung der entzündlichen Störung der Langerhansschen Inseln durch sogenannte toxische Agenzien. Zweitens eine immunologische Wirkung, die teilweise den strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Fremdproteinen und Inselzellantigenen zugeschrieben wird und drittens eine Beeinträchtigung der Differenzierung körperfremder als auch körpereigener Haptene. Man darf aber auch nicht vergessen, dass das mit dem Darm assoziierte Immunsystem dabei eine ebenfalls eine Rolle spielt [Vaarala, 2008].

3.5.4.1 Einfluss der β -Casein-Varianten

Auch ernährungsbedingte Risikofaktoren haben großen Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Typ-I-Diabetes.

Einige Studien haben eine verstärkte humorale Immunantwort auf verschiedene Proteine der Kuhmilch bei Kleinkindern gezeigt, die mit nicht-hydrolysierte Säuglingsnahrung gefüttert wurden und in weiterer Folge an IDDM erkrankt sind. Dennoch kann bis heute kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Milchproteinen und Diabetes m. Typ I bestätigt werden [Luopajarvi et al., 2008].

Wie bereits erwähnt wurde (siehe Kapitel 3.3.1.1.2), hat β -Casomorphin-7 nach einer *in vitro*-Digestion mit Darmenzymen gezeigt, dass es aus den β -Casein-Varianten A¹ und B vermehrt freigesetzt wird als aus der A²-Variante.

Die Vermutung wurde aufgestellt, dass das BCM-7 zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung der Darm-assoziierten Immuntoleranz bei genetisch prädisponierten Personen mit Typ-I-Diabetes beitragen kann.

Es könnte somit als Adjuvans an der Autoimmunreaktion beteiligt sein, die zu der Zerstörung der β -Zellen des Pankreas bei prädiabetischen Personen führt [Elliott et al., 1997, 1999].

Obwohl das BCMIR (siehe Kapitel 3.4.2.4.2) in Darmlumen vorhanden sein kann, konnte die spezifische Freisetzung von BCM-7 aus β -Casein A¹- und B- Varianten jedoch *in vivo* beim Menschen noch nicht nachgewiesen werden [Svedberg et al., 1985].

Sehr wohl konnte aber gezeigt werden, dass Patienten mit IDDM erhöhte Mengen an Anti-Casein-A¹ Antikörper im Serum enthielten, während Kontrollpersonen erhöhte Mengen an Anti-Casein-A² Antikörper vorwiesen [Padberg et al., 1999].

Die sogenannte Diabetogenicity von β -Casein A¹-, A²- und B- Varianten wurde in Tierversuchen und ökologischen Studien an Menschen bewertet.

Zwei Tierversuche haben die Unterschiede in der diabetogenen Wirkung zwischen A¹- und A²-Varianten des β -Caseins untersucht [Elliott et al., 1997; Beales et al., 2002].

Beide Fütterungsstudien kombinierten Casein mit einem Sojaproteinpräparat.

Die erste Studie, die in einem von Experten begutachteten (peer-reviewed) Journal nicht veröffentlicht wurde, zeigte eine höhere Inzidenz des Diabetes nach Zufütterung mit A¹- β -Casein im Vergleich zu A²- β -Casein an Mäusen [Elliott et al., 1997].

Die zweite Studie, die im Gegensatz zur ersten in einem peer-reviewed Journal veröffentlicht wurde, bestätigte die Ergebnisse dieser ersten Studie nicht.

Die Autoren von Beales et al. (2002) kamen zu der Schlussfolgerung, dass A¹- β -Casein eine größere diabetogene Wirkung als A²- β -Casein besitzt und dass, obwohl Milchcaseine kaum Promotoren für Typ-I-Diabetes darstellen, diese doch in einigen Fällen imstande sein können, die Induktion des Diabetes zu erhöhen.

Eine Reihe von ökologischen Studien an Menschen prüfte die Korrelation zwischen dem geschätzten Pro-Kopf-Verbrauch des β -Casein A¹ und A² und der Inzidenz für IDDM nach.

In der Studie von Elliott et al. (1999), die bei Kindern bis zum 14. Lebensjahr in 10 Ländern, einschließlich der nordischen Ländern, durchgeführt wurde, verglich man den nationalen Kuhmilchverbrauch zusammen mit den Polymorphismen der Milchproteine.

Dabei wurde festgestellt, dass der Gesamtproteinkonsum nicht mit der Inzidenz für Diabetes korreliert, aber der Konsum an β -Casein-A¹ allein oder in Kombination mit β -Casein-B sehr wohl mit der Anzahl der Neuerkrankungen an Typ-I-Diabetes in Verbindung steht.

In der Studie von McLachlan (2001) wurde gezeigt, dass der berechnete Verbrauch an β -Casein-A¹ in 16 Ländern stark mit der Inzidenz von IDDM bei männlichen Jugendlichen unter 15 Jahren in Beziehung gebracht werden kann.

Eine größere ökologische Studie, die 19 Länder aus aller Welt einbezog, berichtete über ähnliche Assoziationen [Laugesen and Elliott, 2003].

Auch die Studie von Birgisdottir et al. (2006) konnte eine positive Korrelation zwischen der geschätzten Aufnahme von β -Casein-A¹ bei Kindern unter 2 Jahren und der Inzidenz für Typ-I-Diabetes zeigen.

Jedoch darf nicht außerachtgelassen werden, dass der Unterschied in der Anzahl der Neuerkrankungen von IDDM auch anhand nicht erwähnter Störfaktoren erklärt werden kann, die in ökologischen Studien nicht miteinbezogen wurden bzw. nicht miteinbezogen werden konnten, wie bereits bei den kardiovaskulären Krankheiten (siehe Kapitel 3.5.3) angeführt wurde, seitdem die unterschiedlichen Autoren dieselbe geschätzte Aufnahme von β -Casein-Varianten für deren statistischen Analysen verwendet haben.

Außerdem, wie in Kapitel 3.3.1.1.1 angesprochen wurde, scheint die Relevanz von Daten der Allelfrequenzverteilung des β -Caseins und der tatsächlichen Höhe spezifischer Proteinvarianten in Milch und Milchprodukten schwierig zu interpretieren. Deshalb ist eine umfassende Evaluierung möglicher Stör- und Unsicherheitsfaktoren erforderlich, um die Aussagekraft der vorhergenannten Korrelationen zu beurteilen.

Angesichts der allgemeinen Grenzen ökologischer Studien kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass Kinder mit Typ-I-Diabetes auch nur eine geringe Zufuhr an β -Casein-A¹ im Vergleich zu anderen Kindern im gleichen Land erhielten, da die Nahrungsaufnahme bei Säuglingen und in der Kindheit natürlich großen individuellen und altersbedingten Schwankungen unterliegt.

Zusammenfassend konnte in der bisher veröffentlichten Literatur kein vermeintlich spezifischer Faktor identifiziert werden, der die Ursache-Wirkungsbeziehung zwischen der Aufnahme von β -Casein-A¹ oder -B mit der Inzidenz für Diabetes m. Typ I beweisen könnte.

4. SCHLUSSBETRACHTUNG

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, die Natur und Wirkungsweise der β -Casomorphine (BCMs), Peptidsequenzen im Milchprotein β -Casein, zu erläutern, um anhand der erhaltenen Ergebnisse der verwendeten Literatur deren tatsächlichen Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen bestätigen zu können, und ob diese im Zuge der Nahrungsaufnahme imstande sind, einen Einfluss auf das Sättigungsempfinden des Menschen auszuüben.

BMCs zählen zu den sogenannten bioaktiven Peptiden, die latent in der Primärstruktur verschiedener Nahrungsproteine (insbesondere der Milch) vorhanden und in unterschiedlichen Nahrungsmittelquellen identifiziert worden sind. Freigesetzt werden können diese Peptide durch die Hydrolyse während der Lebensmittelverarbeitung oder durch die Lebensmittelverdauung.

