

*In-vitro*-Analyse des Einflusses von Beta-Casomorphin-7,  
Opioiden und Milch mit den Beta-Kasein-Varianten A1 und A2  
auf die Darmmotilität des Schweins

von Felix Gard

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

*In-vitro*-Analyse des Einflusses von Beta-Casomorphin-7,  
Opioiden und Milch mit den Beta-Kasein-Varianten A1 und A2  
auf die Darmmotilität des Schweins

von Felix Gard

aus Hermeskeil

München 2024



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka  
Priv.-Doz. Dr. Matthias Eddicks  
Univ.-Prof. Dr. Angelika Schoster  
Priv.-Doz. Dr. Andrea Stockmaier-Didier

Tag der Promotion: 6. Juli 2024



Meiner Familie,  
insbesondere  
meinem Großvater, in liebevoller Erinnerung,  
Tante Edith,  
meinem Bruder  
und meinen Eltern





## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Kuhmilch</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Milchzusammensetzung .....	3
2.1.2	Genetische Variationen der bovinen Kaseine .....	3
2.1.3	Verdauung des $\beta$ -Kaseins und Entstehung von $\beta$ -Casomorphin-7 .....	5
2.1.4	Resorption von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren .....	9
2.1.5	Studien zur Resorption von BCM-7 .....	11
<b>2.2</b>	<b>Das enterische Nervensystem</b> .....	<b>13</b>
2.2.1	Aufbau und Funktion.....	13
2.2.2	Entstehung der Kontraktionen der Muskulatur des Darms .....	14
2.2.3	Intrinsisch-vermittelte Kontraktionen.....	16
2.2.4	Extrinsisch-vermittelte Kontraktionen.....	17
2.2.5	Motilitätsmuster des Darms .....	17
<b>2.3</b>	<b>Opioidrezeptoren</b> .....	<b>18</b>
2.3.1	Einteilung, Aufbau und Funktion .....	18
2.3.2	Opioidrezeptoren im Körper.....	20
2.3.2.1	Opioidrezeptoren des Magen-Darm-Trakts .....	21
2.3.2.1.1	Vorkommen im Magen-Darm-Trakt .....	21
2.3.2.1.2	Wirkung auf die Kontraktionen des Magen-Darm-Traktes .....	22
<b>2.4</b>	<b>BCM-7</b> .....	<b>24</b>
2.4.1	BCM-7 als opioides Peptid .....	24
2.4.2	BCM-7 aus A1-Milch und der Zusammenhang zu Krankheiten .....	24
2.4.2.1	BCM-7 und der Zusammenhang zu Diabetes mellitus Typ 1.....	25
2.4.2.2	BCM-7 und der Zusammenhang zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	27
2.4.2.3	Wirkung auf das Immunsystem durch BCM-7 .....	29
2.4.2.4	Effekte auf den Verdauungstrakt durch BCM-7 .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Probenmaterial</b> .....	<b>35</b>

<b>3.2</b>	<b><i>In-vitro</i>-Verdauung der Milch</b> .....	<b>36</b>
3.2.1	Puffer und Lösungen .....	36
3.2.2	Vorbereitung der Milchproben .....	37
3.2.3	Magenphase der <i>in-vitro</i> -Verdauung .....	37
3.2.4	Dünndarmphase der <i>in-vitro</i> -Verdauung.....	38
<b>3.3</b>	<b>Kompetitiver ELISA zur Detektion von BCM-7</b> .....	<b>39</b>
3.3.1	Puffer und Lösungen .....	39
3.3.2	Vorbereitung der ELISA-Platten und Durchführung .....	41
3.3.2.1	Ermittlung der BCM-7 Konzentrationen .....	42
3.3.3	Statistische Auswertung .....	43
<b>3.4</b>	<b>Immunhistochemie</b> .....	<b>44</b>
3.4.1	Puffer und Lösungen .....	44
3.4.2	Herstellung der Paraffinschnitte.....	46
3.4.3	Entparaffinieren der Paraffinschnitte.....	47
3.4.4	Immunhistochemische Färbung.....	47
<b>3.5</b>	<b>Kontraktionsversuch</b> .....	<b>49</b>
3.5.1	Lösungen und Puffer .....	49
3.5.2	Aufbau des Muskelkontraktionsmessplatzes .....	50
3.5.3	Vorbereitung des Probenmaterials .....	52
3.5.4	Durchführen des Kontraktionsversuchs .....	56
3.5.4.1	Untersuchung der spontanen Kontraktionen .....	56
3.5.4.2	Untersuchungen der EFS-induzierten Kontraktionen.....	56
3.5.4.3	Auswertung der Kontraktionsdaten.....	56
3.5.4.3.1	Auswertung der spontanen Kontraktionen.....	56
3.5.4.3.2	Auswertung der EFS-induzierten Kontraktionen.....	58
3.5.5	Statistik .....	59
3.5.5.1	Datenauswertung und grafische Darstellung .....	59
3.5.5.2	Statistische Analyse.....	59
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunhistochemischer Nachweis des MOR im porcinen Jejunum</b> ... <b>61</b>	
<b>4.2</b>	<b>BCM-7-Konzentration in <i>in vitro</i> verdauter A1- und A2-Milch</b> ..... <b>63</b>	

<b>4.3</b>	<b>Wirkung von Morphin, BCM-7 und <i>in vitro</i> verdauter A1- und A2-Milch auf die Darmkontraktion .....</b>	<b>64</b>
4.3.1	Physiologische Spontanmotilität .....	64
4.3.1.1	Die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur wurde nicht neuronal vermittelt .....	66
4.3.1.2	Morphin steigerte die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur ..	66
4.3.1.3	Die Morphin-induzierte Steigerung der Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur wurde nicht neuronal vermittelt.....	68
4.3.1.4	BCM-7 zeigte keine Wirkung auf die Motilität der Longitudinalmuskulatur	68
4.3.1.5	BCM-7 zeigte keine Wirkung auf die Motilität der Zirkulärmuskulatur .....	70
4.3.1.6	Naloxon steigerte die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur ..	71
4.3.2	Elektrisch induzierte Kontraktionen.....	73
4.3.2.1	Die EFS wurde neuronal vermittelt .....	74
4.3.2.2	Morphin hemmte die EFS-induzierten Kontraktionen .....	75
4.3.2.3	BCM-7 zeigte keine Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen .....	79
4.3.2.4	Wirkung von <i>in vitro</i> verdauter A1- und A2-Milch auf die EFS-induzierten Kontraktionen.....	81
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>127</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ammoniumcarbonat
/	pro
°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Ano1	Anoctamin-1
ANS	Autonomes Nervensystem
Aqua inj.	Aqua ad injectabilia
ATP	Adenosintri-phosphat
BCM	β-Casomorphin
BSA	Bovines Serumalbumin
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Citronensäure
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CaCo-2	Immortalisierte, kolorektale Adenokarzinomzelllinie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CH <sub>3</sub> COONa	Natriumacetat
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAMGO	[D-AIA <sub>2</sub> -, N-MePhe <sub>4</sub> , Gly-ol]-enkephalin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDPIV	Dipeptidylpeptidase-IV
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOR	δ-Opioidrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	Elektrische Feldstimulation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENS	Enterisches Nervensystem
fM	Femtomolar

## Abkürzungsverzeichnis

---

g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
ICC	Interstitielle Zellen nach Cajal
ICC-MP	Interstitielle Zellen nach Cajal des myenterischen Plexus
ICC-SMP	Interstitielle Zellen nach Cajal des submukösen Plexus
ICC-SS	subserosale Interstitielle Zellen nach Cajal
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IHD	ischämische Herzkrankheiten
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOR	κ-Opioidrezeptor
LAP	Leucinaminopeptidase
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LM	Longitudinalmuskulatur
log <sub>2</sub>	Binärer Logarithmus
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHCII	Major Histocompatibility Complex 2
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mN	Millinewton
MOR	μ-Opioidrezeptor
N	Newton
n	Stichprobengröße
N/OFQ	Nociceptin/Orphanin FQ

## Abkürzungsverzeichnis

---

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
<i>p</i>	Signifikanzwert
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline mit Tween 20
PBS-V	phosphate buffered saline nach <i>in-vitro</i> -Verdauung
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR $\alpha$ +	Platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$ -positive
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii
pM	Pikomolar
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
T1D	Diabetes mellitus Typ 1
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline mit Tween 20
TM	Tunica mucosa
TS	Tunica serosa
TSM	Tela submucosa
TTX	Tetrodotoxin
V	Volt
x g	-fache Erdbeschleunigung
ZM	Zirkulärmuskulatur
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\beta$ -NAD	$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid



## Abkürzungsverzeichnis

---

γ	Gamma
κ	Kappa

### **Abkürzungen der Aminosäuren:**

N	Asparagin
Q	Glutamin
G	Glycin
Gly	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
Ile	Isoleucin
L	Leucin
F	Phenylalanin
Phe	Phenylalanin
P	Prolin
Pro	Prolin
S	Serin
Y	Tyrosin
Tyr	Tyrosin
V	Valin

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Enzymatische Verdauung von A1- $\beta$ -Kasein in drei Schritten und die Abspaltung von BCM-7. ....	7
Abbildung 2: Aufbau des Muskelkontraktionsmessplatzes. ....	52
Abbildung 3: Präpariervorgang am Jejunum des Schweins. ....	54
Abbildung 4: Eingehängter Muskelstreifen im Organbad. ....	55
Abbildung 5: Berechnung des Integrals. ....	57
Abbildung 6: Varianzen in der Kontraktionskraft technischer Replikate. ....	58
Abbildung 7: Nachweis des MOR auf Neuronen des myenterischen Plexus. ....	61
Abbildung 8: Nachweis des MOR auf Neuronen des submukösen Plexus und Krypten-nahen Zellen. ....	62
Abbildung 9: BCM-7 Konzentrationen in <i>in vitro</i> verdauten A1- und A2-Milchen. ....	63
Abbildung 10: Spontane Motilität der Longitudinalmuskulatur. ....	65
Abbildung 11: Spontane Motilität der Zirkulärmuskulatur. ....	65
Abbildung 12: Tetrodotoxin wirkte nicht auf die spontane Motilität. ....	66
Abbildung 13: Morphin steigerte die spontane Motilität. ....	67
Abbildung 14: Tetrodotoxin hob die Morphin-induzierte Steigerung der Motilität nicht auf. ....	68
Abbildung 15: Motilitätsindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und BCM-7. ....	69
Abbildung 16: Motilitätsindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und BCM-7. ....	70
Abbildung 17: Steigerung der Motilität durch Naloxon und Morphin. ....	71
Abbildung 18: Motilitätsindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und Naloxon. ....	72
Abbildung 19: Motilitätsindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und Naloxon. ....	73
Abbildung 20: EFS-induzierte Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur. ....	74
Abbildung 21: EFS-induzierte Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur. ....	74
Abbildung 22: Hemmung der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur durch Tetrodotoxin. ....	75
Abbildung 23: Morphin hemmte die EFS-induzierten Kontraktionen. ....	76

Abbildung 24: Naloxon blockierte eine Hemmung der EFS-induzierten Kontraktionen durch Morphin. ....	76
Abbildung 25: Naloxon hob die Hemmung der EFS-induzierten Kontraktionen durch Morphin auf. ....	77
Abbildung 26: Amplitudenindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und Naloxon. ....	78
Abbildung 27: Amplitudenindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und Naloxon.....	79
Abbildung 28: Amplitudenindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und BCM-7. ....	80
Abbildung 29: Amplitudenindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und BCM-7.....	80
Abbildung 30: Amplitudenindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von PBS-V, verdauter A1-Milch und verdauter A2-Milch.....	82
Abbildung 31: Amplitudenindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von PBS-V, verdauter A1-Milch und verdauter A2-Milch. ....	83

## 1 EINLEITUNG

Die kontroverse Diskussion über den Einfluss des Kuhmilchkonsums auf die menschliche Gesundheit, insbesondere im Hinblick auf die A1-Variante des  $\beta$ -Kaseins, bleibt Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Forschung (Gonzales-Malca et al. 2023). Die A1-Variante unterscheidet sich von anderen Varianten in einem Austausch einer Aminosäure an der Position 67 der Aminosäuresequenz des  $\beta$ -Kaseins, wobei Histidin die Stelle von Prolin einnimmt (Dumas et al. 1972). Aufgrund dieser Mutation ist das A1- $\beta$ -Kasein anfälliger für die enzymatische Spaltung durch Proteasen und wird häufiger zwischen den Aminosäuren an Position 66 und 67 während der Verdauung gespalten (Asledottir et al. 2018). Das daraus resultierende Peptid wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Opioiden und seiner Länge als  $\beta$ -Casomorphin-7 (BCM-7) bezeichnet (Teschemacher 2003). Vor über vierzig Jahren wurde BCM-7 zum ersten Mal eine opioide Wirkung nachgesagt (Brantl et al. 1979). Seitdem wurde der Konsum von A1-Milch aufgrund des entstehenden BCM-7 mit einem vermehrten Auftreten verschiedener Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 1, Entzündungen, Allergien, Autismus, plötzlichem Kindstod, koronaren Herzkrankheiten und Verdauungsstörungen in Verbindung gebracht (de Vasconcelos et al. 2023). Wissenschaftliche Belege und Beweise für potenzielle Wirkmechanismen für diese teils widersprüchlichen Hypothesen fehlen bis heute und erfordern weitere gezielte Forschung (Cieslinska et al. 2022). Obwohl bewiesen ist, dass BCM-7 nicht nur aus der A1-Variante, sondern auch aus der A2-Variante freigesetzt wird, wird für einen wohltuenden Effekt der A2-Milch geworben und gleichzeitig der Zusammenhang zwischen BCM-7 aus A1-Milch und dem Einfluss auf den Verdauungstrakt thematisiert (Jeong et al. 2023). BCM-7 soll an Opioidrezeptoren in der Darmwand binden und zu einer Reduzierung der Darmmotilität führen, was zu Fehlgärungen und Verdauungsbeschwerden führen soll (Kullenberg de Gaudry et al. 2019). Die bisherige Forschung hat noch keine Bindung von BCM-7 an die Opioidrezeptoren des Magen-Darm-Trakts nachgewiesen. Zudem wurden die direkten Auswirkungen von BCM-7 auf die Darmmuskulatur bisher nicht untersucht. Ein Teilziel dieser Doktorarbeit war daher die Etablierung eines Modells zur *in-vitro*-Untersuchung der potenziellen direkten Wirkung von BCM-7 auf die Darmmotorik. Das Schwein wurde aufgrund seiner anatomischen und verdauungsphysiologischen Ähnlichkeiten zum Menschen als geeignetes Tiermodell ausgewählt (Zhang et al. 2013; Kaminski et al. 2012; Kural

et al. 2023). Am Dünndarm des Schweins soll nach der Etablierung die direkte Wirkung von BCM-7 und von *in vitro* verdauter A1- und A2-Milch auf die Darmmotorik untersucht und ein möglicher Wirkmechanismus definiert werden. Die verfügbare Datenlage zur Expression von Opioidrezeptoren im Dünndarm des Schweins ist sehr begrenzt. Daher zielt diese Doktorarbeit auch darauf ab, die Opioidrezeptoren als potenzielle Bindungsstellen im Schweinedünndarm zu identifizieren, um eine mögliche opioide Wirkung von BCM-7 zu überprüfen.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Kuhmilch

#### 2.1.1 Milchzusammensetzung

Kuhmilch wurde bereits seit dem siebten Jahrtausend vor Christus vom Menschen als Nahrungsmittel oder als Werkstoff verwendet (Evershed et al. 2008). Belege für die aktive Tierhaltung und Milchgewinnung reichen bis ins fünfte Jahrtausend vor Christus (Bartosiewicz et al. 2005). Seitdem bildet Milch eine wichtige Nährstoffquelle für den Menschen und liefert essenzielle Nährstoffe bei Mangelernährung (Givens 2020). Kuhmilch besteht aus 87% Wasser, 4,6% Kohlenhydraten, 4,3% Fett, 3,7% Protein, 0,7% Mineralstoffen und 0,01% Vitaminen und sonstigen Bestandteilen (Lindmark-Månsson et al. 2003). Die Milchzusammensetzung und ihre prozentuale Verteilung unterliegen saisonalen, gesundheitlichen, fütterungsbedingten und rassenspezifischen Schwankungen und können daher von den oben angegebenen Werten abweichen (Graham et al. 1984; Heirbaut et al. 2023). Die größte Proteinfraction in der Milch bilden die Kaseine mit 82% des Gesamteiweißes, wobei die Fraktion der Molkeproteine die restlichen 18% abbilden (Cerbulis et al. 1975; Bochniarz et al. 2023). Die Kaseinfraction lässt sich weiter unterteilen in  $\alpha_{s1}$ -Kasein,  $\alpha_{s2}$ -Kasein,  $\beta$ -Kasein und  $\kappa$ -Kasein (Farrell et al. 2004), welche jeweils durch die Gene CSN1S1, CSN1S2, CSN2, und CSN3 auf dem sechsten Chromosom kodiert werden (Threadgill et al. 1990). Der mittlere Anteil der Kaseine am Gesamt-Protein der Kuhmilch beträgt 28% für das  $\alpha_{s1}$ -Kasein, 10% für das  $\alpha_{s2}$ -Kasein, 31% für das  $\beta$ -Kasein und 17% für das  $\kappa$ -Kasein (Macedo Mota et al. 2023). Die prozentuale Verteilung der Kaseine variiert ebenfalls nach Rasse, Fütterung, Alter und Laktationsstand der Kuh (Franzoi et al. 2019).

#### 2.1.2 Genetische Variationen der bovinen Kaseine

Die verschiedenen Subtypen des bovinen Kaseins weisen genetische Variationen auf, die zu unterschiedlichen Aminosäuresequenzen führen (Huppertz et al. 2018; Hewa Nadugala et al. 2022). Diese unterschiedlichen Aminosäuresequenzen beeinflussen die Neigung der Kaseine zur Hydrolyse durch Enzyme (Jensen et al. 2012). Bezüglich des  $\alpha_{s1}$ -Kaseins wurden beispielsweise zehn Varianten identifiziert, wobei fünf

Varianten (A, B, C, D, E) häufig in den weit verbreiteten Rinderrassen wie dem Holstein-Friesian, Zebu und Jersey vorkommen und die anderen fünf Varianten (F, G, H, I, J) seltener in Rassen wie dem Schwarzbunten Niederungsrind, dem Braunvieh oder dem Kuhri-Rind nachgewiesen wurden (Gallinat et al. 2013; Hewa Nadugala et al. 2022). Das  $\alpha_{s2}$ -Kasein zeigt fünf bekannte Varianten (A, B, C, D, E), wobei die Gene für die Variante A in allen Rassen verbreitet ist, die Varianten B, C, D vereinzelt im Pinzgauer, Ungarischen Steppenrind, Angler, Deutschen Gelbvieh, Hinterwälder, Limpurger, und Vorderwälder nachgewiesen wurde und die Variante E nur im Sarabi-Rind detektiert wurde (Gallinat et al. 2013). Für das  $\kappa$ -Kasein wurden bisher 14 Varianten festgestellt, wobei 90% aller Rinder weltweit das Gen für die Variante A tragen und die restlichen Varianten (A<sup>1</sup>, B, B2, C, D, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J) nur selten nachgewiesen wurden (Farrell et al. 2004; Hewa Nadugala et al. 2022). In Bezug auf das  $\beta$ -Kasein sind bisher 17 Varianten mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen bekannt (Hewa Nadugala et al. 2022). Zu diesen zählen die Varianten A1, A2, A3, A4, B, B2, C, D, E, F, G, H1, H2, I, J, K, L, wobei für die Variante A4 noch keine zugehörige Nukleotid-Mutation nachgewiesen werden konnte (Cieslinska et al. 2022; Kuznetsov et al. 2022). Die Variante A4 wurde lediglich aufgrund ihres Migrationsverhaltens in der Gelelektrophorese in koreanischen Rindern entdeckt und ist noch nicht weiter charakterisiert worden (Li et al. 2022; Chung et al. 1995). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass in ursprünglicheren Rinderrassen, wie dem Zebu oder dem indischen Rathi, nur die A2-Variante vorkommt (Ayaz et al. 2023; Mrinalini Saran 2023; Mukesh et al. 2022). Daher wird angenommen, dass die A2- $\beta$ -Kasein-Variante die „Ur-Variante“ ist, aus der die anderen  $\beta$ -Kasein-Varianten hervorgingen (Ramakrishnan et al. 2023; Mukesh et al. 2022). Die Mutation des  $\beta$ -Kasein-Gens soll zum Zeitpunkt der Domestikation vor 5.000 bis 10.000 Jahren in Europa stattgefunden haben (Martin et al. 1994; Ahmet Fatih 2018). Aus den domestizierten Rindern gingen unsere heutigen modernen Rinderrassen wie das Holstein-Friesian-Rind hervor, welche auch das A1- $\beta$ -Kasein-Allel tragen (Martin et al. 1994; Ahmet Fatih 2018). Die A2-Variante trägt die Aminosäure Prolin an der Position 67, wohingegen sich die A1-Variante durch einen Aminosäureaustausch des Prolins durch Histidin an Position 67 der Aminosäuresequenz auszeichnet (Dumas et al. 1972). Der Aminosäureaustausch der A1-Variante wird vermittelt durch eine Basenmutation im Nukleotid von Cytosin im Basentriplett CCT (kodierend für Prolin) zu Adenosin im Basentriplett CAT (kodierend für Histidin) (Kumar et al. 2020). Die  $\beta$ -

Kasein-Varianten B, C, F und G weisen ebenfalls die Mutation an Position 67 von Prolin zu Histidin auf und sind jeweils noch durch mindestens einen weiteren Aminosäureaustausch gekennzeichnet (Sebastiani et al. 2020). Aufgrund der Mutation an Position 67 werden diese Varianten der A1-Gruppe zugeordnet, wobei die Varianten mit Prolin an der Position 67 der A2-Gruppe zugeordnet werden (Ul-Haq et al. 2014). In den europäischen Milchrindern spielen überwiegend nur die Varianten A1 und A2 eine Rolle, wobei die Varianten B und I nur selten und die restlichen Varianten nur in exotischen Rassen nachgewiesen wurden (Massella et al. 2017). Dementsprechend sind unsere NutZRinder in der Regel entweder homozygote oder heterozygote Träger der Allele, wobei die A2/A2-Rinder mit 37%, A1/A2-Rinder mit 36%, A1/A1-Rinder mit 10%, A2/B-Rinder mit 8%, A2/I-Rinder mit 4%, A1/B-Rinder mit 3% und A1/I-Rinder mit 2% die Allel-Variationen der in Europa dominierenden Milchviehrasse, dem Holstein-Friesian, abbilden (Sebastiani et al. 2020). Die Allel-Verteilung des  $\beta$ -Kaseins in den NutZRindern variiert jedoch zwischen den untersuchten Herden. So wurde in pakistanischen Rindern ein homozygoter Anteil von A1-Rindern mit 50% der Holstein-Friesian und mit 68% der Jersey-Kühe beschrieben (Ayaz et al. 2023). Die homozygoten Rinder geben ausschließlich Milch mit dem entsprechenden  $\beta$ -Kasein-Typ, wobei die heterozygoten Rinder beide  $\beta$ -Kaseine in die Milch abgeben (Ali et al. 2019). Die  $\beta$ -Kaseine von Menschen, Büffeln, Schweinen, Pferden und Eseln weisen ebenfalls die Aminosäure Prolin an Position 67 auf, weshalb sie dem A2-Typ zugeordnet werden (Caroli et al. 2016).

### **2.1.3 Verdauung des $\beta$ -Kaseins und Entstehung von $\beta$ -Casomorphin-7**

Nach oraler Aufnahme von Kuhmilch beginnt beim Monogastrier die Verdauung der Proteine, unter anderem der Kaseine, bereits im Magen (Horstman et al. 2023). Nach dem Abschlucken gelangt die Milch in den Magen, welcher im nüchternen Zustand einen pH-Wert von 1-3 beim erwachsenen Menschen und dem Schwein aufweist (Guo et al. 2020; Koziolok et al. 2015; Henze et al. 2019). Im Magen wird Pepsinogen freigesetzt, welches erst durch den sauren pH-Wert zu Pepsin aktiviert wird und Kaseine bereits im Magen zu Polypeptiden hydrolysiert (Horstman et al. 2023). Aufgrund der hohen Pufferkapazität von Milch, lag in einer Verzehrstudie beim Menschen der Magen-pH kurz nach dem Konsum von Milch bei etwa 6 (Gao et al. 2002). Das Optimum der Pepsinaktivität liegt bei einem pH-Wert von 3, es konnte jedoch auch bei einem pH-Wert von 6 eine Hydrolyseaktivität des porcinen Pepsins *in*



*vitro* nachgewiesen werden (Salelles et al. 2021). Für die Resorption im Dünndarm müssen die hydrolysierten Milchproteine enzymatisch weiter zu kleineren Peptiden und Aminosäuren gespalten werden (Horstman et al. 2023). Im humanen und porcinen Duodenum werden Galle und Proenzyme aus dem Pankreas, sowie Bikarbonat zum gastrischen Chymus hinzugefügt, um einen nahezu neutralen pH-Wert zu erreichen (Loveday 2023). Die Proenzyme (Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Proelastase und Procarboxypeptidase) werden durch mukosale Enterokinasen aktiviert, um die Protein- oder Kaseinhydrolysate aus dem Magen weiter in Aminosäuren, Dipeptide und Tripeptide zu spalten (Kiela et al. 2016). Es wird angenommen, dass es aufgrund der Mutation in der Aminosäuresequenz des A1- $\beta$ -Kaseins an Position 67 während der Verdauung der A1-Variante im Menschen, verglichen zur A2-Variante, vermehrt zur enzymatischen Spaltung zwischen der Position 66 und 67 der Aminosäuresequenz des A1- $\beta$ -Kaseins kommt (Cieślińska et al. 2007). Dadurch wird ein Peptid mit sieben Aminosäuren freigesetzt, welches  $\beta$ -Casomorphin-7 (BCM-7) genannt wird (Brantl et al. 1979). Die Aminosäuresequenz des BCM-7 lautet: Tyr - Pro - Phe - Pro - Gly - Pro - Ile (Henschen et al. 1979). In einer simulierten *in-vitro*-Verdauung wurde nachgewiesen, dass BCM-7 aus dem  $\beta$ -Kasein in drei Schritten von Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Leucinaminopeptidase (LAP) gespalten wird (Ul Haq et al. 2015) (siehe Abbildung 1).



Eine *in-vitro*-Verdauungsstudie, die die Verdauung beim Menschen mit einer Magenphase und einer Darmphase simulierte, zeigte jedoch, dass die mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) detektierten BCM-7-Konzentrationen nur bei 8,7 µg/ml in verdauter A1-Milch und bei 5,8 µg/ml in verdauter A2-Milch lagen (Lambers et al. 2021). Eine andere *in-vitro*-Verdauungsstudie mit simulierten Magen- und Darmphasen detektierte eine BCM-7-Konzentration von 12 µg/ml in A1-Milch und 9 µg/ml in A2-Milch durch die LC/MS (Cattaneo et al. 2023). Die höchsten jemals mit LC/MS gemessenen BCM-7-Konzentrationen nach einer *in-vitro*-Verdauung mit simulierten Magen- und Darmphasen von A1- und A2-Milch lagen bei 59 µg/ml in der verdauten A1-Milch und 35 µg/ml in der verdauten A2-Milch (Buatig et al. 2023). Eine weitere *in-vitro*-Verdauungsstudie mit simulierten Magen- und Darmphasen detektierte mittels LC/MS BCM-7-Konzentration von 18,6 µg/ml aus A1-Milch und nur 0,1 µg/ml BCM-7 aus A2-Milch (Asledottir et al. 2018). Die selbige Arbeitsgruppe verdaute auch nach demselben Schema keine Milch im Ganzen, sondern aufgereinigtes A1- oder A2-β-Kasein mit humanen Magen- und Darmsekreten *in vitro* und detektierte mittels LC/MS, umgerechnet auf einen Milliliter Milch, 40 µg/ml BCM-7 aus A1-Milch und 14 µg/ml BCM-7 aus A2-Milch (Asledottir et al. 2017). Dies war, unseres Wissens nach, die höchste Konzentration von BCM-7 aus aufgereinigtem A1-β-Kasein, die nach einer *in-vitro*-Verdauung gemessen wurde. Eine weitere Arbeitsgruppe verdaute A1- und A2-Milch nicht mittels simulierten Magen- und Darmphasen und den entsprechenden pankreatischen Enzymen, sondern nur mit Pepsin bei pH 1,8, Trypsin bei pH 8 und Elastase bei pH 9 (Cieslinska et al. 2012). Die BCM-7-Konzentrationen wurden durch einen ELISA bestimmt und lagen in der verdauten A1-Milch bei 0,6 µg/ml und in der verdauten A2-Milch bei 0,1 µg/ml (Cieslinska et al. 2012). Diese Verdauungsstudien zeigten, dass BCM-7 nicht nur während der Verdauung aus A1-Milch, sondern auch aus A2-Milch entstehen kann (Lambers et al. 2021). Die gemessene BCM-7-Konzentration aus A1-Milch war jedoch immer höher als die aus A2-Milch (Cattaneo et al. 2023). In unverdauter A1- und auch A2-Milch wurde ebenfalls bereits BCM-7 durch einen ELISA detektiert, wenn auch nur in sehr geringen Konzentrationen von 1-2 ng/ml, wobei die Autoren keine Erklärung zum Entstehungsweg lieferten (Cieslinska et al. 2012). Die ermittelten BCM-7-Konzentrationen in den Studien weisen erhebliche Variationen auf, wobei unklar ist, wie es zu diesen großen Varianzen kommt. Es wurde postuliert, dass technische Unterschiede in den Verdauungsverfahren für die

beobachteten Varianzen verantwortlich sein könnten (Cattaneo et al. 2023). Beispielsweise wurde in Studien ausschließlich Pepsin, Trypsin und Elastase für die *in-vitro*-Verdauung verwendet, während in anderen Studien eine simulierte Verdauung mit einer Magenphase unter Einsatz von Pepsin und einer Darmphase mit Pankreatin durchgeführt wurde (Cieslinska et al. 2012; Ul Haq et al. 2015). Darüber hinaus variierten die Studien hinsichtlich der Inkubationszeiten. Eine Studie zeigte, dass die Dauer der simulierten Magen- und Darmphasen einen Einfluss darauf hat, wie viel BCM-7 gebildet wird, da Enzyme unterschiedlich lange aktiv sind und BCM-7 nach der Entstehung auch weiter abgebaut werden soll (Asledottir et al. 2017). Des Weiteren könnte die Verwendung von unterschiedlich verarbeiteten Ausgangsmilchen oder aufgereinigten Kaseinen zu unterschiedlichen BCM-7-Konzentrationen führen (Asledottir et al. 2017; Asledottir et al. 2018). Es wurde festgestellt, dass aus unbehandelter Milch mehr BCM-7 freigesetzt wird (8,3 µg/ml) als aus pasteurisierter Milch (5,1 µg/ml), was laut den Autoren an der Proteindenaturierung durch das Erhitzen und einer dadurch veränderten Verdauungskinetik der Milchproteine liegt (Lambers et al. 2021). Außerdem könnten die Unterschiede in den Messmethoden, wie eigens entwickelte ELISA oder LC/MS, zu Unterschieden bei den gemessenen BCM-7-Konzentrationen zwischen den Studien führen (Lambers et al. 2021).

#### **2.1.4 Resorption von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren**

Um die postulierten Wirkungen auf den menschlichen Körper auszuüben, muss BCM-7 als intaktes Peptid aus der Ingesta durch das Dünndarmepithel resorbiert werden (de Vasconcelos et al. 2023). Beim Säugetier und dem Menschen findet die Resorption von Aminosäuren und Peptiden vor allem durch die Mukosa des Duodenums, Jejunums und Ileums statt (Loveday 2023). Bei Ratten wurde *in vitro* nachgewiesen, dass neben der Resorption im Dünndarm auch ein geringer Anteil an Aminosäuren über Aminosäuretransporter im Kolon resorbiert werden können (Chen et al. 2020). Freie Aminosäuren werden grundsätzlich abhängig von ihrer Ladung durch Aminosäuretransporter, die als Uniport, Symport oder Antiport agieren, von der apikalen Bürstensaummembran von Enterozyten aus dem Darmlumen aufgenommen (Bröer et al. 2019). Di- und Tripeptide werden im Vertebraten von dem Peptidtransporter 1, einem Protonen-Ko-Transporter, von der apikalen Membran in das Zytoplasma der Enterozyten transportiert (Bröer et al. 2022; Wang et al. 2017). Die vorherrschenden Peptidasen im Zytoplasma der Enterozyten der Säugetiere und

des Menschen hydrolysieren die resorbierten Peptide, wodurch hauptsächlich Aminosäuren, jedoch auch ein geringer Anteil nicht hydrolysierter Peptide an der basolateralen Membran durch Transporter (abhängig von ihrer Ladung) ins Blut abgegeben werden (Bröer et al. 2022; Rohm et al. 2019). Doch nicht nur der Transport von Aminosäuren und kurzen Peptiden aus der Ingesta ins Blut wurde beschrieben (Amigo et al. 2020). Es wurde beispielsweise bei Ratten, aber auch bei Menschen, beschrieben, dass auch größere Peptide die Blut-Darm-Schranke durch para- oder transzellulären Transport überwinden können (Pappenheimer et al. 1994; Shimizu 1999; Shimizu et al. 2007; Amigo et al. 2020). Der parazelluläre Weg wird durch Tight Junctions zwischen den Epithelzellen begrenzt und ermöglicht es Molekülen mit einer Größe von bis zu 600 Dalton, abhängig von ihrer Ladung, zu passieren (Watson et al. 2001). Der transzelluläre Weg bietet auch größeren Peptiden und Proteinen die Möglichkeit, von den Enterozyten aufgenommen und teilweise basolateral abgegeben zu werden (Ballegaard et al. 2023). An Epithelzellen des menschlichen Dünndarms wurde *in vitro* gezeigt, dass Proteine durch Aktin-vermittelte Endozytose von den Epithelzellen resorbiert werden können (Blok et al. 1982). Beim Menschen und in Tiermodellen wurde neben Aktin auch eine Beteiligung von Immunglobulinen, MHCII, Clathrin, Mikrotubulinen, und SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors) am transzellulären Transport festgestellt (Garcia-Castillo et al. 2017). In den Endosomen werden die Proteine dann überwiegend durch Verschmelzung mit Lysosomen im Zytoplasma hydrolysiert (Cuervo et al. 1998). Am Jejunum des Kaninchens wurde ein transzellulärer Transport von Meerrettichperoxidase *in vitro* beschrieben, wobei bis zu drei Prozent des luminalen Proteins basolateral detektiert wurde (Heyman et al. 1982). Doch auch ein protektiver Transport ohne Hydrolyse des Proteins Insulin wurde an Enterozyten der Ratte *in vitro* beobachtet, was eine schnelle Anflutung von Insulin im Blut nach einer oralen Aufnahme erklärt (Ziv et al. 2000). Physiologischer Weise weist der Darm eine gesteigerte Permeabilität des Darmepithels bei Neugeborenen der Säugetiere und des Menschen auf, um Immunglobuline aus dem Kolostrum mit der Nahrung aufzunehmen (Weström et al. 2020). Dies ist vor allem für die Spezies mit einer Placenta epitheliochorialis wie dem Pferd, Wiederkäuer und Schwein wichtig, da kein effizienter Immunglobulinaustausch zwischen maternalem Blut und Fetus stattfinden kann (Schneider et al. 1938). Die Permeabilität des Darms kann aber auch beim erwachsenen Menschen durch Erkrankungen wie chronisch-entzündlichen

Darmerkrankungen oder dem erworbenen Immunschwächesyndrom (AIDS) gesteigert sein (Horowitz et al. 2023). Eine solche erhöhte Permeabilität des Darms wird auch als Leaky-Gut-Syndrom bezeichnet und beschreibt einen multifaktoriell bedingten, erhöhten Permeabilitätszustand der Darmmukosa, wodurch auch größere Peptide und Proteine vermehrt resorbiert werden können (Aleman et al. 2023). Das Leaky-Gut-Syndrom wird auch als eine Möglichkeit diskutiert, die eine Aufnahme von BCM-7 ins Blut fördern soll (Cieslinska et al. 2022). Ob das Leaky-Gut-Syndrome zu erhöhten BCM-7-Konzentrationen im Plasma führen kann, wurde jedoch nach unserem Kenntnisstand noch nicht untersucht (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024).

### 2.1.5 Studien zur Resorption von BCM-7

Ein potenzieller Transport von BCM-7 durch Epithelzellen wurde an einem *in-vitro*-Modell an einer immortalisierten, kolorektalen Adenokarzinomzelllinie (CaCo-2) überprüft (Iwan et al. 2008). BCM-7 wurde durch einen intakten CaCo-2-Zellmonolayer nur zu 0,6% transportiert (Iwan et al. 2008). Signifikant höhere Mengen von BCM-7 (30%) konnten basolateral detektiert werden, wenn die Hydrolase Dipeptidylpeptidase-IV (DDPIV) durch den spezifischen Hemmer Diprotin A in den CaCo-2-Zellen blockiert wurde (Iwan et al. 2008). Die Autoren bestätigten damit einen enzymatischen Abbau von BCM-7 durch DPPIV in den CaCo-2-Zellen und spekulierten über einen passiven Transport des hydrophoben BCM-7 durch die Enterozyten sowie über die mögliche Beteiligung eines Transporters am Mechanismus (Iwan et al. 2008). In einer weiteren *in-vitro*-Studie wurde der geringgradige Transport von BCM-7 durch einen intakten CaCo-2-Zellmonolayer bestätigt (Osborne et al. 2014). Die eingesetzten BCM-7-Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  und 2000  $\mu\text{M}$  sanken apikal des Zellmonolayers nach 30 Minuten signifikant ab und auf der basolateralen Seite, also nach dem Transport, konnte bei einer apikal eingesetzten Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  kein BCM-7 nachgewiesen werden (Osborne et al. 2014). Erst bei einer apikalen Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  wurde BCM-7 basolateral in einer Konzentration von unter 0,5  $\mu\text{M}$  detektiert (Osborne et al. 2014). Die Autoren schlussfolgerten, dass BCM-7 bis zu einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  nach der Resorption in den Enterozyten vollständig durch Hydrolasen abgebaut wird, bevor es basolateral freigesetzt werden kann (Osborne et al. 2014). Der Abbau von BCM-7 durch Enterozyten wurde außerdem in einer porcinen *in-vitro*-Bürstensaummembran-Verdauung nachvollzogen (Asledottir et al. 2019). Nach vier Stunden *in-vitro*-

Verdauung wurden nur noch 21% des ursprünglich eingesetzten BCM-7 nachgewiesen, was einen effektiven Abbau von BCM-7 bewies (Asledottir et al. 2019). Eine potenzielle Resorption von BCM-7 nach dem Konsum von A1- und A2-Milch wurde ebenfalls *in vivo* untersucht. Dazu wurden die BCM-7-Konzentrationen im Serum von Schweinen nach einer sechs-wöchigen Fütterung mit A1- oder A2-Milch ermittelt (Kaminski et al. 2012). Im ELISA wurde bereits zu Beginn der Studie (vor der A1- oder A2-Milch-Fütterung) eine basale BCM-7-Konzentration von 0,1 ng/ml festgestellt (Kaminski et al. 2012). Die A1- oder A2-Milch-Fütterung zeigte keinen Einfluss auf diese basalen BCM-7-Konzentrationen im Serum (Kaminski et al. 2012). Die Herkunft der basalen BCM-7-Konzentrationen sowie die Futterzusammensetzung zu Beginn der Studie und die Eigenschaften des verwendeten ELISA wurden nicht erläutert (Kaminski et al. 2012). Die Autoren nahmen an, dass BCM-7 nur in geringem Maße aufgenommen und dann effektiv durch DPPIV hydrolysiert wurde (Kaminski et al. 2012). Beim Menschen wurde im Blut von gesunden Erwachsenen bisher kein BCM-7 nachgewiesen, jedoch wurde BCM-7 im Plasma von Kindern und Säuglingen detektiert (Jarmolowska et al. 2019; Sokolov et al. 2014; Kost et al. 2009). Nach der Fütterung von Säuglingen mit einer Rinderkasein-haltigen Säuglingsnahrung wurde ein Anstieg der BCM-7-Konzentration im Blut von 55 pg/ml auf 119 pg/ml mittels eines Radioimmunoassays ermittelt (Kost et al. 2009). Die basalen BCM-7-Konzentrationen der Säuglinge erklärten die Autoren mit einer Aufnahme von BCM-7 durch die verminderte Blut-Darm-Schranke in den ersten Lebensmonaten und einer Störung im Abbau des BCM-7 (Kost et al. 2009). Die Ernährung der Kinder vor der Studie wurde nicht erläutert (Kost et al. 2009). Die gleiche Arbeitsgruppe verglich später den BCM-7-Gehalt des Urins von gesunden Kindern mit dem von autistischen Kindern (Sokolov et al. 2014). Beide Gruppen erhielten eine standardisierte Diät, die Kuhmilchprodukte, unbeachtet der A1- und A2- $\beta$ -Kasein-Variante, enthielt (Sokolov et al. 2014). Mithilfe eines ELISA wurde im Urin der gesunden Kinder eine BCM-7-Konzentration von 58 pg/ml und bei den autistischen Kindern eine signifikant höhere BCM-7-Konzentration von 90 pg/ml nachgewiesen (Sokolov et al. 2014). Die Autoren schlossen auf einen verminderten Abbau im Blut und in Darmzellen von BCM-7 durch eine reduzierte Proteaseaktivität der autistischen Kinder (Sokolov et al. 2014). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine weitere Studie, bei der die BCM-7-Konzentration im Blut von autistischen Kindern im Alter von drei bis zehn Jahren mit der von gesunden Kindern verglichen wurde (Jarmolowska et al. 2019). Im Blut der gesunden Kinder wurde mit einem ELISA

26 ng/ml BCM-7 und im Blut der autistischen Kinder eine signifikant höhere Konzentration von 43 ng/ml BCM-7 nachgewiesen (Jarmolowska et al. 2019). In dieser Studie wurde jedoch keine Information zur Ernährung gegeben (Jarmolowska et al. 2019). Fraglich ist auch die Genauigkeit der hier verwendeten Messsysteme und die Aussagekraft der ermittelten BCM-7-Konzentrationen, da zwischen den genannten Studien in gesunden Kindern eine 1000-fache Differenz in der BCM-7-Konzentration im Blut gemessen wurde (Jarmolowska et al. 2019; Sokolov et al. 2014). Unseres Wissens nach wurde keine Studie am gesunden Erwachsenen oder am Schwein durchgeführt, in der auf einen unterschiedlichen BCM-7-Gehalt im Blut nach dem Konsum von entweder A1- oder A2-Milch untersucht wurde.