Da die β -Casomorphine in direkter Wechselwirkung vorzugsweise mit μ -Opioidrezeptoren im Plexus myentericus und im Plexus submucosus der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts stehen, um ihre physiologischen Wirkungen entfalten zu können, stellen sie eine Gruppe von Opioidpeptiden dar.

Die Primärsequenz aller Nahrungsmittelproteine ist einer genetischen Schwankung unterworfen. Bei den genetischen Polymorphismen des Rinder- β -Caseins konnte festgestellt werden, dass BMCs, insbesondere das β -Casomorphin-7, vermehrt aus den A¹- und B-Varianten des β -Caseins im Vergleich zur A²-Variante freigesetzt werden, da bei der A¹- und B-Variante eine Substitution von Histidin an der Position 67 der Aminosäuresequenz vorliegt und hingegen bei der A²-Variante Prolin an derselben Position zu finden ist.

Jedoch erscheint diesbezüglich die Relevanz von Daten der Allelfrequenzverteilung des β -Caseins schwierig zu interpretieren, und die tatsächliche Aufnahme spezifischer Proteinvarianten in Milch und Milchprodukten durch verschiedene Bevölkerungsgruppen ist nicht bekannt.

Bei der Bildung der BCMs während der Lebensmittelverdauung *in vitro* konnte eine Freisetzung bioaktiver Peptide aus den A¹- oder A²-Varinaten des β -Caseins im Anschluss an eine peptische Digestion unter sogenannter simulierter gastrointestinaler Digestion nicht nachgewiesen werden.

Bezüglich der Bildung der β -Casomorphine während der Lebensmittelverarbeitung existieren zwar Beweise dafür, dass verschiedene proteolytische Systeme an der Gärung von Milch- oder Käsefertigung beteiligt sind, die β -Casein zu BCM-7 oder anderen BMCs hydrolysieren können, aber über die tatsächlichen Mengen dieser in fermentierten, enzymatisch- oder UHT-behandelten Milchprodukte, inklusive Säuglingsanfangsnahrungen, stehen keine Informationen zur Verfügung.

Es konnte bis heute nicht bestätigt werden, dass thermische Behandlungen im Zuge der Lebensmittelverarbeitung eine entscheidende Rolle beim Verhindern oder Fördern der Freisetzung von β -Casomorphinen spielen.

Zur Entfaltung physiologischer Wirkungen (*in vivo*) ist es notwendig, dass die BCMs das jeweilige Zielgewebe intakt erreichen. Hierfür müssen diese den Verdauungstrakt intakt passieren, sich somit zum Teil als Hydrolyse-resistent gegenüber Verdauungs-, Plasma- und Leberenzymen erweisen und anschließend über die Pfortader und Leber in den systemischen Blutkreislauf und schließlich zum Wirkungsort gelangen.

Unabhängig von potenziellen Transportmechanismen ist mittlerweile die Tatsache anerkannt worden, dass die Darmmucosa keine absolute Barriere darstellt, die ein Durchdringen von Peptiden total verhindern würde.

Opioidpeptide gelten generell als sehr hydrophob, wodurch ihre Übertragung durch das Darmepithel erschwert wird, die abhängig von deren Hydrophilie eher über einfache Diffusion oder parazellulären Transportweg verläuft.

Anhand der Caco-2 Zelllinie konnte *in vitro* der passive Transport von BCM-7 durch das Darmepithel eindeutig bestätigt werden.

Jedoch ist hier eines der Hauptprobleme aller auf Zellen basierenden *in vitro*-Modelle der Mangel an Muzinen, die beim Menschen von den Becherzellen u.a. im Zottenepithel des Dün- und Dickdarms gebildet werden und das Epithel wie eine Schutzschicht bedecken.

Außerdem besteht ein praktisches Problem darin, dass die in verschiedenen Laboratorien erhaltenen Daten der Permeabilität hinsichtlich der Schwankungen bei der Zellliniendifferenzierung und der Auswahl von Subpopulationen schwierig zu vergleichen sind.

Es hat sich gezeigt, dass der Gebrauch der Ussing chambers-Technik bei *in vitro* / *in vivo*-Korrelationen zu bevorzugen ist, um die Bioverfügbarkeit von Peptiden vorauszusagen.

Im Zuge dieser *in vitro*-Bestimmung konnte das intakte Durchqueren des Darmepithels einiger β -Casomorphine bestätigt werden.

Bei gesunden Erwachsenen ist die Absorption von Peptiden, die größer sind als Di- oder Tripeptide, für gewöhnlich sehr eingeschränkt, und somit konnte bei diesen eine intakte Absorption der BMCs nicht nachgewiesen werden.

Bei Säuglingen konnten Beweise dafür erbracht werden, dass deren Darmmucosa auch für höhere Peptide aufgrund der noch unreifen Schlussleisten (tight junctions) relativ durchlässig ist, die BCMs dadurch der Hydrolyse entgehen und intakt absorbiert werden und weiters, dass diese Peptide aufgrund des noch unreifen ZNS ebenfalls leicht die Blut-Hirn-Schranke passieren können.

Diesbezüglich darf jedoch nicht außerachtgelassen werden, dass die Transportkapazität von Makromolekülen mit zunehmendem Alter rapide abnimmt.

Anhand von Fütterungsversuchen an Tiermodellen konnte bewiesen werden, dass β -Casomorphine aufgrund ihrer direkten Wechselwirkung mit μ -Opioidrezeptoren des GI-Trakts imstande sind, die gastrointestinale Motilität zu hemmen, die Magenentleerung zu reduzieren und somit in weiterer Folge die gastrointestinale Transitzeit herabzusetzen, d.h. zu verlängern.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass einige der BCMs intakt absorbiert werden, da sie nur auf diese Weise über ihre Opioidaktivität regulatorische Wirkungen auf den GI-Trakt ausüben können, und weil diese Peptide aufgrund ihres hohen Gehalts an Prolinrückständen gegen den Angriff einiger proteolytischer Enzyme des GI-Trakts resistent sind.

Weiters konnte in Tierversuchen bestätigt werden, dass das BCM-7 als sogenannter Stimulant für die Muzinfreisetzung im Darm angesehen werden kann.

Es konnte zwar einerseits bewiesen werden, dass β -Casomorphine die gastrointestinale Transitzeit aufgrund ihrer Opioidaktivität, die erst durch die Caseinverdauung freigesetzt wird, verlängern können und auch andererseits, dass das Casein selbst aufgrund dessen Konsistenz länger im GI-Trakt verweilt, aber dennoch existieren für einen möglichen Einfluss der BCMs auf das Sättigungsempfinden des Menschen keine endgültigen Beweise.

In Bezug auf den möglichen Zusammenhang der β -Casomorphine mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Krankheiten wie dem plötzlichen Kindstod, Autismus, kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ I, wofür ökologische Studien an Menschen durchgeführt wurden, konnten keine wissenschaftlich fundierten Beweise erbracht werden.

Um einen potenziellen Gesundheitseinfluss der β -Casomorphine auf den Menschen bestätigen zu können, erfordert es vor allem weitere umfassende Untersuchungen an *in vivo* - bzw. Humanstudien, um die Aussagekraft der erhaltenen Daten aus *in vitro*-Experimenten und Fütterungsversuchen an Tiermodellen beurteilen zu können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Verwendungsmöglichkeiten von β -Casomorphinen als bioaktive Peptide, die u.a. antihypertensive, zyto- und immunmodulierende oder antioxidative Wirkungseigenschaften besitzen, im Ernährungs- wie im Arzneimittelbereich als durchaus vielversprechend anzusehen sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand dieser Diplomarbeit ist es, die Wirkungsweise der β -Casomorphine, Peptidsequenzen im Milchprotein β -Casein, anhand erhaltener Ergebnisse aus vorhandener Literatur zu erläutern, um deren tatsächlichen Auswirkungen auf die Gesundheit und das Sättigungsempfinden des Menschen zu bestätigen.

In Fütterungsversuchen an Tiermodellen und in weiterer Folge aus *in vitro*-Bestimmungen (Caco-2 Zelllinie und Ussing chambers) konnte bewiesen werden, dass β -Casomorphine aufgrund ihrer direkten Wechselwirkung mit μ -Opioidrezeptoren des Gastrointestinaltrakts imstande sind, die Schleimsekretion des Darms zu stimulieren, die gastrointestinale Motilität zu hemmen, die Magenentleerung zu reduzieren und somit folglich die gastrointestinale Transitzeit zu verlängern.

Eindeutige Beweise für einen möglichen Einfluss auf das Sättigungsempfinden des Menschen konnten nicht erbracht werden.

In Bezug auf die Annahme, dass β -Casomorphine mit einer erhöhten Prävalenz bzw. Inzidenz für bestimmte Krankheiten wie dem plötzlichen Kindstod, Autismus, kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ I in Verbindung gebracht werden, konnte diese Vermutung in ökologischen Studien an Menschen nicht wissenschaftlich bestätigt werden.

Um einen potenziellen Gesundheitseinfluss der β -Casomorphine auf den Menschen beweisen zu können, erfordert es vor allem weitere umfassende Untersuchungen an *in vivo*- bzw. Humanstudien, um die Aussagekraft der erhaltenen Daten aus *in vitro*-Experimenten und Fütterungsversuchen an Tiermodellen beurteilen zu können.

Da die β -Casomorphine zu den sogenannten bioaktiven Peptiden zählen, die in vielen unterschiedlichen Nahrungsmitteln enthalten sind und durchaus positive physiologische Eigenschaften besitzen, wie u.a. eine antihypertensive, zyto- oder immunmodulierende Wirkungsweise, sind deren Verwendungsmöglichkeiten künftig im Ernährungs- wie im Arzneimittelbereich als vielversprechend anzusehen.

6. SUMMARY

The aim of this diploma thesis is to explain the impact of β -casomorphins, peptide sequences present in the milk protein β -casein, with the help of results obtained from available literature to confirm their actual effects on health and satiety of human beings.

In feeding experiments on animal models and, subsequently, from *in vitro* assays (Caco-2 cell line and Ussing chambers) could be established that β -casomorphins because of their direct interaction with μ -opioid receptors in the gastrointestinal tract are capable to stimulate the mucin secretion, to inhibit gastrointestinal motility, to reduce gastric emptying and thus to increase the gastrointestinal transit time.

Evidence for a possible effect on the satiety perception of the human being could not be provided.

With regard to the assumption that β -casomorphins are associated with increased prevalence or incidence of certain diseases such as sudden infant death syndrome, autism, cardiovascular disease and diabetes mellitus type 1, this suggestion could not be confirmed in ecological studies in humans.

In order to prove a potential health impact of β -casomorphins on humans, further comprehensive investigations of *in vivo* and human studies are required the validity of the data obtained from *in vitro* experiments and feeding experiments on animal models. Because β -casomorphins count to the so-called bioactive peptides which are included in many different foods, and clearly show positive physiological qualities such as antihypertensive, cyto- or immunomodulating impact, their ranges of application are to be considered to be promising both in nutrition and in pharmaceutical applications.

LITERATURVERZEICHNIS:

Abbadie, C., Lombard, M. C., Besson, J. M., Trafton, J. A., Basbaum A. 2002. Mu and delta opioid receptor-like immunoreactivity in the cervical spinal cord of the rat after dorsal rhizotomy or neonatal capsaicin: an analysis of pre- and postsynaptic receptor distributions. *Brain Res* 930 (1-2): 150-162.

Abbott, N. J. 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200: 629-38.

Advancell Advanced in vitro Cell Technologies, S. A.: www.advancell.net (21.02.2011).

Alexander, S.P., Mathie, A., Peters, J.A. 2008. Guide to Receptors and Channels: Opioid and opioid-like. *British Journal of Pharmacology* 153 (2): S73-S74.

Almaas, H., Cases, A. L., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., Aadnoey, T., Vegarud, G. E. 2006. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal* 16 (9): 961-968.

Anand, P. K. and Pillai, R. V. 1967. Activity of single neurons in the hypothalamic feeding centres: effect of gastric distension. *J Physiol* 192 (1): 63-77.

Agui, S., Ohinata, K., Yoshikawa, M. 2006. Isolation and characterization of a new opioid peptide soymorphin derived from soy. BETA-Conglycinin. *Peptide Science* 2005: 195-198.

Appleyard, S. M., Hayward, M., Young, J. I., Butler, A. A., Cone, R. J., Rubinstein, M., Low, M. J. 2003. A role for the endogenous opioid beta-endorphin in energy homeostasis. *Endocrinology* 144 (5): 1753-1760.

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. *J Pharmaceutical Science* 79: 476-482.

Aschaffenburg, R. 1961. Inherited casein variants in cow's milk. *Nature* 192 (4801): 431-432.

Atkinson, M. A. and Eisenbarth, G. S. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 331 (21): 1428-1436.

Atkinson, M. A. and Eisenbarth, G. S. 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet* 358 (9277): 221-229.

Baldi, A., Ioannis, P., Chiara, P., Eleonora, F., Roubini, C., Vittorio, D. 2005. Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. *Journal Of Dairy Research* 72: 66-72.

- Barbarelli, W. J., Katusic, S. K., Voigt, R. G. 2006. Autism: A review of the state of the science for pediatric primary health care clinicians. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 160 (11): 1167-1175.
- Beales, P., Elliott, R., Flohe, S., Hill, J., Kolb, H., Pozzilli, P., Wang, G. S., Wasmuth, H., Scott, F. 2002. A multi-centre, blinded international trial of the effect of A1 and A2 β -casein variants on diabetes incidence in two rodent models of spontaneous Typ 1 diabetes. *Diabetologia* 45 (9): 1240-1246.
- Benjamin, S. B., Maher, K. A., Cattau, Jr. E. L., Collen, M. J., Fleischer, D. E., Lewis, J. H., Ciarleglio, C. A., Earll, J. M., Schaffer, S., Mirkin, K., Cooper, J. Altschul, A. M. 1988. Double-blind controlled trial of the Garren-Edwards gastric bubble: an adjunctive treatment for exogenous obesity. *Gastroenterology* 95: 581-588.
- Birgisdottir, B. E., Hill, J. P., Thorsson, A. V., Thorsdottir, I. 2006. Lower consumption of cow milk protein A 1 beta-casein at 2 years of age, rather than consumption among 11- or 14-year-old adolescents, may explain the lower incidence of type 1 diabetes in Iceland than in Scandinavia. *Annals of Nutrition and Metabolism* 50 (3): 177-183.
- Blundell, J. E. 1984. Serotonin and appetite. *Neuropharmacology* 23: 1537-1552.
- Boudry, G. 2005. The Ussing chamber technique to evaluate alternatives to in-feed antibiotics for young pigs. *Animal Research* 54 (3): 219-230.
- Boulenc, X., Bourrie, M., Fabre, I., Roque, C., Joyeux, H., Berger, Y., Fabre, G. 1992. Regulation of Cytochrome P450/A1 Gene Expression in a Human Intestinal Cell Line, Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 263 (3): 1471-1478.
- Brands, B., Thornhill, J. A., Hirst, M., Gowdey, C. W. 1979. Suppression of food intake and body weight gain by naloxone in rats. *Life Sci* 24: 1773-1778.
- Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A., Lottspeich, F. 1979. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360 (9): 1211-6.
- Brantl, V., Teschemacher, H., Blasig, J., Henschen, A., Lottspeich, F. 1981. Opioid activities of beta-casomorphins. *Life Sciences* 28 (17): 1903-9.
- Brantl, V., Pfeiffer, A., Herz, A., Henschen, A., Lottspeich, F. 1982. Antinociceptive potencies of beta-casomorphin analogs as compared to their affinities towards mu and delta opiate receptor sites in brain and periphery. *Peptides* 3 (5): 793-7.
- Brantl, V. 1984. Novel opioid peptides derived from human β -casein: human β -casomorphins. *European Journal of Pharmacology* 106 (1): 213-214.
- Brantl, V. and Neubert, K. 1986a. Opioid peptides derived from food proteins. *Trends Pharmacol. Sci* 7: 6-7.