## **2.2 Das enterische Nervensystem**

### **2.2.1 Aufbau und Funktion**

Der gesamte Magen-Darm-Trakt der Bilateria (bilateralsymmetrisch gebaute dreikeimblättrige Gewebetiere) wird von intrinsischen neuronalen Schaltkreisen durchzogen, welche in der Gesamtheit das Enterische Nervensystem (ENS) bilden (Mueller et al. 2022; Furness et al. 2018). Das ENS ist in der Lage, reflexartig die Motilität des Darms, den Austausch von Flüssigkeiten über die Schleimhaut, den Blutfluss und die Sekretion von Darmhormonen zu kontrollieren (Sasselli et al. 2012). Dies geschieht ohne jeglichen Eingriff des Zentralen Nervensystems (ZNS), was das ENS von den anderen Komponenten des Autonomen Nervensystems (ANS), dem Sympathikus und dem Parasympathikus, unterscheidet (Furness 2009). Die Neurone des ENS bilden eine integrierte Schaltung, die, aufgrund der Ähnlichkeit zu der des ZNS, auch als „zweites Hirn“ oder „little brain of the gut“ bezeichnet wird (Annahazi et al. 2020; Avetisyan et al. 2015). Es wurde sogar auch als „the first brain“ bezeichnet, um auf die evolutionär primäre Entwicklung des ENS verglichen zum ZNS aufmerksam zu machen (Furness et al. 2018). Neben allen Bilateria (bilateralsymmetrisch gebaute dreikeimblättrige Gewebetiere) bilden sogar Nesseltiere ein ENS aus, wobei ihnen ein ZNS gänzlich fehlt (Furness et al. 2018). Das ENS setzt sich aus einem Netzwerk von Neuronen und Gliazellen zusammen, die in zwei Hauptplexusgruppen, dem myenterischen (Auerbach) Plexus zwischen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur der Tunica muscularis und dem submukösen (Meissner) Plexus in der Tela submucosa angeordnet sind (Sasselli et al. 2012). Dieser Grundaufbau ist im



gesamten Magen-Darm-Trakt und über Tierarten hinweg identisch, zeigt jedoch je nach Lokalisation im Magen-Darm-Trakt Unterschiede in Größe und Verteilungsmuster der Ganglien (Furness et al. 1987). Bei größeren Tieren, wie dem Schwein und dem Menschen, wurden, verglichen zum Nager, größere Neurone und eine größere Anzahl von Neuronen gefunden, wobei alle Hauptneurotransmitter-Untergruppen von Neuronen in allen bisher untersuchten monogastrischen Arten gefunden wurden (Sharkey et al. 2023). Bei kongenitalem Morbus Hirschsprung, einer Fehlbildung des ENS des Menschen, werden Teile des Darms während der embryonalen Entwicklung unzureichend von Zellen der Neuralleiste besiedelt, was wiederum zu einer unvollständigen oder ausbleibenden Entwicklung des ENS und damit zu einer unzureichenden Kontraktionsfähigkeit des Darms führt (Mueller et al. 2022). Die assoziierten Symptome äußern sich kurz nach der Geburt und ähneln einer neonatalen distalen Darmobstruktion (Das et al. 2017). Die Behandlung einer Aganglionose beim Menschen sieht eine chirurgische Resektion des betroffenen Darmsegments vor (Das et al. 2017). Aganglionosen wurden auch bei Overo-Pferden beobachtet und als Lethal-White-Foal-Syndrom beschrieben (Vonderfecht et al. 1983). Das Lethal-White-Foal-Syndrom wird durch eine Dinukleotidmutation im Endothelin-B-Rezeptor-Gen verursacht und manifestiert sich erst bei Homozygotie des Fohlens für dieses Gen (Yan et al. 1998). Klinisch zeigt sich die Symptomatik einer intestinalen Obstruktion bei fehlendem Absatz des Mekoniums und führt in den ersten Tagen nach der Geburt zum Tode des Fohlens (Finno et al. 2009; McCabe et al. 1990). Neben dem Menschen und dem Pferd wurde eine Aganglionose im Magen-Darm-Trakt auch bei Kalb, Schwein, Hund, Katze, Ratte und Maus beschrieben und äußert sich auch bei diesen Tierarten durch das Fehlen einer lebenswichtigen Darmmotilität in einem Abschnitt des Magen-Darm-Traktes (Forzán et al. 2005; Bates 2002; Yan et al. 1998).

### **2.2.2 Entstehung der Kontraktionen der Muskulatur des Darms**

Die glatten Muskelzellen im Magen-Darm-Trakt der Säugetiere und des Menschen sind in Gruppen angeordnet und durch Gap-Junctions verbunden (Furness et al. 2018). Diese Struktur ermöglicht einen synchronisierten elektrischen Signalfloss zwischen den Zellen, wodurch sie sich koordiniert zusammenziehen können, um eine funktionelle Aktivität zu gewährleisten (Furness et al. 2018). Zwischen den glatten Muskelzellen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur liegen Interstitielle Zellen nach Cajal (ICC). Die ICC lassen sich bei den Säugetieren und beim Menschen aufgrund

ihrer Lokalisation in die ICC des myenterischen Plexus (ICC-MP), ICC des submukösen Plexus (ICC-SMP), intramuskuläre ICC (ICC-IM) und die subserosalen ICC (ICC-SS) unterteilen (Huizinga et al. 2021). Die ICC dienen im Magen-Darm-Trakt als basale Schrittmacher und erzeugen regelmäßige Schwankungen des Membranpotenzials, die sogenannten Slow Waves (Rumessen et al. 1996; Van Helden et al. 2010). In Anoctamin-1 (Ano1)-knock-out-Mäusen wurde festgestellt, dass Slow Waves durch eine rhythmische Schwankung der intrazellulären Kalziumkonzentration entstehen, die durch spezialisierte Kalziumkanäle und Kalzium-aktivierte Chloridkanäle, wie den Ano1-Kanal, vermittelt werden (Singh et al. 2014). *In vitro* wurde am Dünndarm der Maus gezeigt, dass die Slow Waves der ICC das Membranpotenzial der benachbarten glatten Muskelzellen verändern und möglicherweise zu einem Aktionspotential und einer resultierenden Muskelkontraktion führen, falls ein Schwellenwert (Spike-Potenzial) erreicht wird (Rumessen et al. 1996). Die Amplitude, und in gewissem Maße auch die Frequenz der Slow Waves, kann durch erregende und hemmende Neurone und Hormone modifiziert werden, was die Wahrscheinlichkeit von Aktionspotentialen erhöht oder verringert (McQuilken 2021; Xie et al. 2023). Eine größere Anzahl von Spike-Potenzialen in einem Höhepunkt einer Slow Wave führt im Allgemeinen zu einer stärkeren Kontraktion (McQuilken 2021). An Mäusen wurde gezeigt, dass die ICC als Relais zwischen terminalen Nervenendigungen und den glatten Muskelzellen fungieren, indem sie neuronale Informationen weiterleiten (Klein et al. 2013). Außerdem wurde in Mäusen gezeigt, dass nicht nur die ICC, sondern auch eine weitere interstitielle Zellart, die Platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$ -positiven Zellen (PDGFR $\alpha$ -Zellen), die Darmmotorik regulieren (Sanders et al. 2014). Die PDGFR $\alpha$ -Zellen der Maus sind sensitiv gegen Purine wie Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ( $\beta$ -NAD) als inhibitorische Neurotransmitter durch den P2Y1-Rezeptor und erzeugen eine Hyperpolarisation und dadurch eine Relaxation der glatten Muskelzellen (Kurahashi et al. 2011). Zusammen mit den ICC und den glatten Muskelzellen bilden sie im Säugetier und im Menschen eine Vernetzung durch Gap-Junctions und einen funktionellen Zellverband, der als SIP-Synzytium (S = „smooth muscle cells“, I = interstitielle Zellen nach Cajal, P = PDGFR $\alpha$ -Zellen) bezeichnet wird (Lin et al. 2019).

### 2.2.3 Intrinsisch-vermittelte Kontraktionen

Ob es zu einer Kontraktion der Muskulatur des Magen-Darm-Traktes kommt, wird durch Neurone des ENS vermittelt (Allescher 2020). Die enterischen Neurone werden funktionell in die intrinsischen sensorischen Neurone, Interneurone und Motoneurone unterteilt (Breuer 2021). Am Kolon des Meerschweinchens wurde gezeigt, dass die intrinsischen sensorischen Neurone mit ihren Zellkörpern im myenterischen oder submukösen Plexus liegen, wobei die Axone mancher intrinsischen sensorischen Neurone bis in das Epithel reichen und dort durch die Ingesta vermittelte chemische Reize aufnehmen (Neunlist et al. 1999). Außerdem wurde am Meerschweinchen, der Maus und der Ratte gezeigt, dass physikalische Dehnungsreize von den intrinsischen sensorischen Neuronen, aber auch von mechano-sensitiven Inter- und Motoneuronen des ENS detektiert und exzitatorisch weitergeleitet werden (Mazzuoli-Weber et al. 2015; Furness 2000). Der peristaltische Reflex, der nach den Entdeckern auch als Lüderitz–Bayliss–Starling-Effekt bezeichnet wird, beschreibt die kontraktile Antwort des Darms des Säugetiers und des Menschen auf Dehnungsreize, die durch die intrinsischen sensorischen Neurone und mechano-sensitiven Inter- und Motoneuronen vermittelt werden (Schemann et al. 2021). Untersuchungen am Meerschweinchen zeigten, dass Interneurone die Signale der intrinsischen sensorischen Neurone und mechano-sensitiven Inter- und Motoneuronen erhalten und für eine orale und aborale Signalvermittlung zuständig sind (Fung et al. 2020; Bornstein et al. 2004). Die aufsteigenden Interneurone leiteten beim Meerschweinchen die Signale oral an erregende Motoneurone weiter und die absteigenden Interneurone leiteten Signale aboral an hemmende Motoneurone weiter, sodass aboral gerichtete Kontraktionswellen entstehen (Fung et al. 2020; Bornstein et al. 2004). Im ENS des Meerschweinchens und des Menschen ist Acetylcholin (ACh) der Haupttransmitter der Interneurone neben den Ko-Transmittern 5-Hydroxytryptamin, ATP, Tachykinin, Stickstoffmonoxid und Somatostatin (Furness 2000). Die Motilität des Magen-Darm-Trakts des Meerschweinchens und des Menschen wird hauptsächlich durch nicht-adrenerge, nicht-cholinerge inhibitorische Motoneuronen des Plexus myentericus moduliert, welche die Neurotransmitter  $\alpha$ -Purin, ATP, Stickstoffmonoxid und Kohlenmonoxid ausschütten (Zhao et al. 2024). Diese Neurotransmitter stimulieren Zyklen von Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Muskulatur und gewährleisten so die normale Funktion der Bewegung der glatten Muskulatur im Magen-Darm-Trakt (Gallego et al. 2006). Am Jejunum der Katze wurde *in vitro* gezeigt, dass der Darm im

Ruhezustand unter einer neural-vermittelten Hemmung durch Stickstoffmonoxid oder dem vasoaktiven intestinalen Peptid steht (Wood 1972). Die Aufhebung dieser Hemmung ist durch die Hemmung der inhibitorischen Motoneurone oder durch Erregung erregender Motoneurone möglich (Wood 1972). Erregende Motoneurone vermitteln eine Kontraktion der glatten Muskulatur in Mäusen über die Neurotransmitter ACh und Tachykinine und Substanz P (Delvalle et al. 2018).

#### **2.2.4 Extrinsisch-vermittelte Kontraktionen**

Neben der autonomen Regulation durch das ENS wird die Motorik des Magen-Darm-Traktes auch über sympathische oder parasympathische Neurone vermittelt (Jänig 2022). Die sympathische Innervation des Magen-Darm-Trakts stammt beim Menschen von den Rückenmarkssegmenten zwischen dem fünften Brustwirbel bis zum zweiten Lendenwirbel, wobei die meisten Fasern durch das sympathische Nervengeflecht verlaufen, bevor sie in einem Ganglion wie dem Ganglion celiacum oder einem Ganglion mesentericum synaptieren (McQuilken 2021). Diese postganglionären Fasern verwenden beim Meerschweinchen und Menschen Noradrenalin als primären Neurotransmitter (McQuilken 2021). Am Dünndarm des Kaninchens und der Katze wurde gezeigt, dass diese sympathischen Neurone dafür verantwortlich sind, eine Vasokonstriktion der Blutgefäße des Magen-Darm-Trakts zu verursachen und eine allgemeine Abnahme der gastrointestinalen Aktivität durch ihren hemmenden Effekt auf das ENS bewirken (Langley et al. 1905). Die parasympathische Innervation stammt größtenteils vom Vagusnerv, der beim Säuger vom Ösophagus bis zum proximalen Kolon innerviert und von den Nervi splanchnici pelvici, die vom proximalen Kolon bis zum Anus innervieren (Jänig 2022; Johnson et al. 2007). Die Neurone des ENS werden direkt von parasympathischen Neuronen innerviert, die ACh als primären Neurotransmitter nutzen (McQuilken 2021). Die parasympathische Aktivität ist beim Säugetier und beim Menschen im Allgemeinen erregend und verstärkt die Aktivität des Magen-Darm-Trakts (Jacobj 1891; Browning et al. 2014).

#### **2.2.5 Motilitätsmuster des Darms**

Die Muster zyklischer Motilität wurden im Magen-Darm-Trakt verschiedener Tiere als auch des Menschen beschrieben (Rees et al. 1982). Die Motilitätsmuster des Darms lassen sich beim Säugetier und dem Menschen in die Nüchternmotilität und die

postprandiale Motilität einteilen, wobei die Nüchternmotilität weiter in eine Phase der motorischen Ruhe (Phase I), eine Phase mit unkoordinierten Aktivitäten (Phase II) und eine Phase mit regelmäßigen, kräftigen und aboral gerichteten Kontraktionen (Phase III) unterteilt wird (Allescher 2020). Ein Kontraktionszyklus des Nüchternzustands besteht beim Hund und dem Menschen zu 90% aus der Phase I und der darauffolgenden Phase II, wobei die Phase I im Schlaf und die Phase II im Wachzustand überwiegt (Szurszewski 1969; Furukawa et al. 1994). Die von den ICC gebildeten Slow Waves, führen aufgrund fehlender Spike-Potenziale in der Phase I nicht zu einer Kontraktion (Rumessen et al. 1996). In der nachfolgenden Phase II können etwa die Hälfte aller Slow Waves ein Spike-Potenzial auslösen und damit eine Kontraktion induzieren, die hauptsächlich segmental und nicht voranschreitend verläuft (Allescher 2020). In der kurzen Phase III führen alle Slow Waves auch zu voranschreitenden Kontraktionen, welche überwiegend vom Magen ausgehend aboral gerichtet sind und zur Reinigung des Darms dienen (Davenport 1975). Die Frequenzen der Phase III-Kontraktionen liegen beim Menschen für den Magen bei drei pro Minute, für den proximalen Dünndarm bei zwölf pro Minute, für den distalen Dünndarm bei neun pro Minute und dem Kolon bei fünf pro Minute (Rees et al. 1982). Beim Hund und beim Schwein wurden im Dünndarm *in vitro* ebenfalls Kontraktionsfrequenzen von 12-13 pro Minute gemessen (Nagahawatte et al. 2021; Bogach 1959). Eine Nahrungsaufnahme führt beim Menschen unmittelbar zu einer extrinsischen, parasymphatisch vermittelten Umstellung der Nüchternmotilität zur postprandialen Motilität, welche aus stationären Kontraktionen zur Durchmischung und kurzen propulsiven Kontraktionen zum Fortleiten der Ingesta besteht (Stotzer et al. 1996).

## 2.3 Opioidrezeptoren

### 2.3.1 Einteilung, Aufbau und Funktion

Die ersten Versuche mit aufgereinigtem BCM-7 befassten sich mit der Wirkung am Darm des Meerschweinchens und am Vas deferens der Maus (Brantl et al. 1981; Brantl et al. 1979). In einem Opioidrezeptor-Bindungsversuch verdrängte BCM-7 *in vitro* den Opioidantagonisten Naloxon von den Opioidrezeptoren des Rattenhirns, wodurch eine Bindung an Opioidrezeptoren gefolgert wurde (Brantl et al. 1981). Die klassischen Opioidrezeptoren des Säugetiers und des Menschen lassen sich in den  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptor (MOR, DOR und KOR) unterteilen (McDonald et al. 2013).

Die Opioidrezeptoren MOR, DOR und KOR werden jeweils durch die Gene OPRM1, OPRD1 und OPRK1 codiert (Fernandez Robles et al. 2012). Ihre Bezeichnung erhielten die Opioidrezeptoren anhand ihrer Affinität zu den Liganden Morphin ( $\mu$ -Opioidrezeptor), Ketocyclazocine ( $\kappa$ -Opioidrezeptor) oder ihrer anatomischen Lokalisation, am Vas deferens der Maus ( $\delta$ -Opioidrezeptor) (Lord et al. 1977; Martin et al. 1976; Gilbert et al. 1976). Neben den klassischen Opioidrezeptoren wurde noch ein weiterer Rezeptor, der Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) Peptidrezeptor aufgrund seines homologen Aufbaus und Wirkmechanismus zu der Gruppe der Opioidrezeptoren hinzugefügt, obwohl die pharmakologischen Eigenschaften von denen der klassischen Opioidrezeptoren abweichen (Butour et al. 1997; Thompson et al. 2012). Die Opioidrezeptoren bestehen aus jeweils sieben transmembranösen Proteinen mit einem extrazellulären, glykosylierten N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus (Al-Hasani et al. 2011). Die sieben transmembranösen Domänen sind durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen verbunden (Sobczak et al. 2014). Für eine Ligandenbindung am DOR sind die transmembranösen Domänen fünf bis sieben verantwortlich, wobei für die Bindung am KOR die transmembranöse Domäne vier und die zweite extrazelluläre Schleife verantwortlich sind (Befort et al. 1996). Die Bindestelle am MOR wird nur durch die erste extrazelluläre Schleife gebildet (Surratt et al. 1994). Die erste und zweite intrazelluläre Schleife, die transmembranöse Domäne fünf und der C-Terminus sind für die Signalübertragung verantwortlich (Chan et al. 2003). Opioidrezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, da sie intrazellulär an heterotrimere  $G_{i/o}$ -Proteine koppeln (Sobczak et al. 2014). Die klassische Wirkung eines Opioidrezeptors läuft nicht direkt ab, sondern indirekt über die Pertussis-toxin-sensitiven, inhibitorischen G-Proteine, die aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehen (McDonald et al. 2013). Die Bindung eines Opioidagonisten an einen Opioidrezeptor bewirkt, dass die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins ihr gebundenes Guanosindiphosphat (GDP) gegen intrazelluläres Guanosintriphosphat (GTP) austauscht (James et al. 2020). Dies führt zu einer Dissoziation des  $\alpha$ -GTP-Komplex vom  $\beta\gamma$ -Komplex und einer folgenden Interaktion mit Kir3, einem einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal und der Hemmung der Adenylatcyclase, wodurch weniger ATP zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) umgesetzt wird (Sobczak et al. 2014). Aufgrund der Verringerung des cAMP-Spiegels, wird in Nervenzellen die Neurotransmitter-Freigabe reduziert (James et al. 2020). Darüber hinaus interagiert der  $\beta\gamma$ -Komplex mit einer Reihe von Ionenkanälen,

wodurch die Kaliumleitfähigkeit erhöht und die Kalziumleitfähigkeit verringert wird (James et al. 2020). Durch die Aktivierungsvermittlung des  $\alpha$ -GTP-Komplex, wird GTP zu GDP hydrolysiert und der  $\alpha$ -GDP-Komplex verliert seine Aktivität, wodurch er wieder an den  $\beta\gamma$ -Komplex binden kann und zur erneuten Aktivierung bereit steht (Sobczak et al. 2014). Die Gesamtwirkung einer agonistischen Bindung an einen Opioidrezeptor, wie Morphin an den MOR, zeigt sich in einer Hyperpolarisation der betroffenen Zelle und, für neuronale Zellen, einer verringerten Freisetzung von Neurotransmittern (James et al. 2020). Unter physiologischen Bedingungen werden die Opioidrezeptoren durch endogene opioide Peptide wie Endomorphine, Enkephaline, Metorphamide, Dynorphine, Neoendorphine, N/OFQ und Nocistatin aktiviert, wobei die Bindungsaffinitäten innerhalb der Peptide und den Opioidrezeptoren variieren (Darcq et al. 2018; McDonald et al. 2013; Johnson et al. 2002). Neben den endogenen opioiden Peptiden existieren auch exogene, natürlich vorkommende Opioide, wie Morphin, Codeine, Thebaine oder Papaverine (Pathan et al. 2012). Es existieren auch eine Reihe synthetisierter Opioide, die sich in semi-synthetisierte Derivate der natürlichen Opioide wie Hydrocodon, Hydromorphon, Oxycodon, Buprenorphin oder synthetisierte Opioide wie Anililopiperidin (Fentanyl, Alfentanil, Sufentanil, Remifentanil), Diphenylpropylamin-Derivate (Propoxyphen, Dextropropoxyphen, Methadon, Diphenoxylat, Loperamid), Benzamide und andere (Pentazocin, Butorphanol, Nalbuphin, Levorphanol, Tramadol) unterteilen lassen (Abbate et al. 2022). Die Opioide können außerdem anhand ihrer Wirkung am Opioidrezeptor als Agonist, partieller Agonist oder Antagonist eingeteilt werden (James et al. 2020). In der Human- und Tiermedizin werden Opioide aufgrund ihres potenten analgetischen Effektes eingesetzt, wobei aufgrund der zentralen und peripheren Wirkung auch Nebenwirkungen auf den Magen-Darm-Trakt auftreten (Paul et al. 2021). Bei Mensch, Hund, Pferd und Schwein können Opioide zu einer verminderten Darmmotilität führen, was zu Verstopfungen und Koliken führen kann (Capik et al. 2016; Boscan et al. 2006; Farmer et al. 2018; Atmani et al. 2023).

### **2.3.2 Opioidrezeptoren im Körper**

Die höchste Dichte an Opioidrezeptoren des Menschen wurde im ZNS nachgewiesen (Peng et al. 2012). Doch auch in peripheren neuronalen und nicht-neuronalen Geweben wurden Opioidrezeptoren gefunden (James et al. 2020). So wurden Opioidrezeptoren unter anderem auch auf Immunzellen des Menschen, des Schweins,

der Maus und der Ratte nachgewiesen (Hansen et al. 2021; Cechova et al. 2018; Carr et al. 1988; Stetter 2021). Da wir die Opioidrezeptoren des Darms untersuchten, werden die Opioidrezeptoren des Magen-Darm-Trakts im Folgenden genauer beschrieben.

### **2.3.2.1 Opioidrezeptoren des Magen-Darm-Trakts**

#### **2.3.2.1.1 Vorkommen im Magen-Darm-Trakt**

Opioidrezeptoren konnten bei unterschiedlichen Spezies im Magen-Darm-Trakt, vor allem auf den Neuronen des ENS, sowie auf glatter Muskulatur und an den sympathischen und sensorischen peripheren Neuronen nachgewiesen werden, wobei die genaue Verteilung innerhalb der gastrointestinalen Schichten je nach Region und Tierart variierte (Mosinska et al. 2016). Der KOR konnte mittels Immunhistochemie vor allem im submukösen Plexus des Meerschweinchens und des Schweines gefunden werden (Sternini et al. 2004). Im Darm der Ratte wurde der KOR ebenfalls in den submukösen Neuronen, in den interstitiellen Zellen von Cajal, auf Muskelfasern und auf Blutgefäßen immunhistochemisch nachgewiesen (Bagnol et al. 1997). Im Darm vom Menschen wurde der KOR auf dem myenterischen Plexus des Dickdarms funktionell im Kontraktionsversuch an der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur nachgewiesen (Chamouard et al. 1993). Der DOR wurde ebenfalls in dem myenterischen und submukösen Plexus des ENS des Menschen, des Schweins und des Meerschweinchens immunhistochemisch oder mit PCR nachgewiesen (Sternini et al. 2004; Poonyachoti et al. 2002; Brown et al. 1998a). Im Schwein war der DOR außerdem auf den Peyer-Platten mittels PCR nachweisbar (Brown et al. 1998b). In Mäusen wurde eine Ko-Expression des MOR und des DOR mittels Immunhistochemie entlang nahezu der Hälfte aller myenterischen Neurone gefunden, wobei die Expression der Opioidrezeptoren auf den submukösen Neuronen nur selten nachgewiesen werden konnte (DiCello et al. 2020).

Der MOR wurde im Magen und Dünndarm auf myenterischen Neuronen des Meerschweinchens und des Menschen mittels Immunhistochemie nachgewiesen (Sternini et al. 2004). Beim Menschen exprimierten ebenso mononukleäre Zellen in der Lamina propria den MOR (Sternini et al. 2004). Im distalen Dünndarm des Schweins wurde der MOR mittels Radioligandenbindung nur auf basalen Zotten- und Kryptenzellen der Mukosa und nicht auf dem myenterischen oder submukösen Plexus nachgewiesen (Quito et al. 1991; Townsend et al. 2004). Im Ileum des Schweins



konnte der MOR mittels Immunhistochemie nicht detektiert werden (Poonyachoti et al. 2001a). Daten zur Verteilung des MOR auf Proteinebene im Dickdarm des Schweins sind unseres Wissens nach nicht publiziert worden (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Im Dickdarm des Meerschweinchens und des Menschen wurde der MOR auf den myenterischen Plexus und nur beim Menschen auch auf dem submukösen Plexus immunhistochemisch nachgewiesen (Sternini et al. 2004).

### **2.3.2.1.2 Wirkung auf die Kontraktionen des Magen-Darm-Traktes**

Opioidrezeptoren, die von Neuronen des myenterischen und submukösen Plexus exprimiert werden, tragen zur Aufrechterhaltung der Darmhomöostase bei und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Magen-Darm-Transits sowie dem mukosalen Transport von Flüssigkeiten und Elektrolyten (Sobczak et al. 2014). Im Allgemeinen führen Opioide durch die Wirkung an den Opioidrezeptoren des ENS zu einer Verringerung der propulsiven Kontraktionen, wodurch die Transitzeit der Ingesta signifikant verlängert wird (Camilleri et al. 1986; Holzer 2004). Bereits 1917 zeigte Trendelenburg, dass Morphin *in vitro* eine hemmende Wirkung auf die Kontraktionen des Meerschweinchendarms zeigte, wobei der Wirkmechanismus noch unerklärt blieb (Trendelenburg 1917). Heute ist bekannt, dass die Opioide über Opioidrezeptoren, sowohl beim Menschen als auch bei den untersuchten Tiermodellen wie Meerschweinchen, Hund, Ratte oder Maus an präsynaptischen Membranen der Neuronen wirken und die Neurotransmitterausschüttung von ACh an nicotinergen erregenden Neuronen hemmen, wodurch eine Reizweiterleitung reduziert wird (Cherubini et al. 1985; Jensen et al. 2018). Durch Bindung an den MOR und DOR bewirken die Opioide somit eine Hemmung der Freisetzung der Neurotransmitter ACh und Substanz P und wirken hemmend auf die tonisch-segmentalen Kontraktionen (De Luca et al. 1996; Barrett 2000). Die Wirkung der Opioide ist neben einer nerval-vermittelten Motilitätshemmung auch mit einer Erregung der Kontraktionen beschrieben, die durch eine präsynaptische Hemmung der inhibitorischen Neurone vermittelt wird (Allescher 2020). So wurde an *in-vitro*-Präparaten des Dün- und Dickdarms des Menschen, des Meerschweinchens und des Affen gezeigt, dass Morphin über den MOR hemmend auf inhibitorische neuromuskuläre Neurone wirkte, was zu einer Zunahme der Muskelspannung führte, zeitgleich aber auch zu einer Abnahme der propulsiven Motilität (Bauer et al. 1991; Yuan et al. 1995). Eine Aktivierung des KOR vermittelte *in vitro* am humanen Kolon eine Hemmung der

erregenden cholinergen und nicht-cholinergen, als auch der inhibitorischen Neurone (Chamouard et al. 1993). Ähnliches wurde am Dünndarm des Meerschweinchens in einer *in-vitro*-Organbadpräparation beobachtet, wobei Opioide wie Morphin die Glutamat-Sekretion steigerten und demnach erregend auf die Darmmuskulatur wirkten (Donnerer et al. 2009). Des Weiteren wurde *in vitro* am Ileum der Maus eine Hemmung der Freisetzung des Transmitters Stickstoffmonoxid durch Morphin beobachtet, was die hemmende Wirkung auf inhibitorische Neurone und die generell weitreichenden passiven Wirkmechanismen der Opioide über Opioidrezeptoren des ENS auf die Darmphysiologie unterstreicht (Iwata et al. 2007). An der Ratte wurde gezeigt, dass die Wirkung der Opioide auf den Magen-Darm-Trakt nicht nur durch Opioidrezeptoren des ENS, sondern auch von zentralen Opioidrezeptoren vermittelt wird (Herman et al. 2010). Die Aktivierung des MOR durch die Injektion des reinen MOR-Agonisten [D-AIA2-, N-MePhe4, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO) in den medialen Subnukleus des Tractus solitarius reduzierte den Magentonus der Ratte durch Unterdrückung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Aktivität (Herman et al. 2010). Die klinischen Reaktionen auf Opioide sind innerhalb der Tierarten und des Menschen grundsätzlich ähnlich, zeigen allerdings auch tierartige Unterschiede, da die Verteilung der Opioidrezeptoren im Magen-Darm-Trakt unterschiedlich ist (De Schepper et al. 2004; Trendelenburg 1917; Sternini et al. 2004). Zu der Wirkung von Opioiden auf die Motilität des Schweinedarms existieren nur wenige Studien. Eine direkte Wirkung von Opioiden auf die Kontraktionen des porcinen Jejunums ist bisher nicht publiziert worden (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Am Ileum des Schweins konnte *in vitro* eine Hemmung der elektrisch-induzierten Kontraktionen durch den KOR-Agonisten U-69,593 beobachtet werden, wobei die MOR-Agonisten Morphin, DAMGO und Loperamid nur eine geringe hemmende Wirkung zeigten (Poonyachoti et al. 2001b). Die DOR-Agonisten zeigten in der selben Studie keine Wirkung auf die elektrisch-induzierten Kontraktionen (Poonyachoti et al. 2001b). Des Weiteren wurde an einem Schweinemodell *in vivo* der Effekt von Loperamid auf die Motilität des Dickdarms mittels einer Manometrie-Druckmessung untersucht (Atmani et al. 2023). Dabei wurde eine verstärkte Motilität im proximalen Bereich des Dickdarms und eine reduzierte Motilität im distalen Kolon gemessen (Atmani et al. 2023).

## 2.4 BCM-7

### 2.4.1 BCM-7 als opioides Peptid

Die erste Entdeckung von  $\beta$ -Casomorphinen führt in das Jahr 1979. In ersten Versuchen wurde die Wirkung von Chloroform-Methanol Extrakten aus Milch *in vitro* auf die Muskulatur des Ileums des Meerschweinchens untersucht (Brantl et al. 1979). Das Extrakt wies eine hemmende Wirkung auf die elektrisch-induzierte Kontraktion des Ileums auf, die mit Naloxon aufgehoben werden konnte (Brantl et al. 1979). Die gleiche Arbeitsgruppe wies in einem Chloroform-Methanol-Extrakt aus Kasein das Heptapeptid BCM-7 erstmalig nach und schrieb die kontraktionshemmende opioide Wirkung dem BCM-7 zu (Henschen et al. 1979). Die ersten drei Aminosäuren des N-Terminus (Tyr-Pro-Phe) zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu endogenen Peptiden wie Enkephalinen, Endorphinen oder Dynorphinen, welche Tyr-Gly-Gly-Phe am N-Terminus tragen (Teschemacher 2003). Teschemacher klassifizierte BCM-7 aufgrund der Aminosäure Tyrosin am N-Terminus als atypisches opioides Peptid (Teschemacher 2003). BCM-7 zeigte eine hohe Resistenz gegen die enzymatische Spaltung durch bakterielle Pronasen, konnte aber durch Carboxypeptidase Y aus Hefen zuerst in ein weiteres kürzeres Pentapeptid (BCM-5) mit stärkerer Aktivität und dann in ein inaktives Tripeptid (BCM-3) gespalten werden (Henschen et al. 1980). Es wurde eine Bindung von BCM-4, -5, -6 und -7 an Opioidrezeptoren aus Präparaten der longitudinalen Dünndarmmuskulatur des Meerschweinchens und des Vas deferens der Maus und der Ratte nachgewiesen, wobei BCM-5 die höchste und BCM-7 die niedrigste Rezeptoraffinität aufwies (Brantl et al. 1981). Ebenso zeigten BCM-4, -5, -6 und -7 nach einer intrazerebroventrikulären Injektion in Ratten analgetische Effekte, wobei BCM-5 die stärkste Analgesie vermittelte (Brantl et al. 1981). In einer Radioligandenbindungsstudie am Gehirn der Ratte wurde die Affinität zu den Opioidrezeptorklassen untersucht, wobei die  $\beta$ -Casomorphine -5, -6, -7 und -8 die höchste Affinität zum MOR und nur schwache Affinitäten zum DOR und KOR zeigten (Koch et al. 1985).

### 2.4.2 BCM-7 aus A1-Milch und der Zusammenhang zu Krankheiten

Seit der ersten Entdeckung des BCM-7 als opioides Peptid wurden BCM-7 zahlreiche gesundheitsbeeinflussende Wirkungen zugeschrieben (de Vasconcelos et al. 2023).

Der Zusammenhang zu Diabetes mellitus Typ-1, atherosklerotischen Herzkrankheiten, Autismus, gastrointestinalen Beschwerden, Inflammation und Allergie wird seit Jahrzehnten diskutiert (Hegde 2019; de Vasconcelos et al. 2023). Diese Hypothesen konnten bisher nicht bewiesen werden (de Vasconcelos et al. 2023). Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit überprüfte 2009 die Studienlage zu A1-Milch und BCM-7 und kam zu dem Schluss, dass, aufgrund fehlender valider Daten, der Konsum von A1-Milch und die Aufnahme von BCM-7 nicht mit dem Auftreten der beschriebenen Krankheiten assoziiert werden kann (Authority 2009). Die A1-Variante des  $\beta$ -Kaseins und BCM-7 sind weiterhin Teil von Studien und werden mit den folgenden Krankheiten in Zusammenhang gebracht (Jeong et al. 2023).

#### **2.4.2.1 BCM-7 und der Zusammenhang zu Diabetes mellitus Typ 1**

Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) ist eine metabolische Erkrankung, die durch immunmedierte oder idiopathische Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas gekennzeichnet ist und zu chronischer Hyperglykämie führt (Groele et al. 2023). Schon bevor eine Debatte über den Zusammenhang zwischen den  $\beta$ -Kasein-Varianten und T1D aufkam, wurde in einer Fall-Kontroll-Studie an 346 diabetischen Kindern ein Zusammenhang zwischen einem frühen Kuhmilchkonsum im Säuglingsalter und dem Auftreten von T1D gefunden (Gimeno et al. 1997). Daraufhin wurde in retrospektiven Studien der epidemiologische Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichen Konsum von Kuhmilchprotein und dem Auftreten von Typ-1 Diabetes bei unter 14-Jährigen aus zehn verschiedenen Ländern untersucht (Elliott et al. 1999). Anhand genetischer Daten zur A1-Allel-Verteilung im Rinderbestand des jeweiligen Landes, wurde der Anteil des A1- $\beta$ -Kaseins in der pro Kopf konsumierten Milch geschätzt (Elliott et al. 1999). Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Konsum von Milchprotein und T1D gefunden, wobei ein höherer konsumierter Anteil der A1- $\beta$ -Kasein-Variante ebenfalls positiv mit dem Auftreten von T1D korreliert war (Elliott et al. 1999). Isländer zeigten in dieser Studie einen hohen Milchkonsum bei wenigen Fällen von T1D pro Einwohner im internationalen Vergleich (Elliott et al. 1999). Die fehlende Korrelation zwischen dem hohen Milchkonsum und T1D wurde mit dem geringen prozentualen, genetischen Anteil des A1- $\beta$ -Kasein-Allels in der isländischen Rinderpopulation begründet (Elliott et al. 1999). Zum selben Ergebnis kam eine retrospektive Studie, die keine positive Korrelation zwischen dem Milchkonsum von 165 gesunden isländischen Kindern und 55 an T1D erkrankten Kindern feststellte

(Thorsdottir et al. 2000). Die fehlende Korrelation zwischen T1D und dem vergleichsweise hohen Milchkonsum wurde ebenfalls mit dem geringen Anteil des A2- $\beta$ -Kasein-Allels in der isländischen Rinderpopulation begründet (Thorsdottir et al. 2000). Es wurde eine immunsuppressive Wirkung durch BCM-7 aus der A1- $\beta$ -Kasein-Variante diskutiert, die zu einer Darm-assoziierten Immuntoleranz und geschwächten Abwehr gegen Enteroviren führen soll (Elliott et al. 1999). Diese Hypothese wurde von neueren Studien aufgenommen und weiter diskutiert (Chia et al. 2017). Demnach soll der Konsum von A1- $\beta$ -Kasein zu einer gesteigerten Darmpermeabilität führen, wie sie außerdem bei dem Leaky-Gut-Syndrom vorkommt (Chia et al. 2017). Die gesteigerte Permeabilität des Darms beim Leaky-Gut-Syndrom kann zur Aufnahme von krankheitserregenden Substanzen aus dem Darmlumen führen (de Kort et al. 2011; Horowitz et al. 2023). *In-vivo*- und *ex-vivo*-Untersuchungen an Ratten, Mäusen und am Menschen konnten bereits zeigen, dass eine erhöhte parazelluläre Permeabilität des Dünndarms im Zusammenhang mit T1D steht (Mønsted et al. 2021). Ob der A1-Milchkonsum zu einer erhöhten Permeabilität des Darms führt, wurde unseres Wissens nach bisher nicht untersucht (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Der Zusammenhang zwischen der A1- $\beta$ -Kasein-Variante, BCM-7 und T1D wurde ebenfalls bisher nicht bestätigt, sondern an Tiermodellen sogar widerlegt (Benslama et al. 2022). So wurde während einer aktuellen Fütterungsstudie an gesunden Ratten mit A1- und A2-Milch nachgewiesen, dass keine Unterschiede in den Glukosegehalten oder Veränderungen der Nierenwerte im Serum messbar waren (Chauhan et al. 2023). Ein potenzieller Effekt von A1- oder A2- $\beta$ -Kasein wurde ebenfalls an Ratten evaluiert, die zuerst entweder mit A1 oder A2- $\beta$ -Kasein-Hydrolysaten gefüttert wurden und dann jeweils bei der Hälfte der Ratten Diabetes durch Streptozotocin induziert wurde (Thakur et al. 2020). Streptozotocin induziert T1D durch eine  $\beta$ -Zell-toxische Alkylierung, die zu einer verminderten Insulinproduktion führt (Lenzen 2008). Die Fütterung von A1- oder A2- $\beta$ -Kasein zeigte keinen Einfluss auf den Nüchternblutzucker-Spiegel sowie andere biochemische, Diabetes-spezifische Parameter und histopathologische Befunde (Thakur et al. 2020). Des Weiteren wurde am Diabetes-induzierten Mausmodell ebenfalls der Effekt einer Fütterung von A1-Milch und A2-Milch verglichen (Chaudhary et al. 2023). Sowohl die A1-, als auch die A2-Milch-Fütterung führte zu höheren Blutzucker-Spiegeln verglichen zur Standarddiät in den Diabetes-induzierten Mäusen (Chaudhary et al. 2023). Zwischen der A1- und A2-Milch-Fütterung wurde kein Unterschied in den Blutzucker- und Insulin-Spiegeln

festgestellt (Chaudhary et al. 2023). Neben der fehlenden Korrelation der  $\beta$ -Kasein-Varianten und T1D wurden sogar positive Effekte durch BCM-7 im Tiermodell beschrieben. Der direkte Effekt von BCM-7 wurde an Ratten mit Streptozotocin-induziertem T1D untersucht, wobei BCM-7 eine anti-hyperglykämische Wirkung neben einem protektiven Effekt auf die diabetische Nephropathie zeigte (Zhang et al. 2012). Eine 30-tägige Supplementierung von BCM-7 ( $7,5 \times 10^{-6}$  mol/Tag/kg Körpergewicht) führte zu einer signifikanten Senkung des Serumkreatinins und des Blutharnstoffs, begleitet von verringerten Harn-Glukosewerten und einem reduzierten Harnproteingehalt (Zhang et al. 2012). Zudem konnte eine Reduktion des Verhältnisses von Niere zu Körpergewicht sowie eine präventive Wirkung von BCM-7 gegenüber einer Nierenfibrose nachgewiesen werden, die bei den diabetischen Ratten ohne BCM-7-Behandlung verstärkt auftrat (Zhang et al. 2012). Angenommen, aus einem Liter A1-Milch entstehen bis zu 15  $\mu$ mol BCM-7 während des Verdauungsvorgangs im Darm der Ratten, dann müsste eine Ratte pro Kilogramm Körpergewicht 500 ml A1-Milch aufnehmen, um die gleiche Menge an BCM-7 freizusetzen, wie sie in dieser Studie verwendet wurde (Zhang et al. 2012). Neueste Studien am Menschen zeigten, dass eine Kuhmilchaufnahme, unabhängig der  $\beta$ -Kasein-Variante, von Säuglingen mit genetischer Prädisposition für T1D (Risikohaplotyp für T1D: HLA DR3 und DR4) im Alter von unter neun Monaten mit dem späteren Auftreten von T1D korreliert ist (Benslama et al. 2022). Dabei wurde nicht das  $\beta$ -Kasein, sondern das Bovine Serumalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin aufgrund der Homologie mit den Selbstantigenen Antigen-2 und der Glutamatdecarboxylase 1 für die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen verantwortlich gemacht (Benslama et al. 2022). Diese autoreaktiven T-Zellen zerstören die  $\beta$ -Zellen des Pankreas, was wiederum zu Glukoseintoleranz und T1D führt (Kawasaki 2023).