Cade, R., Privette, M., Fregly, M., Rowland, N., Zhongjie, S., Zele, V., Wagemaker, H., Edelstein, C. 2000. Autism and schizophrenia: intestinal disorders. *Nutritional Neuroscience* 3 (1): 57-72.

Cass, H., Sekaran, D., Baird, G. 2006. Medical investigation of children with autistic spectrum disorders. *Child: Care, Health and Development* 32 (5): 521-533.

Cass, H., Gringras, P., March, J., McKendrick, I., O'Hare, A., Owen, L., Pollin, C. 2008. Absence of exogenously derived urinary opioid peptides in children with autism. *Archives of Disease in Childhood* 93 (9): 745-750.

Chessa, S., Chiatti, F., Rignanese, D., Ceriotti, G., Caroli, A. M., Pagnacco, G. 2008. In silico analysis of goat casein sequences. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 59 (1): 71-79.

Chiba, H., Tani, F., Yoshikawa, M. 1989. Opioid antagonist peptides derived from beta-casein. *Journal of Dairy Research* 56 (3): 363-6.

Ching-Dusting, J., Shennan, J., Jones, E., Williams, C., Kingwell, B., Dart, A. 2006. Effect of dietary supplementation with [beta]-casein A1 or A2 on markers of disease development in individuals at high risk of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition* 95 (1): 136.

Christison, G. W. and Ivany, K. 2006. Elimination diets in autism spectrum disorders: Any wheat amidst the chaff? *Journal of Development and Behavioral Pediatrics* 27 (2): 162.

Cieslinska, A., Kaminski, S., Kostyra, E., Sienkiewicz-Szlapka, E. 2007. Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative beta-casein genotypes. *Milchwissenschaft* 62 (2): 125.

Clare, D. A. and Swaisgood, H. E. 200. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science* 83 (6): 1187-1195.

Clark, J. T., Kalra, P. S., Crowley, W. R. 1984. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115: 427-429.

Claustre, J., Toumi, F., Trompette, A., Jourdan, G., Guignard, H., Chayvialle, J. A., Plaisancie, P. 2002. Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 283 (3): 521-528.

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: 435-439.

Daniel, H., Vohwinkel, M., Rehner, G. 1990. Effect of casein and (beta)-casomorphins on gastrointestinal motility in rats. *Journal of Nutrition* 120 (3): 252.

- Daniel, H. and Herget, M. 1997. Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am J Physiol* 273, F1-F8.
- Davis, J. D., Gallagher, R. J., Ladove, R. F. 1967. Food intake controlled by a blood factor. *Science* 157: 1247-1248.
- Davis, J. D., Gallagher, R. J., Ladove, R. F., Turausky, A. J. 1969. Inhibition of food intake by a humoral factor. *J Comp Physiol Psychol* 67: 407-414.
- Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D., Damico, L. A. 2002. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 277 (38): 35035-35043.
- De Noni, I. 2008. Release of beta-casomorphin 5 and 7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine beta-casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chemistry* 110 (4): 897-903.
- Des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y. J., Preat, V. 2006. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release* 116 (1): 1-27.
- Dev, B. C., Sood, S. M., Dewind, S., Slattery, C. W. 1994. k-Casein and b-Casein in human micelles: Structural studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 314: 329-336.
- Dorkoosh, F. A., Broekhuizen, C. A. N., Borchard, G., Rafiee-Tehrani, M., Verhoef, J. C., Junginger, H. E. 2004. Transport of octreotide and evaluation of mechanism of opening the paracellular tight junctions using superporous hydrogel polymers in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93 (3): 743-752.
- Dubynin, V. A., Malinovskaya, I. V., Belyaeva, Y. A., Stovolosov, I. S., Bespalova, Z. D., Andreeva, L. A., Kamenskii, A. A., Myasoedov, N. F. 2008. Delayed effect of exorphins on learning of albino rat pups. *Biology Bulletin* 35 (1): 43-49.
- Edwards, C. M., Abusnana, S., Sunter, D., Murphy, K. G., Ghatei, M. A., Bloom, S. S. 1999. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 160 (3): R7-12.
- Egleton, R. D. and Davis, T. P. 1997. Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain. *Peptides* 18 (9): 1431-9.
- Egleton, R. D. and Davis, T. P. 2005. Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier. *NeuroRX* 2 (1): 44-53.
- Elliott, R. B., Wasmuth, H. E., Bibby, N. J., Hill, J. P. 1997. The role of beta-casein in the induction of insulin-dependent diabetes in the non-obese diabetic mouse and humans. Brussels: International Dairy Federation, Seminar on Milk Protein Polymorphism, IDF Special Issue 9702: 445-453.

Elliott, R. B., Harris, D. P., Hill, J. P., Bibby, N. J., Wasmuth, H. E. 1999. Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 42 (3): 292-296.

Elmadfa, I. und Leitzmann, C. 1998. Ernährung des Menschen. 3.Auflage. Verlag: Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart: 35-38.

Elwood, P. C., Pickering, J. E., Fehily, A. M., Hughes, J., Ness, A. R. 2004a. Milk drinking, ischaemic heart disease and ischaemic stroke I. Evidence from the Caerphilly cohort. *European Journal of Clinical Nutrition* 58 (5): 711-717.

Elwood, P. C., Pickering, J. E., Hughes, J., Fehily, A. M., Ness, A. R. 2004b. Milk drinking, ischaemic heart disease and ischaemic stroke II. Evidence from cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition* 58 (5): 718-724.

Elwood, P. C. 2005a. Milk and cardiovascular disease: a review of the epidemiological evidence. *Australian Journal of Dairy Technology* 60 (1): 58-60.

Elwood, P. C., Strain, J. J., Robson, P. J., Fehily, A. M., Hughes, J., Pickering, J. E., Ness, A. R. 2005b. Milk consumption, stroke, and heart attack risk: evidence from the Caerphilly cohort of older men. *Journal of Epidemiology and Community Health* 59 (6): 502-505.

Enright, E., Patricia Bland, A., Needs, E. C., Kelly, A. L. 1999. Proteolysis and physicochemical changes in milk on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO₃ addition. *International Dairy Journal* 9 (9): 581-591.

Ernährungsinformation der CMA 03/2005. Regulation von Hunger und Sättigung.

Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J., Cone, R. D. 1997. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385: 165-168.

Ferranti, P., Traisci, M. V., Picariello, G., Nasi, A., Boschi, V., Siervo, M., Falconi, C., Chianese, L., Addeo, F. 2004. Casein proteolysis in human milk: tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides. *Journal of Dairy Research* 71 (01): 74-87.

Fickel, J., Bagnol, D., Watson, S. J., Akil, H. 1997. Opioid receptor expression in the rat gastrointestinal tract: a quantitative study with comparison to the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 46: 1-8.

FitzGerald, R. J. and Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition* 84 (1): 33-37.

FitzGerald, R. J. and Meisel, H. 2003. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: Advanced Dairy Chemistry. Third Edition, Part B Chapter 14 (eds. Fox, P. F. and McSweeney, P.), Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, 675-698.

- 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: 209-214.
- Föger, F., Kopf, A., Loretz, B., Albrecht, K., Bernkop-Schnürch, A. 2008. Correlation of in vitro and in vivo models for the oral absorption of peptide drugs. *Amino Acids* 35 (1): 233-241.
- Foltz, M., Cerstiaens, A., Van Meensel, A., Mols, R., Van der Pijl, P. C., Duchateau, G. S., Augustijns, P. 2008. The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides* 29: 1312-1320.
- Fukudome, S. and Yoshikawa, M. 1992. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Lett* 296 (1): 107-111.
- Fukudome, S. and Yoshikawa, M. 1993. Gluten exorphin C. A novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS letters* 316 (1): 17-19.
- Fukudome, S., Jinsmaa, Y., Matsukawa, T., Sasaki, R., Yoshikawa, M. 1997. Release of opioid peptides, gluten exorphins by the action of pancreatic elastase. *FEBS letters* 412 (3): 475-479.
- Ganapathy, V. and 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: 14189-14192.
- Ganapathy, V. and Miyauchi, S. 2005. Transport systems for opioid peptides in mammalian tissues. *The AAPS Journal* 7 (4): 852-856.
- Gardner, M. L. G. 1983. Evidence for, and implications of passage of intact peptides across the intestinal mucosa. *Biochemical Society Transaction* 11: 810.
- Gardner, J., Rothwell, N., Luheshi, G. 1998. Leptin affects food intake via CRF-receptor-mediated pathways. *Nature Neuroscience* 1: 103.
- Geliebter, A., Westreich, S., Gage, D. Hashim, S. A. 1986. Intragastric balloon reduces food intake and body weight in rats. *Am J Physiol* 251: R794-R797.
- Geliebter, A. 1988. Gastric distension and gastric capacity in relation to food intake in humans. *Physiol Behav* 44: 665-668.
- Gitter, A. H., Schulzke, J. D., Sorgenfrei, D., Fromm, M. 1997. Ussing chamber for high-frequency transmural impedance analysis of epithelial tissues. *J Biochem. Biophys. Methods* 35: 81-88.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. 2007. Bioactive Peptides in Dairy Products. *Handbook of Food Products Manufacturing: Principles, Bakery, Beverages, Cereals, Cheese, Confectionary, Fats, Fruits and Functional Foods*: 489-517.

- Gonzalez, M. F. and Deutsch, J. A. 1981. Vagotomy abolishes cues of satiety produced by gastric distension. *Science* 212 (4500): 1283-1284.
- Grandison, L. and Guidotti, A. 1977. Stimulation of food intake by muscimol and beta-endorphin. *Neuropharmacology* 16: 533-536.
- Grecksch, G., Schweigert, C., Matthies, H. 1981. Evidence for analgesic activity of beta-casomorphin in rats. *Neurosci Lett* 27 (3): 325-8.
- Grimes, D. A. and Schulz, K. F. 2002. Cohort studies: marching towards outcomes. *In Lancet*, 359: 341-5.
- Guesdon, B., Pichon, L., Tome, D. 2006. Opioid Peptides. In: Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. *Nutraceutical Science and Technology* 4: 367-376.
- Hao, S., Avraham, Y., Mechoulam, R., Berry, E. M. 2000. Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol* 392: 147-156.
- Hara, H., Fujibayashi, A., Kiriya, S. 1992. Pancreatic protease secretion profiles after spontaneous feeding of casein or soybean protein diet in unrestrained conscious rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 3 (4): 176-181.
- Hartwig, A., Teschemacher, H., Lehmann, W., Gauly, M., Erhardt, G. 1997. Influence of genetic polymorphisms in bovine milk on the occurrence of bioactive peptides. Seminar on milk protein polymorphism, IDF special issue no. 9702. *International Dairy Federation, Brussels*: 459-460.
- Hayashi, R., Hilgendorf, C., Artursson, P., Augustijns, P., Brodin, B., Dehertogh, P., Fisher, K., Fossati, L., Hovenkamp, E., Korjamo, T. 2008. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 35 (5): 383-396.
- Hemlin, M., Jodal, M., Lundgren, O., Sjövall, H., Stage, L. 1988. The importance of the subepithelial resistance for the electrical properties of the rat jejunum in vitro. *Acta Physiol. Scand* 1988 Sep, 134 (1): 79-88.
- Hendrickson, A. E., Wagoner, N., Cowan, W. M. 1972. An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 135: 1-26 [58].
- Hetherington, A. W. and Ranson, S. W. 1940. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 78: 149-172.
- 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: 736-749.

Hildebrandt, M., Reuter, W., Arck, P., Rose, M., Klapp, B. 2000. Aguardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence. *Clinical Sci* 99: 93-104.

Hill, J. P., Crawford, R. A., Boland, M. J. 2002. Milk and consumer health: a review of the evidence for a relationship between the consumption of beta-casein A1 with heart disease and insulin-dependent diabetes mellitus. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 62: 111-114.

Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., Chi, L. 2008. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides* 29(6): 1062-1071.

Hu, H., Miyauchi, S., Bridges, C. C., Smith, S. B., Ganapathy, V. 2003. Identification of a novel Na-and Cl-coupled transport system for endogenous opioid peptides in retinal pigment epithelium and induction of the transport system by HIV-1 Tat. *Biochem J* 375: 17-22.

Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A., Morris, H. R. 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258 (5536): 577-579.

Hulshof, T., de Graaf, C., Weststrate, J. A. 1993. The effect of preloads varying in physical state and fat content on satiety and energy intake. *Appetite* 21: 273-286.

Hunt, J. N. and Stubbs, D. F. 1975. The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying. *J Physiol* 245 (1): 209-225.

Hunt, J. N., Smith, J. L., Liang, C. 1985. Effect of meal volume and energy density on the gastric emptying of carbohydrates. *Gastroenterology* 89: 1326-1330.

Hunter, L.C., O'Hare, A., Herron, W. J., Fisher, L. A., Jones, G. E. 2003. Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Development Medicine and Child Neurology* 45 (2): 121-128.

IUPHAR 2008. The IUPHAR Database on Receptor Nomenclature and Drug Classification. <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorListForward>.

Iwan, M., Jarmolowska, B., Bielikowicz, K., Kostyra, E., Kostyra, H., Kaczmarek, M. 2008. Transport of μ -opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer. *Peptides* 29 (6): 1042-1047.

Jackson, H. C. and Sewell, R. D. 1985. Are delta-opioid receptors involved in the regulation of food and water intake? *Neuropharmacology* 24: 885-888 [255].

Jain, M. R., Horvath, T. L., Kalra, P. S. 2000. Evidence that NPY Y1 receptors are involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. *Regul Pept* 8; 87 (1-3): 19-24.

- Jarmolowska, B., Sidor, K., Iwan, M., Bielikowicz, K., Kaczmariski, M., Kostyra, E., Kostyra, H. 2007a. Changes of β -casomorphin content in human milk during lactation. *Peptides* 28 (10): 1982-1986.
- Jinsmaa, M. and Yoshikawa, M. 1999. Enzymatic release of neocasomorphin and b-casomorphin from bovine b-casein. *Peptides* 20: 957-962.
- Kaiser, T. 1999. Zellkulturtest für den täglichen Gebrauch. *LaborPraxis; Heft 10/99*: 50-52.
- Kalra, S., Dube, M. G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T. L. 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Rev* 20: 68-100.
- Kelly, J., Alheid, G. F., Newberg, A., Grossman, S. P. 1977. GABA stimulation and blockade in the hypothalamus and midbrain: effects on feeding and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 7: 537-541.
- 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: 139-146.
- King, H., Aubert, R. E., Herman, W. H. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21 (9): 1414.
- Koch, G., Wiedemann, K., Teschemacher, H. 1985. Opioid activities of human β -casomorphins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 331 (4): 351-354.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2003. Food-derived bioactive peptides – Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* 9 (16): 1297-1308.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16 (9): 945-960.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2007. Bioactive peptides from food proteins. *Handbook of food products manufacturing: health, meat, milk poultry, seafood, and vegetables: John Wiley&Sons*: 5-38.
- Koompans, H. S. 1983. A stomach hormone that inhibits food intake. *J Auton Nerv Syst* 9: 157-171.
- Kramer, F. M., Stunkard, A. J., Spiegel, T. A., Deren, J. J., Velchik, M. G., Wadden, T. A., Marshall, K. A. 1989. Limited weight losses with a gastric balloon. *Arch Int Med* 149: 411-413.
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribi, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madson, O. D., Vrang, P. J., Hastrup, S. 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.