#### **2.4.2.2 BCM-7 und der Zusammenhang zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere die atherosklerotischen Herzkrankheiten wie ischämische Herzkrankheiten (IHD), Atherosklerose, Koronare Herzkrankheiten und Koronarsklerose, gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen beim Menschen (Surma et al. 2024). Der Konsum von A1- $\beta$ -Kasein und BCM-7 wurde auch als möglicher Risikofaktor für die Entstehung von Herzkrankheiten in Betracht gezogen (Laugesen et al. 2003; McLachlan 2001; Tailford et al. 2003). In frühen retrospektiven epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen dem Konsum von

A1-Milch und atherosklerotischen Herzkrankheiten untersucht (Laugesen et al. 2003). Dabei wurde der Pro-Kopf-Gesamtmilchkonsum sowie der prozentuale Anteil der A1- $\beta$ -Kasein-Variante in der konsumierten Milch anhand genetischer Daten des Rinderbestands des jeweiligen Landes geschätzt und mit dem Auftreten von Todesfällen durch ischämische Herzkrankheiten national verglichen (Laugesen et al. 2003). Es wurden positive Korrelationen zwischen dem vermehrten Auftreten von Todesfällen durch ischämische Herzkrankheiten und dem Milchkonsum sowie der A1- $\beta$ -Kasein-Variante gefunden (Laugesen et al. 2003). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine weitere epidemiologische retrospektive Studie, in der der Zusammenhang zwischen IHD-Todesraten von Männern zwischen 30-69 Jahren aus verschiedenen Ländern und der Aufnahme von Milchprotein sowie von A1- $\beta$ -Kasein untersucht wurde (McLachlan 2001). Es wurde anhand genetischer Daten zur  $\beta$ -Kasein-Allel-Verteilung der Rinderpopulation der Anteil des A1- $\beta$ -Kaseins im durchschnittlichen Pro-Kopf-Konsum geschätzt (McLachlan 2001). Auch hier wurde eine positive Korrelation zwischen einem hohen A1- $\beta$ -Kasein-Konsum und IHD festgestellt (McLachlan 2001). Allerdings wurde in keiner der genannten Studien eine potenzielle Korrelation zwischen anderen  $\beta$ -Kasein-Varianten und dem Auftreten von IHD-Todesraten untersucht (McLachlan 2001; Laugesen et al. 2003). Um die Hypothese zu prüfen, dass A1- $\beta$ -Kasein zu atherosklerotischen Herzkrankheiten führt, wurde eine *in-vivo*-Studie an Kaninchen durchgeführt (Tailford et al. 2003). Die Kaninchen wurden über einen Zeitraum von sechs Wochen entweder mit einer Standarddiät ohne Zusatz oder mit einer Standarddiät gefüttert, die mit 10% A1- oder A2- $\beta$ -Kasein angereichert war (Tailford et al. 2003). Dabei entsprach die A1- $\beta$ -Kasein-Dosis einer Aufnahme von 300 ml Milch pro Kaninchen pro Tag (Tailford et al. 2003). Es wurde festgestellt, dass die Fütterung mit A1- $\beta$ -Kasein, im Vergleich zur Fütterung mit A2- $\beta$ -Kasein, zu signifikant höheren Cholesterinwerten im Serum führte (Tailford et al. 2003). Zudem traten nach der Fütterung mit beiden  $\beta$ -Kasein-Varianten atherosklerotische Läsionen auf, wobei diese bei der Fütterung mit der A1-Variante signifikant häufiger waren (Tailford et al. 2003). Die Autoren hypothesisierten, dass BCM-7 an der Oxidation von Low Density Lipoproteinen beteiligt sei, was zur Entstehung von Atherosklerose führen könnte (Tailford et al. 2003). Einige Autoren führten in diesem Zusammenhang das fehlende Auftreten von atherosklerotischen Herzkrankheiten bei den Masai an und verwiesen auf Studien, die signifikant niedrigere Werte an Protein, Fett und Cholesterin im Serum der Masai im Vergleich zum US-Durchschnitt nachgewiesen haben (McLachlan 2001;

Bell et al. 2006; Biss et al. 1971). Die Masai konsumieren große Mengen Milch von Zebu-Rindern, die ausschließlich das A2-Allel tragen und daher nur Milch mit dem A2- $\beta$ -Kasein produzieren (McLachlan 2001). Aus diesem Grund wurde häufig der Schluss gezogen, dass der Konsum der A2- $\beta$ -Kasein-Variante nicht zu atherosklerotischen Herzkrankheiten führt, während in westlichen Ländern auch A1-Milch konsumiert wird und dort atherosklerotischen Herzkrankheiten vermehrt auftreten (McLachlan 2001; Bell et al. 2006). Nachdem die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit im Jahr 2009 BCM-7 und den Konsum von A1-Milch als nicht förderlich für atherosklerotischen Herzkrankheiten einstufte, wurden keine weiteren Studien mehr in dieser Richtung durchgeführt (Jeong et al. 2023). Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und dem A1-Milch-Konsum wurde weitestgehend durch Studien widerlegt, die sogar einen protektiven Effekt von Milchkonsum unabhängig von der  $\beta$ -Kasein-Variante gegen IHD aufzeigten (Song et al. 2022; Zhuang et al. 2023).

#### **2.4.2.3 Wirkung auf das Immunsystem durch BCM-7**

Auch eine Wirkung auf das Immunsystem wurde durch BCM-7 über opioide Mechanismen postuliert (Elitsur et al. 1991). *In-vitro*-Studien an humanen Immunzellen zeigten sowohl inflammatorische als auch anti-inflammatorische Effekte von BCM-7 (Elitsur et al. 1991; Kayser et al. 1996; Fiedorowicz et al. 2011). Zur Untersuchung der Wirkung auf die Immunzellen im Darm wurden humane Lamina propria Lymphozyten aus makroskopisch gesunden Stücken einer Kolonresektion gewonnen und *in vitro* unter Concanavalin A-Stimulation mit und ohne BCM-7 über fünf Tage inkubiert (Elitsur et al. 1991). Nach vier Tagen wurde eine Hemmung der Proliferation durch 63  $\mu$ M BCM-7 beschrieben, welche durch Naloxon, einem Opioidantagonisten, aufgehoben wurde und damit nach Ansicht der Autoren die opioiderge Wirkung bestätigte (Elitsur et al. 1991). In einer anderen Studie zeigte BCM-7 in einem *in-vitro*-Bromdesoxyuridin-Proliferationsassay an humanen Concanavalin A-stimulierten peripheren mononukleären Zellen des Bluts (PBMC) sowohl anti-proliferative Effekte bei niedrigeren Konzentrationen (1 pM - 100 nM) als auch proliferative Effekte bei höheren Konzentrationen (1  $\mu$ M - 100  $\mu$ M) (Kayser et al. 1996). Durch die Ergebnisse wurde auf einen noch unbekanntem Wirkmechanismus geschlossen (Kayser et al. 1996), der aber bis heute nicht gezeigt wurde (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Tatsächlich konnte gegensätzlich dazu in einer anderen *in-vitro*-Studie eine rein proliferative Wirkung von BCM-7 auf die PBMC des Menschen mittels



Bromdesoxyuridin-Proliferationsassay unter PHA-L-Stimulation in allen getesteten Konzentration von 1 fM - 10  $\mu$ M beobachtet werden (Fiedorowicz et al. 2011). Außerdem konnten in der gleichen Studie erhöhte Werte von Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-8 nach Inkubation mit BCM-7 ermittelt werden (Fiedorowicz et al. 2011). Die gleiche Arbeitsgruppe verfolgte die Hypothese, dass BCM-7 über den MOR wirkt und untersuchte *in vitro* den Effekt von BCM-7 auf die Gen-Expression des MOR und der DPPIV der PBMC gesunder Kinder und von Kindern mit atopischer Dermatitis (Fiedorowicz et al. 2016). Die Inkubation mit BCM-7 bewirkte eine signifikante Steigerung der Expression der MOR-Gene und eine Verringerung der DPPIV-Genexpression in den PBMC von Kindern mit atopischer Dermatitis verglichen zu den PBMC gesunder Kinder (Fiedorowicz et al. 2014). Die Autoren diskutierten eine inflammatorische Wirkung von BCM-7 aus A1-Milch, welche zur Entstehung einer atopischen Dermatitis beitragen soll (Fiedorowicz et al. 2014). Neben dem Effekt von BCM-7 auf die Proliferation *in vitro* wurde die Wirkung von A1- und A2-Milch auf das Immunsystem *in vivo* untersucht. Eine *in-vivo*-Studie an BALB/c Mäusen zeigte, dass die Fütterung von A1-Milch, im Vergleich zu A2-Milch, pro-inflammatorische Effekte auf den Respirationstrakt hatte (Yadav et al. 2020). Die gemessenen Immunglobulin G (IgG)- und Immunglobulin E (IgE)-Werte aus der bronchoalveolären Lavage waren nach einer A1-Milch-Fütterung signifikant höher als nach der A2-Milch-Fütterung (Yadav et al. 2020). Zusätzlich entwickelten die mit A1-Milch gefütterten Mäuse eine bronchiale Hyperreagibilität und zeigten erhöhte Werte von IL-4 und IL-5 in der bronchoalveolären Lavage und im Serum, wie sie bei einem durch Th2-vermitteltem Asthma auftreten (Baos et al. 2017; Yadav et al. 2020). Dieser pro-inflammatorische Effekt konnte in einer jüngeren Studie nicht bestätigt werden (Liu et al. 2022). Bei 30 Mäusen wurden die Konzentrationen der Immunmarker IgG, IgE, Interferon- $\gamma$ , IL-4, IL-5 im Blut nach der Fütterung einer Standarddiät ohne und mit A1- oder A2- $\beta$ -Kasein gemessen (Liu et al. 2022). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Fütterung des A1- $\beta$ -Kaseins zur Kontrollgruppe gefunden (Liu et al. 2022). Die Fütterung des A2- $\beta$ -Kaseins führte hingegen zu erhöhten IgG- und IgE-Werten im Serum der Mäuse (Liu et al. 2022). Die erhöhten IgG- und IgE-Werte nach Fütterung mit A2- $\beta$ -Kasein sind direkt gegensätzlich zu den beschriebenen Ergebnissen der vorherig beschriebenen Studie, in der erhöhte IgG- und IgE-Werte in der bronchoalveolären Lavage nach der Fütterung mit A1-Milch nachweisbar waren (Liu et al. 2022; Yadav et al. 2020). Die hier erwähnten *in-vitro*-Proliferationsdaten und *in-*

*vivo*-Untersuchungen zeigen deutlich, wie widersprüchlich die Ergebnisse zu den Effekten von BCM-7 und A1-Milch sind.

#### **2.4.2.4 Effekte auf den Verdauungstrakt durch BCM-7**

Neben den beschriebenen postulierten Beteiligungen an Erkrankungen, soll A1- $\beta$ -Kasein und BCM-7 auch auf den Magen-Darm-Trakt wirken (Ramakrishnan et al. 2023). In einer frühen *in-vitro*-Kontraktionsstudie am Ileum des Meerschweinchens zeigten Chloroform-Methanol-Extrakte aus Milch und verdaulichem Kasein inhibierende Eigenschaften auf die Darmkontraktionen, die durch Naloxon aufhebbar waren (Brantl et al. 1979). Die Autoren schlossen deshalb auf eine opioide Wirkung der Bestandteile des Extraktes (Brantl et al. 1979). In folgenden *in-vivo*-Studien wurde eine potenzielle opioide Wirkung von Kaseinen weiter untersucht (Defilippi et al. 1995). Mittels intraluminaler Manometrie wurden Veränderungen der motorischen Aktivität des Dünndarms bei Hunden nach intragastraler Verabreichung von Sojaprotein oder Kasein, unbeachtet der  $\beta$ -Kasein-Variante, analysiert (Defilippi et al. 1995). Nach der Verabreichung von Kasein kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Amplitude und Frequenz der Kontraktionen im Dünndarm im Vergleich zu Sojaprotein (Defilippi et al. 1995). Eine Vorbehandlung mit Naloxon unterdrückte den hemmenden Effekt von Kasein (Defilippi et al. 1995). Die Autoren postulierten den Effekt auf die opioide Wirkung durch  $\beta$ -Casomorphine, die während der Verdauung des Kaseins entstehen (Defilippi et al. 1995). In weiteren *in-vivo*-Studien wurde folgend nicht nur der Effekt von Kasein, sondern der Effekt der einzelnen A1- oder A2- $\beta$ -Kasein-Varianten genauer untersucht (Barnett et al. 2014). Ratten erhielten dazu eine Diät mit A1- oder A2-Milchpulver und bekamen nach zwölf Stunden einen Titandioxid-Tracer oral appliziert (Barnett et al. 2014). Die Hälfte jeder Fütterungsgruppe erhielt zeitgleich mit dem Tracer ebenfalls eine intraperitoneale Naloxon-Injektion (Barnett et al. 2014). Eine positive Tracer-Ausscheidung mit dem Stuhl, wurde nach null, vier, sechs, acht, elf, 14, 21 und 24 Stunden ermittelt (Barnett et al. 2014). Erste Ratten, sowohl aus der A1- als auch aus der A2-Fütterungsgruppe, begannen mit der Ausscheidung des Tracers bereits nach vier Stunden und erst nach 21 Stunden schieden alle Ratten den Tracer aus (Barnett et al. 2014). Zu einzelnen Messzeitpunkten konnte eine signifikant geringere Ausscheidung des Tracers in der A1-Gruppe verglichen zur A2-Gruppe oder der Naloxon-behandelten A1-Gruppe detektiert werden (Barnett et al. 2014). Die Autoren folgerten daraus, dass das A1- $\beta$ -Kasein für eine verlangsamte Darmpassage

verantwortlich sei (Barnett et al. 2014). Da Naloxon die Verlangsamung der Passage aufhob, soll diese Wirkung über Opioidrezeptoren vermittelt worden sein, welche die Darmmotorik reduziert und zu einer längeren Ingestapassage führte (Barnett et al. 2014). In einer weiteren *in-vivo*-Studie wurde die Auswirkung einer A1- oder A2-Milch-Tränke auf die Stuhlkonsistenz, Milchaufnahme und das tägliche Wachstum von 47 Kälbern in den ersten drei Lebenswochen untersucht (Hohmann et al. 2020). Die Ergebnisse zeigten, dass die Kälber mit A1-Milch-Tränke signifikant höhere Milchaufnahmen und weniger Probleme mit Durchfall aufwiesen als diejenigen, die A2-Milch erhielten (Hohmann et al. 2020). Die täglichen Gewichtszunahmen der A1-Gruppe waren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur A2-Gruppe (Hohmann et al. 2020). Darüber hinaus wurde im Blut aller Kälber im ELISA zum Zeitpunkt der Geburt kein BCM-7 nachgewiesen (Hohmann et al. 2020). Die BCM-7 Konzentrationen im Blut aller Kälber lag am dritten Tag bei circa 60 ng/ml, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen der A1- und A2-Gruppe festgestellt wurde (Hohmann et al. 2020). Am 21. Tag wurden hingegen signifikant höhere BCM-7-Konzentrationen in der A1-Gruppe (55,82 ng/ml) als in der A2-Gruppe (12,73 ng/ml) gemessen (Hohmann et al. 2020). Die Autoren diskutierten eine Beteiligung von  $\beta$ -Casomorphinen, die für ein geringeres Auftreten von Durchfall durch eine Reduzierung der Darmmotorik, verantwortlich sein könnten (Hohmann et al. 2020). Zu gegensätzlichen Ergebnissen kamen Untersuchungen am Menschen (Ho et al. 2014; Sheng et al. 2019). In einer doppelt-verblindeten, randomisierten Pilot-Studie wurde die Stuhlkonsistenz und die Verdauungsbeschwerden von 41 gesunden Männern und Frauen nach dem Konsum von A1- oder A2-Milch untersucht (Ho et al. 2014). Dabei führte A1-Milch zu signifikant höheren Stuhlkonsistenzen ( $3,87 \pm 0,11$  SEM), verglichen zur A2-Milch ( $3,56 \pm 0,15$  SEM), wobei Verdauungsbeschwerden nach dem Konsum beider Milchen festgestellt wurden (Ho et al. 2014). Die Stuhlkonsistenzen beider Gruppen lagen im optimalen Bereich des Bristol Stoolscores (Ho et al. 2014). In einer weiteren doppelt-verblindeten Cross-over-Studie wurde die Auswirkung des Konsums von A2-Milch und einer nicht näher-beschriebenen konventionellen Milch an Milch-intoleranten Kindern untersucht (Sheng et al. 2019). Laut der Einschätzung der Probanden soll der Konsum der konventionellen Milch, aber nicht der Konsum von A2-Milch, zu Blähungen, Bauchschmerzen und einem vollen Gefühl im Magen geführt haben (Sheng et al. 2019). Die Autoren kamen lediglich zu dem Entschluss, dass A2-Milch zu einem besseren Verdauungsbefinden führe, wobei keine Begründung angeführt wurde

(Sheng et al. 2019). Ein Einfluss auf das gastrointestinale Wohlbefinden durch A1- und A2-Milch wurde ebenfalls in einer randomisierten und verblindeten Studie an chinesischen Kindern im Alter von zwölf bis 36 Monaten untersucht (Meng et al. 2023). Die Kinder wurden mit einem A2-Milchprodukt (A2-gum) oder dem konventionellen Pendant gefüttert (Meng et al. 2023). Weitere Informationen oder eine Zusammensetzung des konventionellen Produkts wurde nicht gegeben (Meng et al. 2023). Die Häufigkeit gastrointestinaler Beschwerden, wie Stuhlabsatzprobleme, Verstopfung, abdominale Schmerzen, Durchfall und Blähungen wurden nach sieben und 14 Tagen durch die Eltern erfasst (Meng et al. 2023). Zu Beginn der Studie wurden die Kinder in Gruppen mit jeweils mehr oder weniger Verdauungsbeschwerden eingeteilt (Meng et al. 2023). Bei den Kindern ohne vorherige Verdauungsbeschwerden zeigte eine Fütterung mit dem konventionellen oder A2-Produkt keinen Unterschied auf das Verdauungsverhalten der Kinder (Meng et al. 2023). Bei den Kindern, die zu Studienbeginn bereits häufiger unter Verdauungsbeschwerden litten, zeigte sich eine Verbesserung der Symptomatik während der Studie, wobei der Rückgang der Symptomatik in der Gruppe mit A2-Produkt-Fütterung signifikant stärker ausfiel als in der Gruppe, der das konventionelle Produkt gefüttert wurde (Meng et al. 2023). Trotz der Verbesserung der Symptomatik durch beide Produkte wurde in dem Artikel nur thematisiert, dass das A2- $\beta$ -Kasein zu einem höheren Wohlbefinden führe, wobei eine Begründung nicht angeführt wurde (Meng et al. 2023). Die derzeitige Studienlage zu den Auswirkungen von BCM-7 auf den Magen-Darm-Trakt ist widersprüchlich (Hegde 2019). Außerdem wurde bisher keine der Hypothesen bewiesen (Hegde 2019). Ob A1-Milch über BCM-7 auf Opioidrezeptoren des Magen-Darm-Traktes des Menschen wirkt, wurde unseren Wissen nach noch nicht untersucht (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Aus diesem Grund besteht ein dringender Bedarf an weiterer Forschung zur Bewertung der Wirkung von A1- $\beta$ -Kasein oder BCM-7 auf den Magen-Darm-Trakt des Menschen (Gonzales-Malca et al. 2023). Das Schwein bietet sich als geeignetes Modell für die Verdauungsphysiologie des Menschen an (Gonzalez et al. 2015; Yuan et al. 2023). Darüber hinaus liegen unserer Kenntnis nach keine Studien vor, die die Wirkung von BCM-7 oder A1- und A2- $\beta$ -Kasein auf den Magen-Darm-Trakt von Schweinen untersucht haben (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Daher war es Ziel dieser Doktorarbeit, den Einfluss von BCM-7 sowie von A1- und A2- $\beta$ -Kasein auf die Motorik der Muskulatur des porcinen Jejunums zu untersuchen. Um herauszufinden, ob eine

potenzielle Wirkung auf die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur von BCM-7 über Opioidrezeptoren vermittelt wird, nutzen wir Morphin als MOR-Agonisten als Positivkontrolle. Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Expression des MOR im Dünndarm des Schweins zu lokalisieren, da der MOR den potenziellen Wirkort des BCM-7 darstellt und dieser bisher nicht auf dem myenterischen und submukösen Plexus des porcinen proximalen Jejunums beschrieben wurde (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024).

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Probenmaterial

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Organproben von der ehemaligen Schweineschlachtung München GmbH in München und vom Schlachthof Hasenheide in Fürstenfeldbruck bezogen. Die Ausnahmegenehmigung für die Verwendung von tierischen Nebenprodukten zu Diagnose- und Forschungszwecken nach Artikel 17 Absatz 1 in Verbindung mit Artikel 23 der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 wurde uns vom Landratsamt München erteilt. Die aktuelle Genehmigungsnummer lautet: DE 09 184 0063 21 (Stand: 13.03.2024). Die Organproben stammten von deutschen Mastschweinen im Alter von sechs Monaten, die regulär zur Lebensmittelgewinnung geschlachtet wurden. Die Schweine wurden mit einer Elektrozange betäubt und anschließend durch Blutentzug getötet. Die toten Schweine wurden nach dem Brühen eviszeriert. Von der Tötung bis zur Eviszierung vergingen maximal 15 Minuten. Vom Magen-Darm-Trakt der Schweine wurde nach der Eviszierung ein zehn Zentimeter langes Stück des proximalen Jejunums entfernt und direkt drei Mal mit 4°C kaltem Krebs-Puffer luminal gewaschen (Zusammensetzung: NaCl 113 mM, KCl 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 20 mM, Glucose 5,6 mM; pH-Wert 7,4). Der Krebs-Puffer wurde am Tag vor jedem Versuch frisch hergestellt und mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid, für 15 Minuten stark begast und luftdicht-verschlossen transportiert. Das Jejunum wurde in 4°C kaltem Krebs-Puffer (pH-Wert 7,4) zum Lehrstuhl für Physiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, Lena-Christ-Straße 48, 52152 Planegg/Martinsried transportiert. Der Transport dauerte circa 30 Minuten. Die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten ebenfalls mit dem auf diesem Wege erhaltenen Probenmaterial. Die Kuhmilchproben stammten von Kühen des Lehr- und Versuchsguts der LMU München und des Lehr- und Forschungsguts Ruthe der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Die Milchproben wurden frisch im Rahmen der regulären Milchgewinnung von gesunden, genotypisierten A1- oder A2-Kühen ermolken und gekühlt bei 4°C zum Lehrstuhl für Physiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, Lena-Christ-Straße 48, 52152 Planegg/Martinsried transportiert. Die Milch wurde bei 4°C für maximal 24 Stunden bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

## 3.2 *In-vitro*-Verdauung der Milch

### 3.2.1 Puffer und Lösungen

#### Simulierter Magensaft, pH 3,0

KCl <sup>1</sup> (6,9 mM)	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2</sup> (0,9 mM)	0,05 g
NaHCO <sub>3</sub> <sup>3</sup> (25 mM)	1,05 g
NaCl <sup>4</sup> (47,2 mM)	1,38 g
MgCl <sub>2</sub> ·6(H <sub>2</sub> O) <sup>4</sup> (0,1 mM)	0,01 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>5</sup> (0,5 mM)	0,02 g

In 500 ml destilliertem Wasser lösen und pH-Wert mit 6 M HCl<sup>4</sup> auf 3,0 einstellen.

#### Simulierter Dünndarmsaft, pH 7,0

KCl <sup>1</sup> (6,9 mM)	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2</sup> (0,9 mM)	0,05 g
NaHCO <sub>3</sub> <sup>3</sup> (85 mM)	3,57 g
NaCl <sup>4</sup> (38,4 mM)	1,12 g
MgCl <sub>2</sub> ·6(H <sub>2</sub> O) <sup>4</sup> (0,33 mM)	3,50 mg

In 500 ml destilliertem Wasser lösen und pH-Wert mit 1 M NaOH<sup>2</sup> oder 1 M HCl<sup>4</sup> auf 7,0 einstellen.

#### Kalziumchlorid-Lösung, 0,3 M

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O <sup>2</sup> (0,3 M)	4,41 g
---	--------

In 100 ml destilliertem Wasser lösen.

---

<sup>1</sup> Carl Roth, Karlsruhe

<sup>2</sup> Merck, Darmstadt

<sup>3</sup> neoLab, Heidelberg

<sup>4</sup> Applichem, Darmstadt

<sup>5</sup> Sigma-Aldrich, Steinheim

**Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4**

NaCl <sup>6</sup> (137 mM)	8,00 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O <sup>7</sup> (8 mM)	1,54 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>7</sup> (1,5 mM)	0,20 g
KCl <sup>8</sup> (2,7 mM)	0,20 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen.

**Proteaseinhibitor-Lösung**

Complete EDTA-free<sup>9</sup> 1 Tablette

In 400 µl simuliertem Dünndarmsaft lösen.

**3.2.2 Vorbereitung der Milchproben**

Die verwendeten Milchproben stammten ausschließlich von Holstein-Friesian-Rindern. Es wurden insgesamt 18 Proben von homozygoten A1-Kühen sowie 23 Proben von homozygoten A2-Kühen gewonnen. Zur Vorbereitung der Proben wurden sie einem Entfettungsverfahren unterzogen. Hierbei wurden die Milchproben drei Mal für jeweils fünf Minuten bei einer Temperatur von 4°C und einer Zentrifugalkraft von 2000 x g zentrifugiert. Zwischen jedem Zentrifugationsschritt wurde das obenauf abgesetzte Fett, welches sich als feste Phase zeigte, mit einem Löffel abgeschöpft. Sollte nach dem dritten Zentrifugationsschritt noch eine dünnere Fettschicht sichtbar gewesen sein, erfolgten weitere Zentrifugationen für fünf Minuten bei 2000 x g, bis kein Fettfilm mehr erkennbar war. Anschließend wurden die entfetteten Milchproben aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

**3.2.3 Magenphase der *in-vitro*-Verdauung**

Die *in-vitro*-Verdauung der Milch wurde gemäß einem modifizierten Protokoll durchgeführt, das nach den Richtlinien des COST-Infogest-Netzwerks entwickelt wurde (Minekus et al. 2014). Neben den Milchproben wurde auch PBS (pH 7,4) dem Protokoll unterzogen, um folglich als Negativkontrolle zu dienen. Die Milch und das PBS wurden im Verhältnis 1:2 mit simuliertem Magensaft gemischt und der pH-Wert

---

<sup>6</sup> Applichem, Darmstadt

<sup>7</sup> Merck, Darmstadt

<sup>8</sup> Carl Roth, Karlsruhe

<sup>9</sup> Roche, Mannheim



der Mischung mit 1 M HCL<sup>10</sup> auf 3,0 eingestellt. Die Mischung wurde dann in einem Wasserbad<sup>11</sup> 10 Minuten lang bei 37°C inkubiert und dabei regelmäßig geschwenkt. Anschließend wurden Pepsin<sup>12</sup> (3,2 mg/ml) und die Kalziumchlorid-Lösung (Endkonzentration: 0,075 mM) hinzugefügt. Das Gemisch wurde für weitere zwei Stunden bei 37°C unter regelmäßigem Schwenken inkubiert.

### 3.2.4 Dünndarmphase der *in-vitro*-Verdauung

Die Milch-Magensaft-Mischung wurde im Verhältnis 1:2 mit dem simulierten Dünndarmsaft gemischt, und der pH-Wert mit 1 M NaOH<sup>13</sup> auf 7,0 eingestellt, um die Wirkung des Pepsins zu stoppen. Anschließend wurde Natrium-Taurocholat<sup>13</sup> (5 mg/ml Dünndarmsaft) zugegeben und die Mischung erneut für 10 Minuten bei 37°C unter regelmäßigem Schwenken inkubiert. Danach wurden Pankreatin<sup>12</sup> (1,6 mg/ml) und die Kalziumchlorid-Lösung (Endkonzentration: 0,3 mM) hinzugefügt. Der pH-Wert wurde erneut kontrolliert und gegebenenfalls mit 1 M NaOH<sup>13</sup> auf 7,0 korrigiert. Auch in dieser Phase wurde das Gemisch zwei Stunden lang bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Um den Verdauungsprozess abzuschließen, wurde die Wirkung der Proteasen aus dem Pankreatin durch Zugabe der Proteaseinhibitor-Lösung (0,8 µl/ml Verdauungsmischung) gestoppt, die eine Stunde lang bei Raumtemperatur einwirkte. Anschließend wurden alle verdauten Proben drei Mal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut, um alle noch aktiven Enzyme zu inaktivieren. Die verdauten Proben wurden einzeln für die Analyse im ELISA eingefroren. Außerdem wurden die 18 A1-Milchproben zu einem A1-Pool und die 23 A2-Milchproben zu einem A2-Pool zusammengefasst und bis zur Verwendung im Kontraktionsversuch eingefroren. Das PBS, das das *in-vitro*-Verdauungsprotokoll durchlief, wird im Folgenden als PBS-V bezeichnet und wurde ebenfalls bis zur weiteren Nutzung eingefroren.

---

<sup>10</sup> AppliChem, Darmstadt

<sup>11</sup> VWR, Belgien

<sup>12</sup> AppliChem, Darmstadt

<sup>13</sup> Merck, Darmstadt

### 3.3 Kompetitiver ELISA zur Detektion von BCM-7

#### 3.3.1 Puffer und Lösungen

##### Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer), pH 9,6

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ <sup>14</sup> (29 mM) 3,11 g

$\text{NaHCO}_3$ <sup>15</sup> (71 mM) 6,00 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen.

##### PBS, pH 7,4

Siehe Kapitel 2.1

##### PBS-T, pH 7,4

Tween-20<sup>16</sup> (0,05%) 0,5 ml

In 1000 ml PBS lösen.

##### BSA-Block, pH 7,4

BSA (Serva, Heidelberg) 0,25 g

In 25 ml PBS-T lösen.

##### Tetramethylbenzidin (TMB)-Stammlösung

Tetramethylbenzidin<sup>17</sup> 6,0 mg

In 1 ml DMSO<sup>18</sup> (25mM) lösen.

##### TMB-Puffer, pH 5,0

$\text{CH}_3\text{COONa}$ <sup>19</sup> (100 mM) 8,2 g

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ <sup>20</sup> (16,4 mM) 3,15 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen.

---

<sup>14</sup> Applichem, Darmstadt

<sup>15</sup> neoLab, Heidelberg

<sup>16</sup> Th. Geyer, Renningen

<sup>17</sup> Applichem, Darmstadt

<sup>18</sup> Serva, Heidelberg

<sup>19</sup> Merck, Darmstadt

<sup>20</sup> Carl Roth, Karlsruhe

**TMB-Substratlösung**

TMB-Puffer	10 ml
TMB-Stammlösung	332 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% <sup>21</sup>	3,3 µl

Gut mischen, erst kurz vor Gebrauch ansetzen.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>22</sup>, 1 M****PBS-V**

siehe 3.2.4

**Folgende Antikörper wurden verwendet:**

Antikörper	Wirtsspezies	Typ	Verdünnung	Firma/Herkunft
Trägerantikörper AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Ziege	polyklonal	1:600 in PBS-T	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Großbritannien
Anti-BCM-7 Antikörper	Maus	monoklonal	1:25 in PBS-T	Dr. Elisabeth Kremmer, LMU München

<sup>21</sup> Merck, Darmstadt

<sup>22</sup> Morphisto, Offenbach

**Folgende Reagenzien wurden verwendet:**

Reagenz	Ausgangskonzentration	Verdünnung	Arbeitskonzentration	Firma Herkunft
Standard: BCM-7	1 mg/ml	1:195 in PBS-V	5120 ng/ml	Peps4LS, Heidelberg
Tracer: eBio-BCM-7	1 mg/ml	1:250.000 in PBS-T	4 ng/ml	Peps4LS, Heidelberg
Streptavidin -POD	1mg/ml	1:10.000 in PBS-T	100 ng/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Großbritannien

**3.3.2 Vorbereitung der ELISA-Platten und Durchführung**

Es wurden alle 96 Kavitäten einer 96-Well-Maxisorb-Platte<sup>23</sup> mit jeweils 100 µl des Goat-Anti-Mouse IgG (H+L) Antikörpers<sup>24</sup> beschichtet und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde die Platte drei Mal mit PBS-T gewaschen und abgeklopft. Zum Blockieren der freien Bindungsstellen wurden in jede Kavität 250 µl des BSA-Blocks gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte drei Mal mit PBS-T gewaschen und abgeklopft. Daraufhin wurden 100 µl des Anti-BCM-7 Antikörpers<sup>25</sup> in jede Kavität gegeben. Die Platte wurde wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, damit der Trägerantikörper an den Anti-BCM-7 Antikörper binden kann. Anschließend wurde die Platte drei Mal mit PBS-T gewaschen und abgeklopft. In einer Vorbereitungsplatte (ELISA-Platte, Medium Bind. F<sup>26</sup>) wurde während dieser Inkubationszeit eine Standardkurve des BCM-7 in Duplikaten vorbereitet. Als Verdünnungsmedium wurde dazu PBS-V 1:10 mit PBS verdünnt. Jeweils 60 µl davon wurden in die Kavitäten der Standardkurve vorgelegt, die ersten zwei Kavitäten dabei ausgelassen. Für diese wurde die BCM-7-Startkonzentration von 5120 ng/ml im Verdünnungsmedium hergestellt und die Kavitäten mit jeweils 120 µl befüllt. Von diesen Kavitäten

<sup>23</sup> Thermo Fisher Scientific, Bremen

<sup>24</sup> Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Großbritannien

<sup>25</sup> Dr. Elisabeth Kremmer, LMU München

<sup>26</sup> Sarstedt, Nümbrecht

ausgehend wurde absteigend eine BCM-7 log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden jeweils 60 µl in die darauffolgenden zwei Kavitäten gegeben, resuspendiert und wiederum 60 µl daraus in die nächsten zwei Kavitäten gegeben und wieder resuspendiert. Dieses Vorgehen wurde bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml BCM-7 fortgeführt. Für die Negativkontrolle und den Blank, jeweils Duplikate, wurde das Verdünnungsmedium ohne Zugabe von BCM-7 verwendet (je 60 µl pro Delle). Die verdauten Milchen wurden zunächst 1:10 mit PBS verdünnt und jeweils 60 µl davon in die Vorbereitungsplatte pipettiert. Auch dabei wurde immer mit Duplikaten gearbeitet. Nach der Inkubationszeit (und anschließendem Waschen) der ELISA-Platte wurden 50 µl aus allen Kavitäten der Vorbereitungsplatte in die ELISA-Platte überführt. Nach einer zehn-minütigen Inkubation wurden 50 µl des Tracers<sup>27</sup> in alle Kavitäten gegeben. Die Kavitäten des Blanks wurden ausgelassen und stattdessen mit 50 µl PBS-T befüllt. Die ELISA-Platte wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin drei Mal mit PBS-T gewaschen und abgeklopft. Während der Inkubationszeit konnte das BCM-7 des Standards und das BCM-7 aus den verdauten Milchproben an den Anti-BCM-7-Antikörper binden. Um diese Bindung konkurrierte der Tracer. Nach dem Waschen wurden 100 µl Streptavidin-POD in alle Kavitäten pipettiert. Das Streptavidin-POD bindet an das Biotin des Tracers. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die ELISA-Platte drei Mal gewaschen und abgeklopft. Im nächsten Schritt wurden 100 µl TMB-Substratlösung in jede Delle gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die POD katalysierte die Oxidation von TMB, wodurch ein Farbumschlag nach blau sichtbar wurde. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>28</sup> pro Delle gestoppt, wodurch ein Farbumschlag nach gelb stattfand. Die optische Dichte wurde folgend bei 450 nm für jede Delle in einem ELISA Reader<sup>29</sup> mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt.

### 3.3.2.1 Ermittlung der BCM-7 Konzentrationen

Anhand der OD-Werte wurde eine Standardkurve mit einer Auswertesoftware<sup>30</sup> erstellt. Mittels der Standardkurve wurden durch eine lineare Regression die BCM-7-

---

<sup>27</sup> Peps4Life, Heidelberg

<sup>28</sup> Morphisto, Offenbach

<sup>29</sup> Tecan, Crailsheim

<sup>30</sup> AAT Bioquest, Pleasanton, USA

Konzentrationen in den verdauten Milchproben ermittelt.

### **3.3.3 Statistische Auswertung**

Die ermittelten BCM-7-Konzentrationen der 18 *in vitro* verdauten A1-Milchen und 23 *in vitro* verdauten A2-Milchen wurden innerhalb der A1- und A2-Gruppe auf ihre Normalverteilung mit einem angepassten Jarque-Bera-Test überprüft, der sich auch für kleine Stichproben eignet (Ukponmwan et al. 2017). Die Daten erwiesen sich als normalverteilt, was ebenfalls durch die grafische Darstellung mittels Boxplots bestätigt wurde (siehe Punkt 4.2). Um die Homogenität der Varianzen zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurde ein Levene-Test durchgeführt. Dieser zeigte, dass die Varianzen nicht homogen zwischen den untersuchten Gruppen waren. Daraufhin wurde ein Welch-Test verwendet, um signifikante Unterschiede zu untersuchen, da dieser für normalverteilte Gruppen mit unterschiedlichen Varianzen geeignet ist (Reed 2005).

## 3.4 Immunhistochemie

### 3.4.1 Puffer und Lösungen

#### 4%ige Formalin-Fixierlösung

Formalin<sup>31</sup> 37% 100 ml

In 825 ml PBS lösen.

#### EDTA-Puffer

EDTA<sup>31</sup> (100 mM) 29,22 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen und pH auf 8,0 einstellen.

#### Citratpuffer (DAKO)

Dako REAL Target Retrieval Solution (10x)<sup>32</sup>

Vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen.

#### PBS-T, pH 7,4

Tween-20<sup>33</sup> (0,05%) 0,50 ml

In 1000 ml PBS (Kap. 2.1) lösen

#### Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 7,4

Tris<sup>34</sup> (100 mM) 1,21 g

NaCl<sup>35</sup> (150 mM) 8,80 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen und pH auf 7,4 einstellen.

#### TBS-T, pH 7,4

Tween-20<sup>33</sup> (0,05%) 0,50 ml

In 1000 ml TBS lösen.

---

<sup>31</sup> Sigma-Aldrich, Steinheim

<sup>32</sup> DAKO, Hamburg

<sup>33</sup> Th. Geyer, Renningen

<sup>34</sup> Carl Roth, Karlsruhe

<sup>35</sup> Applichem, Darmstadt

**Lösung zur Antikörperverdünnung**

BSA<sup>36</sup> (1%) 1,00 g

In 100 ml TBS-T lösen.

**Blockadelösung 1**

Eselserum (5%) 0,05 ml

BSA<sup>36</sup> (1%) 0,01 ml

In 100 ml TBS-T lösen.

**Blockadelösung 2**

Eselserum (20%) 0,20 ml

BSA<sup>36</sup> (1%) 0,01 ml

In 100 ml TBS-T lösen.

**Blockadelösung 3**

Eselserum (10%) 0,10 ml

BSA<sup>36</sup> (1%) 0,01 ml

In 100 ml TBS-T lösen.

---

<sup>36</sup> Serva, Heidelberg



**Folgende Antikörper wurden verwendet:**

Antikörper	Wirtsspezies	Typ	Firma/Herkunft	Verdünnung
eOPRM1	Kaninchen	polyklonal	Prof. Dr. Ammer, LMU München	1:200
Anti- Neurofilament 200	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:1000
Kaninchen IgG	Kaninchen	polyklonal	Prof. Dr. Ammer, LMU München	1:1600
Cy3 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti- Rabbit IgG (H+L)	Esel	polyklonal	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Großbritannien	1:500
AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti- Rabbit IgG (H+L)	Esel	polyklonal	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Großbritannien	20%
Alexa Fluor 488 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti- Rabbit IgG (H+L)	Esel	polyklonal	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Großbritannien	1:300

**3.4.2 Herstellung der Paraffinschnitte**

Vom Jejunum wurde ein intaktes 1 cm langes Segment in 4%iger Formalin-Fixierlösung in PBS für 72 Stunden fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dies erfolgte jeweils für 24 Stunden in Ethanol<sup>37</sup> mit Konzentrationen von 70%, 96% und 99%, sowie in Isopropanol<sup>37</sup> (85%) und Xylol<sup>37</sup>. Vor der Einbettung wurden die Schnitte jeweils für 24 Stunden in flüssigem Paraffin<sup>38</sup>

<sup>37</sup> CLN, Freising<sup>38</sup> Thermo Fisher Scientific, Bremen

1, 3, 6 und 9 gelagert. Anschließend wurden sie in Paraffin 9 eingebettet und ausgehärtet. Mit einem Rotationsmikrotom (Pfm Rotary 3006 EM<sup>39</sup>) wurden dann aus den paraffinierten Organproben Schnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt und auf Objektträger gezogen. Um ein Ablösen der histologischen Präparate während der immunhistochemischen Färbung zu verhindern, wurden die Objektträger 72 Stunden lang bei 39°C getrocknet. Danach wurden sie in Sammelboxen bis zur Verwendung gelagert.

### 3.4.3 Entparaffinieren der Paraffinschnitte

Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Dies erfolgte zweimal für je 5 Minuten in Xylol, anschließend jeweils 5 Minuten in Isopropanol<sup>40</sup>, 99% Ethanol<sup>40</sup>, 96% Ethanol<sup>40</sup> und 70% Ethanol<sup>40</sup>, und schließlich für 10 Minuten in destilliertem Wasser. Nach diesem Schritt wurden durch eine 15-minütige Kochung in EDTA-Puffer die maskierten Proteinepitope größtenteils freigelegt. Die Schnitte wurden dann für 10 Minuten im Eisbad abgekühlt und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Proteinepitope durch eine weitere 15-minütige Kochung in Citratpuffer vollständig freigelegt. Diese beiden Demaskierungsschritte waren notwendig, um die Epitope an den Strukturen wieder zugänglich für die Antikörper zu machen. Die histologischen Präparate auf den Objektträgern wurden mit einem PAP Pen<sup>41</sup> umrandet, um ein Verlaufen der Antikörperlösung während der späteren Färbung zu verhindern. Nach kurzem Antrocknen wurden die Schnitte für 15 Minuten in PBS-T umgepuffert.

### 3.4.4 Immunhistochemische Färbung

Zu Beginn wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 40 min mit einer Blockadelösung 1 aus TBS-T mit 1% BSA und 5% Eselserum bedeckt. Dieser Schritt diente der Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe. Nach Abklopfen der Blockadelösung erfolgte die Inkubation mit dem ersten primären Antikörper (anti-eOPRM1 Antikörper<sup>42</sup> in TBS-T + 1% BSA verdünnt) über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer. Der verwendete primäre Antikörper richtet sich gegen

---

<sup>39</sup> pfm medical, Köln

<sup>40</sup> CLN, Freising

<sup>41</sup> Sigma-Aldrich, Steinheim

<sup>42</sup> Prof. Dr. Ammer, LMU München

den intrazellulären C-Terminus des MOR. Er wurde im Kaninchen hergestellt und ist reaktiv gegen den MOR von Mensch, Maus, Pferd, Ratte und Schwein, da die Sequenz der antikörperbindenden Domäne bei diesen Spezies identisch ist. Jeweils ein Schnitt von jedem untersuchten Organ wurde als Isotypkontrolle mit Kaninchen IgG<sup>43</sup> (1:1600 verdünnt in TBS-T mit 1% BSA) inkubiert. Am nächsten Tag wurden drei Waschschrte in TBS-T zu je zehn Minuten durchgeführt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem ersten sekundären Antikörper (Cy3 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)<sup>44</sup> in TBS-T mit 1% BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Der Antikörper wurde im Esel hergestellt und ist mit dem Farbstoff Cyanine Cy3 konjugiert. Daraufhin wurden wieder drei Waschschrte in TBS-T zu je fünf Minuten durchgeführt. Nun erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit der Blockadelösung 2 aus TBS-T mit 1% BSA und 20% Eseserum. Die Blockadelösung 2 wurde daraufhin abgeklopft und es folgte die Inkubation mit dem zweiten sekundären Antikörper (20% AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)<sup>44</sup> in TBS-T mit 1% BSA) über Nacht. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte in TBS-T zu je zehn Minuten. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der Blockadelösung 3 aus TBS-T und 10% Eseserum für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach Abklopfen der Blockadelösung 3 erfolgte die Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper (IgG Rabbit Anti-Neurofilament 200<sup>45</sup>, in TBS-T mit 1% BSA) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag erfolgten 3 Waschschrte mit TBS-T zu je zehn Minuten. Darauf folgte die Inkubation mit dem dritten sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)<sup>44</sup> in TBS-T mit 1% BSA) und gleichzeitig mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)<sup>46</sup> (verdünnt 1:1000 in TBS-T und BSA 1%) zur Kernfärbung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dann dreimal in TBS-T für jeweils zehn Minuten gewaschen und abschließend mit Fluoromount Medium<sup>47</sup> und 22 x 40 mm Deckgläsern<sup>48</sup> eingedeckelt. Nach dem Trocknen erfolgte die Beurteilung und Dokumentation der Färbungen mit einem Leica DMI8 Mikroskop<sup>49</sup> und der dazugehörigen LAS-X-Software<sup>49</sup>.

---

<sup>43</sup> Prof. Dr. Ammer, LMU München

<sup>44</sup> Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Großbritannien

<sup>45</sup> Sigma-Aldrich, Steinheim

<sup>46</sup> Carl Roth, Karlsruhe

<sup>47</sup> Serva, Heidelberg

<sup>48</sup> VWR, Belgien

<sup>49</sup> Leica, Wetzlar

## 3.5 Kontraktionsversuch

### 3.5.1 Lösungen und Puffer

#### Krebs-Puffer, pH 7,4

NaCl <sup>50</sup> (113 mM)	6,60 g
KCl <sup>51</sup> (4,7 mM)	0,35 g
CaCl <sub>2</sub> x2(H <sub>2</sub> O) <sup>52</sup> (2,5 mM)	0,37 g
MgSO <sub>4</sub> x7(H <sub>2</sub> O) <sup>52</sup> (1,2 mM)	0,29 g
Glucose <sup>53</sup> (5,6 mM)	2,22 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>52</sup> (1,18 mM)	0,16 g
NaHCO <sub>3</sub> <sup>54</sup> (20 mM)	1,68 g

In 1000 ml Aqua dest. lösen.

#### Aqua ad injectabilia<sup>55</sup> (Aqua inj.)

#### Morphin-Sulfat-Verdünnungen

Morphin-Sulfat-Pentahydrat <sup>53</sup> (100 mM)	75,88 mg
---	----------

In 1 ml Aqua inj. lösen.

Die folgenden Verdünnungen wurden aus der 100 mM-Verdünnung durch Verdünnung in Aqua inj. hergestellt:

- Morphin-Sulfat-Pentahydrat<sup>53</sup> (50 mM)
- Morphin-Sulfat-Pentahydrat<sup>53</sup> (10 mM)
- Morphin-Sulfat-Pentahydrat<sup>53</sup> (1 mM)
- Morphin-Sulfat-Pentahydrat<sup>53</sup> (0,1 mM)

---

<sup>50</sup> Applichem, Darmstadt

<sup>51</sup> Carl Roth, Karlsruhe

<sup>52</sup> Merck, Darmstadt

<sup>53</sup> Sigma Aldrich, Steinheim

<sup>54</sup> neoLab, Heidelberg

<sup>55</sup> Braun, Melsungen

**Naloxon-Hydrochlorid-Verdünnungen**

Naloxon-Hydrochlorid-Dihydrat<sup>56</sup> (50 mM) 20,00 mg

Naloxon-Hydrochlorid-Dihydrat<sup>56</sup> (10 mM) 4,00 mg

Jeweils in 1 ml Aqua inj. lösen.

**BCM-7-Verdünnungen**

BCM-7<sup>57</sup> (200 mM) 148 mg

BCM-7<sup>57</sup> (100 mM) 79,00 mg

Die folgenden Verdünnungen wurden aus der 100 mM-Verdünnung durch Verdünnung in Aqua inj. hergestellt:

BCM-7<sup>57</sup> (50 mM)

BCM-7<sup>57</sup> (10 mM)

BCM-7<sup>57</sup> (1 mM)

**Tetrodotoxin-Lösung (TTX)**

Tetrodotoxin-citrat<sup>58</sup> (1 mM) 1,00 mg

In 3,13 ml Aqua inj. lösen.

**3.5.2 Aufbau des Muskelkontraktionsmessplatzes**

Der Muskelkontraktionsmessplatz wurde von der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover entwickelt und gebaut. Der Muskelkontraktionsmessplatz zur Untersuchung der Kontraktionen bestand aus acht separaten Organbädern<sup>59</sup> aus Plexiglas. Die Organbäder waren nach oben hin offen und verfügten am tiefsten Punkt über einen verschließbaren Ablauf zum Wechsel der Pufferlösung. Sie verfügten über ein totales Volumen von jeweils 100 ml. Im Versuch wurde nur ein Volumen von 30 ml verwendet. Der Krebs-Puffer in den Organbädern wurde kontinuierlich mit Carbogen feinperlig über eine Mikrokapillare<sup>60</sup> begast, um einen konstanten pH-Wert sicherzustellen. Jedes Organbad war so aufgebaut, dass es von einer integrierten, sie seitlich komplett umschließenden Heizkammer umgeben wurde. Die integrierte Heizkammer wurde mit Wasser durchspült und temperierte das Organbad auf die gewünschte Temperatur von 38,5°C, wie sie physiologisch beim Schwein vorkommt (Koch et al. 2023). Jede

---

<sup>56</sup> Sigma Aldrich, Steinheim

<sup>57</sup> Peps 4LS, Heidelberg

<sup>58</sup> Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt

<sup>59</sup> MEKU Erich Pollähne, Wennigsen

<sup>60</sup> Brand, Wertheim

Heizkammer kommunizierte über einen Zu- und Ablauf mit einem Umwälz- und Wärmebad<sup>61</sup>, das das Heizwasser zu den Organbädern pumpte und auf die voreingestellte Temperatur aufheizte. Der zu untersuchende Muskelstreifen wurde mit einem Ende an die Öse einer Blasenwand<sup>62</sup> geknotet und mit dieser Blasenwand im Organbad fixiert. Alle Organbäder waren an einer Haltevorrichtung statisch fixiert. An dieser Haltevorrichtung war jeweils pro Organbad ein Kraftsensor, in Form einer Plattform-Wägezelle<sup>63</sup> angebracht, an den das andere Ende eines zu untersuchenden Muskelstreifen über einen langen Faden fixiert wurde. Jeder Kraftsensor war in der Höhe über eine Einbaumessschraube<sup>64</sup> justierbar, um die Muskelstreifen auf die gewünschte Vorspannung von 10 mN zu spannen. Ein Kraftsensor konnte Kräfte zwischen 0,5 mN bis 3 N detektieren. Das Messsignal der Kraftsensoren wurde über einen 8-Kanal-Messverstärker<sup>63</sup> verarbeitet und an die Mess- und Analysesoftware (catman<sup>63</sup>) auf einen Computer übertragen und gespeichert. Pro Sekunde wurden zehn Werte gespeichert (Messfrequenz: 10 Hz).

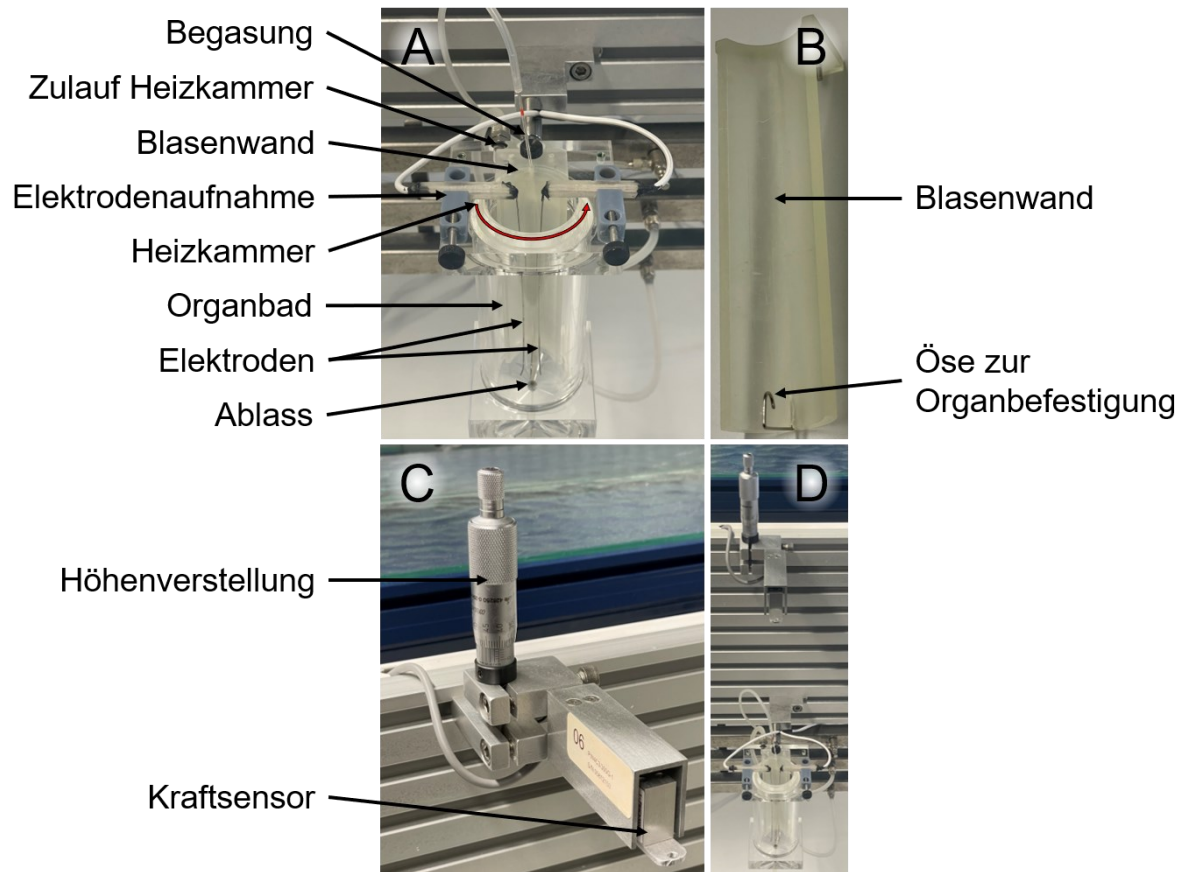
---

<sup>61</sup> B. Braun, Melsungen

<sup>62</sup> TiHo, Hannover

<sup>63</sup> HBM, Darmstadt

<sup>64</sup> Hoffmann Group, Bremen



**Abbildung 2: Aufbau des Muskelkontraktionsmessplatzes.** A: Ein Organbad ohne Puffer und Muskelstreifen ist dargestellt. B: Die Blasenwand zur Aufnahme des Muskelstreifens und Fixation im Organbad. C: Der zugehörige höhenverstellbare Kraftsensor. D: Überblick über ein Organbad mit zugehörigem Kraftsensor.

### 3.5.3 Vorbereitung des Probenmaterials

Die Präparation der Darmmuskulatur wurde maximal sechs Stunden nach Entnahme des Gewebes durchgeführt. Direkt nach Ankunft im Labor wurde ein drei Zentimeter langes Segment des Jejunums abgeschnitten, entlang des Mesenteriums aufgeschnitten und erneut in frischem Krebs-Puffer (21°C) gewaschen. Das Darmstück wurde dann in eine mit einem Silikonelastomer (Sylgard-184<sup>65</sup>) beschichtete Petrischale (Durchmesser 15 cm) überführt, sodass die Tunica mucosa nach oben zeigte. Die Petrischale wurde mit frischem Krebs-Puffer (21°C) befüllt. Der Krebs-Puffer in der Petrischale wurde alle 10 Minuten erneuert. Das Jejunum wurde mit feinen Minutiennadeln<sup>66</sup> auf dem Silikonelastomer befestigt und zart über 360° gespannt, bis das Gewebe keine Falten mehr aufwies (siehe Abbildung 3, A). Dabei wurde darauf geachtet, dass der Darm longitudinal entlang des Hilfsrasters der

<sup>65</sup> MAVOM, Steinfurt

<sup>66</sup> Bioform, Nürnberg

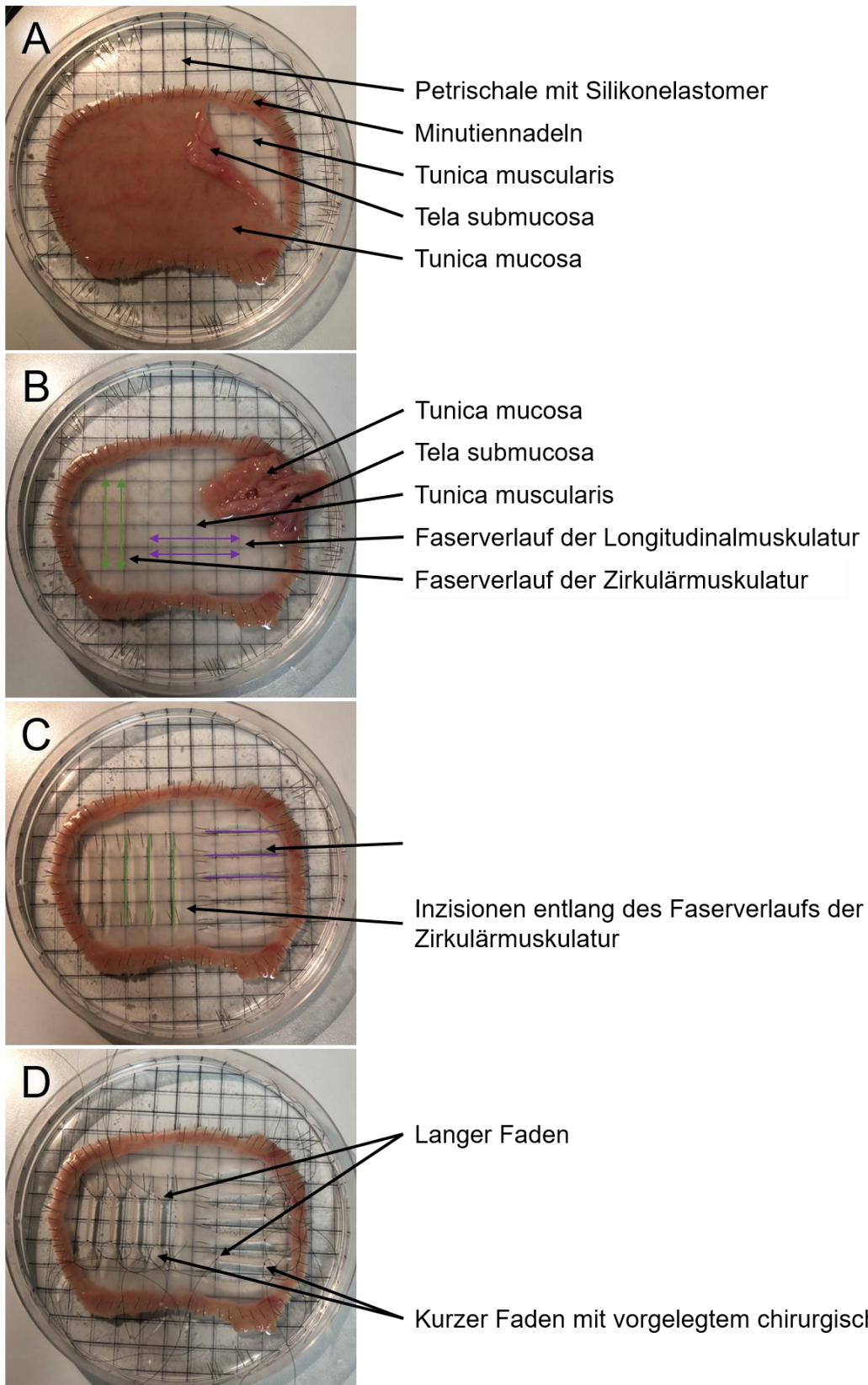
Petrischale aufgespannt wurde. Anschließend wurden die Tunica mucosa und die Tela submucosa vorsichtig von der Tunica muscularis mit einer Mikroschere<sup>67</sup> abpräpariert (siehe Abbildung 3, A). Der Verlauf des oberliegenden Stratum circulare (im Folgenden Zirkulärmuskulatur genannt) war aufgrund des Faserverlaufs gut erkennbar (siehe Abbildung 3, B). Der Verlauf des Stratum longitudinale (im Folgenden Longitudinalmuskulatur genannt) wurde im rechten Winkel dazu angenommen. Entlang des Faserverlaufs der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur wurden jeweils 3 cm x 1 cm große Areale abgesteckt (siehe Abbildung 3, C). Diese wurden entlang der langen Seite eingeschnitten, um drei Zentimeter lange Muskelstreifen zu erhalten, die jedoch noch an den Enden mit der restlichen Muskelschicht verbunden waren (siehe Abbildung 3, C). An beiden Enden wurden diese Muskelstreifen so verknotet, dass sie eine Länge von zwei Zentimetern aufwiesen (siehe Abbildung 3, D). Dazu wurde ein langer Faden<sup>68</sup> an einem Ende und ein kurzer Faden<sup>68</sup> am anderen Ende verwendet (siehe Abbildung 3, D). Nachdem der kurze Faden festgeknotet wurde, wurde ein chirurgischer Knoten vorgelegt, aber nicht festgezogen (siehe Abbildung 3, D).

---

<sup>67</sup> Bioform, Nürnberg

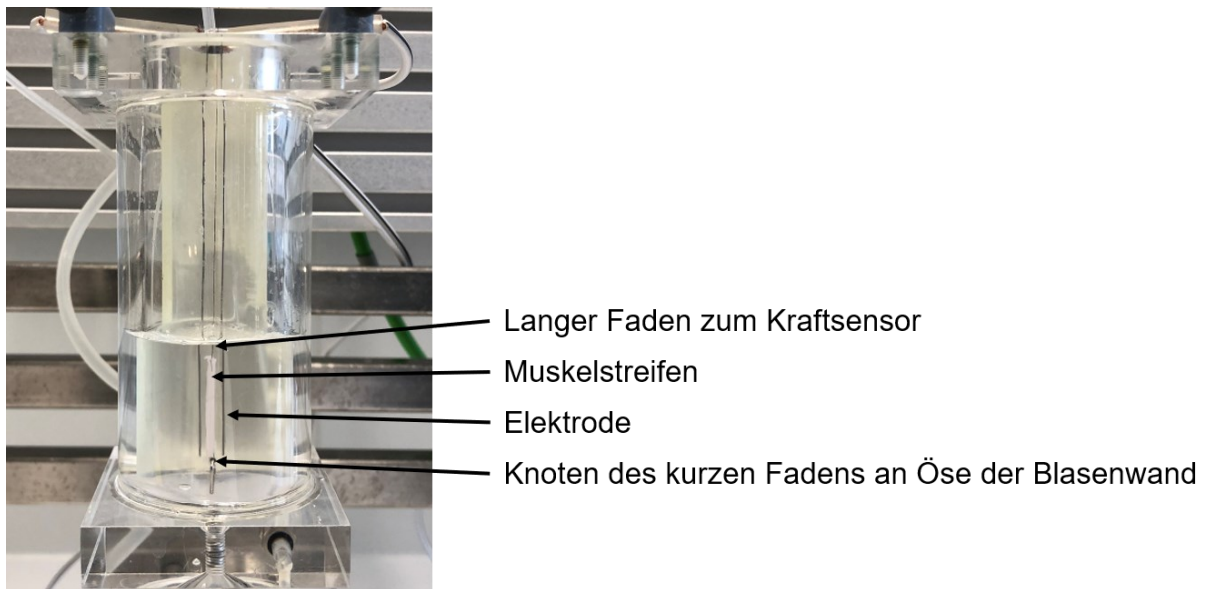
<sup>68</sup> Prym, Stolberg





**Abbildung 3: Präpariervorgang am Jejunum des Schweins.** A: Das Darmstück wird aufgespannt und die Tunica mucosa mit der Tela submucosa abpräpariert. B, C: Anhand des Faserverlaufs wurden die Muskelstreifen abgesteckt und entlang der Muskelfasern seitlich eingeschnitten. D: Jeweils ein kurzer Faden wurde an ein Ende des Muskelstreifens und ein langer Faden an das andere Ende des Muskelstreifens geknotet.

Die Muskelstreifen wurden dann von der restlichen Muskulatur eng an den Knoten abgetrennt und mit dem kurzen Faden an die Öse einer Blasenwand<sup>69</sup> geknotet (siehe Abbildung 4). Die Blasenwand diente als Träger des Muskelstreifens und wurde folgend im Organbad festgeschraubt (siehe Abbildung 4). Nach der Kalibrierung der Kraftsensoren wurde der lange Faden am freien Ende des Muskelstreifens an den Kraftsensor geknotet. Die Muskelstreifen wurden auf eine Vorspannung mit einer Kraft von 10 mN gebracht. Es konnten bis zu acht Muskelstreifen simultan untersucht werden. Die Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur jedes Schweins wurde jeweils in technischen Duplikaten untersucht. Durch den Krebs-Puffer wurden die Muskelstreifen vital gehalten und mit Mineralien und Glukose versorgt. Nach 30 Minuten erfolgte standardmäßig ein Pufferwechsel in jedem Organbad.



**Abbildung 4: Eingehängter Muskelstreifen im Organbad.** Das Organbad wurde mit 30 ml Krebs-Puffer befüllt. Der Muskelstreifen ist mit einem Ende (kurzer Faden) an die Öse der Blasenwand geknotet. Das zweite Ende des Muskelstreifens ist über einen langen Faden mit dem Kraftsensor verbunden (nicht dargestellt). Hinter der blass-gelben Blasenwand liegt die Kapillare zur Begasung des Krebs-Puffers mit Carbogen.

<sup>69</sup> HBM, Darmstadt

### **3.5.4 Durchführen des Kontraktionsversuchs**

#### **3.5.4.1 Untersuchung der spontanen Kontraktionen**

Die Kontraktionsmessung begann mit dem Einhängen der Muskelstreifen in ein Organbad. Nach 30 Minuten wurde ein Pufferwechsel in jedem Organbad durchgeführt. Die Motilität des Darms in den ersten 10 Minuten nach der Äquilibration diente als Ausgangsmotilität. Dann wurden die zu untersuchenden Stoffe (30 µl von Aqua inj., BCM-7, Morphin-Sulfat, Naloxon-Hydrochlorid oder TTX) zu den 30 ml eines Organbads pipettiert und dadurch 1:1000 verdünnt. Pro Applikation wurden 10 Minuten für eine potenzielle Wirkung abgewartet, bevor ein weiterer Stoff appliziert oder ein Versuch beendet wurde.

#### **3.5.4.2 Untersuchungen der EFS-induzierten Kontraktionen**

Die elektrische Feldstimulation (EFS) wurde pro Organbad über zwei monopolare Platinelektroden<sup>70</sup> vermittelt. Die Elektroden wurden seitlich eines Muskelstreifens im Abstand von einem Millimeter zum Gewebe platziert (siehe Abbildung 11). Die elektrischen Reize wurden mit einem Reizgenerator (Grass S88X<sup>71</sup>) erzeugt. Dabei handelte es sich um Rechteckimpulse mit einer Spannung von 30 Volt und einer Impulsdauer von 0,9 Millisekunden in einer Frequenz von 20 Hertz für eine Dauer von 300 Millisekunden. Jedes Organbad wurde separat von den anderen stimuliert. Es erfolgte pro Minute eine EFS pro Organbad. Zur Untersuchung der Wirkung der Stoffe auf die EFS-induzierten Kontraktionen wurden die Stoffe nach dem gleichen Ablauf wie in der Untersuchung auf die spontanen Kontraktionen in die Organbäder pipettiert. Bevor der erste Stoff appliziert wurde, wurde für mindestens zehn Minuten elektrisch stimuliert. Die Kontraktionsantworten auf die EFS der ersten zehn Minuten dienten als Ausgangskontraktionen für die spätere Auswertung.

#### **3.5.4.3 Auswertung der Kontraktionsdaten**

##### **3.5.4.3.1 Auswertung der spontanen Kontraktionen**

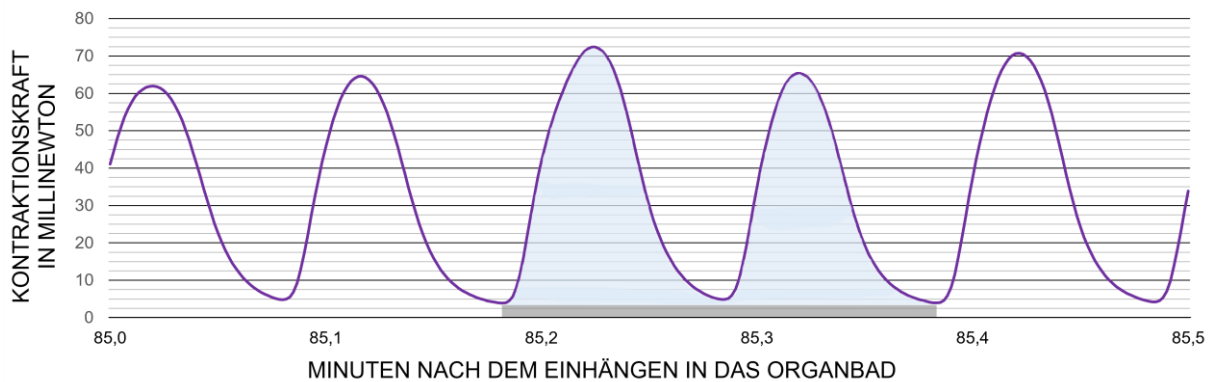
Es kam gelegentlich vor, dass ein Muskelstreifen keine Kontraktionen zeigte, weshalb dieser ausgeschlossen wurde. Die Kontraktionen der Muskelstreifen wurden als Kraft

---

<sup>70</sup> TiHo, Hannover

<sup>71</sup> GRASS Technologies, Warwick, USA

in Newton [N] pro Zeiteinheit [s] gemessen. Um eine Aussage über die spontane Motilität der Muskelstreifen zu treffen, wurde die Fläche unter der Messkurve berechnet. Dazu wurde aus den Messwerten über einen definierten Zeitraum von fünf Minuten das Integral der Messkurven ermittelt. Jede 100 Millisekunden wurde eine Kraftmessung durchgeführt (Messfrequenz 10 Hz). Mit jedem dieser Messwerte wurde die Fläche eines Rechtecks berechnet. Die Höhe des Rechtecks bildete die Kraft eines Messpunktes in Newton und die Breite das Messintervall von 100 Millisekunden. Die Summe aller Rechtecke für den zu betrachtenden Zeitraum ergab annäherungsweise das Integral der Messkurven. Um die Grundspannung eines Muskelstreifens nicht in das Integral einzubeziehen, wurde die Fläche aus der Grundspannung und dem Zeitintervall von dem ermittelten Integral subtrahiert (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Berechnung des Integrals.** Die Messkurve (lila) repräsentiert die Kontraktionskraft eines Muskelstreifens im Zeitverlauf. Das Integral über einen Zeitraum wurde blau dargestellt. Das Integral der Grundspannung ist grau dargestellt.

Die Formel zur Berechnung des Integrals lautet wie folgt:

$$A = \sum_{i=1}^n (F_i \times t) - (F_{\text{Grundspannung}} \times t_{\text{Gesamt}})$$

Hierbei ist:

A die bereinigte Fläche unter der Kurve,

n die Anzahl der Messungen über den betrachteten Zeitraum,

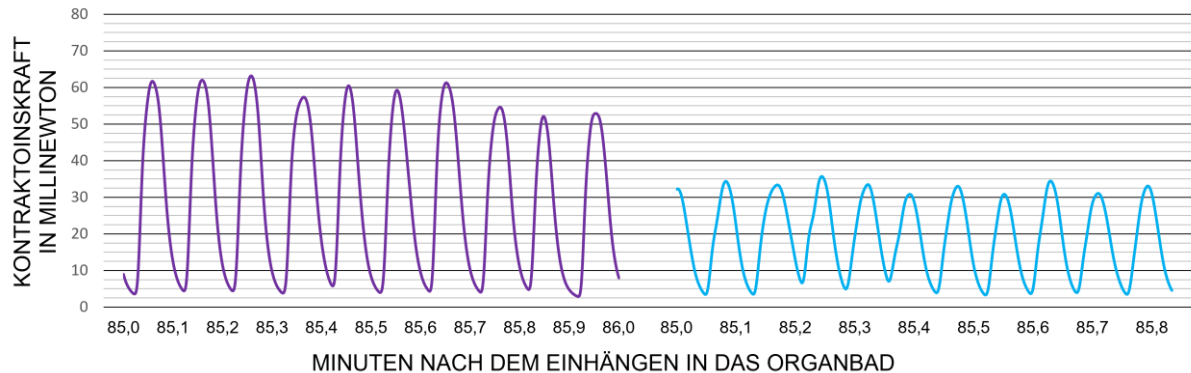
$F_i$  die Kraft des  $i$ -ten Messpunktes in Newton,

t das Zeitintervall zwischen den Messungen in Sekunden,

$F_{\text{Grundspannung}}$  die Grundspannung des Muskelstreifens in Newton und

$t_{\text{Gesamt}}$  die Gesamtdauer des betrachteten Zeitraums in Sekunden.

Die Muskelstreifen zeigten teils große Varianzen in den Kontraktionsstärken. Auch zwischen zwei technischen Replikaten wurden große Unterschiede in der Kontraktionskraft festgestellt (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Varianzen in der Kontraktionskraft technischer Replikate.** Dargestellt sind zwei Messkurven technischer Replikate. Die Amplituden der Messkurve eines Replikats (lila) sind höher als die Amplituden der Messkurve des anderen Replikats (blau).

Um die Wirkung der applizierten Stoffe zwischen mehreren Muskelstreifen vergleichen zu können, wurde für jeden Muskelstreifen ein Index gebildet, der das Ausmaß der Motilitätsänderung unabhängig der absoluten Werte angibt.

Die dazu verwendete Formel lautet wie folgt: 
$$\text{Motilitätsindex} = \frac{A_{\text{nach Stoffapplikation}}}{A_{\text{Ausgangsmotilität}}}$$

Der Motilitätsindex vergleicht die Motilität des Muskelstreifens nach der Stoffapplikation mit seiner Ausgangsmotilität. Ein Motilitätsindex von 1 bedeutet keine Veränderung der Motilität. Ein Index kleiner als 1 deutet auf eine Hemmung der Motilität hin, während ein Index größer als 1 auf eine Steigerung der Motilität hinweist.

### 3.5.4.3.2 Auswertung der EFS-induzierten Kontraktionen

Da im Gegensatz zur spontanen Motilität kein Zeitintervall, sondern jeweils nur die einzelnen EFS-induzierten Kontraktionen untersucht wurden, wurden zur Bewertung der Kontraktionsantwort auf die EFS nach einer Stoffapplikation nur die Amplituden als Stärke einer EFS-induzierten Kontraktion betrachtet. Pro Stoffapplikation wurden in einem Zeitraum von zehn Minuten auch zehn EFS-induzierte Kontraktionen gemessen. Von den letzten fünf Kontraktionen wurde die durchschnittliche Amplitudenhöhe ermittelt. Die letzten fünf Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen vor der ersten Stoffapplikation dienten als Ausgangsamplituden. Da die Kraft der EFS-induzierten Kontraktionen auch bei technischen Replikaten

unterschiedlich stark ausfiel, wurde ein Quotient aus den ermittelten Amplituden nach der Stoffapplikation und den Ausgangsamplituden eines jeden Darmstücks gebildet, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dadurch ergab sich der Amplitudenindex.

Die Formel lautet wie folgt: 
$$\text{Amplitudenindex} = \frac{\text{Amplitude nach Stoffapplikation}}{\text{Amplitude vor Stoffapplikation}}$$

Ein Amplitudenindex größer als 1 deutet auf eine Steigerung der EFS-induzierten Kontraktionen hin, während ein Index kleiner als 1 auf eine Hemmung der Kontraktionen hinweist.

### 3.5.5 Statistik

#### 3.5.5.1 Datenauswertung und grafische Darstellung

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Software catman<sup>72</sup> zur initialen Datenvorbereitung, sowie Excel 2016<sup>73</sup> für die Datenaufbereitung und -analyse. Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2016<sup>73</sup> und GraphPad Prism5<sup>74</sup> visualisiert und mithilfe von RStudio<sup>75</sup> wurde die statistische Analyse durchgeführt.

#### 3.5.5.2 Statistische Analyse

Die ermittelten Indizes wurden mithilfe eines angepassten Jarque-Bera-Tests auf ihre Normalverteilung überprüft, der auch für kleine Stichproben geeignet ist (Ukponmwan et al. 2017). Die Daten bestätigten ihre Normalverteilung, was zusätzlich durch die grafische Darstellung mittels Boxplots verdeutlicht wurde (siehe Abschnitt 4.3). Zur Beurteilung der Homogenität der Varianzen zwischen den Gruppen wurde ein Levene-Test durchgeführt, der zeigte, dass die Varianzen zwischen den untersuchten Gruppen nicht homogen waren. Daraufhin wurde eine Welch-Anova angewendet, um mögliche signifikante Unterschiede zu ermitteln, da diese Methode für normalverteilte Gruppen mit unterschiedlichen Varianzen geeignet ist (Reed 2005). Im Falle signifikanter Unterschiede wurde der Games-Howell-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  festgelegt.

---

<sup>72</sup> HBM, Darmstadt

<sup>73</sup> Microsoft Corporation, Redmond, USA

<sup>74</sup> GraphPad Software, Boston, USA

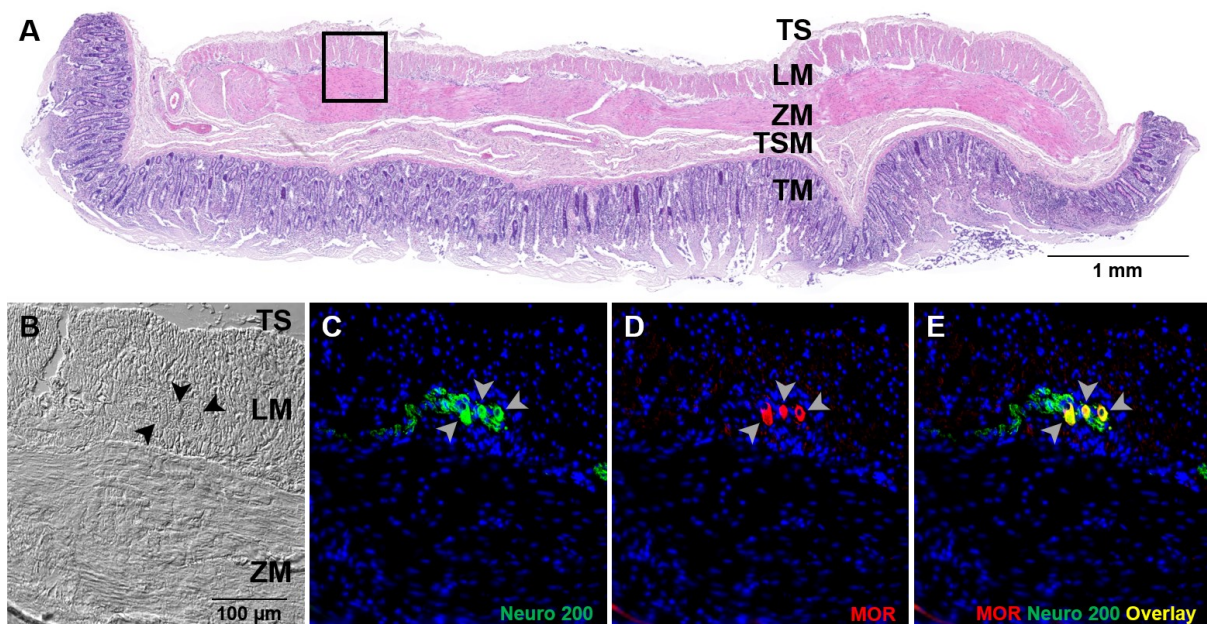
<sup>75</sup> Posit Software, Boston, USA



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Immunhistochemischer Nachweis des MOR im porcinen Jejunum

Nach dem Konsum von A1-Milch, soll das entstehende BCM-7 die Motilität des Darms reduzieren, indem es agonistisch an den MOR der enterischen Neurone bindet und die Signaltransduktion verhindert (North et al. 1983; Daniel et al. 1990). Da in der Literatur keine Auskunft über die Expression des MOR im proximalen Jejunum des Schweins gegeben wird (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024), wurde der MOR im Rahmen dieser Doktorarbeit vorab im proximalen Jejunum von fünf Schweinen als potenzielle Bindungsstelle für BCM-7 lokalisiert. Mittels immunhistochemischer Färbung wurden neurogene, in Ganglien organisierte Strukturen des myenterischen Plexus in der Tunica muscularis zwischen dem Stratum circulare und dem Stratum longitudinale des submukösen Plexus in der Tela submucosa im proximalen Jejunum aller Schweine nachgewiesen (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Auf den neuronalen Zellkörpern der Ganglien des myenterischen Plexus des proximalen Jejunums aller Schweine (n=5) wurde der MOR ebenfalls immunhistochemisch lokalisiert (siehe Abbildung 7).

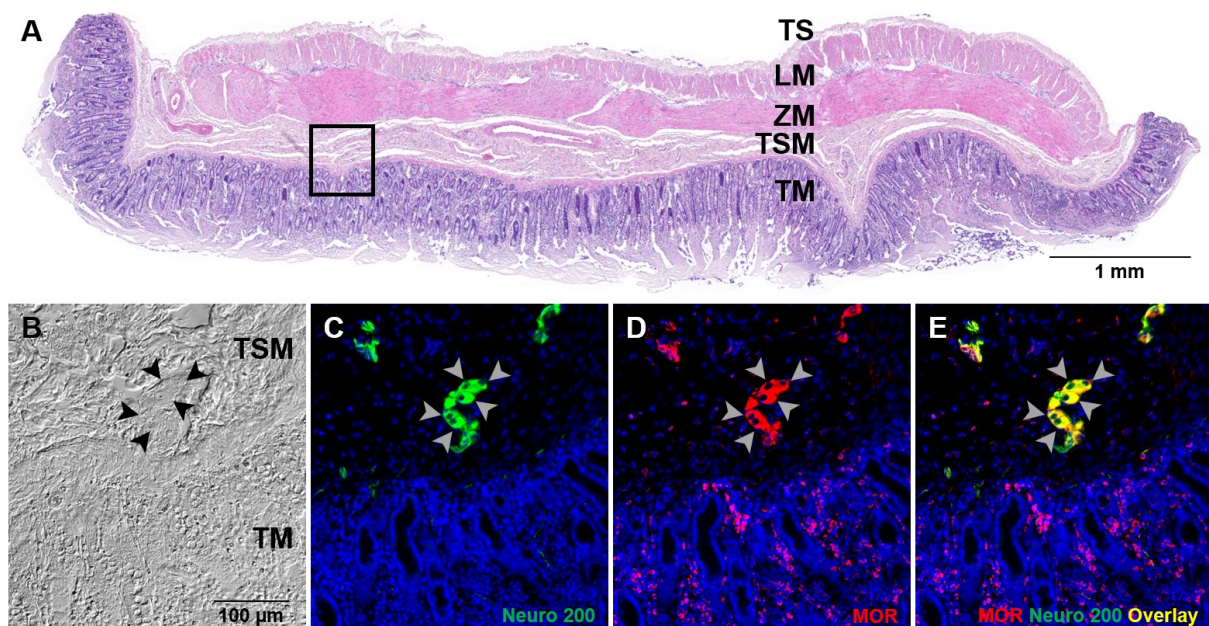


**Abbildung 7: Nachweis des MOR auf Neuronen des myenterischen Plexus.** A: Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient als Überblick und zur Orientierung im Querschnitt des porcinen Jejunums. Die Darmwand setzt sich von innen nach außen aus der Tunica mucosa (TM), der Tela submucosa (TSM), der Tunica muscularis mit der Zirkulärmuskulatur (ZM) und der Longitudinalmuskulatur (LM) und der Tunica serosa (TS) zusammen. Das schwarze Rechteck repräsentiert den Bild-Ausschnitt der folgenden



Darstellungen. B: Der Differenzial-Interferenz-Kontrast (DIC) zeigt die Oberflächenstruktur der Tunica muscularis im Querschnitt. C: Das Neurofilament 200 (grün) wurde von neuronalen Strukturen des myenterischen Plexus gebildet. D: Der MOR (rot) war auf Nervenzellkörpern der myenterischen Ganglien nachweisbar. Eine schwache Immunoreaktivität des MOR ist um das myenterische Ganglion und in der Longitudinalmuskulatur erkennbar. E: Ein Overlay (gelb) zeigt die Ko-Expression von MOR (rot) auf den Nervenzellen (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Pfeile markieren die Nervenzellkörper eines Ganglions des myenterischen Plexus.