- Kuge, T., Greenwood-Van Meerveld, B., Sokabe, M. 2006. Stress-induced breakdown of intestinal barrier function in the rat: Reversal by wood creosote. *Life Sciences* 79 (9): 913-918.
- Lambert, P. D., Wilding, J. P. H., Ghatei, M. A., Bloom, S.R. 1993. A role for GLP-1 (7-36)NH₂ in the central control of feeding behavior. *Digestion* 54: 360-361.
- Lambert, P. D., Couceyro, P. R., Koylu, E., Ling, N., DeSouza, E., Kuhar, M. 1997. A role for novel CART peptide fragments in the central control of food intake. *Neuropeptides* 31: 620-621.
- Lambert, P. D., Couceyro, P. R., McGirr, K. M., Dall Vechia, S. E., Smith, Y., Kuhar, M. J. 1998. CART peptides in the central role of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29: 293-298.
- Laugesen, M. and Elliot, R. 2003a. Ischaemic heart disease, Type 1 diabetes, and cow milk A1 β -casein. *Journal of the New Zealand Medical Association* 116 (1168):
- Laugesen, M. and Elliot, R. 2003b. The influence of consumption of A1 β -casein on heart disease and Type 1 diabetes – the authors reply. *Journal of the New Zealand Medical Association* 116 (1170):
- Leibowitz, S. F., Brown, O., Tretter, R. J. 1982. Peripheral and hypothalamic injections of a-adrenergic and dopaminergic receptor drugs have specific effects on nutrient selections in rats. *Proc East Psychol Assoc* 53: 136.
- Leibowitz, S. F. 1986. Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behaviour. *Fed Proc* 45: 1396-1403.
- Lin, L., Umahara, M., York, D. A., Bray, G. A. 1998. Beta casomorphins stimulate and enterostatin inhibits the intake of dietary fats in rats. *Peptides (New York, NY. 1980)* 19 (2): 325-331.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., Wilkison, W. O. 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802.
- Luopajarvi, K., Savilahti, E., Virtanen, S. M., Ilonen, J., Knip, M., Akerblom, H. K., Vaarala, O. 2008. Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood. *Pediatric Diabetes* 9 (5): 434-441.
- Lynch, P. J.: Medical Illustrator. File: Brain human sagittal section. Dec 23/2006.
- Macaud, C., Zhao, Q., Ricart, G., Piot, J. M. 1999. Rapid detection of a casomorphin and new casomorphin-like peptide from a peptic casein hydrolysate by spectral comparison and second order derivative spectroscopy during HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 22 (3): 401-418.

- Mackenzie, B., Loo, D. D., Fei, Y., Liu, W. J., Ganapathy, V., Leibach, F. H., Wright, E. M. 1996. Mechanisms of the human intestinal H⁺-coupled oligopeptide transporter hPEPT1. *J Biol Chem* 271: 5430-5437.
- Madara, J. L. and Pappenheimer, J. R. 1987. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J Membr Biol* 100: 149-164.
- Mahe, S., Tome, D., Dumontier, A. M., Desjeux, J. F. 1989a. Absorption of intact morphiceptin by diisopropylfluorophosphate-treated rabbit ileum. *Peptides* 10 (1): 45-52.
- Mahe, S., Tome, D., Dumontier, A. M., Desjeux, J. F. 1989b. Absorption of intact beta-casomorphins (beta-CM) in rabbit ileum in vitro. *Reprod Nutr Dev* 29 (6): 725-733.
- Mahe, S., Benamouzig, R., Gaudichon, C., Huneau, J. F., Decruz, I., Rautureau, J., Tome, D. 1995. Nitrogen movements in the upper jejunum lumen in humans fed low amounts of casein or beta-Lactoglobulin. *Gastroenterology Clinique Et Biologique* 19 (1): 20-26.
- Mahe, S., Roos, N., Benamouzig, R., Davin, L., Luengo, C., Gagnon, L., Gausserges, N., Rautureau, J., Tome, D. 1996. Gastrojejunal kinetics and the digestion of [N-15]beta-lactoglobulin and casein in humans: The influence of the nature and quantity of the protein. *American Journal of Clinical Nutrition* 63 (4): 546-552.
- Maklakova, A. S., Dubynin, V. A., Nazarenko, I. V., Nezavibat'ko, V. N., Alfeeva, L. A., Kamenskii, A. A. 1995. Effects of β -casomorphin-7 on different types of learning in white rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 120 (5): 1121-1124.
- Malagelada, J. R. 1977. Quantification of gastric solid-liquid discrimination during digestion of ordinary meals. *Gastroenterology* 72: 1264-1267.
- Maslennikova, N. V., Sazonova, E. N., Timoshin, S. S. 2008. Effect of β -casomorphin-7 on DNA synthesis in cell populations of newborn albino rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 145 (2): 210-212.
- Matthies, H., Stark, H., Hartrodt, B., Ruethrich, H. L., Spieler, H. T., Barth, A., Neubert, K. 1984. Derivatives of beta-casomorphins with high analgesic potency. *Peptides* 5 (3): 463-470.
- McKay, L. D., Kenney, N. J., Edens, N. K., Williams, R. H., Woods, S. C. 1981. Intracerebroventricular beta-endorphin increases food intake of rats. *Life Sci* 29: 1429-1434.
- McLachlan, C. N. S. 2001. β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses* 56 (2): 262-272.
- Meisel, H. 1997. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43 (2): 119-128.

- Meisel, H. and FitzGerald, R. J. 2000. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition* 84 (1): 27-31.
- Meisel, H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors* 21 (1): 55-61.
- Meister, B. 2007. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behaviour and body weight. *Physiol Behav* 92 (1-2): 263-271.
- Meshkinpour, H., Hsu, D., Farivar, S. 1988. Effect of gastric bubble as a weight reducing device: a controlled, crossover study. *Gastroenterology* 95: 589-592.
- Mihatsch, W. A., Franz, A. R., Kuhnt, B., Hogel, J., Pohlandt, F. 2005. Hydrolysis of casein accelerates gastrointestinal transit via reduction of opioid receptor agonists released from casein in rats. *Biol Neonate* 87 (3): 160-163.
- Mine, Y. and Shahidi, F. 2006. Nutraceutical proteins and peptides in health and disease: an overview. *Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group*.3-9.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition* 47 (4): 171-182.
- Modern drug discovery, Oct 2000, Vol.3, No.8.
- Morgane, P. J. 1961. Evidence of a 'hunger motivational' system in the lateral hypothalamus of the rat. *Nature* 191: 672-674.
- Morris, P. E. and FitzGerald, R. J. 2008. Whey proteins and peptides in human health. In: *Whey Processing, Functionality and Health Benefits* – (ed: Onwulata, C.) Woodhead Publishing, UK, 287-345.
- Moskowitz, D. W. 2002. Is "Somatic" Angiotensin I-Converting Enzyme a mechanosensor? *Diabetes Technology & Therapeutics* 4 (6): 841-858.
- Moskowitz, D. W. 2003. Pathophysiologic Implications of Angiotensin I-Converting Enzyme as a mechanosensor: Diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics* 5 (2): 189-199.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M. M., Matsuo, H., Kangawa, K., Matsukura, S. 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198.
- Ng-Kwai-Hang, K. and Grosclaude, F. 2003. Genetic polymorphism of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry 3rd edition* 1: 405-455.