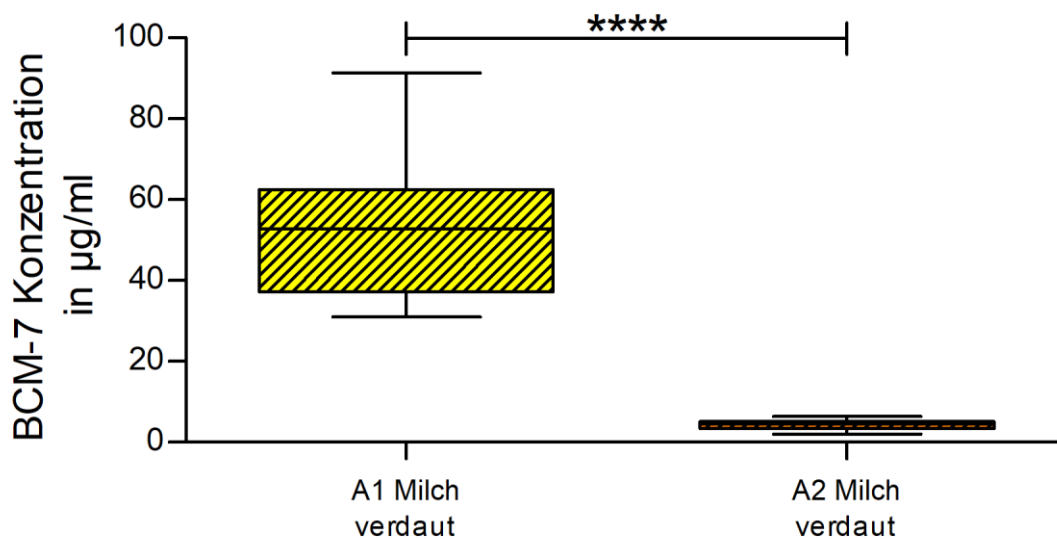
Neben den Neuronen des myenterischen Plexus wurde der MOR auch auf den neuronalen Zellkörpern der Ganglien des submukösen Plexus und auf Krypten-nahen Zellen der Lamina propria mucosae des proximalen Jejunums aller Schweine nachgewiesen (n=5) (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Nachweis des MOR auf Neuronen des submukösen Plexus und Krypten-nahen Zellen.** A: Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient als Überblick und zur Orientierung im Querschnitt des porcinen Jejunums. Die Darmwand setzt sich von innen nach außen aus der Tunica mucosa (TM), der Tela submucosa (TSM), der Tunica muscularis mit der Zirkulärmuskulatur (ZM) und der Longitudinalmuskulatur (LM) und der Tunica serosa (TS) zusammen. Das schwarze Rechteck repräsentiert den Bild-Ausschnitt der folgenden Darstellungen. B: Die DIC-Aufnahme zeigt die Oberflächenstruktur der Tunica mucosa und Tela submucosa. C: Das Neurofilament 200 (grün) wurde von neuronalen Strukturen des submukösen Plexus gebildet. D: Der MOR (rot) war auf Nervenzellkörpern der submukösen Ganglien nachweisbar. In der Tunica mucosa exprimierten Krypten-Nahe Zellen ebenfalls den MOR (rot). E: Ein Overlay (gelb) zeigt die Expression von MOR (rot) auf den Nervenzellen (grün). Die MOR-exprimierenden Zellen (rot) in der Tunica mucosa wiesen keine neurogenen Strukturen auf. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Pfeile markieren die Nervenzellkörper eines Ganglions des submukösen Plexus.

## 4.2 BCM-7-Konzentration in *in vitro* verdauter A1- und A2-Milch

Da der Konsum von A1-Milch, aber nicht der Konsum von A2-Milch, mit opioiden Wirkungen auf die Darmmotilität durch BCM-7 auf den Magen-Darm-Trakt assoziiert wurde (Jeong et al. 2023), war es vorab interessant zu untersuchen, wie viel BCM-7 während des Verdauungsprozesses in den A1- und A2-Milchen entsteht, um diese dann folgend im Kontraktionsversuch an der Muskulatur des porcinen Jejunums einzusetzen. Um die Theorie der vermehrten BCM-7-Entstehung während des Verdauungsprozesses aus A1-Milch zu überprüfen, wurden folgend 18 A1-Milchen und 23 A2-Milchen von jeweils homozygoten A1- oder A2-Rindern einer *in-vitro*-Verdauung mit simulierten Magen- und Darmphasen unterzogen und anschließend auf die BCM-7-Konzentrationen hin untersucht. In den *in vitro* verdauten A2-Milchen wurde durchschnittlich  $4,4 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 nachgewiesen, während in den A1-Milchen signifikant höhere BCM-7-Konzentrationen von durchschnittlich  $52,4 \pm 15,2 \mu\text{g/ml}$  ermittelt wurden (siehe Abbildung 9).



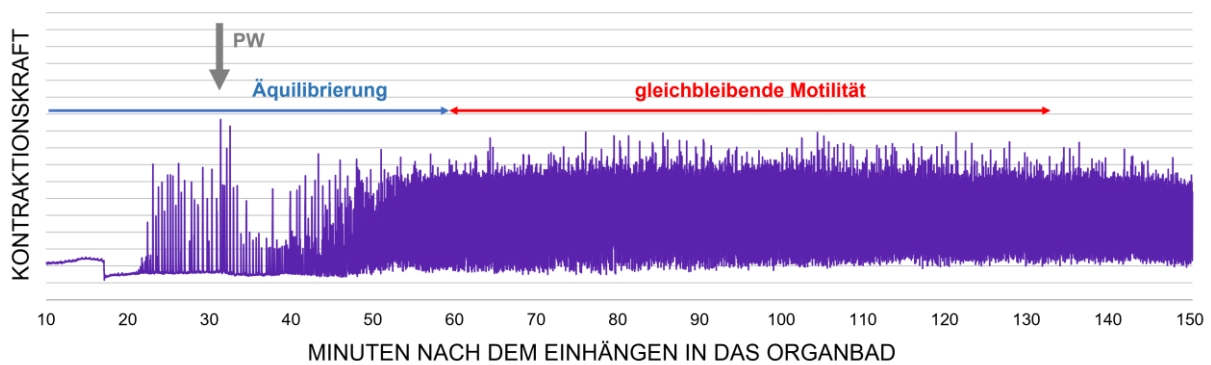
**Abbildung 9: BCM-7 Konzentrationen in *in vitro* verdauten A1- und A2-Milchen.** Nach der *in-vitro*-Verdauung wurde in den A1-Milchen (gelb, schräg-gestreift, n=18) eine signifikant höhere BCM-7-Konzentration als in den A2-Milchen (orange, quer-gestreift, n=23) nachgewiesen. Die A1-Milchen enthielten durchschnittlich  $52,4 \pm 15,2 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 und die A2-Milchen  $4,4 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$  BCM-7. Es wurde ein Welch-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen; \*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ .

### **4.3 Wirkung von Morphin, BCM-7 und *in vitro* verdauter A1- und A2-Milch auf die Darmkontraktion**

Nachdem der MOR als potenzielle Bindungsstelle auf den Neuronen des myenterischen und submukösen Plexus im porcinen proximalen Jejunum lokalisiert wurde, wurde die Wirkung von BCM-7 auf die Motilität des Jejunums am Muskelkontraktionsmessplatz untersucht. Dazu betrachteten wir die Longitudinalmuskulatur getrennt von der Zirkulärmuskulatur. Als Kontrollsubstanz einer agonistischen MOR-spezifischen Wirkung wurde Morphin-Sulfat eingesetzt.

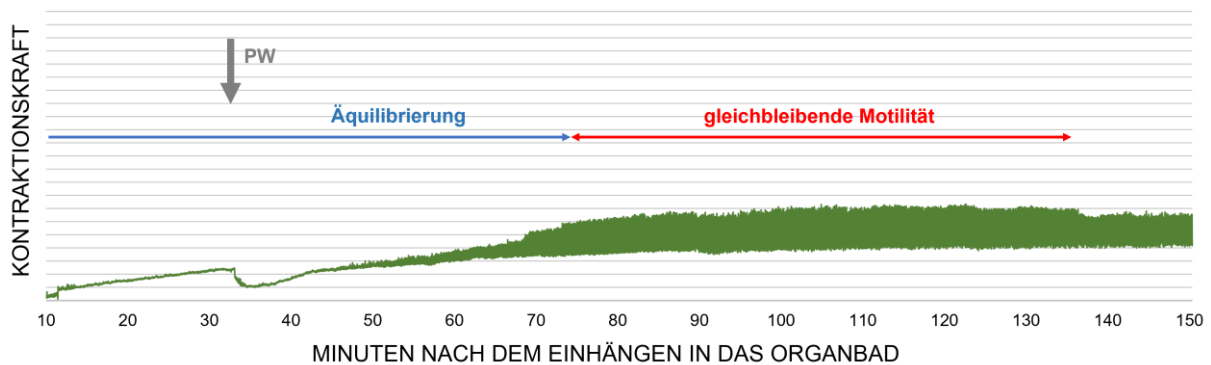
#### **4.3.1 Physiologische Spontanmotilität**

In der Literatur wurden Opioide neben einer neural-vermittelten, motilitätshemmenden Wirkung auch mit einer erregenden Wirkung beschrieben, die durch eine präsynaptische Hemmung der inhibitorischen Neurone vermittelt wird (Allescher 2020). Daher wurde zuerst eine mögliche Wirkung von BCM-7 auf die myogen-induzierten spontanen Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur untersucht. Vorerst wurde ein geeigneter Versuchsablauf und die Äquilibrationdauer ermittelt, die die Muskelstreifen benötigten, um sich gleichbleibend spontan zu kontrahieren. Die Muskelstreifen der Longitudinalmuskulatur zeigten nach dem Einhängen am Muskelkontraktionsmessplatz eine Zunahme der Motilität bis Minute  $60,4 \pm 5,3$  min (n=5). Nach der Äquilibration blieben die Kontraktionen überwiegend konstant und nutzbar für die folgenden Versuche, bis sie ab der 135. Minute langsam schwächer wurden (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Spontane Motilität der Longitudinalmuskulatur.** Die Messkurve zeigt die Kontraktionskraft der Longitudinalmuskulatur (lila) im Zeitverlauf. In der 30. Minute erfolgte ein Pufferwechsel (grauer Pfeil, PW). Die Motilität der Longitudinalmuskulatur steigerte sich bis zur 60. Minute (Äquilibration, blauer Pfeil). Ab der 60. bis zur 135. Minute blieb die Motilität überwiegend einheitlich (roter Doppelpfeil).

Die Muskelstreifen der Zirkulärmuskulatur zeigten nach dem Einhängen in das Organbad eine Zunahme der Motilität bis Minute  $71,4 \pm 5,7$  ( $n=5$ ). Nach der Äquilibration blieben die Kontraktionen überwiegend konstant und nutzbar für die folgenden Versuche, bis sie ab der 135. Minute langsam schwächer wurden (siehe Abbildung 11).



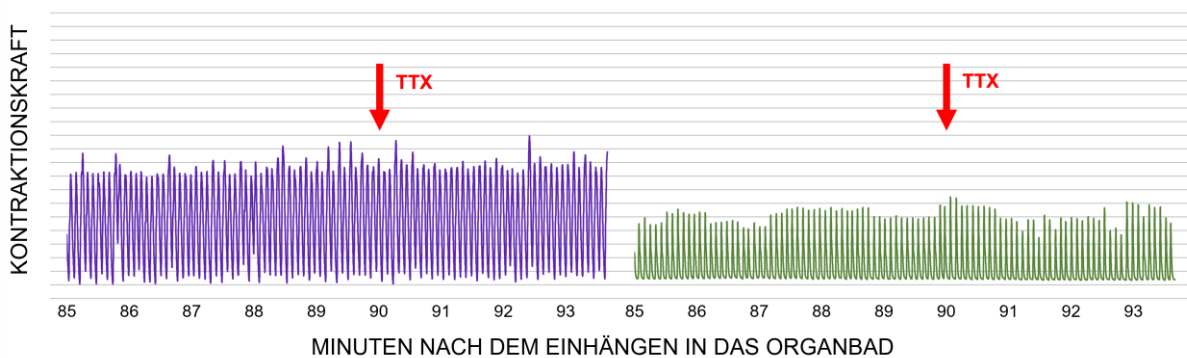
**Abbildung 11: Spontane Motilität der Zirkulärmuskulatur.** Die Messkurve zeigt die Kontraktionskraft der Zirkulärmuskulatur (grün) im Zeitverlauf. In der 30. Minute erfolgte ein Pufferwechsel (grauer Pfeil, PW). Die Motilität der Zirkulärmuskulatur steigerte sich bis zur 75. Minute (Äquilibration, blauer Pfeil). Ab der 75. bis zur 135. Minute blieb die Motilität überwiegend einheitlich (roter Doppelpfeil).

Um sicherzustellen, dass alle zu untersuchenden Muskelstreifen ihre gleichbleibende, maximale Motilität vor dem Versuchsbeginn erreicht hatten, wurde folgend Morphin-Sulfat oder BCM-7 erst ab der 80. Minute appliziert. Die Zeitspanne zwischen der 75. und 80. Minute diente als Ausgangsmotilität, welche auf Abweichungen durch Morphin und BCM-7 untersucht wurde. In dieser Zeitspanne kontrahierte die

Longitudinalmuskulatur (n=5) durchschnittlich mit einer Frequenz von  $12,8 \pm 1,7$  (SD) Mal pro Minute bei einer Amplitude von  $9,3 \pm 2,2$  (SD) mN. Die Zirkulärmuskulatur (n=5) zeigte eine Frequenz von  $12,5 \pm 1,4$  (SD) pro Minute mit einer niedrigeren Amplitude von  $0,5 \pm 0,5$  (SD) mN.

#### 4.3.1.1 Die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur wurde nicht neuronal vermittelt

Um zu Beginn zu überprüfen, ob die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur einer neuronalen Modulation unterliegt, wurde Tetrodotoxin (TTX) in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  zur Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur von drei Schweinen appliziert. TTX hemmt die spannungsabhängigen Natriumkanäle der Neurone und verhindert dadurch eine neuronale Reizweiterleitung (Kotipoyina et al. 2024). Wenn Kontraktionen neuronal vermittelt sind, werden sie demnach durch TTX gehemmt (Cai et al. 2022). TTX bewirkte keine Änderung der Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 12). Dies zeigte, dass die spontanen Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur unabhängig neuronal-vermittelter Signale entstanden.

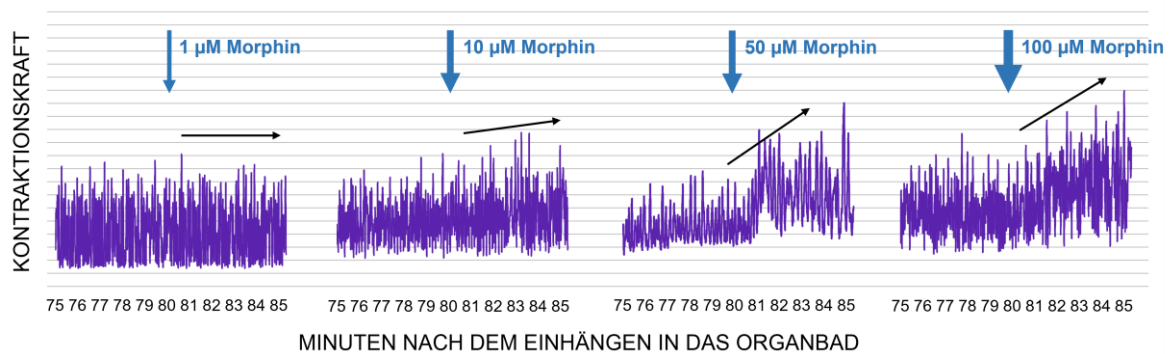


**Abbildung 12: Tetrodotoxin wirkte nicht auf die spontane Motilität.** Die Messkurven zeigen die Wirkung von TTX auf die Motilität der Longitudinal- (lila) und Zirkulärmuskulatur (grün) im Zeitverlauf. Die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur blieb nach einer  $1 \mu\text{M}$  TTX-Applikation in der 90. Minute (roter Pfeil) unverändert.

#### 4.3.1.2 Morphin steigerte die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur

Um die angenommene opioide Wirkung von BCM-7 auf die Motilität des Jejunums zu untersuchen, wurde zunächst die Wirkung von Morphin-Sulfat als Kontrollsubstanz für eine opioide Wirkung am MOR betrachtet. Dazu wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung von Morphin-Sulfat in einem Vorversuch an der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur

eines Schweins in einer Verdünnungsreihe von 1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  ermittelt. Eine Applikation von Morphin-Sulfat in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zeigte keine Wirkung auf die spontane Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 13). Eine Applikation von Morphin-Sulfat in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigte eine geringfügige Steigerung der Motilität, die sich in einer Zunahme der Kontraktionskraft äußerte (siehe Abbildung 13). Eine Zunahme der Kontraktionskraft zeigt sich in der grafischen Darstellung als eine Steigerung der Amplitude der Messkurve (siehe Abbildung 13). Morphin-Sulfat in den Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  oder 100  $\mu\text{M}$  bewirkten eine deutliche Zunahme der Motilität durch eine Steigerung der Kontraktionskraft der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 13).



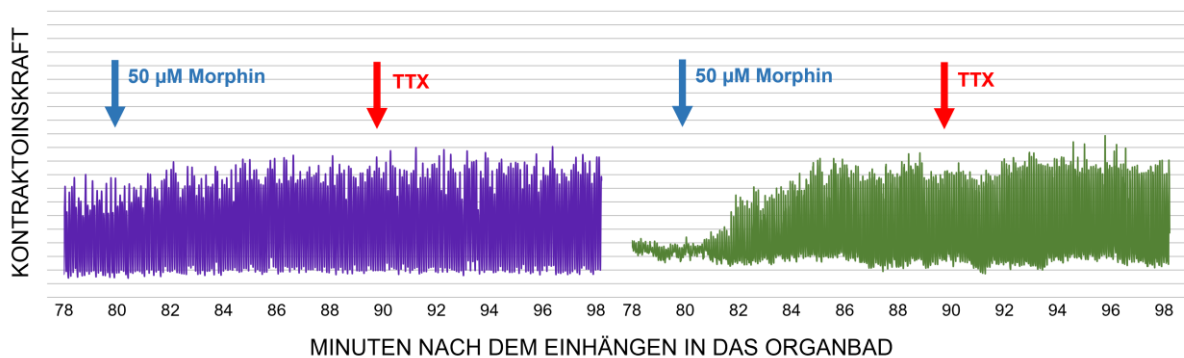
**Abbildung 13: Morphin steigerte die spontane Motilität.** Die Messkurven zeigen die Wirkung von Morphin-Sulfat in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur im Zeitverlauf. Die jeweiligen Morphin-Sulfat-Applikationen (1  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$ ) in der 80. Minute werden durch die blauen Pfeile mit unterschiedlichen Dicken dargestellt. Morphin-Sulfat steigerte die Kontraktionskraft ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Eine deutliche Steigerung der Kontraktionskraft war ab 50  $\mu\text{M}$  erkennbar.

Da bereits ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine deutliche Steigerung der Motilität durch die Steigerung der Kontraktionskraft der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur durch Morphin-Sulfat zu erkennen war, nutzten wir folgend 50  $\mu\text{M}$  als Konzentration für weitere Versuche mit Morphin-Sulfat. Auf die Longitudinalmuskulatur ( $n=6$ ) bewirkten 50  $\mu\text{M}$  Morphin-Sulfat eine Zunahme der durchschnittlichen Amplitude von  $43\% \pm 15\%$  (SD) bei einer gleichbleibenden Frequenz ( $-2 \pm 2\%$  (SD)). Der resultierende Motilitätsindex der Longitudinalmuskulatur nach 50  $\mu\text{M}$  Morphin-Sulfat-Applikation betrug  $1,4 \pm 0,1$  (SD) (siehe Abbildung 15). Die Steigerung der Motilität der Zirkulärmuskulatur ( $n=6$ ) nach einer 50  $\mu\text{M}$  Morphin-Sulfat-Applikation zeigte sich in einer Zunahme der durchschnittlichen Amplitude um  $375\% \pm 137\%$  (SD) bei einer gleichbleibenden Frequenz ( $+1 \pm 1\%$  (SD)). Der Motilitätsindex der Zirkulärmuskulatur

nach 50  $\mu\text{M}$  Morphin-Sulfat-Applikation lag höher als der Motilitätsindex der Longitudinalmuskulatur und betrug  $4,7 \pm 1,4$  (SD) (siehe Abbildung 16).

#### 4.3.1.3 Die Morphin-induzierte Steigerung der Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur wurde nicht neuronal vermittelt

Um herauszufinden, ob die Wirkung von Morphin-Sulfat auf die Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur neuronal vermittelt wurde, wurde TTX in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nach einer 50  $\mu\text{M}$  Morphin-Sulfat-Applikation appliziert. TTX wirkte nicht auf die Steigerung der Motilität der Longitudinal- (n=3) und Zirkulärmuskulatur (n=3) durch Morphin-Sulfat. Die Motilitätssteigerung wurde demnach nicht neuronal vermittelt (siehe Abbildung 14).

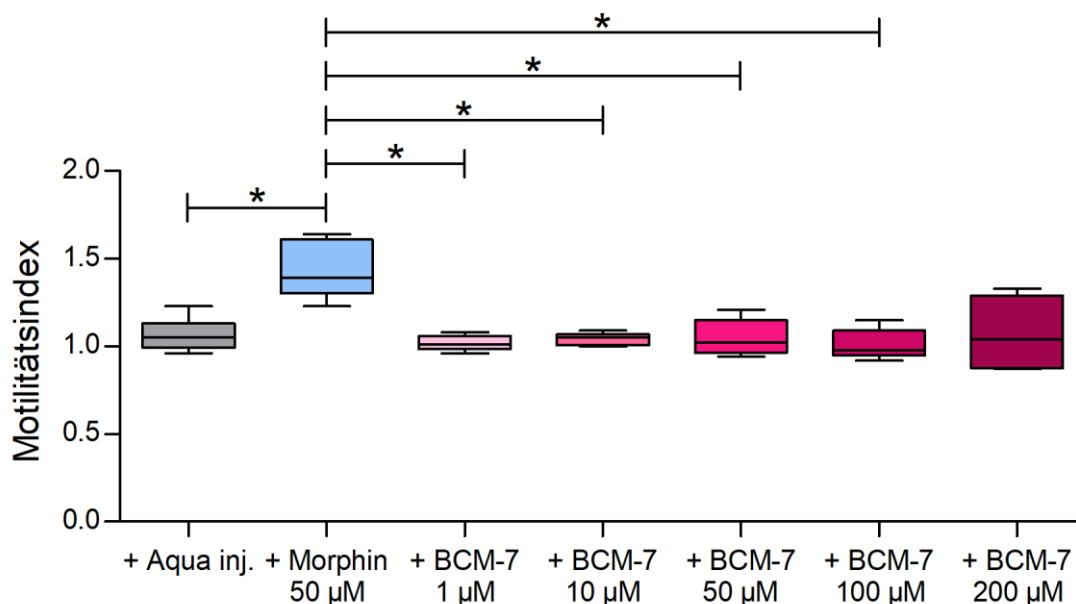


**Abbildung 14: Tetrodotoxin hob die Morphin-induzierte Steigerung der Motilität nicht auf.** Die Messkurven zeigen die Wirkung von Morphin-Sulfat und folgend TTX auf die Motilität der Longitudinal- (lila) und Zirkulärmuskulatur (grün) im Zeitverlauf. Die jeweiligen Morphin-Sulfat-Applikationen (50  $\mu\text{M}$ ) in der 80. Minute werden durch den blauen Pfeil und eine TTX-Applikation durch den roten Pfeil repräsentiert. Eine TTX-Applikation (1  $\mu\text{M}$ , roter Pfeil) wirkte nicht auf die Morphin-induzierte Steigerung der Motilität.

#### 4.3.1.4 BCM-7 zeigte keine Wirkung auf die Motilität der Longitudinalmuskulatur

Um herauszufinden, ob BCM-7 wie die Positivkontrolle Morphin-Sulfat für eine Wirkung am MOR zu einer Steigerung der Kontraktionskraft der Longitudinalmuskulatur führt, wurde eine mögliche Wirkung von BCM-7 in den Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  (n=5), 10  $\mu\text{M}$  (n=6) und 50  $\mu\text{M}$  (n=5) auf die Motilität der Longitudinalmuskulatur untersucht. Im Gegensatz zu Morphin-Sulfat, zeigte keine der Applikationen von BCM-7 eine Wirkung auf die Motilität der Longitudinalmuskulatur (siehe Abbildung 15). Aus diesem Grund wurde auch die Wirkung von 100  $\mu\text{M}$  BCM-7 (n=10) auf die spontanen Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur untersucht, wobei ebenfalls keine Wirkung festgestellt

wurde (siehe Abbildung 15). Aufgrund der hohen Mengen pro Organbad im Kontraktionsversuch wurde die oberste einsetzbare Stoffmenge primär auf 100  $\mu\text{M}$  festgelegt, was auch eine üblich verwendete Maximalkonzentration zur *in-vitro*-Untersuchung pharmakologischer Wirkungen an Muskelstreifen ist (Jespersen et al. 2015). Um eine mögliche Wirkung auch in höheren Konzentrationen nicht zu übersehen, wurde trotzdem auf eine potenzielle Wirkung von BCM-7 in der Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  auf die Longitudinalmuskulatur fünf weiterer Schweine untersucht. Auch in der Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  zeigte BCM-7 keine Wirkung auf die Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur (siehe Abbildung 15). Der Motilitätsindex der Longitudinalmuskulatur betrug nach einer BCM-7-Applikation von 1  $\mu\text{M}$   $1,0 \pm 0,0$  (SD), von 10  $\mu\text{M}$   $1,0 \pm 0,0$  (SD), von 50  $\mu\text{M}$   $1,0 \pm 0,1$  (SD), von 100  $\mu\text{M}$   $1,0 \pm 0,1$  (SD) und von 200  $\mu\text{M}$   $1,1 \pm 0,2$  (SD) (siehe Abbildung 15). Da BCM-7 und Morphin-Sulfat in Aqua inj. gelöst wurden und jeweils 30  $\mu\text{l}$  Substanz-Lösung in das Organbad pipettiert wurde, nutzten wir 30  $\mu\text{l}$  Aqua inj. als Negativkontrolle. Der Motilitätsindex der Longitudinalmuskulatur nach Aqua inj.-Applikation ( $n=9$ ) lag bei  $1,1 \pm 0,1$  (SD) (siehe Abbildung 15). Wie bereits in Punkt 4.3.1.2 beschrieben, betrug der Motilitätsindex der Longitudinalmuskulatur nach 50  $\mu\text{M}$  Morphin-Sulfat-Applikation  $1,4 \pm 0,1$  (SD) (siehe Abbildung 15).



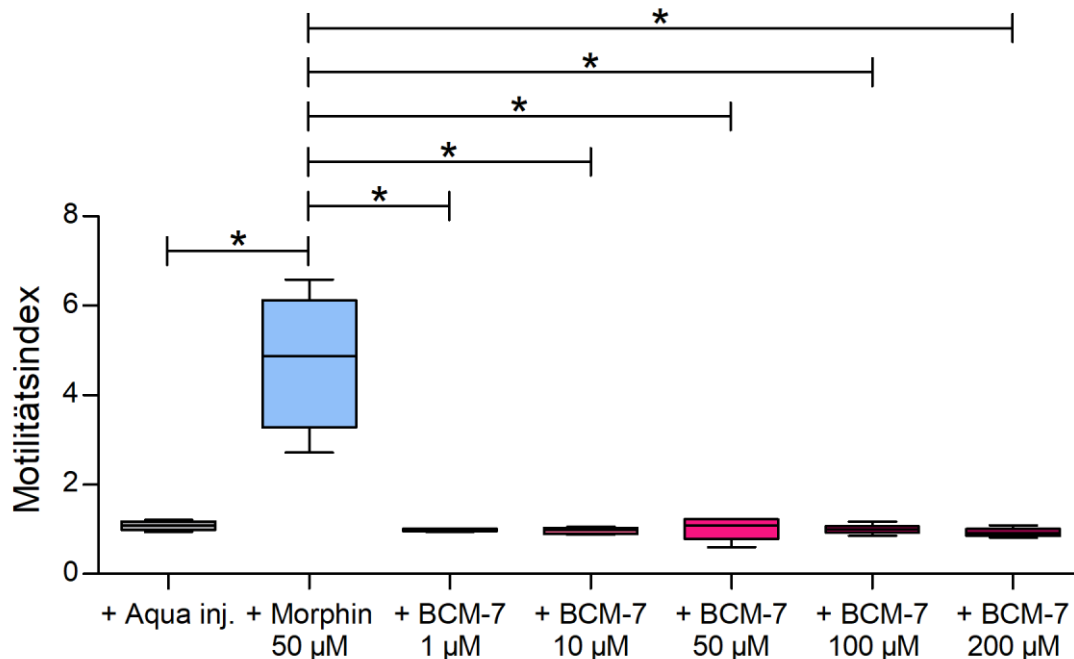
**Abbildung 15: Motilitätsindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und BCM-7.** Dargestellt sind die Motilitätsindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von 30  $\mu\text{l}$  Aqua inj. (grau,  $n=9$ ), 50  $\mu\text{M}$  Morphin-Sulfat (blau,  $n=6$ ) und 1  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=5$ ), 10  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=5$ ), 50  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=5$ ), 100  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=10$ ), 200  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=5$ ) (von hell-rosa bis dunkel-rosa),  $\pm$  SD. Aqua inj. diente als Negativkontrolle. Morphin-Sulfat steigerte die Motilität signifikant und diente als Positivkontrolle. BCM-7 wirkte in keiner Konzentration auf die Motilität. Alle BCM-7-



Konzentrationen und Aqua inj. zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es wurden alle im Games-Howell-Post-hoc-Test ermittelten signifikanten Unterschiede dargestellt; \*,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3.1.5 BCM-7 zeigte keine Wirkung auf die Motilität der Zirkulärmuskulatur

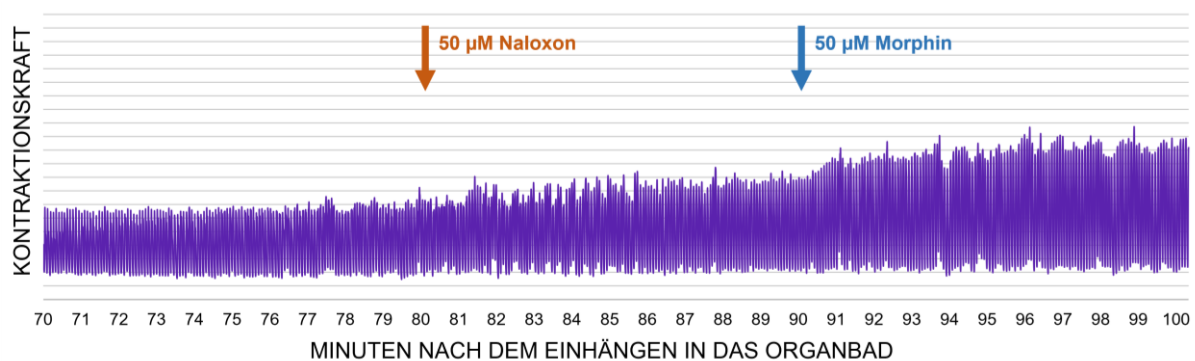
Auch auf die spontane Motilität der Zirkulärmuskulatur wurde eine potenzielle Wirkung durch BCM-7 untersucht. BCM-7 zeigte in den Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  ( $n=5$ ), 10  $\mu\text{M}$  ( $n=5$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $n=5$ ), 100  $\mu\text{M}$  ( $n=10$ ) und 200  $\mu\text{M}$  ( $n=5$ ) ebenfalls keine Wirkung auf die Motilität der Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 16). Der Motilitätsindex der Zirkulärmuskulatur betrug nach einer BCM-7-Applikation von 1  $\mu\text{M}$   $1,0 \pm 0,0$  (SD), von 10  $\mu\text{M}$   $1,0 \pm 0,1$  (SD), von 50  $\mu\text{M}$   $1,0 \pm 0,2$  (SD), von 100  $\mu\text{M}$   $1,0 \pm 0,1$  (SD) und von 200  $\mu\text{M}$   $0,9 \pm 0,1$  (SD) (siehe Abbildung 16). Der Motilitätsindex der Zirkulärmuskulatur nach Aqua inj.-Applikation ( $n=8$ ) lag bei  $1,1 \pm 0,1$  (SD) (siehe Abbildung 16). Wie bereits in Punkt 4.3.1.2 beschrieben, betrug der Motilitätsindex der Zirkulärmuskulatur nach 50  $\mu\text{M}$  Morphin-Sulfat-Applikation  $4,7 \pm 1,4$  (SD) (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: Motilitätsindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und BCM-7.** Dargestellt sind die Motilitätsindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von 30  $\mu\text{l}$  Aqua inj. (grau,  $n=8$ ), 1  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=5$ ), 10  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=5$ ), 50  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=5$ ), 100  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=10$ ) und 200  $\mu\text{M}$  BCM-7 ( $n=5$ ) (von hell-rosa bis dunkel-rosa),  $\pm$  SD. Aqua inj. diente als Negativkontrolle. Morphin-Sulfat bewirkte eine signifikante Motilitätssteigerung und diente als Positivkontrolle. BCM-7 wirkte in keiner Konzentration auf die Motilität. Alle BCM-7-Konzentrationen und Aqua inj. zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es wurden alle im Games-Howell-Post-hoc-Test ermittelten signifikanten Unterschiede dargestellt; \*,  $p \leq 0,05$ .

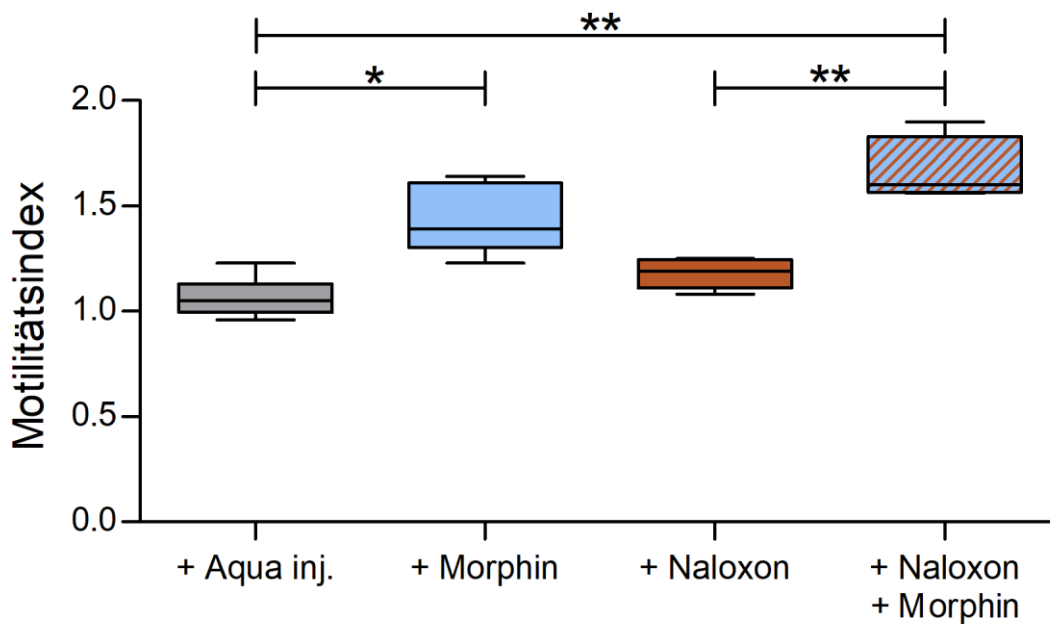
#### 4.3.1.6 Naloxon steigerte die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur

Um zu überprüfen, ob die Motilitätssteigerung auf die spontanen Kontraktionen durch Morphin-Sulfat über Opioidrezeptoren vermittelt wurde, welche durch Naloxon, einem Opioidrezeptor-Antagonisten, blockiert werden, wurde zehn Minuten vor der Morphin-Sulfat-Applikation Naloxon-Hydrochlorid in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zur Longitudinal- (n=5) und Zirkulärmuskulatur (n=5) appliziert. Eine vorherige Naloxon-Hydrochlorid-Applikation konnte die Wirkung von Morphin-Sulfat nicht blockieren (siehe Abbildung 17).



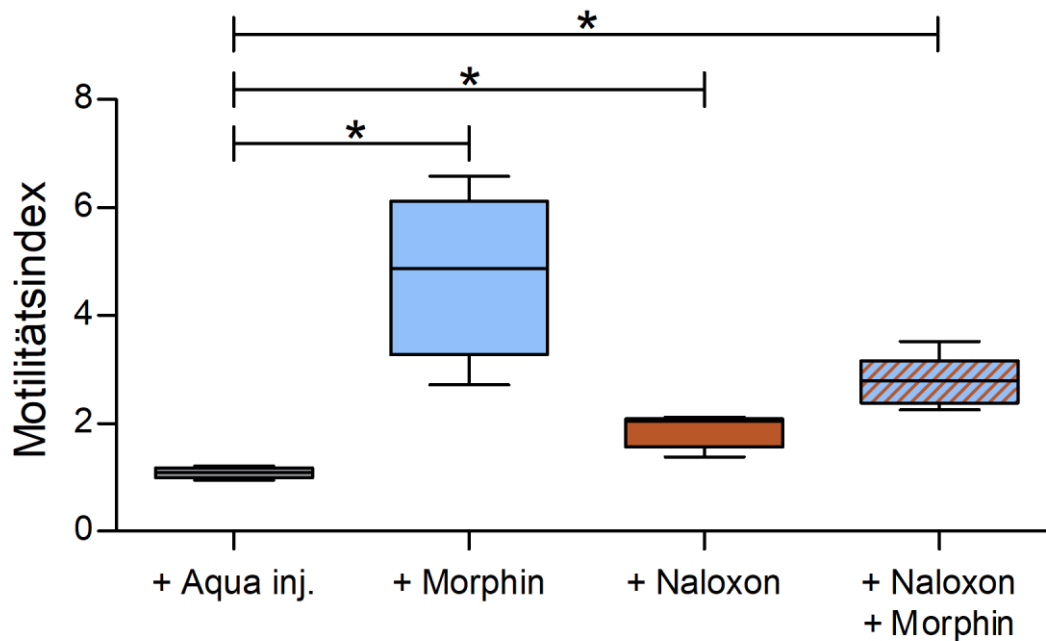
**Abbildung 17: Steigerung der Motilität durch Naloxon und Morphin.** Die Messkurve zeigt repräsentativ die motilitätssteigernde Wirkung von Naloxon-Hydrochlorid und Morphin-Sulfat auf die Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur im Zeitverlauf. Der Zeitpunkt der Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (50  $\mu\text{M}$ ) wird durch den braunen Pfeil und der Zeitpunkt der Morphin-Sulfat-Applikation (50  $\mu\text{M}$ ) wird durch den blauen Pfeil gekennzeichnet. Naloxon-Hydrochlorid steigerte die Motilität geringfügig, welche wiederum durch Morphin-Sulfat weiter gesteigert wurde.

Eine alleinige Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (n=5) führte zu einer geringfügigen, aber nicht signifikanten Steigerung der Kontraktionskraft der Longitudinalmuskulatur. Der resultierende Motilitätsindex der Longitudinalmuskulatur nach Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (50  $\mu\text{M}$ ) lag bei  $1,2 \pm 0,1$  (SD). Eine Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (50  $\mu\text{M}$ ) mit einer folgenden Morphin-Sulfat-Applikation (50  $\mu\text{M}$ ) (n=5) führte gemeinsam zu einer signifikanten Steigerung des Motilitätsindex der Longitudinalmuskulatur ( $1,7 \pm 0,1$  (SD)) (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18: Motilitätsindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und Naloxon.** Dargestellt sind die Motilitätsindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von 30  $\mu$ l Aqua inj. (grau, n=9), 50  $\mu$ M Morphin-Sulfat (blau, n=6), alleinig Naloxon-Hydrochlorid (braun, n=5) und 50  $\mu$ M Naloxon-Hydrochlorid mit nachfolgend 50  $\mu$ M Morphin-Sulfat (blau, braun-gestreift, n=5),  $\pm$  SD. Aqua inj. diente als Negativkontrolle. Morphin steigerte signifikant die Motilität der Longitudinalmuskulatur und diente als Positivkontrolle. Eine vorherige Naloxon-Hydrochlorid-Applikation verstärkte diesen Effekt. Naloxon-Hydrochlorid alleinig führte zu einer nicht-signifikanten Steigerung der Motilität. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es wurden alle im Games-Howell-Post-hoc-Test ermittelten signifikanten Unterschiede dargestellt; \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ .

An der Zirkulärmuskulatur führte Naloxon-Hydrochlorid (n=5) alleinig ebenfalls zu einer signifikanten Motilitätssteigerung. Naloxon-Hydrochlorid mit einer folgenden Morphin-Sulfat-Applikation (n=5) führte zu einer weiteren Steigerung der Motilität (siehe Abbildung 19). Der Motilitätsindex der Zirkulärmuskulatur nach einer alleinigen Naloxon-Hydrochlorid-Applikation lag bei  $1,9 \pm 0,3$  (SD). Der Motilitätsindex nach Applikation von Naloxon-Hydrochlorid und einer folgenden Morphin-Sulfat-Applikation lag bei  $4,4 \pm 1,8$  (SD) (siehe Abbildung 19).

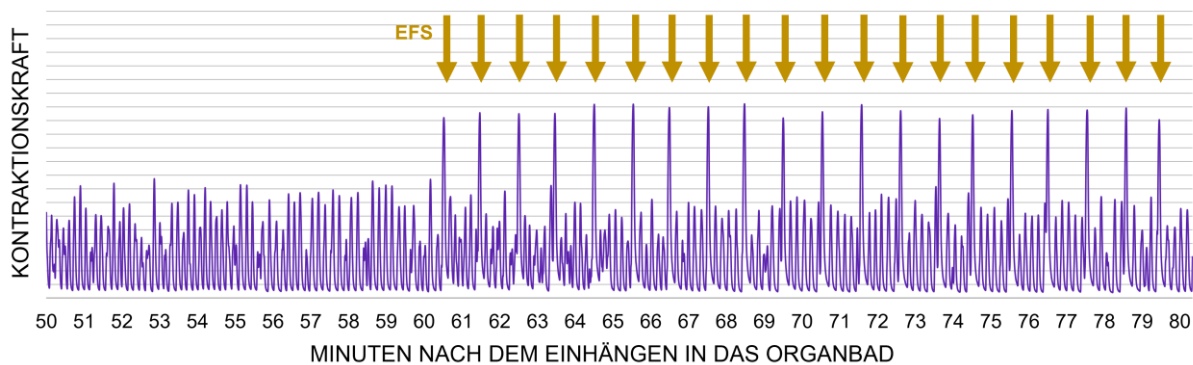


**Abbildung 19: Motilitätsindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und Naloxon.** Dargestellt sind die Motilitätsindizes der spontanen Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von 30  $\mu$ l Aqua inj. (grau, n=8), 50  $\mu$ M Morphin-Sulfat (blau, n=6), alleinig 50  $\mu$ M Naloxon-Hydrochlorid (braun, n=5) und 50  $\mu$ M Naloxon-Hydrochlorid mit nachfolgend 50  $\mu$ M Morphin-Sulfat (blau, braun-gestreift, n=5) und,  $\pm$  SD. Aqua inj. diente als Negativkontrolle. Morphin-Sulfat (blau) steigerte die Motilität signifikant und diente als Positivkontrolle. Eine vorherige Applikation von Naloxon-Hydrochlorid konnte diesen Effekt nicht blockieren aber reduzieren. Eine alleinige Naloxon-Hydrochlorid-Applikation führte zu einer nicht-signifikanten Steigerung der Motilität. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es wurden alle im Games-Howell-Post-hoc-Test ermittelten signifikanten Unterschiede dargestellt; \*,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3.2 Elektrisch induzierte Kontraktionen

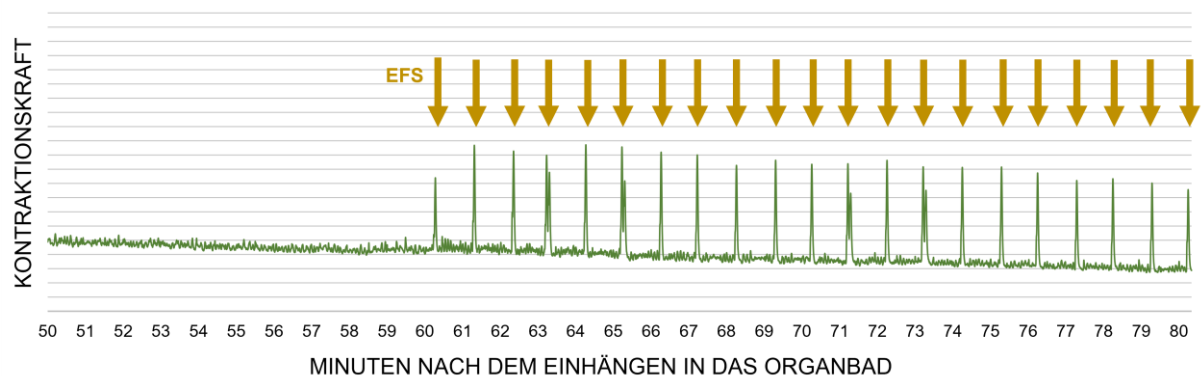
Nachdem keine Wirkung von BCM-7 auf die myogen-vermittelten spontanen Kontraktionen ermittelt werden konnte, wurde eine potenzielle Wirkung von BCM-7 auf die neuronal-vermittelten Kontraktionen untersucht. Dazu war es notwendig, die Muskelstreifen extrinsisch mittels EFS zu stimulieren, um eine Nerv-Muskel-Antwort der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur durch das enterische Nervensystem zu simulieren. Die von uns verwendeten EFS-Einstellungen lauten wie folgt: Spannung 30 Volt, Impulsdauer 0,9 Millisekunden, 20 Impulse pro Sekunde für 300 Millisekunden. Nach der 60-minütigen Äquilibration ließen sich gleichbleibende Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur mittels EFS auslösen, weshalb die zu untersuchenden Stoffe ab Minute 70 in das jeweilige Organbad appliziert werden konnten (siehe Abbildung 20). Die EFS-induzierten Kontraktionen traten einmalig nach der EFS auf und erzeugten, aufgrund der höheren Kontraktionskraft, höhere

Amplituden als die spontanen Kontraktionen (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: EFS-induzierte Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur.** Die Messkurve zeigt die Wirkung der EFS auf die Longitudinalmuskulatur (lila) im Zeitverlauf. Der Zeitpunkt jeder EFS ist mit einem goldenen Pfeil markiert. Jede EFS erzeugte eine einmalige Kontraktion mit höheren Amplituden als die spontanen Kontraktionen.

Auch die Zirkulärmuskulatur zeigte gleichbleibende einmalige EFS-induzierte Kontraktionen nach 60-minütiger Äquilibration (siehe Abbildung 21). Die zu untersuchenden Stoffe konnten daher ab der 70. Minute in das jeweilige Organbad appliziert werden.

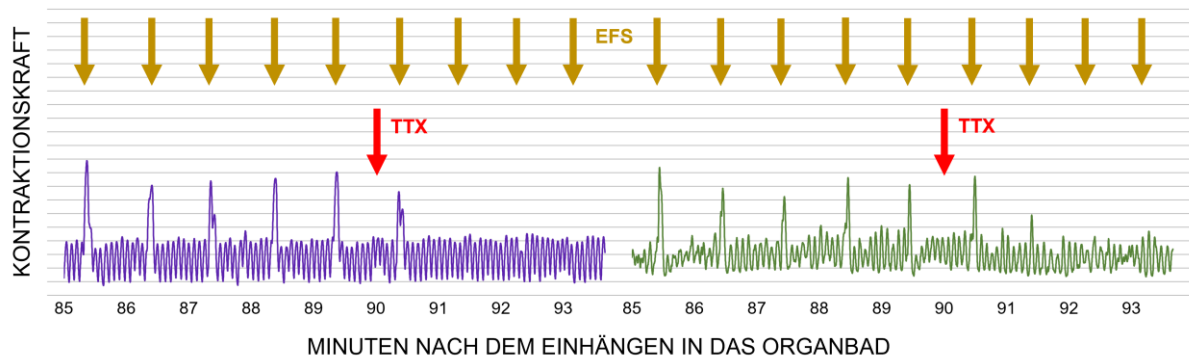


**Abbildung 21: EFS-induzierte Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur.** Die Messkurve zeigt die Wirkung der EFS auf die Zirkulärmuskulatur (grün) im Zeitverlauf. Der Zeitpunkt jeder EFS ist mit einem goldenen Pfeil markiert. Jede EFS erzeugte eine einmalige Kontraktion mit höheren Amplituden als die spontanen Kontraktionen.

#### 4.3.2.1 Die EFS wurde neuronal vermittelt

Um nachzuweisen, dass die EFS-induzierten Stimuli über Neurone an die Muskelzellen weitergeleitet werden und nicht direkt an der Muskelzelle wirken, wurde das EFS-induzierte Kontraktionsverhalten nach 1  $\mu\text{M}$  TTX-Applikation untersucht. TTX hemmt die Reizweiterleitung der Neurone und dient als Beweis, dass die EFS-induzierten Stimuli nicht direkt an den Muskelzellen wirken (Lefebvre et al. 2017). Die

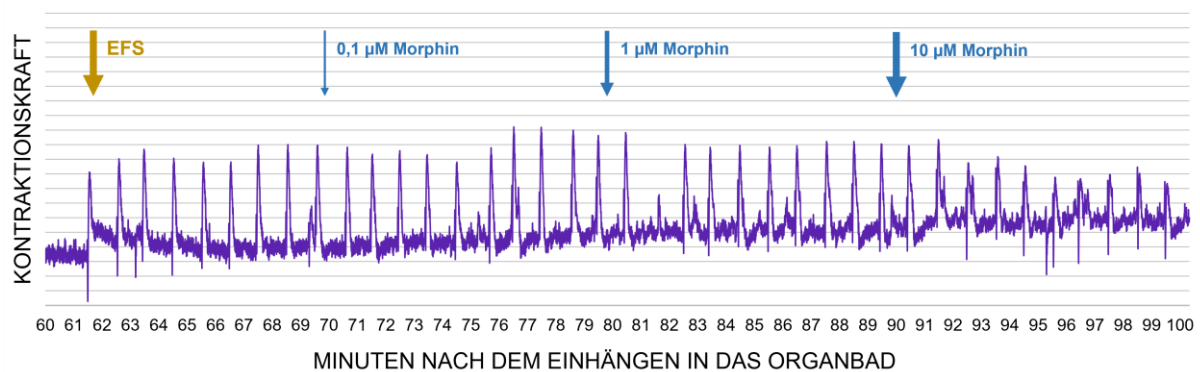
TTX-Applikation hemmte dauerhaft und vollständig die EFS-vermittelten Kontraktionen der Longitudinal- (n=3) und Zirkulärmuskulatur (n=3) innerhalb von zwei Minuten (siehe Abbildung 22). Damit wurde bewiesen, dass die Impulse der EFS über Neurone an den Muskel geleitet werden und die EFS nicht direkt am Muskel wirkt.



**Abbildung 22: Hemmung der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur durch Tetrodotoxin.** Die Messkurven zeigen die Wirkung einer TTX-Applikation auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- (lila) und Zirkulärmuskulatur (grün) im Zeitverlauf. Der Zeitpunkt jeder EFS ist mit einem goldenen Pfeil markiert. Eine TTX-Applikation (roter Pfeil) hemmte die EFS-induzierte Kontraktion der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur vollständig.

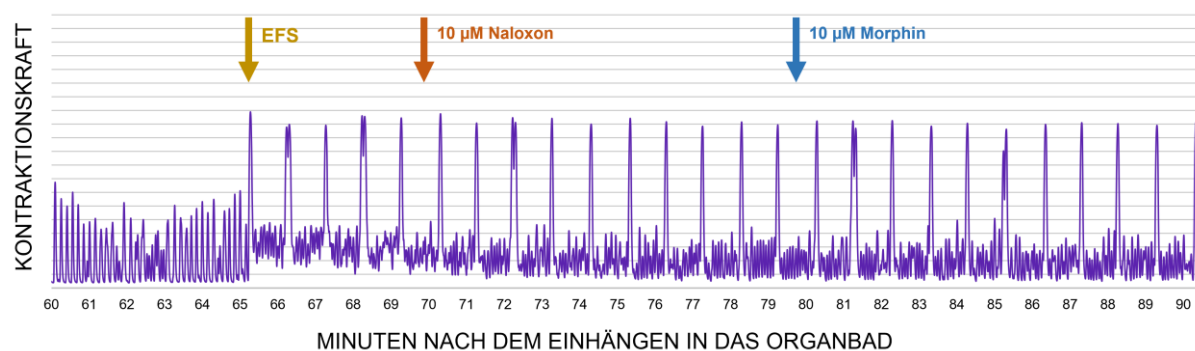
#### 4.3.2.2 Morphin hemmte die EFS-induzierten Kontraktionen

Bevor die Auswirkungen von BCM-7 auf EFS-induzierte Kontraktionen untersucht wurden, wurde der Effekt von Morphin-Sulfat als Positivkontrolle für eine opioide Wirkung am MOR auf die EFS-induzierten Kontraktionen getestet. Dazu wurde Morphin-Sulfat in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zur Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur eines Schweines appliziert und die Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen untersucht. In einer Morphin-Sulfat-Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  zeigte sich keine Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen, wobei 1  $\mu\text{M}$  bereits die Amplitude der EFS-induzierten Kontraktionen geringgradig reduzierte (siehe Abbildung 23). In einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigte eine Morphin-Sulfat-Applikation eine deutliche Hemmung der Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23: Morphin hemmte die EFS-induzierten Kontraktionen.** Die Messkurve zeigt repräsentativ die Wirkung von Morphin-Sulfat in verschiedenen Konzentrationen auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur im Zeitverlauf. Der Zeitpunkt des ersten EFS-Impulses ist mit dem goldenen Pfeil markiert. Pro Minute wurde einmal elektrisch stimuliert. Die jeweiligen Morphin-Sulfat-Applikationen werden durch die blauen Pfeile in unterschiedlichen Dicken dargestellt. Eine Morphin-Sulfat-Applikation von 0,1 µM zeigte keine, 1 µM eine geringgradige und 10 µM eine deutliche Hemmung der Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen.

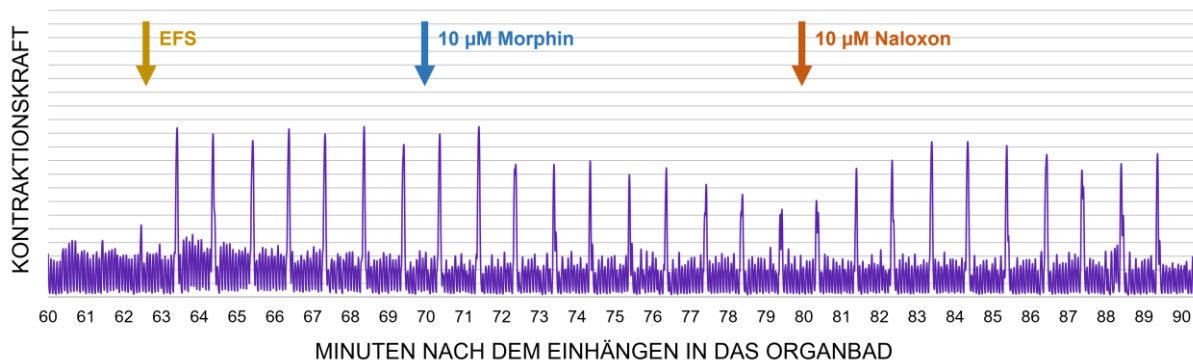
Dass die Hemmung der Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen durch Morphin-Sulfat über den MOR vermittelt wurde, bewies dann eine vorhergehende Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (n=1). Naloxon-Hydrochlorid blockierte in einer Konzentration von 10 µM die hemmende Wirkung von Morphin-Sulfat auf die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur, sodass die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen einer folgenden 10 µM Morphin-Sulfat-Applikation auf dem Ausgangsniveau blieben (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24: Naloxon blockierte eine Hemmung der EFS-induzierten Kontraktionen durch Morphin.** Die Messkurve zeigt repräsentativ die Wirkung der Applikation von 10 µM Naloxon-Hydrochlorid und folgend 10 µM Morphin-Sulfat auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur im Zeitverlauf. Der Zeitpunkt des ersten EFS-Impulses ist mit dem goldenen Pfeil markiert. Pro Minute wurde einmal elektrisch stimuliert. Die Naloxon-Hydrochlorid-Applikation wird durch den braunen Pfeil und die Morphin-Sulfat-Applikation durch den blauen Pfeil dargestellt. Naloxon-Hydrochlorid zeigte keine direkte Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen, blockierte jedoch eine Hemmung durch Morphin.

Ebenso konnte eine Applikation von Naloxon-Hydrochlorid nach einer Morphin-Sulfat-

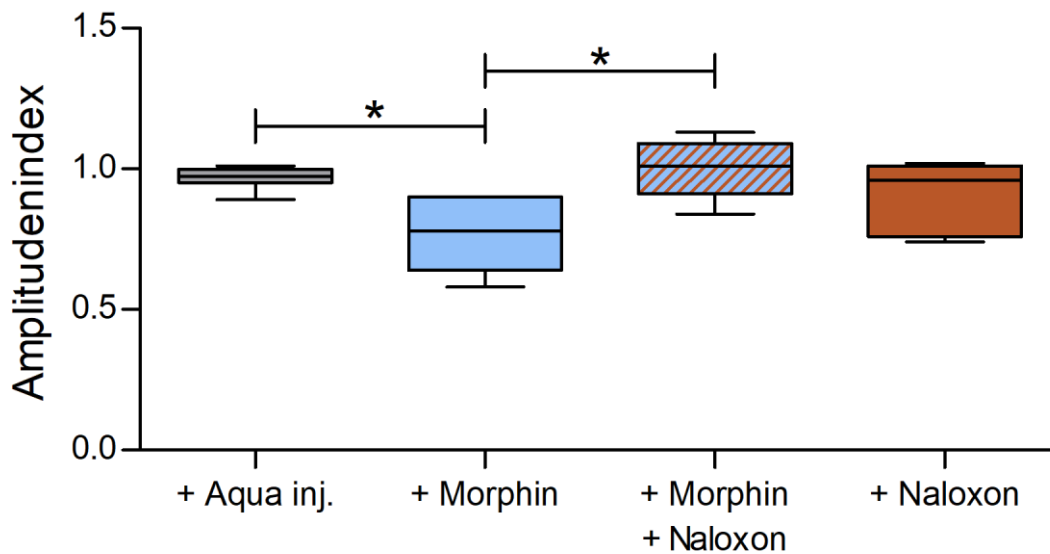
Applikation die Hemmung der Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen durch Morphin-Sulfat aufheben. (siehe Abbildung 25)



**Abbildung 25: Naloxon hob die Hemmung der EFS-induzierten Kontraktionen durch Morphin auf.** Die Messkurve zeigt repräsentativ die Wirkung von 10 µM Morphin-Sulfat und folgend 10 µM Naloxon-Hydrochlorid auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur im Zeitverlauf. Der Zeitpunkt des ersten EFS-Impulses ist mit dem goldenen Pfeil markiert. Pro Minute wurde einmal elektrisch stimuliert. Die Morphin-Sulfat-Applikation wird durch den blauen Pfeil und die Naloxon-Hydrochlorid-Applikation durch den braunen Pfeil dargestellt. Morphin-Sulfat reduzierte die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen. Diese Hemmung wurde durch Naloxon-Hydrochlorid aufgehoben.

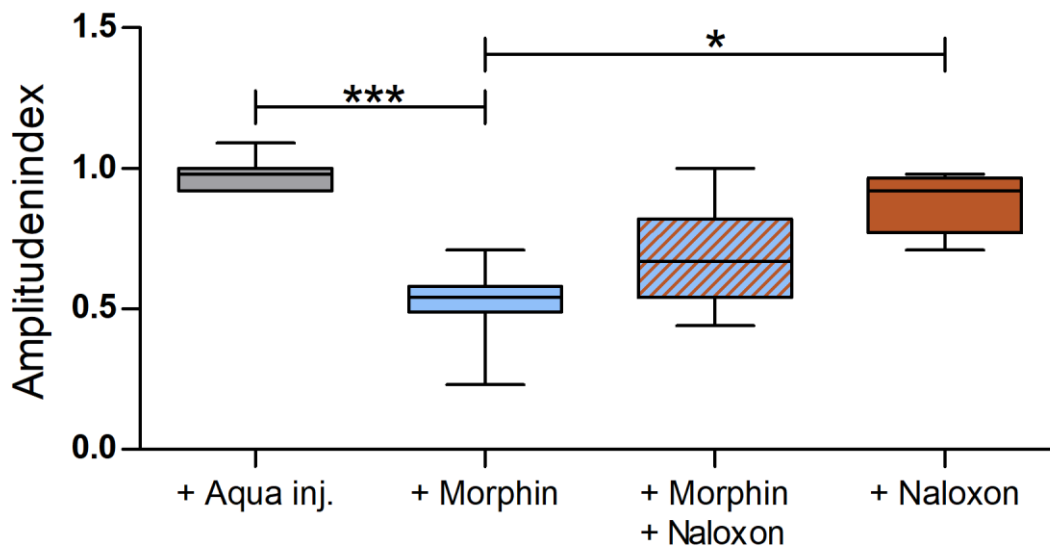
Die Morphin-Sulfat-Applikation hemmte signifikant die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur ( $n=7$ ) um  $23 \pm 13\%$  (SD) (Amplitudenindex  $0,8 \pm 0,1$  (SD)) (siehe Abbildung 26). Eine Naloxon-Hydrochlorid-Applikation ( $n=7$ ) nach einer Morphin-Sulfat-Applikation löste diese Hemmung der Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen vollständig auf (Amplitudenindex  $1,0 \pm 0,1$  SD) (siehe Abbildung 26). Die alleinige Naloxon-Hydrochlorid-Applikation ( $n=5$ ) zeigte eine nicht-signifikante Reduktion der Amplituden (Amplitudenindex  $0,9 \pm 0,1$  (SD)) (siehe Abbildung 26). Als Negativkontrolle nutzten wir, wie bereits bei den spontanen Kontraktionen, 30 µl Aqua inj. ( $n=8$ ), was keine Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur zeigte (Amplitudenindex  $1,0 \pm 0,0$  (SD)) (siehe Abbildung 26).





**Abbildung 26: Amplitudenindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und Naloxon.** Dargestellt sind die errechneten Amplitudenindizes der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von 30  $\mu$ l Aqua inj. (grau, n=8), 10  $\mu$ M Morphin-Sulfat (blau, n=7), 10  $\mu$ M Morphin-Sulfat mit folgender 10  $\mu$ M Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (blau, braun-schräg-gestreift, n=7) und alleinig 10  $\mu$ M Naloxon-Hydrochlorid (braun, n=5),  $\pm$  SD. Aqua inj. diente als Negativkontrolle. Morphin-Sulfat hemmte signifikant die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen. Naloxon-Hydrochlorid hob diese Wirkung auf. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es wurden alle im Games-Howell-Post-hoc-Test ermittelten signifikanten Unterschiede dargestellt; \*,  $p \leq 0,05$ .

An der Zirkulärmuskulatur hemmte die Morphin-Sulfat-Applikation (n=7) die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen signifikant um  $48\% \pm 13\%$  (SD) (Amplitudenindex  $0,5 \pm 0,1$  (SD)) (siehe Abbildung 27). Eine Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (n=7) nach einer Morphin-Sulfat-Applikation reduzierte die Hemmung der Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen nicht signifikant (Amplitudenindex  $0,7 \pm 0,2$  (SD)) (siehe Abbildung 27). Die alleinige Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (n=5) zeigte eine nicht-signifikante Reduktion der Amplituden (Amplitudenindex  $0,9 \pm 0,1$  (SD)) (siehe Abbildung 27). Die 30  $\mu$ l Aqua inj.-Applikation (n=7) wirkte nicht auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur (Amplitudenindex  $1,0 \pm 0,1$  (SD)) (siehe Abbildung 27).

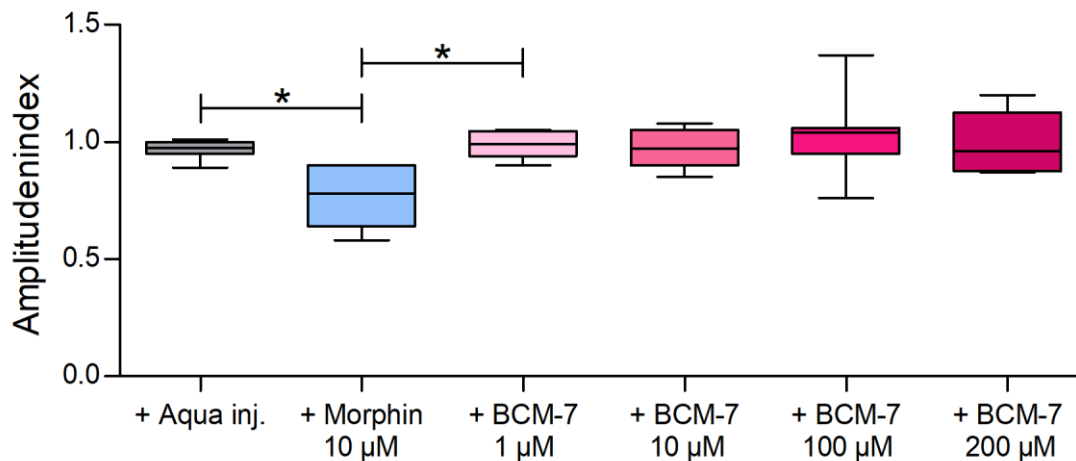


**Abbildung 27: Amplitudenindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und Naloxon.** Dargestellt sind die errechneten Amplitudenindizes der EFS-induzierten Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von 30  $\mu$ l Aqua inj. (grau, n=7), 10  $\mu$ M Morphin-Sulfat (blau, n=7), 10  $\mu$ M Morphin-Sulfat mit folgender 10  $\mu$ M Naloxon-Hydrochlorid-Applikation (blau, braun-schräg-gestreift, n=7) und alleinig 10  $\mu$ M Naloxon-Hydrochlorid (braun, n=5),  $\pm$  SD. Aqua inj. diente als Negativkontrolle. Morphin-Sulfat hemmte stark signifikant die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es wurden alle im Games-Howell-Post-hoc-Test ermittelten signifikanten Unterschiede dargestellt; \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

Die Aufhebung der hemmenden Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktions-Amplituden von Morphin-Sulfat durch Naloxon-Hydrochlorid bestätigte, dass die Wirkung von Morphin-Sulfat über Opioidrezeptoren vermittelt wurde und unser Versuchsaufbau geeignet ist, um opioiderge Wirkungen zu untersuchen.

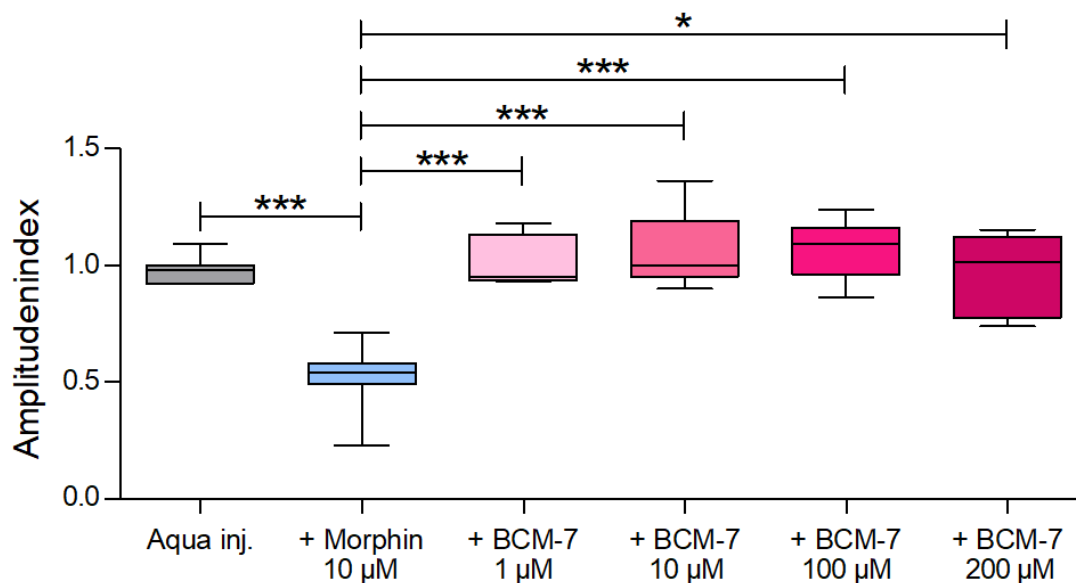
#### 4.3.2.3 BCM-7 zeigte keine Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen

Um eine mögliche, opioide Wirkung durch BCM-7 auf die EFS-induzierten Kontraktionen zu prüfen, wurde BCM-7 in Konzentrationen von 1  $\mu$ M (n=5), 10  $\mu$ M (n=7), 100  $\mu$ M (n=7) und 200  $\mu$ M (n=5) zur Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur appliziert. BCM-7 zeigte in keiner Konzentration eine signifikante Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen (siehe Abbildung 28). Die Amplitudenindizes der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur nach BCM-7-Applikation lagen bei  $1,0 \pm 0,1$  (SD) für 1  $\mu$ M, bei  $1,0 \pm 0,1$  (SD) für 10  $\mu$ M, bei  $1,0 \pm 0,2$  (SD) für 100  $\mu$ M und bei  $1,0 \pm 0,1$  (SD) für 200  $\mu$ M (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28: Amplitudenindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und BCM-7.** Dargestellt sind die errechneten Amplitudenindizes der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von 30 µl Aqua inj. (grau, n=8), 10 µM Morphin-Sulfat (blau, n=7), 1 µM BCM-7 (n=5), 10 µM BCM-7 (rosa, n=7), 100 µM BCM-7 (n=7) und 200 µM BCM-7 (n=5) (von hell-rosa bis dunkel-rosa), ± SD. Aqua inj. diente als Negativkontrolle. Morphin-Sulfat diente als Positivkontrolle für eine Opioid-vermittelte signifikante Hemmung der Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen. BCM-7 zeigte in keiner Konzentration eine Wirkung. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es wurden alle im Games-Howell-Post-hoc-Test ermittelten signifikanten Unterschiede dargestellt; \*,  $p \leq 0,05$ .

Die Amplitudenindizes der EFS-induzierten Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur nach BCM-7-Applikation lagen bei  $1,0 \pm 0,1$  (SD) für 1 µM, bei  $1,1 \pm 0,2$  (SD) für 10 µM, bei  $1,1 \pm 0,1$  (SD) für 100 µM und bei  $1,0 \pm 0,2$  (SD) für 200 µM (siehe Abbildung 29).

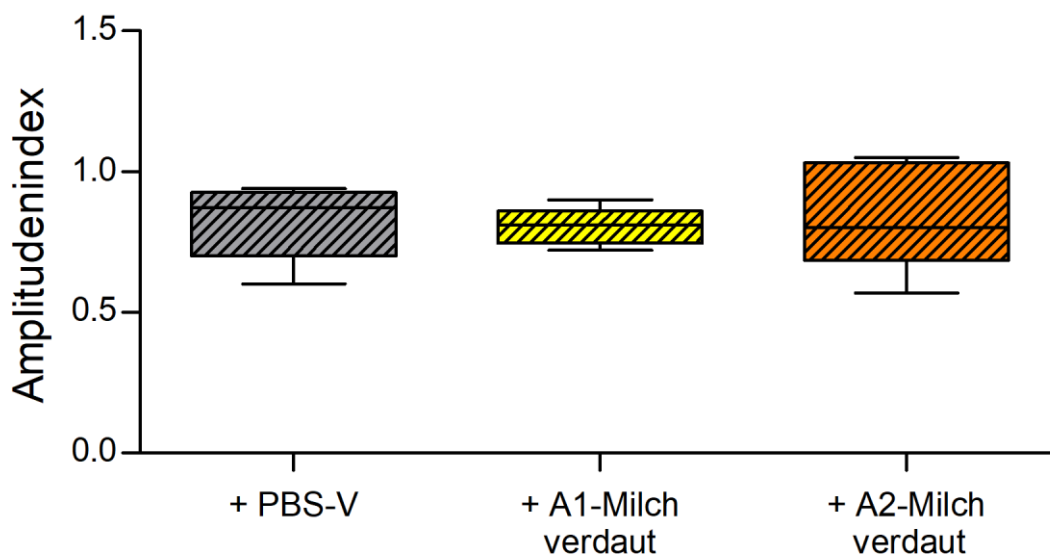


**Abbildung 29: Amplitudenindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von Aqua inj., Morphin und BCM-7.** Dargestellt sind die errechneten Amplitudenindizes der EFS-induzierten Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von 30 µl Aqua inj. (grau, n=7), 10 µM Morphin-Sulfat (blau, n=7), 1 µM BCM-7 (n=5), 10 µM BCM-7 (rosa, n=7), 100 µM BCM-7 (n=7) und 200 µM

BCM-7 (n=5) (von hell-rosa bis dunkel-rosa),  $\pm$  SD. Aqua inj. diente als Negativkontrolle. Morphin-Sulfat diente als Positivkontrolle für eine Opioid-vermittelte signifikante Hemmung der Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen. BCM-7 zeigte in keiner Konzentration eine Wirkung. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es wurden alle im Games-Howell-Post-hoc-Test ermittelten signifikanten Unterschiede dargestellt; \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

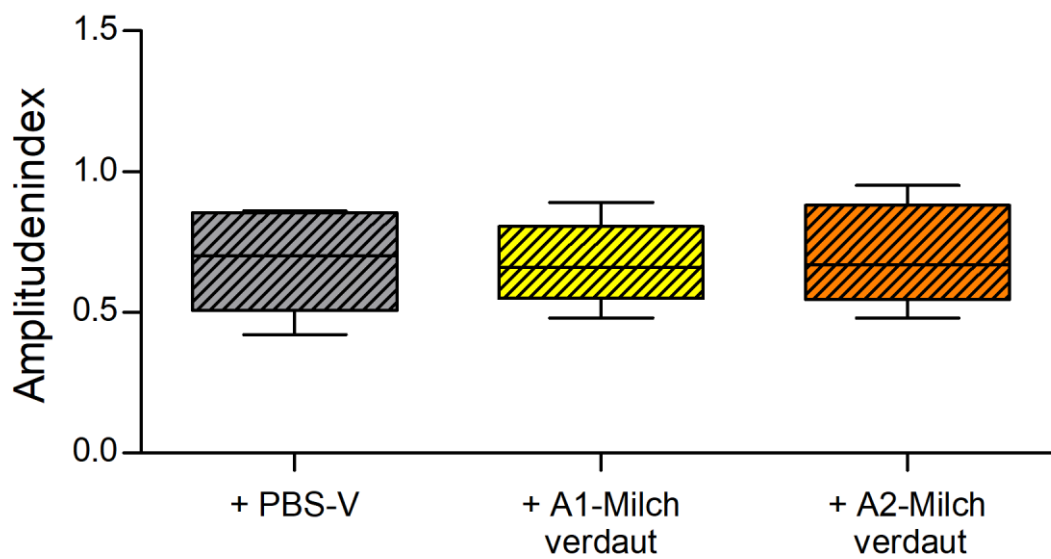
#### **4.3.2.4 Wirkung von *in vitro* verdauter A1- und A2-Milch auf die EFS-induzierten Kontraktionen**

A1-Milch steht in der Diskussion, Verdauungsbeschwerden im Darm zu verursachen (de Vasconcelos et al. 2023). Diese Wirkung wird auf das beim Verdauungsprozess entstehende BCM-7 zurückgeführt, das über Opioidrezeptoren wirken soll (Giribaldi et al. 2022). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde nachgewiesen, dass BCM-7 in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Kontraktionen der Muskulatur des porcinen Jejunums hatte. Um eine potenzielle Wirkung von verdauter A1-Milch im Gesamten zu erkennen, wurde folgend die Wirkung der *in vitro* verdauten A1- und A2-Milch auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur untersucht. Die 18 verdauten A1-Milchen und die 23 verdauten A2-Milchen wurden jeweils zu einem A1- und einem A2- Pool zusammengefasst und in einer Endkonzentration von 1% im Kontraktionsversuch eingesetzt. Während des Verdauungsprozesses der Milchen werden Enzyme, Salze, Gallensäuren und Enzymhemmer zur Milch hinzugefügt (siehe Abschnitt 3.2). Um eine Wirkung durch diese auszuschließen, wurde PBS der gleichen *in-vitro*-Verdauung unterzogen. Das daraus resultierende PBS-V enthielt alle Enzyme, Salze, Gallensäuren und Enzymhemmer und diente als Negativkontrolle im Kontraktionsversuch in einer Endkonzentration von ebenfalls 1%. Das PBS-V (n=5) hemmte die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur (siehe Abbildung 30). Der resultierende Amplitudenindex lag bei  $0,8 \pm 0,1$  (SD) (siehe Abbildung 30). Verglichen zum PBS-V zeigten weder die A1- (n=5) noch die A2-Milch (n=5) eine Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur (siehe Abbildung 30). Der Amplitudenindex der verdauten A1-Milch lag bei  $0,8 \pm 0,1$  (SD) und der verdauten A2-Milch bei  $0,8 \pm 0,2$  (SD) (siehe Abbildung 30).



**Abbildung 30: Amplitudenindizes der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von PBS-V, verdauter A1-Milch und verdauter A2-Milch.** Dargestellt sind die errechneten Amplitudenindizes der EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur nach Applikation von 1% PBS-V (grau, schräg-gestreift, n=5), 1% *in vitro* verdauter A1-Milch (gelb, schräg-gestreift, n=5), 1% *in vitro* verdauter A2-Milch (orange, schräg-gestreift, n=5),  $\pm$  SD. PBS-V diente als Negativkontrolle. Die verdauten Milchen zeigten keine Wirkung auf die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor;  $p > 0,05$ .

Auch die EFS-induzierten Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur wurden durch das PBS-V (n=5) gehemmt. Der resultierende Amplitudenindex lag bei  $0,7 \pm 0,2$  (SD) (siehe Abbildung 31). Verglichen zum verdauten PBS zeigten weder die A1- (n=5) noch die A2-Milch (n=5) eine Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 31). Der Amplitudenindex der verdauten A1-Milch lag bei  $0,7 \pm 0,1$  (SD) und der verdauten A2-Milch bei  $0,7 \pm 0,2$  (SD) (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31: Amplitudenindizes der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von PBS-V, verdauter A1-Milch und verdauter A2-Milch.** Dargestellt sind die errechneten Amplitudenindizes der EFS-induzierten Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur nach Applikation von 1% PBS-V (grau, schräg-gestreift, n=5), 1% *in vitro* verdauter A1-Milch (gelb, schräg-gestreift, n=5), 1% *in vitro* verdauter A2-Milch (orange, schräg-gestreift, n=5),  $\pm$  SD. PBS-V diente als Negativkontrolle. Die verdauten Milchen zeigten keine Wirkung auf die Amplituden der EFS-induzierten Kontraktionen. Es wurde eine Welch-ANOVA mit Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt, um auf statistische Signifikanz zu prüfen. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor;  $p > 0,05$ .



## 5 DISKUSSION

Der Konsum von boviner A1-Milch, verglichen zum Konsum von boviner A2-Milch, wird mit Verdauungsbeschwerden beim Menschen assoziiert (Jeong et al. 2023). Die Verdauungsbeschwerden sollen durch das bei der Verdauung von A1-Milch entstehende BCM-7 hervorgerufen werden (de Vasconcelos et al. 2023). A1-Milch unterscheidet sich von A2-Milch durch einen Aminosäureaustausch an Position 67 des  $\beta$ -Kaseins von Prolin (A2) zu Histidin (A1) (Truswell 2005). Dieser Aminosäureaustausch von Prolin (A2-Variante) zu Histidin (A1-Variante) soll zu einer höheren enzymatischen Spaltungs-Affinität im Dünndarm führen und damit für die vermehrte Entstehung von BCM-7 (Aminosäuresequenz 60 bis 66 des bovinen  $\beta$ -Kaseins) aus A1-Milch verantwortlich sein (Ul Haq et al. 2015). BCM-7 soll laut der Literatur nicht nur nach dem Konsum von A1-, sondern auch nach dem Konsum von A2-Milch entstehen (Cattaneo et al. 2023). Nach der ersten Entdeckung des BCM-7 wurde es mit einer Affinität zum MOR des myenterischen Plexus des Meerschweinchens beschrieben (Brantl et al. 1981). In *in-vivo*-Studien wurde immer wieder eine vermeintliche opioide Wirkung auf den Verdauungstrakt nach dem Konsum von A1-Milch diskutiert (Daniloski et al. 2021). Demnach soll der A1-Milchkonsum zu Blähungen, Bauchschmerzen und einer verlangsamten Ingestapassage beim Menschen führen (Meng et al. 2023). Ein Beleg für die Opioid-ähnliche Wirkung wurde in diesem Zusammenhang jedoch nie gegeben (Meng et al. 2023). Aus diesem Grund war es Ziel dieser Doktorarbeit, ein Verständnis für die Wirkung von BCM-7 auf die Motorik des Darms zu schaffen und eine potenzielle Wirkung von BCM-7 vergleichend mit Opioiden zu untersuchen. Das Schwein bietet sich aufgrund verdauungsphysiologischer Ähnlichkeiten zum Menschen als geeignetes translationales Modell für diese Untersuchungen an (Gonzalez et al. 2015; Atmani et al. 2023). Daher wurde das Schwein als Modelltier gewählt und die Wirkung von BCM-7, verglichen zu Opioiden, auf die Motorik der Muskulatur des porcinen Jejunums untersucht, da dort das meiste BCM-7 bei der Verdauung von Milch entstehen soll (Parashar et al. 2015).

Um eine opioide Wirkung beweisen zu können, war es primär wichtig, den MOR als potenzielle Bindestelle im Jejunum des Schweins zu lokalisieren. Da der MOR über die Neurone des ENS auf die Motorik des Darms wirkt, wurde das neuronale Zytoskelett im Jejunum des Schweins immunhistochemisch dargestellt. Damit waren



die Ganglien des myenterischen und submukösen Plexus lokalisierbar. In der immunhistochemischen Untersuchung wurden Ansammlungen von Neuronen zwischen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur der Tunica muscularis und in der Tela submucosa nachgewiesen (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Dies entspricht der Lokalisation der Ganglien des myenterischen und submukösen Plexus im Säugetier und wurde so bereits in vorherigen Studien beschrieben (Furness et al. 2018). Zwischen den Ganglien waren vereinzelte neurogene Fortsätze nachweisbar. Diese neurogenen Fortsätze spiegeln die komplexe Verschaltung der Neurone des ENS über Axone in der Darmwand wider (Chen et al. 2023). Auf den neuronalen Zellkörpern der Ganglien, sowohl des myenterischen als auch des submukösen Plexus, konnte der MOR immunhistochemisch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Dies war der erste Nachweis des MOR auf Proteinebene im Jejunum des Schweins auf dem myenterischen und submukösen Plexus (Pubmed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Eine ältere Studie wies lediglich die mRNA des MOR im Magen-Darm-Trakt des Schweins nach (Pampusch et al. 1998). Auf ein Vorhandensein der MOR-mRNA wurden dabei die Lysate der gesamten Darmwand aus allen Darmabschnitten des Schweins untersucht und auch das Epithel, die Tunica mucosa und die Tunica muscularis mit dem myenterischen Plexus des Ileums (Pampusch et al. 1998). Die MOR-mRNA wurde im gesamten Darmtrakt nachgewiesen und auch in der Tunica mucosa und Tunica muscularis mit dem myenterischen Plexus des Ileums (Pampusch et al. 1998). Von welchen Zellen die mRNA des MOR gebildet wurde, konnte nicht nachvollzogen werden (Pampusch et al. 1998). Außerdem konnte nicht bestätigt werden, ob die mRNA des MOR zu einer Ausbildung des MOR in der Zellmembran führte (Pampusch et al. 1998). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte immunhistochemische Untersuchung bestätigte das Vorhandensein des MOR und lokalisierte den MOR auf Zellebene im myenterischen und submukösen Plexus des porcinen Jejunums. Weitere Studien zur Untersuchung des Vorkommens des MOR im Magen-Darm-Trakt des Schweins wurden lediglich am Ileum und dem Kolon durchgeführt (Townsend et al. 2002; Poonyachoti et al. 2001a). Gegensätzlich zu den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, in der der MOR auf dem submukösen und myenterischen Plexus des porcinen Jejunum lokalisiert wurde, konnte der MOR in einer älteren Studie auf dem submukösen Plexus des porcinen Ileums immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden (Poonyachoti et al. 2001a). Dabei wurde ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege verwendet, der

gegen den extrazellulären N-Terminus des MOR gerichtet war (Poonyachoti et al. 2001a). Mit diesem Antikörper wurde in der gleichen Studie als Positivkontrolle der MOR im porcinen Hypothalamus nachgewiesen, womit bewiesen wurde, dass der Antikörper auch an den MOR des Schweins bindet (Poonyachoti et al. 2001a). Möglicherweise war die Affinität des verwendeten Antiköpers zu schwach, um auch eine vergleichsweise schwache Expression des MOR im Ileum, verglichen zum Hypothalamus, nachzuweisen (Poonyachoti et al. 2001a). Ob der MOR auf dem submukösen Plexus ebenfalls im Ileum des Schweins vorkommt oder nicht, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht untersucht. Die Annahme eines Fehlens des MOR auf dem submukösen Plexus im porcinen Ileum wurde aber durch eine Radioligandenbindungsstudie widerlegt (Townsend et al. 2002). Dabei wurde der MOR durch eine Bindung eines Tritium-gelabelten, selektiven MOR-Agonisten [<sup>3</sup>H]DAMGO auf dem submukösen und myenterischen Plexus des porcinen Ileums und Kolons nachgewiesen (Townsend et al. 2002). Die Bindung des MOR-Agonisten war dabei in beiden Plexus sehr schwach, aber vorhanden (Townsend et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit reihen sich in die Ergebnisse dieser Radioligandenbindungsstudie ein und zeigen, dass der MOR auch von den Neuronen des submukösen und myenterischen Plexus des porcinen Jejunums gebildet wurde. Ein Vorhandensein des MOR im Jejunum des Schweins wurde des Weiteren auch funktionell mit Morphin-Sulfat bestätigt, welches, antagonisierbar mit Naloxon, die EFS-induzierten Kontraktionen im Kontraktionsversuch im Rahmen dieser Doktorarbeit hemmte. Auch am Dickdarm wurde in einer Studie funktionell bewiesen, dass der MOR auf den Neuronen des myenterischen Plexus vorkommt (Yuan et al. 2023). So wurde mittels Manometrie in Schweinen die Dickdarmmotorik, nicht aber die Motorik des Dünndarms, nach oraler Loperamid-Administration, einem MOR-Agonisten, untersucht (Yuan et al. 2023). Die Schweine zeigten nach der Gabe von Loperamid eine verringerte Motilität im distalen und eine erhöhte Motilität im proximalen Kolon (Yuan et al. 2023). Dies bestätigte funktionell das Vorhandensein des MOR auf den Neuronen des myenterischen Plexus im Kolon des Schweins (Yuan et al. 2023). Die unterschiedliche Wirkung von Loperamid auf den proximalen Abschnitt, verglichen zum distalen Abschnitt des Kolons, wurde dabei nicht diskutiert (Yuan et al. 2023). Es könnte sein, dass eine unterschiedliche Verteilung des MOR auf hemmenden oder erregenden Neuronen des myenterischen Plexus für eine abschnittsweise motilitätssteigernde oder motilitätshemmende Wirkung verantwortlich war (Yuan et al.