- Nicklas, B. J., You, T., Pahor, M. 2005. Behavioural treatments for chronic systemic inflammation: effects of dietary weight loss and exercise training. *Canadian Medical Association Journal* 172 (9): 1199-1209.
- Norgren, R. and Leonard, C. M. 1973. Ascending central gustatory pathways. *J Comp Neurol* 150: 217-237 [105].
- Ohinata, K., Agui, S., Yoshikawa, M. 2007. Soymorphins, novel μ opioid peptides derived from soy β -conglycinin β -subunit, have anxiolytic activities. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71 (10): 2618-2621.
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G. S. 1997. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138.
- Pacha, J. 2000. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiological Reviews* 80 (4): 1633-1667.
- Padberg, S., Schumm-Draeger, P. M., Petzoldt, R., Becker, F., Federlin, K. 1999. The significance of A1 and A2 antibodies against beta-casein in type 1 diabetes mellitus. *Dtsch Med Wochenschr* 124 (50): 1518-1521.
- Patel, L. N., Zaro, J. L., Shen, W. C. 2007. Cell penetrating peptides: Intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research* 24 (11): 1977-1992.
- Patlak, J. 1999. Department of Physiology, University of Vermont. Nov 01, 2000.
- Pauletti, G. M., Gangwar, S., Knipp, G. T., Nerurkur, M. M., Okumu, F. W., Tamura, K., Siahaan, T. J., Borchardt, R. T. 1996. Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. *Journal of Controlled Release* 41 (1-2): 3-17.
- Pauletti, G. M., Gangwar, S., Wang, B., Borchardt, R. T. 1997. *Pharm Res* 14: 11-17.
- Peter, S. 2007. Trends in the incidence of type 1 diabetes mellitus worldwide. *West Indian Medical Journal* 56 (3): 264.
- Peterson, R. F. and Kopfler, F. C. 1966. Detection of new types of β -casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH: A proposed nomenclature. *Bioch And Biophys Research Communications* 22: 368.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.-D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assamnn, 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: 323-330.
- Poggioli, R., Vergoni, A. V., Bertolini, A. 1986. ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides* 7: 843-848.

- Porrini, M., Corvetti, R., Riso, P., Santangelo, A., Testolin, G. 1995. Effects of physical and chemical characteristics on food of specific and general satiety. *Pyhsiol Behav* 57: 461-468.
- Pozzilli, P., Guglielmi, C., Pronina, E., Petraikina, E. 2007. Double or hybrid diabetes associated with an increase in type 1 and type 2 diabetes in children and youths. *Pediatric Diabetes* 8 (s9): 88-95.
- Quiros, A., Davalos, A., Lasuncion, M. A., Ramos, M., Recio, I. 2008. Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP. *International Dairy Journal* 18 (3): 279-286.
- Ramos, E. J., Megiud, M. M., Campos, A. C., Coelho, J. C. 2005. Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone and monoamines in food intake regulation. *Nutrition* 21 (2): 269-279.
- Rehner, G. and Daniel, H. 2002. Biochemie der Ernährung. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage.
- Reichelt, K. L. and Knivsberg, A. M. 2003. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutritional Neuroscience* 6 (1): 19-28.
- Ricardo, J. A. and Koh, E. T. 1978. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdale, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153: 1-26 [116].
- Rolls, B. J., Bell, E. A., Thorwart, M. L. 1999. Water incorporated into a food but not served with a food decreases energy intake in lean women. *Am J Clin Nutr* 70: 448-455.
- Rossi, M., Kim, M. S., Morgan, D. G., Small, C. J., Edwards, C. M., Sunter, D., Abusnana, S., Goldstone, A. P., Russell, S. H., Stanley, S. A., Smith, D. M., Yagaloff, K., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. 1998. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139: 4428-4431.
- Roumi, M., Kwong, E., Deghenghi, R., Locatelli, V., Marleau, S., Du Souich, P., Beliveau, R., Ong, H. 2001. Permeability of the peptide GH secretagogues hexarelin and EP 51389, across rat jejunum. *Peptides* 22 (7): 1129-1138.
- Rowbotham, D. J. 2001. Endogenous opioids, placebo response, and pain. *Lancet*. 2001 Jun 16; 357 (9272): 1901-2.
- Rubio, L. A. and 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: 5202-5206.

Saito, T. 2008. Antihypertensive Peptides Derived from Bovine Casein and Whey Proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology: bioactive components of milk* 606: 295-317.

Sakaguchi, M., Koseki, M., Wakamatsu, M., Matsumura, E. 2003a. Effects of β -casomorphin-5 on passive avoidance response in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67 (11): 2501-2504.

Sakaguchi, M., Murayama, K., Jinsmaa, Y., Yoshikawa, M., Matsumura, E. 2003b. Neurite outgrowth-stimulating activities of β -casomorphins in neuro-2a mouse neuroblastoma cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67 (12): 2541-2547.

Sakaguchi, M., Koseki, M., Wakamatsu, M., Matsumura, E. 2006. Effects of systemic administration of β -casomorphin-5 on learning and memory in mice. *European Journal of Pharmacology* 530 (1-2): 81-87.

Scherfer, E. 2003. Von Kohorten- sowie Fall-Kontroll-Studien und einem Werkzeugkoffer. *Zeitschrift für Psychotherapeuten*; 55. Jg. Nr. 5: 812-816.

Schick, R. R., Yaksh, T. L., Go, V. L. W. 1986. Intracerebroventricular injections of cholecystokinin octapeptide suppress feeding in rats-pharmacological characterization of this action. *Regul Pept* 14: 277-291.

Schick, R. R., Harty, G. J., Yaksh, T. L., Go, V. L. W. 1990. Sites in the brain at which cholecystokinin octapeptide (CCK-8) acts to suppress feeding in rats: a mapping study. *Neuropharmacology* 29: 109-118 [245].

Schick, R. R., Schusdziarra, V., Endres, C., Eberl, T., Classen, M. 1991. Putative sleep factors and satiety in rats: role of cholecystokinin (CCK) and delta sleep inducing factor (DSIP). *Neuropeptides (Life Sci Adv)* 10: 41.48 [246].

Schick, R. R. and Schusdziarra, V. 1994. Regulation of food intake. In: Ditschuneit, H., Gries, F. A., Hauner, H., Schusdziarra, V., Wechsler, J. G., eds. *Obesity in Europe* 1993. London: John Libbey: 335-348.

Schick, R. R., Erdmann, J., Schusdziarra, V. 2003. Appetit- und Sättigungsregulation. In: *Adipositas, Ursachen und Therapie*. Wechsler J. G. (Hrsg.), Blackwell Verlag, 2.Auflage: 131-143.

Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H. H., Raith, K. 2007. Peptic digestion of β -casein Time course and fate of possible bioactive peptides. *Journal of Chromatography A* 1166 (1-2): 108-115.

Schrezenmeir, J. and Jagla, A. 2000. Milk and diabetes. *Journal of the American College of Nutrition* 19 (90002): 176-190.

Share, I. E., Martyniuk, E., Grossman, M. I. 1952. Effect of prolonged intragastric feeding on oral food intake in dogs. *Am J Physiol* 169: 229-235.

- Shimizu, M., Tsunogai, M., Aria, S. 1997. Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides* 18: 681-687.
- Singh, M., Rosen, C. L., Chang, K., Haddad, G. G. 1989. Plasma [beta]-Casomorphin-7 Immunoreactive Peptide Increases after Milk Intake in Newborn but not in Adult Dogs. *Pediatric Research* 26 (1): 34.
- Seely, S. 1981. Diet and coronary disease: a survey of mortality rates and food consumption statistics of 24 countries. *Med Hypotheses* 7 (7): 907-918.
- Speiser, F., PBC, Roche. www.roche.com/pages/facets/6/weight.htm (21.02.2011).
- Spinas, G. A., Heitz, Ph. U. 2004. Basierend auf: www.megru.unizh.ch/j3/module/endokrinologie/ (19.03.2011).
- Stanley, B. G. and Leibowitz, S. F. 1984. Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci* 35: 2635-2642.
- Stanley, B. G., Daniel, D. R., Chin, A. S., Leibowitz, S. F. 1985. Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* 6: 1205-1211.
- Stanley, B. G., L anthier, D., Leibowitz, S. F. 1989. Multiple brain sites sensitive to feeding stimulation by opioid agonists: a cannula-mapping study. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 825-8.
- Stefanovic, G. [Webmaster; Mafasoft], Administration. 2008.
- Steinerova, A., Korotvicka, M., Racek, J., Rajdl, D., Trefil, L., Stozicky, F., Rokyta, Z. 2004. Significant increase in antibodies against oxidized LDL particles (IgoxLDL) in three-month old infants who received milk formula. *Atherosclerosis* 173 (1): 147-8.
- Sun, Z., Zhang, Z., Wang, X., Cade, R., Elmir, Z., Fregly, M. 2003. Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides (New York, N.Y. 1980)* 24 (6): 937-943.
- Svedberg, J., de Haas, J., Leimenstoll, G., Paul, F., Teschemacher, H. 1985. Demonstration of beta-casomorphin immunoreactive materials in in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* 6 (5): 825-830.
- Synder, S. H. Chemie der Psyche. Spektrum Verlag Heidelberg (1988).
- Takahashi, M. and Yoshikawa, M. 1994. Isolation and characterization of oryzatensin: a novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin. *Biochemistry and Molecular Biology International* 33 (6): 1151-1158.