2023).

Es ist bekannt, dass die Expression der Opioidrezeptoren je nach Region im Verdauungstrakt von Säugetieren variiert, was die unterschiedlichen Reaktionen der Darmmuskulatur in den verschiedenen Darmabschnitten auf Opioide erklärt. (Mosinska et al. 2016). Eine vergleichende Betrachtung des MOR, DOR und KOR auf dem myenterischen und submukösen Plexus wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt, da primär der MOR als potenzielle Bindestelle für BCM-7 von Bedeutung war. Eine quantitative Beurteilung der Expression des MOR im Vergleich zu DOR und KOR soll deshalb in weiteren Untersuchungen durchgeführt werden und liefert bei Betrachtung des gesamten Magen-Darm-Trakts wertvolle Ergebnisse über die Expression der Opioidrezeptoren. Dies würde weiter zum Verständnis der Wirkung von Opioiden auf unterschiedliche Abschnitte im Verdauungstrakt des Schweines beitragen. Die in dieser Dissertation gewonnene Erkenntnis, dass der MOR von Neuronen des ENS des Jejunums exprimiert wurde, stellt eine wesentliche Basis für nachfolgende Forschungsarbeiten dar. Diese Befunde belegen die Eignung des Jejunums als Untersuchungsobjekt für die Erforschung der Effekte von MOR-Agonisten.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der MOR neben den Neuronen des myenterischen und submukösen Plexus außerdem auf Krypten-nahen Zellen in der Lamina propria mucosae des Jejunums des Schweines nachgewiesen (siehe Abbildung 8). Die MOR-immunoreaktive Zellpopulation wurde nicht bestimmt. Diese MOR-exprimierenden, Krypten-nahen Zellen der porcinen Lamina propria mucosae wurden bereits im distalen porcinen Jejunum in einem Radioligandenbindungsassay mit dem radioaktiv-gelabelten, selektiven MOR-Agonisten [<sup>3</sup>H]DAMGO beschrieben (Quito et al. 1991). Beim Meerschweinchen konnte ebenfalls in der jejunalen Tunica mucosa eine MOR-exprimierende Zellpopulation mittels FITC-gelabelten Opioiden in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Lang et al. 1996). Auch in der humanen Tunica mucosa wurde der MOR auf Zellen immunhistochemisch nachgewiesen, die histologisch den mononukleären Immunzellen zugeordnet wurden (Sternini et al. 2004). Möglicherweise geht die MOR-Immunoreaktivität der Krypten-nahen Zellen in der Lamina propria mucosae des Jejunums des Schweines von Immunzellen aus. Dass der MOR auf den Immunzellen des Blutes des Menschen, der Maus und der Ratte vorkommt, bestätigte eine Vielzahl an Studien (Raffaelli et al. 2020; Carr et al. 1988; Hansen et al. 2021; Cechova et al. 2018). Auf Immunzellen des Schweines, war unseres

Wissens nach, das Vorkommen des MOR auf Proteinebene nicht untersucht worden (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Es wurde lediglich die mRNA des MOR auf den Immunzellen der Peyer-Platten im Ileum des Schweins nachgewiesen (Pampusch et al. 1998). In den porcinen Blutlymphozyten konnte die mRNA des MOR aber nicht nachgewiesen werden (Pampusch et al. 1998). Die Identität der MOR-exprimierenden, Krypten-nahen Zellen soll in folgenden Studien mit Leukozyten-Markern bestimmt werden. Außerdem sollen weitere Immunzellen, wie die Lymphozyten der Peyer-Platten und die Blutlymphozyten des Schweins, auf das Vorhandensein des MOR immunhistochemisch untersucht werden, um herauszufinden, ob die MOR-Expression des Schweins mit der des Menschen übereinstimmt.

Bevor BCM-7, die *in vitro* verdauten Milchen und die Opiode in einem Kontraktionsversuch zur Untersuchung der Auswirkung auf die Motilität des porcinen Jejunums eingesetzt wurden, etablierten wir das Modell zur Messung der jejunalen Motilität des Schweins. Dazu wurde zu Beginn die spontane Motilität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur erfasst. Die Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur zeigten nahezu identische und dauerhafte spontane Kontraktionsfrequenzen von jeweils  $12,8 \pm 1,7$  (SD) und  $12,5 \pm 1,7$  (SD) pro Minute. Ältere *in-vitro*-Untersuchungen am Duodenum des Schweins konnten ebenfalls Kontraktionsfrequenzen zwischen zehn und 16 pro Minute feststellen, wobei diese mit der Zeit abnahmen (Gregersen et al. 1992). Auch am caninen Ileum wurden *in-vitro* selbige gleichbleibende Frequenzen von 12,5 bis 13 Kontraktionen pro Minute ermittelt (Bogach 1959). Dass ein *in-vitro*-Modell mit isolierten Muskelstreifen nicht gänzlich die Motilitätsabläufe einer *in-vivo*-Situation repräsentiert, zeigten *in-vivo*-Studien zur Kontraktion des humanen Dünndarms (Seidl et al. 2012; Sarna et al. 1989). Mittels eines Manometriekatheters wurden im Dünndarm gesunder Probanden regelmäßige, wiederkehrende Phase I-, Phase II- und Phase III-Kontraktionsmuster detektiert, die die physiologische interdigestive Motilität mit ihren Ruhephasen, gefolgt von Phasen mit Kontraktionen, repräsentieren (Seidl et al. 2012; Sarna et al. 1989). Während der Phase I traten keine Kontraktionen auf, in der Phase II lag die Frequenz der Kontraktionen zwischen zwei und drei pro Minute und in der Phase III zwischen zehn und zwölf pro Minute (Seidl et al. 2012; Sarna et al. 1989; Kerlin et al. 1982). Unser *in-vitro*-Modell der jejunalen Muskulatur des Schweins zeigte keine Änderung der Kontraktionsmuster, sondern gleichbleibende, wiederkehrende Kontraktionen mit einheitlicher Frequenz und Amplitude. Dieses Kontraktionsmuster entsprach der Phase III der interdigestiven

Motilität.

Für das Ablaufen der Phasen I bis III der interdigestiven Motilität des Säugers ist ein intaktes ENS notwendig, das intrinsische chemische und motorische Reize in Kontraktionen umsetzt und extrinsisch moduliert wird (Kunze et al. 1999; Boesmans et al. 2008). Der Darm steht unter einer neuronal-vermittelten tonischen Hemmung, die die Spike-Potenziale der Slow Waves hemmen und somit eine Kontraktion der glatten Muskulatur verhindern (Allescher 2020). Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Muskelstreifen (2x1 cm) beinhalten nur einen kleinen Ausschnitt des komplexen Netzwerks des ENS. Durch die Präparation werden Axone durchtrennt, womit keine nervale Signalverschaltung mehr stattfinden konnte. Das Fehlen einer neuronalen Modulation der spontanen Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur des porcinen Jejunums wurde mit einer TTX-Applikation bestätigt. Nach der TTX-Applikation (1  $\mu$ M) trat keine Änderung der spontanen Motilität ein (siehe Abbildung 12). Dies bewies, dass die ICC nicht neural moduliert wurden und demnach die Frequenz der Kontraktionen auch mit der Frequenz der Slow Waves der ICC identisch sein musste.

Die Slow-Wave-Frequenz der ICC wurde beim Schwein bereits *in vivo* und *in vitro* ermittelt. Mittels intra-operativ angebrachten Elektroden wurde beim Schwein die Slow-Wave-Frequenz bestimmt, wobei die Frequenz bei zwölf pro Minute lag (Egbuji et al. 2010; Angeli et al. 2017). Auch in *ex-vivo*-Präparaten des Dünndarms des Schweins konnte mit Elektroden eine Slow-Wave-Frequenz von zwölf pro Minute ermittelt werden (Nagahawatte et al. 2021). Die am Schwein gemessenen Kontraktionen, und demnach auch die Slow-Wave-Frequenzen, sind gleich zu der des Menschen (Christensen et al. 1966; Egbuji et al. 2010; Angeli et al. 2017). Das humane Duodenum zeigte *in vitro* eine mit Elektroden ermittelte Frequenz der Slow Waves von zwölf pro Minute (Bauer et al. 1991). Die Frequenz der Slow Waves des menschlichen Darms wurde auch *in vivo* mittels intraluminaler Elektroden als „basic electric rhythm“ an der Mukosa erfasst (Christensen et al. 1966). Dabei lag die Frequenz am proximalen Dünndarm ebenfalls bei zwölf pro Minute und nahm aboral langsam ab (Christensen et al. 1966). Am humanen Kolon wurde nach einem ähnlichen Verfahren mit intraluminalen Elektroden eine Frequenz von elf pro Minute ermittelt (Sarna et al. 1980). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde demnach ein Modell am Schwein entwickelt mit dem, unabhängig des ENS, die spontane Motilität durch die Schrittmacherfunktion der ICC untersucht werden konnte und die Frequenz der

Kontraktionen der jejunalen Muskulatur identisch zu der Slow Wave Frequenz der ICC bei 12,5 pro Minute war. Dies zeigt, dass sich das Modell des Schweins als physiologisch-ähnliches Modell zur Untersuchung der humanen Darmmotorik der Phase III der interdigestiven Darmmotorik für den Menschen eignet.

Im Gegensatz dazu sind die Slow-Wave-Frequenzen bei anderen klassischen Modelltieren anders als beim Menschen (Hou et al. 2005). Bei Mäusen wurde *in vivo* eine höhere Frequenz der Slow Waves ermittelt (Hou et al. 2005). Dazu wurden operativ bipolare Elektroden serosal zwei Zentimeter distal des Pylorus platziert, um folgend im Wachzustand die Slow Waves der ICC zu detektieren (Hou et al. 2005). Die Slow-Wave-Frequenz lag bei 19 pro Minute und war damit höher als beim Schwein oder Menschen (Hou et al. 2005). Auch am Dünndarm des Meerschweinchens wurden höhere Slow-Wave-Frequenzen detektiert (Gwynne et al. 2007). Diese lagen *in vitro* bei 20 pro Minute im Duodenum, bei 17 pro Minute im Jejunum und bei 16 pro Minute im Ileum (Gwynne et al. 2007). Es zeigt sich damit deutlich, dass im Gegensatz zum Schwein, die Maus und das Meerschweinchen als Modelltiere nicht die physiologischen Kontraktionsabläufe des Menschen abbilden und weniger als Modelle zur Untersuchung der Darmmotilität des Menschen geeignet sind.

Neben den spontanen Kontraktionen konnten am porcinen Jejunum außerdem ENS-vermittelte Kontraktionen untersucht werden. Diese wurden am Muskelkontraktionsmessplatz durch die EFS (30 V, 20 Hz mit 0,9 ms Impulsen für 300 ms, jede Minute) induziert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde demnach erfolgreich ein Modell etabliert, welches die Wirkung von  $\mu$ -Opioidanaloga auf die EFS-induzierten Kontraktionen des porcinen Jejunums als Modell für den Menschen abbildete. Dies wurde durch die reversibel hemmende Wirkung von Morphin-Sulfat auf die EFS-induzierten Kontraktionen nachgewiesen. Naloxon-Hydrochlorid hob die Wirkung von Morphin-Sulfat auf und blockierte diese, was darauf hindeutete, dass die hemmende Wirkung von Morphin-Sulfat auf die EFS-induzierten Kontraktionen über Opioidrezeptoren vermittelt wurde (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Die EFS-induzierten Kontraktionen wurden durch TTX gänzlich gehemmt, wodurch bestätigt wurde, dass die EFS nicht direkt an der Muskulatur wirkte, sondern der Impuls der EFS neural vermittelt wurde (siehe Abbildung 22). TTX hemmte die spannungsabhängigen Natriumkanäle der Neurone, die an der Reizweiterleitung zu den ICC und den Muskelzellen beteiligt waren, wodurch keine Depolarisation stattfinden konnte und kein Aktionspotenzial entstehen konnte.

Anhand dieses Modells wurde keine Wirkung von BCM-7 in allen untersuchten Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  sowohl auf die EFS-induzierten Kontraktionen der Longitudinal- als auch der Zirkulärmuskulatur detektiert (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29). Demnach konnte an der glatten Muskulatur des Schweins und auf das ENS keine Opioid-ähnliche Wirkung nachvollzogen werden. Ähnliche Untersuchungen am Schwein sind uns nicht bekannt (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Nur beim Meerschweinchen wurde zuvor die Wirkung von BCM-7 *in vitro* am Ileum an einem Muskelkontraktionsmessplatz untersucht (Koch et al. 1985). Dabei bewirkte BCM-7 eine Reduzierung der EFS-induzierten Kontraktionen, welche durch Naloxon aufhebbar war (Koch et al. 1985). Die mittlere inhibitorische Konzentration von BCM-7 am Ileum des Meerschweinchens lag dabei bei 5  $\mu\text{M}$ , wobei die Anzahl der in dieser Studie untersuchten Meerschweinchen nicht angegeben wurde (Koch et al. 1985). Die EFS wurde alle 10 Sekunden bei 60 Volt für 0,5 ms angewendet und führte zu einer supramaximalen Kontraktion der glatten Darmmuskulatur (Koch et al. 1985). Beim Schwein wird, wie in dieser Doktorarbeit verwendet, bereits eine supramaximale Kontraktion ab einer Spannung von 30 Volt erreicht (Koch et al. 1985). Es wurde eine Opioid-ähnliche Wirkung durch BCM-7 am MOR des Meerschweinchens angenommen (Koch et al. 1985). Möglicherweise besitzt BCM-7 eine Affinität zum MOR des Meerschweinchens und nicht zum MOR des Schweins. Eine Radioligandenbindungsstudie, die eine Bindung des BCM-7 am MOR des Meerschweinchens untersucht, wurde bisher nicht durchgeführt (Pub-Med-Recherche, Stand: 19.03.2024). Nur am MOR der Ratte wurden bisher Radioligandenbindungsstudien mit BCM-7 durchgeführt und eine Affinität, wenn auch 500-fach schwächer verglichen zu Normophin, festgestellt (Koch et al. 1985; Brantl et al. 1981). Weitere Radioligandenbindungsstudien an anderen Spezies mit BCM-7 sind nicht publiziert worden (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024).

Die Opioidrezeptoren bei Säugetieren sind sehr ähnlich, weisen jedoch Spezies-spezifische Unterschiede in den jeweiligen Proteinsequenzen auf (Stevens 2009). Dadurch entstehen unterschiedliche Affinitäten zu Opioidliganden innerhalb der Säuger (Stevens 2009). Dies könnte erklären, warum BCM-7 nicht auf die EFS-induzierten Kontraktionen des porcinen Jejunums wirkte, jedoch die EFS-induzierten Kontraktionen des Ileums des Meerschweinchens hemmte. Um die fehlende Affinität von BCM-7 am porcinen MOR zu bestätigen und am humanen MOR zu untersuchen, sollte eine Radioligandenbindungsstudie am humanen und porcinen MOR

durchgeführt werden. Außerdem wäre eine vergleichende Untersuchung der Wirkungen von Opioiden und Neurotransmittern auf die humane und porcine Dünndarmmuskulatur sinnvoll, um das Schwein als Modell für den Menschen weiter zu charakterisieren. Neben der Wirkung auf den Magen-Darm-Trakt des Menschen und des Schweins, wäre eine Untersuchung der Wirkung von BCM-7 und A1- und A2-Milch auf den Magen-Darm-Trakt des Kalbes interessant. Ob BCM-7 an Opioidrezeptoren des Kalbs wirkt, wurde bisher nicht untersucht (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Das Kalb repräsentiert den natürlichen Konsumenten der bovinen A1-Milch, wodurch interessant wäre, ob das entstehende BCM-7 einen evolutionär förderlichen Effekt hatte, wodurch die A1-Varinate weitervererbt wurde. Eine Fütterung von Kälbern mit A1-Milch verglichen zur A2-Milch zeigte jedenfalls keine Unterschiede in Bezug auf Wachstum, Stuhlkonsistenz und täglicher Milchaufnahme bei Kälbern (Kappes et al. 2024). Demnach ist eine Wirkung auf den Magen-Darm-Trakt beim Kalb durch BCM-7 aus A1-Milch eher unwahrscheinlich.

Da der gesundheitsbeeinflussende Effekt von A1-Milch auf das entstehende BCM-7 postuliert wurde (Thiruvengadam et al. 2021), jedoch keine Wirkung von BCM-7 auf die Darmmotorik des Schweins festgestellt wurde, war es ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit, die direkte Wirkung der A1- und A2-Milch auf die Kontraktionen des porcinen Jejunums zu untersuchen, um den möglichen Einfluss anderer Faktoren aus den Verdauungsprodukten zu erfassen. Um dies möglichst physiologisch-nah abzubilden, wurde die A1- und A2-Milch zuvor einer *in-vitro*-Verdauung unterzogen. Dazu wurde A1-Milch von 18 homozygoten A1-Rindern und A2-Milch von 23 homozygoten A2-Rindern *in vitro* verdaut und folgend auf die entstandenen BCM-7-Konzentrationen mit einem ELISA zur Detektion von BCM-7 untersucht. Wir entschieden uns für einen reproduzierbaren, nicht-invasiven *in-vitro*-Verdauungsprozess mit simulierten Magen- und Darmphasen, wie er standardisiert eingesetzt wird, um die Verdauung des Menschen zu simulieren (Brodkorb et al. 2019; Minekus et al. 2014). In vorherigen *in-vitro*-Untersuchungen zur Entstehung von BCM-7 wurde Milch teils nur mit Trypsin und Pepsin verdaut (Cieślińska et al. 2007). Dies repräsentiert jedoch unzureichend die physiologisch komplexe Verdauung unter Einwirkung von Enzymen aus dem Magen und dem Pankreas des Monogastriers (Sanchón et al. 2018). Dass eine vermehrte BCM-7-Freisetzung von mehreren Enzymen als nur Pepsin und Trypsin abhängig ist, zeigte eine *in-vitro*-Verdauungsstudie, in der das entstandene BCM-7 nach unterschiedlichen



Enzymzusammensetzungen mittels eines kompetitiven ELISA quantifiziert wurde (Ul Haq et al. 2015). Die maximale BCM-7-Entstehung erforderte die Enzyme Pepsin, Chymotrypsin, Elastase und LAP (Ul Haq et al. 2015). Daher wurde der Verdauungsprozess im Rahmen dieser Doktorarbeit mit Pepsin in der Magenphase und mit Pankreatin in der Dünndarmphase durchgeführt und imitierte dadurch die physiologische Verdauung des Monogastriers *in vitro*. Anschließend wurde die BCM-7-Konzentration in den verdauten A1- und A2-Milchen einzeln mit einem kompetitiven ELISA zur Detektion von BCM-7 ermittelt. In den verdauten A1-Milchen wurden signifikant (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) höhere BCM-7-Konzentrationen von  $52,4 \pm 15,2 \mu\text{g/ml}$  ( $\pm$  SD) als in den verdauten A2-Milchen gemessen. Die BCM-7-Konzentrationen in den A2-Milchen lagen bei  $4,4 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$  ( $\pm$  SD). Mit dem Vorhandensein von BCM-7 wurde ein erfolgreicher Verdauungsvorgang bewiesen. Die ermittelten BCM-7-Konzentrationen in A1- und A2-Milch sind ähnlich zu ermittelten BCM-7-Konzentrationen in einer *in-vitro*-Verdauungsstudie von aufgereinigtem A1- und A2- $\beta$ -Kasein (Asledottir et al. 2017). In dieser Studie wurde aufgereinigtes A1- und A2- $\beta$ -Kasein einer *in-vitro*-Verdauung mit humanen Magen- und Dünndarmsäften von gesunden Spendern unterzogen und anschließend die BCM-7-Konzentration mittels LC/MS und Isotopen-gelabeltem BCM-7-Standards ermittelt (Asledottir et al. 2017). Es wurden, umgerechnet auf einen Milliliter Milch,  $40 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 aus A1-Milch und  $14 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 aus A2-Milch nachgewiesen (Asledottir et al. 2017). Die selbige Arbeitsgruppe verdaute neben A1- und A2- $\beta$ -Kasein auch entfettete Kuhmilch von genotypisierten homozygoten A1- und A2-Rindern im selben *in-vitro*-Verdauungsverfahren mit humanen Magen- und Dünndarmsäften und konnte dabei nur  $18,6 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 in verdauter A1-Milch und  $0,1 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 in verdauter A2-Milch nachweisen (Asledottir et al. 2018). Wie es zu diesen unterschiedlichen Konzentrationen zwischen den beiden Studien mit den gleichen Verdauungsverfahren kam, wurde nicht diskutiert (Asledottir et al. 2018). Weitere Verdauungsstudien mit A1- und A2-Milch zeigten ebenfalls, wie variabel die BCM-7-Konzentrationen nach der *in-vitro*-Verdauung mit simulierten Magen- und Darmphasen sein können und wiesen jeweils  $59 \mu\text{g/ml}$ ,  $12 \mu\text{g/ml}$  oder  $8,7 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 in A1-Milch und jeweils  $35 \mu\text{g/ml}$ ,  $9 \mu\text{g/ml}$  oder  $5,8 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 in A2-Milch nach (Cattaneo et al. 2023; Lambers et al. 2021; Buatig et al. 2023). Grundsätzlich reiht sich das Ergebnis dieser Doktorarbeit in diese Studien ein und beweist, dass BCM-7 während der *in-vitro*-Verdauung vermehrt aus der A1-Milch, aber auch aus A2-Milch in niedrigeren Konzentrationen entsteht. Warum es zu

unterschiedlichen Konzentrationen von BCM-7 zwischen den Studien innerhalb der A1- und A2-Milchen kam, lag möglicherweise an mehreren Faktoren. Beispielsweise wurde in manchen Studien ausschließlich Pepsin, Trypsin oder Elastase für die *in-vitro*-Verdauung verwendet, während in anderen Studien eine simulierte Verdauung mit einer Magenphase unter Einsatz von Pepsin und einer Darmphase mit Pankreatin durchgeführt wurde (Cieslinska et al. 2012; Ul Haq et al. 2015). Dass die Enzymzusammensetzung zu einem Unterschied in der zu entstehenden BCM-7-Menge beiträgt, wurde in einer bereits zitierten Studie nachgewiesen (Ul Haq et al. 2015). Diese zeigte, dass die höchste Menge an BCM-7 freigesetzt wird, wenn Pepsin, Chymotrypsin, Elastase und LAP an der Verdauung beteiligt waren (Ul Haq et al. 2015). Darüber hinaus variierten die Studien hinsichtlich der Inkubationszeiten, wodurch mehr oder weniger BCM-7 entstehen könnte. In einer Studie wurde gezeigt, dass die Dauer der simulierten Magen- und Darmphase einen Einfluss darauf hat, wie viel BCM-7 gebildet wird, da die Enzyme unterschiedlich lange aktiv sind und BCM-7 nach der Entstehung auch weiter abgebaut werden soll (Asledottir et al. 2017). Des Weiteren könnte die Verwendung von unterschiedlich verarbeiteten Milchen oder aufgereinigten Kaseinen zwischen den Studien zu unterschiedlichen BCM-7-Konzentrationen führen (Asledottir et al. 2017; Asledottir et al. 2018). Es wurde festgestellt, dass aus unbehandelter Milch mehr BCM-7 freigesetzt wird (8,3 µg/ml) als aus pasteurisierter Milch (5,1 µg/ml), was laut der Autoren an der Proteindenaturierung durch das Erhitzen und einer dadurch veränderten Verdauungskinetik der Milchproteine lag (Lambers et al. 2021). Außerdem könnten die verschiedenen Messmethoden, wie eigens entwickelte ELISA oder LC/MS, zu Unterschieden in den gemessenen BCM-7-Konzentrationen zwischen den Studien führen (Lambers et al. 2021). In einer ersten Verdauungsstudie aus dem Jahr 1997 wurde BCM-7 in einer *in-vitro*-Verdauung mit LAP nur in verdauter A1-Milch aber nicht in verdauter A2-Milch detektiert (Hartwig 1997). Eine folgende *in-vitro*-Verdauungsstudie verdaute A1- und A2-Milch mit Pepsin und mikrobieller Corolase und detektierte BCM-7 ebenfalls nur in der verdauten A1-Milch mittels LC/MS (Noni 2008). Daraus wurde gefolgert, dass der Aminosäureaustausch von Prolin zu Histidin im A1-β-Kasein zu der Entstehung von BCM-7 führe und BCM-7 nur aus der A1-Variante entstehen soll (Hartwig 1997; Noni 2008). Die verwendete *in-vitro*-Verdauung in diesen Studien repräsentierte dabei nicht die physiologische Verdauung des Menschen, wie sie im Rahmen dieser Doktorarbeit und in den jüngere Verdauungsstudien *in vitro* imitiert wurde (Cattaneo et al. 2023;

Buatig et al. 2023). Die ursprüngliche Annahme, dass aus A2- $\beta$ -Kasein kein BCM-7 entsteht, wurde durch diese Doktorarbeit und die jüngeren *in-vitro*-Verdauungsstudien somit entkräftet. Dementsprechend sollte auch A2-Milch potenziell durch das entstehende BCM-7 wie A1-Milch wirken.

Um die Wirkung der Verdauungsprodukte aus der A1-Milch und der A2-Milch auf die Muskulatur des Jejunums zu untersuchen, wurden diese Verdauungsprodukte folgend im Kontraktionsversuch am porcinen Jejunum eingesetzt. Dabei zeigten weder die Verdauungsprodukte der A1- noch der A2-Milch eine Wirkung auf die EFS-induzierten Kontraktionen der porcinen Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31). Dies zeigte, dass die Verdauungsprodukte, inklusive des entstandenen BCM-7, der A1-Milch und der A2-Milch nicht auf den MOR des porcinen Jejunums in den eingesetzten Konzentration wirkten. Neben BCM-7 sollen bei der Verdauung von A1- und A2- $\beta$ -Kasein auch weitere  $\beta$ -Casomorphine wie BCM-5, -6, -8, -9 entstehen (Lambers et al. 2021; Ul Haq et al. 2015; Edwards et al. 2021). Diese sollen, wie das BCM-7 am MOR, mit unterschiedlichen Affinitäten wirken, wodurch verdaute Milch eine hohe Konzentration potenzieller MOR-Agonisten beinhalten würde (Brantl et al. 1981; Koch et al. 1985). Es konnte somit bewiesen werden, dass der Konsum von A1- und A2-Milch mit den, aus der Verdauung resultierenden, potenziell opioiden Peptiden, zu keiner Wirkung auf die Kontraktionen des porcinen Jejunums führt. Es liegen keine weiteren Studien vor, die vergleichend die Wirkungen von A1- und A2-Milch auf die Darmmuskulatur *in vitro* analysierten (Pubmed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Lediglich *in-vivo*-Studien untersuchten die postulierten Wirkungen der A1-Milch, die zu Verdauungsbeschwerden führen soll. Erste Fütterungsversuche wurden an Hunden und Ratten durchgeführt (Daniel et al. 1990; Defilippi et al. 1995). Bei Hunden wurde nach intragastraler Verabreichung von Sojaprotein oder Kasein, ungeachtet der  $\beta$ -Kasein-Variante, mittels Manometrie die Magenentleerung *in vivo* untersucht (Defilippi et al. 1995). Dabei führte Kasein im Vergleich zu Sojaprotein zu einer verlangsamten Magenentleerung (Defilippi et al. 1995). Durch eine vorherige Applikation von Naloxon soll diese Wirkung aufgehoben worden sein, was auf eine Opioid-artige Wirkung des Kaseins hindeutete (Defilippi et al. 1995). Dieses *in-vivo*-Modell spiegelte eine *in-vivo*-Verdauungssituation wider, die am Modell in dieser Doktorarbeit durch die EFS *in vitro* simuliert wurde. Ein Opioid-ähnlicher Effekt der Verdauungsprodukte der A1- und A2-Milchen wurde dabei, wie bereits beschrieben, nicht beobachtet. Ob die Wirkung am Magen der Hunde durch  $\beta$ -Casomorphine

vermittelt wurde, ist fraglich, da diese vor allem erst ab dem Duodenum durch die enzymatische Aktivität der Pankreasenzyme entstehen sollen, und weniger bereits im Magen durch Pepsin (Daniloski et al. 2021). An Ratten wurde ein ähnliches Experiment *in vivo* durchgeführt (Daniel et al. 1990). Die Ratten wurden oral mit einem radioaktiven Tracer substituiert, während sie eine Diät mit hydrolysiertem Kasein- oder Molkenprotein erhielten (Daniel et al. 1990). Dabei führte die Kasein-haltige Diät zu einer verlangsamten Magenentleerung, was teilweise durch eine intraperitoneale Naloxon-Injektion aufgehoben wurde (Daniel et al. 1990). Auch in dieser Studie wurde eine Opioid-ähnliche Wirkung durch Kaseine angenommen, die aber nicht weiter untersucht wurde (Daniel et al. 1990). Diese Hypothesen über die Wirkung von Kasein wurden in weiteren *in-vivo*-Studien aufgenommen, auf welchen die postulierten Effekte von A1-Milch auf den Darm wie Verstopfung, Durchfall, Blähungen und Bauchschmerzen beruhen (Barnett et al. 2014). In der ersten Studie wurden Ratten entweder mit A1- oder A2-Milchpulver gefüttert und die Passagezeit der Ingesta analysiert (Barnett et al. 2014). Hierfür wurde den Ratten nach einer zwölf-stündigen Nahrungskarenz ein Tracer in Form von Titandioxid oral verabreicht (Barnett et al. 2014). Zusätzlich erhielt die Hälfte der Tiere aus jeder Gruppe gleichzeitig mit dem Tracer eine intraperitoneale Injektion des Opioid-Antagonisten Naloxon (Barnett et al. 2014). Die Ausscheidung des Tracers im Stuhl wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (null, vier, sechs, acht, elf, 14, 21 und 24 Stunden nach der Applikation) gemessen (Barnett et al. 2014). Die ersten Ratten aus beiden Diätgruppen begannen nach vier Stunden mit der Ausscheidung, während erst 17 Stunden später alle Ratten sowohl der A1-, als auch der A2-Gruppe den Tracer ausschieden (Barnett et al. 2014). Zu bestimmten Messzeitpunkten schieden weniger Tiere der A1-Gruppe im Vergleich zur A2-Gruppe und zur Naloxon behandelten A1-Gruppe den Tracer aus (Barnett et al. 2014). Aus diesem Grund wurde die Fütterung der A1-Milch mit einer opioiden Wirkung assoziiert, die zu einer Verlangsamung der Darmpassage führen sollte (Barnett et al. 2014). Dabei gilt zu beachten, dass nach 24 Stunden, also am Ende der Studie, nur circa 60% des oral applizierten Tracers in der A1- Gruppe und 57% in der A2-Gruppe zurückgewonnen wurden (Barnett et al. 2014). Die Autoren begründeten dies mit einer möglichen Retention des Tracers im Magen-Darm-Trakt oder eines nicht vollständigen oralen Applizierens des Tracers (Barnett et al. 2014). Ob unter diesen Rahmenbedingungen eine korrekte Aussage über eine Wirkung der A1- oder A2-Milchdiät getroffen werden kann, ist fraglich. Des Weiteren wurde die Studie durch ein

Unternehmen gesponsort, das sich auf die Vermarktung von A2-Milch spezialisiert hatte (Barnett et al. 2014). Ein Teil der Autoren war zu dem Zeitpunkt der Studie in selbigem Unternehmen angestellt, wodurch Interessenskonflikte zu einem Ergebnis beigetragen haben könnten, die gegen einen Konsum von A1-Milch werben sollten (Barnett et al. 2014). Die teils widersprüchlichen Ergebnisse im Zusammenhang mit BCM-7 unterstrich eine *in-vivo*-Studie am Menschen (He et al. 2017). In dieser multizentrisch randomisiert kontrollierten Studie wurden 600 Teilnehmer mit selbstberichteter, also nicht ärztlich diagnostizierter, Laktoseintoleranz einbezogen (He et al. 2017). Die Probanden konsumierten entweder 300 ml Milch mit 58% A1- und 42 % A2- $\beta$ -Kasein oder 100% A2- $\beta$ -Kasein, gefolgt von einer 7-tägigen Auswaschphase, nach der sie die jeweils andere Milch konsumierten (He et al. 2017). Über eine Verblindung der Studie wurde nicht berichtet (He et al. 2017). Die Probanden berichteten, dass nur der Konsum der Milch mit der A1- $\beta$ -Kasein-Variante zu häufigerem Stuhlabsatz, weicherem Stuhl und mehr Verdauungsbeschwerden wie Blähungen und Bauchschmerzen in den ersten 12 Stunden nach dem Konsum geführt haben soll (He et al. 2017). Die Autoren diskutierten in diesem Zusammenhang eine Inflammation, welche möglicherweise durch oxidativen Stress durch das entstehende BCM-7 aus 300 ml Milch hervorgerufen wurde (He et al. 2017). Diese Studie wurde ebenfalls von dem Unternehmen gesponsort, welches sich auf die Vermarktung von A2-Milch spezialisiert hatte (He et al. 2017). In dieser Studie wurde BCM-7, unabhängig der postulierten Opioid-ähnlichen Wirkung, die zu festerem Stuhl und verlangsamter Ingestapassage führt, eine pro-inflammatorische Wirkung im Magen-Darm-Trakt zugesprochen, was zu einer schnelleren Ingestapassage führen soll (He et al. 2017; Barnett et al. 2014). Die Annahme über eine entzündliche Wirkung ist komplett gegensätzlich zu anderen Studien, die die Proliferation von Darm-Immunzellen des Menschen *in vitro* untersuchten und nach vier Tagen eine Hemmung der Concanavalin A-induzierten Proliferation durch BCM-7 zeigten (Elitsur et al. 1991). Dieser Effekt wurde auf eine immunsuppressive opioide Wirkung von BCM-7 zurückgeführt (Elitsur et al. 1991). Ob die A1- bzw. A2-Variante oder BCM-7 eine Entzündung im Magen-Darm-Trakt bewirken kann, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht untersucht. Die beschriebene widersprüchliche entzündungsfördernde oder entzündungshemmende Wirkung von BCM-7 auf den Darm soll deshalb zukünftig weiter untersucht werden, um auch Klarheit über die Wirkung durch BCM-7 zu schaffen.

Eine weitere Studie am Menschen unterstrich die Variabilität und die freie Interpretation der erhobenen Daten bezüglich einer postulierten Wirkung durch A1-Milch. In einer doppelt-verblindeten randomisierten Pilot-Studie wurden Stuhlkonsistenz und Verdauungsbeschwerden von 41 gesunden Männern und Frauen nach dem Konsum von A1- oder A2-Milch untersucht (Ho et al. 2014). Dabei soll der Konsum von 750 ml A1-Milch pro Tag zu signifikant höheren Stuhlkonsistenzen ( $3,87 \pm 0,11$  SEM), verglichen zur A2-Milch ( $3,56 \pm 0,15$  SEM), geführt haben (Ho et al. 2014). Die Stuhlkonsistenzen beider Gruppen lagen demnach im optimalen Bereich des Bristol Stoolscores (Ho et al. 2014). Es wurde thematisiert, dass der A1-Milchkonsum zu vermehrten Verdauungsbeschwerden führe, wobei die Ergebnisse zeigten, dass Verdauungsbeschwerden nach dem Konsum beider Milchen festgestellt wurden (Ho et al. 2014). Dennoch folgerten die Autoren, dass die Verdauungsbeschwerden durch die entzündliche Wirkung von A1- $\beta$ -Kasein hervorgerufen wurden (Ho et al. 2014). Außerdem soll eine längere Passagezeit zu einer verstärkten mikrobiellen Fermentation der Ingesta führen und dadurch Bauchschmerzen entstehen (Ho et al. 2014). Wie die A1-Variante ihre postulierte Wirkung vermittelt haben soll, wurde in dieser Studie nicht diskutiert (Ho et al. 2014). Diese Studie wurde ebenfalls von einem Unternehmen gesponsort, welches sich auf die Vermarktung von A2-Milch spezialisierte (Ho et al. 2014). Eine Autorin war zu dem Zeitpunkt Angestellte in diesem Unternehmen (Ho et al. 2014). Von dieser Art Studien gibt es zahlreiche weitere, in denen über Probandenaussagen Daten erhoben wurden, die auf einen wohltuenden Effekt der A2-Milch hindeuten sollen. All diese Studien sind von demselben Unternehmen gesponsort, welches A2-Milch vermarktet. In keiner Studie wurden wissenschaftlich-fundierte Daten erhoben, die auf eine nachvollziehbare Wirkung durch A1-Milch und BCM-7 schließen lassen (Ho et al. 2014; Sheng et al. 2019; He et al. 2017; Meng et al. 2023; Jianqin et al. 2016). In dieser Doktorarbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass BCM-7 und auch die Verdauungsprodukte von A1- und A2-Milch keine Auswirkungen auf die Kontraktionen der Muskultur des porcinen Jejunums zeigten (siehe Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 30 und Abbildung 31). Die höchste im Kontraktionsversuch eingesetzte Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  BCM-7 entspricht bereits einer nicht physiologisch erzeugbaren BCM-7-Konzentration nach oraler Aufnahme von Milch. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass aus A1-Milch  $52,4 \mu\text{g/ml}$  BCM-7 freigesetzt werden. Selbst bei einer optimistischen Absorptionsrate von 1% intaktem BCM-7

( $M_{BCM-7} \approx 790 \frac{g}{mol}$ ) durch das Darmepithel und ohne Abbau durch Peptidasen wie DPPIV, müsste ein Mastschwein 1206 Liter A1-Milch auf einmal aufnehmen, um eine BCM-7-Konzentration von 200  $\mu M$  in vier Liter Blut zu erreichen. Für eine Diffusion in das Gewebe, wie der Darmmuskulatur, wäre eine noch größere Menge Milch erforderlich, um diese Konzentration aufrechtzuerhalten. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass, selbst wenn BCM-7 in höheren Konzentrationen auf die Opioidrezeptoren des Magen-Darm-Trakts des Schweins oder Menschen wirken sollte, es nicht möglich ist, solche Milchmengen aufzunehmen.

Neben den EFS-induzierten Kontraktionen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit auch die Wirkung von Morphin-Sulfat, Naloxon-Hydrochlorid und BCM-7 auf die spontanen Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur des porcinen Jejunums untersucht. BCM-7 zeigte dabei in allen untersuchten Konzentrationen von 1  $\mu M$  bis 200  $\mu M$  keine Wirkung auf die Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Dies zeigte, wie schon bei den EFS-induzierten Kontraktionen, dass BCM-7 die Motilität des porcinen Jejunums nicht beeinflusst oder eine weitaus höhere Konzentration notwendig wäre, um eine Wirkung festzustellen.

Morphin-Sulfat bewirkte dabei in der Konzentration von 50  $\mu M$  eine Steigerung der Kontraktionsstärke der spontanen Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Wie bereits diskutiert, wirkte TTX nicht auf die spontanen Kontraktionen (siehe Abbildung 12). Auch die Steigerung der spontanen Kontraktionen durch Morphin-Sulfat wurden durch eine TTX-Applikation nicht beeinflusst (siehe Abbildung 14). Demnach wurden auch die gesteigerten spontanen Kontraktionen durch Morphin-Sulfat nicht neural vermittelt. Es ist davon auszugehen, dass die Kontraktionssteigerung durch Morphin-Sulfat über die ICC oder die Muskelzellen direkt und nicht neural über das ENS vermittelt wurde. An welchen Zellen Morphin-sulfat wirkte, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht untersucht.