- Takahashi, M., Moriguchi, S., Suganuma, H., Shiota, A., Tani, F., Usui, H., Kurahashi, K., Sasaki, R., Yoshikawa, M. 1997. Identification of casoxin C, an ileum-contracting peptide derived from bovine kappa-casein, as an agonist for C3a receptors. *Peptides* 18 (3): 329-336.
- Tang-Christensen, M., Larsen, P. J., Göke, R., Fink-Jensen, A., Jessop, D. A., Møller, M., Sheikh, S. P. 1996. Central administration of GLP-1 (7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol* 271: R848-R856.
- Tani, F., Iio, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. 1990. Isolation and characterization of opioid antagonist peptides derived from human lactoferrin. *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (7): 1803-1810.
- Teschemacher, H., Koch, G., Brantl, V. 1997. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43 (2): 99-117.
- Teschemacher, H. 2003. Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Design* 9: 1331-1344.
- Tome, D., Dumontier, A. M., Hautefeuille, M., Desjeux, J. F. 1987. Opiate activity and transepithelial passage of intact beta-casomorphins in rabbit ileum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 253 (6): 737-744.
- Tournier, A. and Louis-Sylvestre, J. 1991. Effect of the physical state of a food on subsequent intake in humans. *Appetite* 16: 17-24.
- Trompette, A., Claustre, J., Caillon, F., Jourdan, G., Chayvialle, J. A., Plaisancie, P. 2003. Milk bioactive peptides and β -casomorphins induce mucus release in rat jejunum. *Journal of Nutrition* 133 (11): 3499-3503.
- Tsuji, S. and Bray, G. A. 1989. Acetylation alters the feeding response to MSH and beta-endorphin. *Brain Res Bull* 23: 165-169.
- Tuma, P. L. and Hubbard, A. 2003. Transcytosis: Crossing Cellular Barriers. *Physiological Reviews* 83 (3): 871-932.
- Turner, T. D., Browning, J. L., Widmayer, M. A., Baskin, D. S. 1998. Penetration of dynorphin 1-13 across the blood-brain barrier. *Neuropeptides* 32 (2): 141-9.
- Turton, M. D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S. A., Edwards, C. M., Meeran, K., Choi, S. J., Taylor, G. M., Heath, M. M., Lambert, P. D., Wilding, J. P., Smith, D. M., Ghatei, M. A., Herbert, J., Bloom, S. R. 1996. A role for glucagons-like-peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379: 69-72.
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Mathes, W. F., Przypek, R., Kanarek, R., Maratos-Flier, E. 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247.

Umbach, M., Teschemacher, H., Praetorius, K., Hirschhauser, R., Bostedt, H. 1985. Demonstration of a beta-casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regulatory Peptides* 12 (3): 223-230.

Urtti, A., Johns, S. J., Sadee, W. 2001. Genomic structure of proton-coupled oligopeptide transporter hPEPT1 and pH-sensing regulatory splice variant. *AAPS Pharmsci.* 3, E6.

Ussing, H. H. 1950. Active Transport of sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiol. Scand* Vol.23, Dec 23/1950 : 110-127.

Vaarala, O., Paronen, J., Otonkoski, T., Akerblom, H. K. 1998. Cow milk feeding induces antibodies to insulin in children: a link between cow milk and IDDM. *Scand J Immunol* 47: 131-135.

Vaarala, O. 2008. Leaking gut in type 1 diabetes. *Current Opinion in Gastroenterology* 24 (6): 701.

Van Dyke, R. W. 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: 1062-1088.

Venn, B. J., Skeaff, C. M., Brown, R., Mann, J. I., Green, T. J. 2006. A comparison of the effects of A1 and A2 β -casein protein variants on blood cholesterol concentrations in New Zealand adults. *Atherosclerosis* 188 (1): 175-178.

Waldhoer, M., Bartlett, S. E., Whistler, J. L. 2004. Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry* 73: 953-990.

Walsh, D. J. and FitzGerald, R. J. 2004. Health-related functional value of dairy proteins and peptides. In: *Proteins in food processing*. (ed. Yada, R.), Woodhead Publishing, Cambridge, UK, 559-606.

WHO 2003. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of the WHO/FAO Joint Expert Consultation. *WHO Technical reports* 916: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf.

Williams, C. M. and Kirkham, T. C. 1999. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 143: 315-317.

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: 24-40.

Wirth, K. E. 1961. Food intake of rats after removal and electrical stimulation of the hypothalamus. *Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 272: 602-611 [210].

- Wittert, G., Hope, P., Pyle, D. 1996. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218 (3): 877-881.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Porte, D., Schwartz, M. W. 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280: 1378-1383.
- Wren, A. M., Small, C. J., Ward, H. L., Murphy, K. G., Dakin, C. L., Taheri, S., Kennedy, A. R., Roberts, G. H., Morgan, D. G., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. 2000. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141: 4325-4328.
- Yang, C. Y., Dantzig, A. H., Pidgeon, C. 1999. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Phar Res* 16: 1331-1343.
- Yoshikawa, M., Tani, F., Ashucaga, T., Yoshimura, T., Chiba, H. 1986. Purification and characterization of an opioid antagonist from a peptic digest of bovine κ -casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (11): 2951-2954.
- Young, R. C., Gibbs, J., Antin, J., Holt, J., Smith, G. P. 1974. Absence of satiety during sham feeding in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 87: 795-800.
- Zioudrou, C., Streaty, R. A., Klee, W. A. 1979. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *Journal of Biological Chemistry* 254 (7): 2446-2449.
- Zoghbi, S., Trompette, A., Claustre, J., Homsy, M. E., Garzon, J., Jourdan, G., Scoazec, J. Y., Plaisancie, P. 2006. β -Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a μ -opioid pathway. *American Journal of Pyhsiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (6): 1105-1113.
- Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E., Louvard, D. 1991. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. *Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System* 4: 223-255.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Vor- und Zunahme:	Daniela Toure-Demmerer
Geburtsdatum:	24.01.1977
Hauptwohnsitz:	Wien
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	verheiratet

Ausbildung

Sep. 1983 – Juli 1987:	Volksschule Mariazell
Sep. 1987 – Juli 1994:	Neusprachliches Gymnasium der Ursulinen Graz
Dez. 1994 – Juni 1995:	Bundesgymnasium Bruck a.d. Mur
Juni 1995 :	AHS – Matura
Okt. 1995 – Juli 1996:	Studium der Veterinärmedizin (Vet Med)
Seit März 1996:	Studium der Ernährungswissenschaften (Universität Wien)
Sep. 2004:	Pharmareferentenprüfung

Berufserfahrung

Juli 1995 – Sep. 1995:	Geldschalterdienst bei der Post Mariazell
Nov. 1995 – Januar 1996:	Hausangestellte des Bundesschullandheim Mariazell
Aug. 1997:	Assistentin bei der „International Ethological Conference“ (WU – Wien)
Mai 1999 – Aug. 1999:	Verkäuferin bei Lutz GMBH (1150 Wien)

- Okt. 1999 – Juni 2002: Private Betreuungsperson
(1070 Wien)
- Aug. 2008 – Okt. 2008: Praktikum bei der Fa. Schütz-Marketing Services
(1180 Wien)
- Okt. 2008 – Juni 2010: Pharmareferentin
bei der Fa. Schütz-Marketing Services

Weitere Qualifikationen

- Persönliche Fähigkeiten:
- Englisch (fließend, in Wort und Schrift)
 - Französisch (Maturaniveau, in Wort und Schrift)
 - Allgemeine Computerkenntnisse