Dass Morphin-Sulfat die Kraft der spontanen Kontraktionen der Dünndarmmuskulatur *in vitro* steigern kann, wurde bereits beim Kaninchen, der Maus und der Ratte beobachtet (Bian et al. 2015; Iwata et al. 2007; Sienkiewicz-Szłapka et al. 2009). Am Kaninchen steigerte Morphin-Sulfat *in vitro* die Amplituden der spontanen Kontraktionen des Ileums in Konzentrationen von 126  $\mu M$  bis 12,6 mM (Sienkiewicz-Szłapka et al. 2009). Auch am Ileum der Maus wurde *in vitro* eine Zunahme der Kontraktion der Zirkulärmuskulatur durch Morphin-Hydrochlorid ab einer Konzentration

von 1  $\mu\text{M}$  gemessen (Iwata et al. 2007). Eine *in-vitro*-Studie am Ileum der Ratte kam zu den gleichen Ergebnissen (Bian et al. 2015). Dabei wirkte Morphin-Hydrochlorid ab einer Konzentration von 13  $\mu\text{M}$  kontraktionssteigernd auf die spontanen Kontraktionen (Bian et al. 2015). Ob Morphin diese kontraktionssteigernde Wirkung in den drei zitierten Studien über Opioidrezeptoren der Neurone, der ICC oder der Muskelzellen vermittelte, wurde in keiner der Studie untersucht (Bian et al. 2015; Iwata et al. 2007; Sienkiewicz-Szłapka et al. 2009). Die ICC wären eine mögliche Bindestelle für MOR-Agonisten wie Morphin. Auf den ICC der Ratte wurde der MOR bereits von Magen bis zum Kolon immunhistochemisch nachgewiesen (Bagnol et al. 1997; Gray et al. 2006). Auch in der immunhistochemischen Untersuchung im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde am proximalen Jejunum des Schweins eine schwache Immunreaktivität des MOR auf Zellen um den myenterischen Plexus und auch in der Longitudinalmuskulatur festgestellt (siehe Abbildung 7). Das Vorkommen des MOR könnte auf die ICC zurückzuführen sein, die sich als ICC-MP um den myenterischen Plexus oder als ICC-LM in der Longitudinalmuskulatur des Menschen anordnen (Radu et al. 2023; Vanderwinden et al. 1999). Demnach ist es möglich, dass die Kontraktionssteigerung der spontanen Kontraktionen am porcinen Jejunum über die Opioidrezeptoren der ICC vermittelt wurde, was zu einer gesteigerten Kalziumleitfähigkeit und zu mehr Spike-Potenzialen der Slow Waves führen könnte. Die isolierte und direkte Wirkung von Opioiden auf die ICC wurde unseren Wissens nach noch bei keiner Tierart untersucht (PubMed-Recherche, Stand: 05.03.2024). Ob Morphin-Sulfat die Opioidrezeptoren der ICC des Schweins aktiviert, soll zukünftig mit Antikörpern gegen einen aktivierten, also phosphorylierten MOR am porcinen Jejunum immunhistochemisch untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit, wie Morphin-Sulfat die spontanen Kontraktionen des porcinen Jejunums verstärkt haben könnte, ist die Wirkung über Opioidrezeptoren der glatten Muskelzellen. Es wurde festgestellt, dass der MOR, DOR und der KOR auf der glatten Muskulatur des Darms des Meerschweinchens exprimiert wird (Murthy et al. 1996). Die Opioidrezeptoren sind selektiv an G-Proteine gekoppelt und führen bei einer Aktivierung durch Morphin-Sulfat zu einer Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$  durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine (Murthy et al. 1996). Dadurch soll die Inositol-3-Phosphat-abhängige Kalzium-Freisetzung stimuliert werden, wodurch Kontraktionen der glatten Muskulatur ausgelöst werden (Murthy et al. 1996). Dieser Mechanismus, der im Meerschweinchendarm nachgewiesen wurde, könnte auch am Jejunum des Schweins für eine Steigerung der Kontraktionen durch Wirkung an den



Opioidrezeptoren der Muskelzellen gesorgt haben. Neben der Wirkung von Opioiden auf die ICC soll auch die Wirkung von Opioiden auf die glatten Muskelzellen des porcinen Jejunums mit Antikörpern gegen den phosphorylierten MOR am porcinen Jejunum immunhistochemisch überprüft werden.

Die beobachtete Kontraktionssteigerung der spontanen Kontraktionen des porcinen Jejunums durch Morphin-Sulfat wurde, entgegen der Erwartung, durch den Opioid-Antagonisten Naloxon-Hydrochlorid nicht aufgehoben. Interessanterweise führte Naloxon-Hydrochlorid selbst zu einer Steigerung der Kontraktionsstärke der spontanen Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur (siehe Abbildung 17). Eine agonistische Wirkung durch Naloxon-Hydrochlorid am Opioidrezeptor ist für das Schwein bisher nicht beschrieben (PubMed-Recherche, Stand: 19.03.2024). Am Jejunum des Kaninchens wurde *in vitro* eine agonistische Wirkung von Naloxon-Hydrochlorid in hohen Konzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 1 mM auf die spontanen Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur nachgewiesen (Cosola et al. 2006). Dabei wirkte Naloxon-Hydrochlorid wie der MOR-Agonist  $\beta$ -Endorphin (1  $\mu\text{M}$ ), wobei beide zu einer Reduktion der Amplituden der Kontraktionen führten (Cosola et al. 2006). In niedrigeren Konzentrationen von 10 nM bis 1  $\mu\text{M}$  führte Naloxon-Hydrochlorid zu einer erwarteten Steigerung der Kontraktionen nach vorheriger, hemmender  $\beta$ -Endorphin-Applikation, was an einer Blockade der Wirkung von  $\beta$ -Endorphin am MOR lag (Cosola et al. 2006). Die Autoren folgerten, dass auch Naloxon in höheren Konzentrationen den Opioidrezeptor nicht bloß blockiert, sondern auch an diesem agonistisch wirkt (Cosola et al. 2006). Dies könnte die beobachtete kontraktionssteigernde Wirkung auf die spontanen Kontraktionen des porcinen Jejunums durch Naloxon-Hydrochlorid erklären. Ob neben Morphin-Sulfat auch Naloxon-Hydrochlorid direkt an den ICC und den glatten Muskelzellen des Schweins im Kontraktionsmodell wirkte, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher untersucht und soll Gegenstand weiterer Forschung sein. Außerdem ist ein immunhistochemischer Nachweis der Opioidrezeptoren auf den ICC mit einem ICC-spezifischen Marker (cKit) beim Schwein notwendig, um auch Auskunft über die Expression des MOR auf den ICC des Schweins zu erhalten.

Durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein Modell am porcinen Jejunum für die pharmakologische Wirkung von Opioiden auf die Darmmuskulatur etabliert. Erstmals wurde der MOR im Jejunum des Schweins im myenterischen und submukösen Plexus nachgewiesen. An dem erfolgreich etablierten

Modell wurde gezeigt, dass BCM-7 und die Verdauungsprodukte von A1- und A2-Milch keine Wirkung auf die Kontraktionen des Jejunums hatten, womit die postulierten Wirkungen des A1-Milchkonsums widerlegt wurden.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Eine genetische Mutation im bovinen  $\beta$ -Kasein-Gen führte zu einem Austausch einer Aminosäure in der Aminosäuresequenz des  $\beta$ -Kaseins, wodurch eine neue Variante, das A1- $\beta$ -Kasein, entstanden ist. Das A1- $\beta$ -Kasein trägt die Aminosäure Histidin an Position 67, wobei in der ursprünglichen Variante, dem A2- $\beta$ -Kasein die Aminosäure Prolin diese Position einnimmt. Durch diesen Aminosäureaustausch soll A1- $\beta$ -Kasein anfälliger für eine enzymatische Spaltung während der Verdauung im Darm zwischen den Aminosäuren an Position 66 und 67 des  $\beta$ -Kaseins sein. Dadurch soll vermehrt ein sieben Aminosäure langes Peptid, das BCM-7 freigesetzt werden. Aus A2-Milch, die das A2- $\beta$ -Kasein ohne die entsprechende Mutation enthält, entstehen geringere Mengen von BCM-7. Es wird angenommen, dass BCM-7 als MOR-Agonist wirken soll und potenziell an den MOR in der Darmwand bindet. So soll die Darmmotilität gehemmt werden, was potenziell zu Verdauungsbeschwerden nach dem Verzehr von A1-Milch führen könnte. Studien, die diese Hypothese untersuchten, kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Ein Nachweis, dass BCM-7 auf den humanen Darm wirkt, wurde bisher nicht gegeben. Trotz dem Fehlen wissenschaftlich-fundierter Daten steht Milch mit dem A1- $\beta$ -Kasein weltweit in der Kritik für Verdauungsbeschwerden verantwortlich zu sein, wobei der Konsum von A2-Milch mit wohltuenden Eigenschaften auf die Verdauung assoziiert wird.

Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, eine potenzielle Wirkung von BCM-7 und den Verdauungsprodukten von A1- und A2- Milch auf die Darmmotilität zu untersuchen und mit der Wirkung von Opioiden zu vergleichen. Aufgrund verdauungsphysiologischer Ähnlichkeiten mit dem Menschen bietet sich das Schwein als geeignetes translationales Modell für diese Untersuchungen an. Wegen fehlender Daten zum Vorkommen der Opioidrezeptoren im Dünndarm des Schweins wurde zuerst ein Vorhandensein des MOR auf den Neuronen des ENS des porcinen proximalen Jejunums immunhistochemisch analysiert. Folglich wurde an einem Muskelkontraktionsmessplatz mit Organbädern *in vitro* ein potenzieller Opioid-ähnlicher Effekt von BCM-7 und *in vitro* verdauter A1- und A2- Milch auf die Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur des porcinen proximalen Jejunums untersucht, da im proximalen Dünndarm die größte Menge an BCM-7 während des Verdauungsprozesses von Milch entstehen soll.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der MOR auf den Neuronen des myenterischen und submukösen Plexus des ENS nachgewiesen, wodurch gezeigt wurde, dass die Bindestellen für MOR-Agonisten im porcinen Jejunum vorhanden sind und sich das Jejunum des Schweins die potenziellen Rezeptoren für weitere Untersuchungen mit BCM-7 und den Opioiden vorweist. Folgend wurde erfolgreich ein Modell zur *in-vitro*-Untersuchung der Wirkung von Opioiden an der glatten Muskulatur des porcinen Dünndarms an einem Muskelkontraktionsmessplatz etabliert. Die EFS-induzierten, neural-vermittelten Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur wurden von Morphin gehemmt, womit gezeigt wurde, dass das Schwein als Modell für eine Opioid-induzierte Inhibition der Motilität des Jejunums geeignet ist. Interessanterweise induzierten die Opiode eine Steigerung der spontanen Kontraktionen, welche vermutlich direkt über die ICC oder die glatten Muskelzellen vermittelt wurde. Die hypothetisierte Wirkung der Opiode auf die ICC und die Muskelzellen und damit auf die spontanen Kontraktionen soll in weiteren Studien bestätigt werden. Anhand dieses Modells wurde gezeigt, dass BCM-7 in den Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 200  $\mu$ M keine Wirkung auf die spontanen, als auch die EFS-induzierten, neural-vermittelten Kontraktionen des porcinen Jejunums hatte. Diese Stoffkonzentrationen sind *in vivo* selbst mit übermäßigem Milchkonsum nicht erreichbar, wodurch davon auszugehen ist, dass BCM-7 auch bei übermäßigem Milchkonsum nicht auf die Motorik des Darms des Menschen einwirkt. Die Kontraktionen der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur wurden, neben BCM-7, auch durch die Verdauungsprodukte der A1- und A2-Milch nicht gehemmt. Insgesamt zeigte diese Doktorarbeit, dass auch die Verdauungsprodukte der A1- aber auch der A2-Milch die Motorik des Darms nicht modulieren. Dies liegt höchstwahrscheinlich an einer fehlenden Wirkung am MOR oder einer zu geringen Wirkstärke am Rezeptor. Ob BCM-7 überhaupt an humanen und porcinen und humanen Opioidrezeptoren bindet, soll Gegenstand weiterer Forschung sein. Durch diese Doktorarbeit wurden die notwendigen Grundlagen zur Bestätigung einer fehlenden Wirkung von BCM-7 an Opioidrezeptoren des Schweins gegeben.

## 7 SUMMARY

A genetic mutation in the bovine  $\beta$ -casein gene led to the substitution of an amino acid in the amino acid sequence of  $\beta$ -casein, resulting in a new variant, the A1- $\beta$ -casein. A1- $\beta$ -casein carries the amino acid histidine at position 67, whereas in the original variant, A2- $\beta$ -casein, the amino acid proline occupies this position. This amino acid exchange is believed to render A1- $\beta$ -casein more susceptible to enzymatic cleavage during digestion in the intestine between the amino acids at position 66 and 67 of  $\beta$ -casein. This is thought to increase the release of a seven-amino-acid-long peptide, BCM-7. From A2 milk, which contains A2- $\beta$ -casein without the corresponding mutation, lesser amounts of BCM-7 are produced during intestinal digestion. It is assumed that BCM-7 acts as a MOR agonist and potentially binds to the MOR in the intestinal wall. This is believed to inhibit intestinal motility, potentially leading to digestive discomfort after consuming A1 milk. Studies investigating this hypothesis have yielded conflicting results. Evidence that BCM-7 affects the human intestine has not been provided so far. Despite the lack of scientifically sound data, milk containing A1- $\beta$ -casein is globally criticized for being responsible for digestive discomfort, while the consumption of A2 milk is associated with beneficial digestive properties.

The aim of this doctoral thesis was therefore to investigate the potential effect of BCM-7 and the digestion products of A1 and A2 milk on gut motility and to compare it with the effect of opioids. Due to its physiological similarities with humans concerning the digestive system, the pig serves as a suitable translational model for these investigations. Since data on the presence of opioid receptors in the small intestine of pigs did not exist to date, the presence of MOR on neurons of the ENS of the porcine proximal jejunum was first analyzed via immunohistochemistry. Subsequently, a potential opioid-like effect of BCM-7 and *in vitro* digested A1 and A2 milk on the longitudinal and circular musculature of the porcine proximal jejunum was investigated using an organ bath muscle contraction measurement setup *in vitro*, as the proximal small intestine is believed to produce the highest amount of BCM-7 during the milk digestion process.

Within this doctoral thesis, the presence of MOR on the neurons of the myenteric and submucosal plexus of the ENS was demonstrated, indicating that binding sites for MOR agonists are present in the porcine jejunum. This confirmed that the jejunum of the pig possesses the potential receptors for further investigations involving BCM-7

and opioids. In consequence, a model for *in vitro* examination of the effect of opioids on the smooth muscle of the porcine small intestine was successfully established using a muscle contraction measurement setup. EFS-induced, neurally mediated contractions of the longitudinal and circular musculature were inhibited by morphine, demonstrating that the pig serves as a model for opioid-induced inhibition of jejunal motility. Interestingly, opioids induced an increase in spontaneous contractions, likely mediated directly via the ICC or smooth muscle cells. The hypothesized effect of opioids on the ICC and muscle cells, and thus on spontaneous contractions, will be confirmed in further studies. Using this model, it was demonstrated that BCM-7 at concentrations ranging from 1  $\mu\text{M}$  to 200  $\mu\text{M}$  had no effect on spontaneous or EFS-induced neurally mediated contractions of the porcine jejunum. These substance concentrations are not achievable *in vivo* even with excessive milk consumption, suggesting that BCM-7 does not affect intestinal motility even with high milk intake. Contractions of the longitudinal and circular musculature were further not inhibited by the digestion products of A1 and A2 milk. Overall, this doctoral thesis showed that neither the digestion products of A1 nor A2 milk modulate intestinal motility. This is most likely due to a lack of effect on the MOR or insufficient potency at the receptor. Whether BCM-7 binds to human and porcine opioid receptors at all should be the subject of further research. This doctoral thesis laid the necessary groundwork to confirm the lack of BCM-7 effect on porcine opioid receptors.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbate, Vincenzo, Andrea Sosa Moreno, and Timothy J. Wiegand. 2022. 'Chapter16 - Novel synthetic opioids.' in Paul Dargan and David Wood (eds.), *Novel Psychoactive Substances (Second Edition)* (Academic Press: Boston).
- Ahmet Fatih, Demirel; Bahattin, ÇAK. 2018. 'Discussions of Effect A1 and A2 Milk Beta-Casein Gene on Health', *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*.
- Al-Hasani, R., and M. R. Bruchas. 2011. 'Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior', *Anesthesiology*, 115: 1363-81.
- Aleman, Ricardo Santos, Marvin Moncada, and Kayanush J. Aryana. 2023. 'Leaky Gut and the Ingredients That Help Treat It: A Review', *Molecules*, 28: 619.
- Ali, Waqas Rafique, Imran Amin, Muhammad Asif, and Shahid Mansoor. 2019. 'Genotyping Test Development and Genotyping Survey of Pakistani population of Holstein Friesian imported from Different Origins for A1/A2 SNP in Beta-casein Gene', *bioRxiv*: 720045.
- Allescher, Hans-Dieter. 2020. 'Einführung: Allgemeine Grundlagen der gastrointestinalen Motilität.' in Fuchs Karl-Hermann, Frieling Thomas and Allescher Hans-Dieter (eds.), *Management der gastrointestinalen und kolorektalen Motilitätsstörungen* (De Gruyter: Berlin, Boston).
- Amigo, Lourdes, and Blanca Hernández-Ledesma. 2020. 'Current Evidence on the Bioavailability of Food Bioactive Peptides', *Molecules*, 25: 4479.
- Angeli, T. R., P. Du, N. Paskaranandavadivel, S. Sathar, A. Hall, S. J. Asirvatham, G. Farrugia, J. A. Windsor, L. K. Cheng, and G. O'Grady. 2017. 'High-resolution electrical mapping of porcine gastric slow-wave propagation from the mucosal surface', *Neurogastroenterol Motil*, 29.
- Annahazi, Anita, and Michael Schemann. 2020. 'The enteric nervous system: "A little brain in the gut"', *Neuroforum*, 26: 31-42.
- Asledottir, T., G. Picariello, G. Mamone, P. Ferranti, A. Roseth, T. G. Devold, and G. E. Vegarud. 2019. 'Degradation of beta-casomorphin-7 through in vitro gastrointestinal and jejunal brush border membrane digestion', *J Dairy Sci*, 102: 8622-29.
- Asledottir, Tora, Thao T. Le, Bjørn Petrat-Melin, Tove G. Devold, Lotte B. Larsen, and Gerd E. Vegarud. 2017. 'Identification of bioactive peptides and quantification of  $\beta$ -casomorphin-7 from bovine  $\beta$ -casein A1, A2 and I after ex vivo gastrointestinal digestion', *International Dairy Journal*, 71: 98-106.
- Asledottir, Tora, Thao T. Le, Nina A. Poulsen, Tove G. Devold, Lotte B. Larsen, and Gerd E. Vegarud. 2018. 'Release of  $\beta$ -casomorphin-7 from bovine milk of different  $\beta$ -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion', *International Dairy Journal*, 81: 8-11.
- Atmani, Karim, Muriel Larauche, Luis Cabanillas, Xu Han, Wentai Liu, Catia Sternini, and Million Mulugeta. 2023. 'A porcine model of opioid-induced constipation: colon motility characterization and evidence for intestinal opioid receptor modulation', *Physiology*, 38: 5734528.
- Authority, European Food Safety and. 2009. "Review of the potential health impact of  $\beta$ -casomorphins and related peptides." In.
- Avetisyan, M., E. M. Schill, and R. O. Heuckeroth. 2015. 'Building a second brain in the bowel', *J Clin Invest*, 125: 899-907.
- Ayaz, Syed Muhammad Suhail, Ijaz Ahmad, Muhammad Tariq Zeb, Rajwali Khan, Asim Ijaz, Iftikhar



- Ahmad, et al. 2023. 'Detection of A2A2 genotype of beta casein protein (CSN2) gene in local, exotic and cross bred cattle in Pakistan', *Animal Biotechnology*, 34: 1462-73.
- Bagnol, D., A. Mansour, H. Akil, and S. J. Watson. 1997. 'Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract', *Neuroscience*, 81: 579-91.
- Ballegaard, Anne-Sofie Ravn, and Katrine Lindholm Bøgh. 2023. 'Intestinal protein uptake and IgE-mediated food allergy', *Food Research International*, 163: 112150.
- Baos, S., D. Calzada, L. Cremades, J. Sastre, J. Quiralte, F. Florido, C. Lahoz, and B. Cárdbaba. 2017. 'Biomarkers associated with disease severity in allergic and nonallergic asthma', *Mol Immunol*, 82: 34-45.
- Barnett, M. P., W. C. McNabb, N. C. Roy, K. B. Woodford, and A. J. Clarke. 2014. 'Dietary A1  $\beta$ -casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2  $\beta$ -casein in Wistar rats', *Int J Food Sci Nutr*, 65: 720-7.
- Barrett, K. E. 2000. 'New insights into the pathogenesis of intestinal dysfunction: secretory diarrhea and cystic fibrosis', *World J Gastroenterol*, 6: 470-74.
- Bartosiewicz, László, John Chapman, Matthew Collins, Oliver E. Craig, Carl Heron, Gillian Taylor, Alasdair Whittle, and Laura H. Willis. 2005. 'Did the first farmers of central and eastern Europe produce dairy foods?', *Antiquity*, 79: 882-94.
- Bates, Michael D. 2002. 'Development of the enteric nervous system', *Clinics in Perinatology*, 29: 97-114.
- Bauer, A. J., M. G. Sarr, and J. H. Szurszewski. 1991. 'Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum', *Gastroenterology*, 101: 970-6.
- Befort, K., L. Tabbara, S. Bausch, C. Chavkin, C. Evans, and B. Kieffer. 1996. 'The conserved aspartate residue in the third putative transmembrane domain of the delta-opioid receptor is not the anionic counterpart for cationic opiate binding but is a constituent of the receptor binding site', *Mol Pharmacol*, 49: 216-23.
- Bell, Stacey J., Gregory T. Grochoski, and Andrew J. Clarke. 2006. 'Health Implications of Milk Containing  $\beta$ -Casein with the A2 Genetic Variant', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 93-100.
- Benslama, Yasmine, Nouria Dennouni-Medjati, Majda Dali-Sahri, Fatima Zahra Meziane, and Yahia Harek. 2022. 'Childhood type 1 diabetes mellitus and risk factor of interactions between dietary cow's milk intake and HLA-DR3/DR4 genotype', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40: 10931-39.
- Bian, X., R. Zhou, Y. Yang, P. Li, Y. Hang, Y. Hu, L. Yang, and D. Wen. 2015. 'Divergent Effect of Dezocine, Morphine and Sufentanil on Intestinal Motor Function in Rats', *Int J Med Sci*, 12: 848-52.
- Biss, Kurt, Kang-Jey Ho, Belma Mikkelson, Lena Lewis, and C. Bruce Taylor. 1971. 'Some Unique Biologic Characteristics of the Masai of East Africa', *New England Journal of Medicine*, 284: 694-99.
- Blok, J., B. A. Scheven, A. A. Mulder-Stapel, L. A. Ginsel, and W. T. Daems. 1982. 'Endocytosis in absorptive cells of cultured human small-intestinal tissue: effect of cytochalasin B and D', *Cell Tissue Res*, 222: 113-26.
- Bochniarz, M., P. Blaszczyk, M. Szczubial, I. Vasiu, L. Adaszek, K. Michalak, D. Pietras-Ozga, M. Wochnik, and R. Dabrowski. 2023. 'Comparative analysis of total protein, casein, lactose, and fat content in milk of cows suffering from subclinical and clinical mastitis caused by *Streptococcus* spp', *J Vet Res*, 67: 251-57.

- Boesmans, W, P Gomes, J Janssens, J Tack, and P Vanden Berghe. 2008. 'Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system', *Gut*, 57: 314-22.
- Bogach, P. G. 1959. 'Frequency of the rhythmic contractions of the small intestine', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 47: 395-400.
- Bornstein, J. C., M. Costa, and J. R. Grider. 2004. 'Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility', *Neurogastroenterology & Motility*, 16: 34-38.
- Boscan, P., L. M. Van Hoogmoed, T. B. Farver, and J. R. Snyder. 2006. 'Evaluation of the effects of the opioid agonist morphine on gastrointestinal tract function in horses', *Am J Vet Res*, 67: 992-7.
- Brantl, V., and H. Teschemacher. 1979. 'A material with opioid activity in bovine milk and milk products', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 306: 301-4.
- Brantl, Victor, Hansjörg Teschemacher, Julia Bläsigg, Agnes Henschen, and Friedrich Lottspeich. 1981. 'Opioid activities of  $\beta$ -casomorphins', *Life Sciences*, 28: 1903-09.
- Breuer, Thomas. 2021. 'Evaluierung und Anwendung einer neuen Messmethode zur funktionellen Charakterisierung intrinsischer nervaler Schaltkreise am porcinen Colon'.
- Brodkorb, André, Lotti Egger, Marie Alminger, Paula Alvito, Ricardo Assunção, Simon Ballance, Torsten Bohn, et al. 2019. 'INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion', *Nature Protocols*, 14: 991-1014.
- Bröer, S., and G. Gauthier-Coles. 2022. 'Amino Acid Homeostasis in Mammalian Cells with a Focus on Amino Acid Transport', *J Nutr*, 152: 16-28.
- Bröer, Stefan, and Stephen J. Fairweather. 2019. 'Amino Acid Transport Across the Mammalian Intestine.' in, *Comprehensive Physiology*.
- Brown, D. R., S. Poonyachoti, M. A. Osinski, T. R. Kowalski, M. S. Pampusch, R. P. Elde, and M. P. Murtaugh. 1998a. 'Delta-opioid receptor mRNA expression and immunohistochemical localization in porcine ileum', *Dig Dis Sci*, 43: 1402-10.
- Brown, David, Sutthasinee Poonyachoti, Mark Osinski, Teresa Kowalski, Mary Pampusch, Robert Elde, and Michael Murtaugh. 1998b. 'Delta-Opioid Receptor mRNA Expression and Immunohistochemical Localization in Porcine Ileum', *Digestive Diseases and Sciences*, 43: 1402-10.
- Browning, K. N., and R. A. Travagli. 2014. 'Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions', *Compr Physiol*, 4: 1339-68.
- Buatig, Raja, Miriam Clegg, Nicholas Michael, and Maria-Jose Oruna-Concha. 2023. 'Quantification of  $\beta$ -Casomorphin 7 in Commercially Available Filtered and Pasteurized Cow's Milk', *Biology and Life Sciences Forum*, 26: 125.
- Butour, J. L., C. Moisand, H. Mazarguil, C. Mollereau, and J. C. Meunier. 1997. 'Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL 1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids', *Eur J Pharmacol*, 321: 97-103.
- Cai, Weigang, Raj Makwana, Marilisa Straface, Armen Gharibans, Paul L. R. Andrews, and Gareth J. Sanger. 2022. 'Evidence for tetrodotoxin-resistant spontaneous myogenic contractions of mouse isolated stomach that are dependent on acetylcholine', *British Journal of Pharmacology*, 179: 1187-200.
- Camilleri, M., J. R. Malagelada, V. Stanghellini, A. R. Zinsmeister, P. C. Kao, and C. H. Li. 1986. 'Dose-related effects of synthetic human beta-endorphin and naloxone on fed gastrointestinal

- motility', *Am J Physiol*, 251: G147-54.
- Capik, I., O. Nagy, C. Tothova, and I. Polkowska. 2016. 'Comparison of tramadol and buprenorphine analgesia for continuous intravenous propofol anaesthesia in dogs undergoing dental prophylaxis', *Veterinární medicína*, 61: 213-18.
- Caroli, A. M., S. Savino, O. Bulgari, and E. Monti. 2016. 'Detecting  $\beta$ -Casein Variation in Bovine Milk', *Molecules*, 21: 141.
- Carr, D. J., K. L. Bost, and J. E. Blalock. 1988. 'The production of antibodies which recognize opiate receptors on murine leukocytes', *Life Sci*, 42: 2615-24.
- Cattaneo, S., F. Masotti, M. Stuknytè, and I. De Noni. 2023. 'Impact of in vitro static digestion method on the release of  $\beta$ -casomorphin-7 from bovine milk and cheeses with A1 or A2  $\beta$ -casein phenotypes', *Food Chem*, 404: 134617.
- Cechova, K., M. Hlouskova, E. Javorkova, L. Roubalova, H. Ujcikova, V. Holan, and P. Svoboda. 2018. 'Up-regulation of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in concanavalin A-stimulated rat spleen lymphocytes', *J Neuroimmunol*, 321: 12-23.
- Cerbulis, J., and H. M. Farrell. 1975. 'Composition of Milks of Dairy Cattle. I. Protein, Lactose, and Fat Contents and Distribution of Protein Fraction2', *Journal of Dairy Science*, 58: 817-27.
- Chamouard, Patrick, Annick Klein, Elisabeth Martin, Michel Adloff, and Fabielle Angel. 1993. 'Regulatory role of enteric kappa opioid receptors in human colonic motility', *Life Sciences*, 53: 1149-56.
- Chan, A. S., P. Y. Law, H. H. Loh, P. N. Ho, W. M. Wu, J. S. Chan, and Y. H. Wong. 2003. 'The first and third intracellular loops together with the carboxy terminal tail of the delta-opioid receptor contribute toward functional interaction with Galpha16', *J Neurochem*, 87: 697-708.
- Chaudhary, Vipul, Manishi Mukesh, Gaurav Bhakri, Pamela Singh, Ranjit Kataria, Saket Niranjana, Ashok Mohanty, and Monika Sodhi. 2023. 'Effects of Feeding A1 and A2 Cow Milk-based Diet on Hematological Parameters in Diabetic Mice Model', *Indian Journal of Animal Research*.
- Chauhan, Ashutosh, Sunil Kumar Joshi, Ankit Kumar, Ravindra Semwal, Ruchi Badoni Semwal, Deepak Kumar Semwal, Monika Shodhi, and Kumud Upadhyaya. 2023. 'Comparative evaluation of A1A2 and A2A2 cow milk-containing diets on biochemical and histological parameters of Wistar rats', *Journal of Dairy Research*: 1-5.
- Chen, Bao Nan, Adam Humenick, Wai Ping Yew, Rochelle A. Peterson, Lukasz Wiklendt, Phil G. Dinning, Nick J. Spencer, David A. Wattchow, Marcello Costa, and Simon J. H. Brookes. 2023. 'Types of Neurons in the Human Colonic Myenteric Plexus Identified by Multilayer Immunohistochemical Coding', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 16: 573-605.
- Chen, Y., M. M. Dinges, A. Green, S. E. Cramer, C. K. Larive, and C. Lytle. 2020. 'Absorptive transport of amino acids by the rat colon', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 318: G189-g202.
- Cherubini, E, and R A North. 1985. 'Mu and kappa opioids inhibit transmitter release by different mechanisms', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 1860-63.
- Chia, J. S. J., J. L. McRae, S. Kukuljan, K. Woodford, R. B. Elliott, B. Swinburn, and K. M. Dwyer. 2017. 'A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes', *Nutr Diabetes*, 7: e274.
- Christensen, J., H. P. Schedl, and J. A. Clifton. 1966. 'The small intestinal basic electrical rhythm (slow wave) frequency gradient in normal men and in patients with variety of diseases', *Gastroenterology*, 50: 309-15.

- Chung, E. R., S. K. Han, and T. J. Rhim. 1995. 'Milk protein polymorphisms as genetic marker in Korean native cattle', *Asian-Australas J Anim Sci*, 8: 187-94.
- Cieslinska, A., E. Fiedorowicz, D. Rozmus, E. Sienkiewicz-Szlapka, B. Jarmolowska, and S. Kaminski. 2022. 'Does a Little Difference Make a Big Difference? Bovine beta-Casein A1 and A2 Variants and Human Health-An Update', *Int J Mol Sci*, 23.
- Cieslinska, A., E. Kostyra, H. Kostyra, K. Olenski, E. Fiedorowicz, and S. Kaminski. 2012. 'Milk from cows of different beta-casein genotypes as a source of beta-casomorphin-7', *Int J Food Sci Nutr*, 63: 426-30.
- Cieślińska, Anna, Stanislaw Kamiński, Elżbieta Kostyra, and Edyta Sienkiewicz-Szlapka. 2007. 'Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative  $\beta$ -casein genotypes', *Milchwissenschaft-milk Science International*, 62: 125-27.
- Cosola, C., M. Albrizio, A. C. Guaricci, M. A. De Salvia, A. Zarrilli, R. L. Sciorsci, and R. Minoia. 2006. 'Opioid agonist/antagonist effect of naloxone in modulating rabbit jejunum contractility in vitro', *J Physiol Pharmacol*, 57: 439-49.
- Cuervo, Ana Maria, and J. F. Dice. 1998. 'Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases', *Journal of Molecular Medicine*, 76: 6-12.
- Daniel, H., M. Vohwinkel, and G. Rehner. 1990. 'Effect of casein and beta-casomorphins on gastrointestinal motility in rats', *J Nutr*, 120: 252-7.
- Daniloski, Davor, Noel A. McCarthy, and Todor Vasiljevic. 2021. 'Bovine  $\beta$ -Casomorphins: Friends or Foes? A comprehensive assessment of evidence from in vitro and ex vivo studies', *Trends in Food Science & Technology*, 116: 681-700.
- Darcq, E., and B. L. Kieffer. 2018. 'Opioid receptors: drivers to addiction?', *Nat Rev Neurosci*, 19: 499-514.
- Das, K., and S. Mohanty. 2017. 'Hirschsprung Disease - Current Diagnosis and Management', *Indian J Pediatr*, 84: 618-23.
- Davenport, Horace W. 1975. 'Gastrointestinal Physiology, 1895–1975: Motility.' in, *Comprehensive Physiology*.
- de Kort, S., D. Keszthelyi, and A. A. Masclee. 2011. 'Leaky gut and diabetes mellitus: what is the link?', *Obes Rev*, 12: 449-58.
- De Luca, A., and I. M. Coupar. 1996. 'Insights into opioid action in the intestinal tract', *Pharmacol Ther*, 69: 103-15.
- De Schepper, H. U., F. Cremonini, M. I. Park, and M. Camilleri. 2004. 'Opioids and the gut: pharmacology and current clinical experience', *Neurogastroenterology & Motility*, 16: 383-94.
- de Vasconcelos, M. L., Lmf Oliveira, J. P. Hill, and A. M. C. Vidal. 2023. 'Difficulties in Establishing the Adverse Effects of  $\beta$ -Casomorphin-7 Released from  $\beta$ -Casein Variants-A Review', *Foods*, 12.
- Defilippi, C., E. Gomez, V. Charlin, and C. Silva. 1995. 'Inhibition of small intestinal motility by casein: a role of beta casomorphins?', *Nutrition*, 11: 751-4.
- Delvalle, N. M., D. E. Fried, G. Rivera-Lopez, L. Gaudette, and B. D. Gulbransen. 2018. 'Cholinergic activation of enteric glia is a physiological mechanism that contributes to the regulation of gastrointestinal motility', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 315: G473-g83.
- DiCello, J. J., S. E. Carbone, A. Saito, P. Rajasekhar, R. A. Ceredig, V. Pham, C. Valant, et al. 2020. 'Mu and Delta Opioid Receptors Are Coexpressed and Functionally Interact in the Enteric Nervous System of the Mouse Colon', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 9: 465-83.

- Donnerer, J., and I. Liebmann. 2009. 'Evidence for opioid-induced release of glutamate in guinea pig longitudinal muscle-myenteric plexus strip', *Neurosci Lett*, 462: 118-20.
- Dumas, Bruno RIBADEAU, Ghislaine Brignon, François Grosclaude, and Jean-Claude Mercier. 1972. 'Structure primaire de la caséine  $\beta$  bovine', *European Journal of Biochemistry*, 25: 505-14.
- Edwards, Teagan S., Krista L. Dawson, Jacqueline I. Keenan, and Andrew S. Day. 2021. 'A simple method to generate  $\beta$ -casomorphin-7 by in vitro digestion of casein from bovine milk', *Journal of Functional Foods*, 85: 104631.
- Egbuji, J. U., G. O'Grady, P. Du, L. K. Cheng, W. J. Lammers, J. A. Windsor, and A. J. Pullan. 2010. 'Origin, propagation and regional characteristics of porcine gastric slow wave activity determined by high-resolution mapping', *Neurogastroenterol Motil*, 22: e292-300.
- Elitsur, Y., and G. D. Luk. 1991. 'Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation', *Clin Exp Immunol*, 85: 493-7.
- Elliott, R. B., D. P. Harris, J. P. Hill, N. J. Bibby, and H. E. Wasmuth. 1999. 'Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption', *Diabetologia*, 42: 292-6.
- Evershed, R. P., S. Payne, A. G. Sherratt, M. S. Copley, J. Coolidge, D. Urem-Kotsu, K. Kotsakis, et al. 2008. 'Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding', *Nature*, 455: 528-31.
- Farmer, Adam D., Caroline Bruckner Holt, Thomas J. Downes, Eugenio Ruggeri, Sara Del Vecchio, and Roberto De Giorgio. 2018. 'Pathophysiology, diagnosis, and management of opioid-induced constipation', *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 3: 203-12.
- Farrell, H. M., R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. F. Ng-Kwai-Hang, and H. E. Swaisgood. 2004. 'Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision', *Journal of Dairy Science*, 87: 1641-74.
- Fernandez Robles, C. R., M. Degnan, and K. A. Candiotti. 2012. 'Pain and genetics', *Curr Opin Anaesthesiol*, 25: 444-9.
- Fiedorowicz, E., B. Jarmolowska, M. Iwan, E. Kostyra, R. Obuchowicz, and M. Obuchowicz. 2011. 'The influence of mu-opioid receptor agonist and antagonist peptides on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)', *Peptides*, 32: 707-12.
- Fiedorowicz, E., M. Kaczmarek, A. Cieslinska, E. Sienkiewicz-Szlapka, B. Jarmolowska, B. Chwala, and E. Kostyra. 2014. 'beta-casomorphin-7 alters mu-opioid receptor and dipeptidyl peptidase IV genes expression in children with atopic dermatitis', *Peptides*, 62: 144-9.
- Fiedorowicz, E., L. H. Markiewicz, K. Sidor, D. Swiatecka, A. Cieslinska, M. Matysiewicz, K. Piskorz-Ogorek, et al. 2016. 'The influence of breast milk and infant formulae hydrolysates on bacterial adhesion and Caco-2 cells functioning', *Food Res Int*, 89: 679-88.
- Finno, Carrie J., Sharon J. Spier, and Stephanie J. Valberg. 2009. 'Equine diseases caused by known genetic mutations', *The Veterinary Journal*, 179: 336-47.
- Forzán, M. J., and J. T. McClure. 2005. 'Congenital aganglionosis in a 3-day-old Holstein calf', *Can Vet J*, 46: 342-4.
- Franzoi, M., G. Niero, G. Visentin, M. Penasa, M. Cassandro, and M. De Marchi. 2019. 'Variation of Detailed Protein Composition of Cow Milk Predicted from a Large Database of Mid-Infrared Spectra', *Animals (Basel)*, 9.
- Fung, Candice, and Pieter Vanden Berghe. 2020. 'Functional circuits and signal processing in the enteric nervous system', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77: 4505-22.

- Furness, J. B. 2000. 'Types of neurons in the enteric nervous system', *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81: 87-96.
- Furness, J. B., and M. J. Stebbing. 2018. 'The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems', *Neurogastroenterology & Motility*, 30: e13234.
- Furness, John B. 2009. 'Enteric Nervous System.' in Marc D. Binder, Nobutaka Hirokawa and Uwe Windhorst (eds.), *Encyclopedia of Neuroscience* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Furness, John Barton, and Marcello Costa. 1987. *The enteric nervous system* (Churchill Livingstone).
- Furukawa, Yoshiyuki, Ian J. Cook, Voula Panagopoulos, R. Douglas McEvoy, David J. Sharp, and Maria Simula. 1994. 'Relationship between sleep patterns and human colonic motor patterns', *Gastroenterology*, 107: 1372-81.
- Gallego, Diana, Pilar Hernández, Pere Clavé, and Marcel Jiménez. 2006. 'P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291: G584-G94.
- Gallinat, J. L., S. Qanbari, C. Drogemuller, E. C. Pimentel, G. Thaller, and J. Tetens. 2013. 'DNA-based identification of novel bovine casein gene variants', *J Dairy Sci*, 96: 699-709.
- Gao, K. P., T. Mitsui, K. Fujiki, H. Ishiguro, and T. Kondo. 2002. 'Effect of lactase preparations in asymptomatic individuals with lactase deficiency--gastric digestion of lactose and breath hydrogen analysis', *Nagoya J Med Sci*, 65: 21-8.
- Garcia-Castillo, M. D., D. J. Chinnapen, and W. I. Lencer. 2017. 'Membrane Transport across Polarized Epithelia', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Gilbert, P. E., and W. R. Martin. 1976. 'The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog', *J Pharmacol Exp Ther*, 198: 66-82.
- Gimeno, Suely Godoy Agostinho, and José Maria Pacheco De Souza. 1997. 'IDDM and Milk Consumption: A case-control study in São Paulo, Brazil', *Diabetes Care*, 20: 1256-60.
- Giribaldi, M., C. Lamberti, S. Cirrincione, M. G. Giuffrida, and L. Cavallarin. 2022. 'A2 Milk and BCM-7 Peptide as Emerging Parameters of Milk Quality', *Front Nutr*, 9: 842375.
- Givens, D. I. 2020. 'MILK Symposium review: The importance of milk and dairy foods in the diets of infants, adolescents, pregnant women, adults, and the elderly\*', *Journal of Dairy Science*, 103: 9681-99.
- Gonzales-Malca, Jhony Alberto, Vicente Amirpasha Tirado-Kulieva, María Santos Abanto-López, William Lorenzo Aldana-Juárez, and Claudia Mabel Palacios-Zapata. 2023. 'Worldwide research on the health effects of bovine milk containing A1 and A2  $\beta$ -casein: Unraveling the current scenario and future trends through bibliometrics and text mining', *Current Research in Food Science*, 7: 100602.
- Gonzalez, L. M., A. J. Moeser, and A. T. Blikslager. 2015. 'Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research', *Transl Res*, 166: 12-27.
- Graham, E. R. Bruce, Hugh A. McKenzie, Douglas M. McLean, and Raul W. Ponzoni. 1984. 'Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition', *Journal of Dairy Research*, 51: 531-46.
- Gray, A. C., I. M. Coupar, and P. J. White. 2006. 'Comparison of opioid receptor distributions in the rat

- ileum', *Life Sciences*, 78: 1610-16.
- Gregersen, H., C. S. Jorgensen, F. H. Dall, and S. L. Jensen. 1992. 'Characteristics of spontaneous and evoked motility in the isolated perfused porcine duodenum', *Journal of Applied Physiology*, 73: 9-19.
- Groele, L., and A. Szypowska. 2023. 'Type 1 diabetes mellitus prevention', *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*, 29: 209-13.
- Guo, Qing, Aiqian Ye, Harjinder Singh, and D errick Rousseau. 2020. 'Deconstructing and restructuring of foods during gastric digestion', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19: 1658-79.
- Gwynne, R. M., and J. C. Bornstein. 2007. 'Mechanisms underlying nutrient-induced segmentation in isolated guinea pig small intestine', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292: G1162-G72.
- Hansen, Wiebke, Sina Luppus, Romy Barthel, Dae-In Chang, Julia Broemstrup, Thomas Zwarg, Jo Shibata, Astrid M. Westendorf, Jan Buer, and Norbert Scherbaum. 2021. 'Heroin-assisted treatment of heroin-addicted patients normalizes regulatory T cells but does not restore CD4+ T cell proliferation', *Addiction Biology*, 26: e12998.
- Hartwig, A., Teschemacher, H., Lehmann, W., Gaulty, M., Erhardt, G. 1997. 'Influence of genetic polymorphisms in bovine milk on the occurrence of bioactive peptides.', *International Dairy Federation*: (459–60).
- He, M., J. Sun, Z. Q. Jiang, and Y. X. Yang. 2017. 'Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study', *Nutr J*, 16: 72.
- Hegde, Narayan G. 2019. 'Research on A1 and A2 milk: A1 milk is not a matter of health concern', *The Indian Journal of Animal Sciences*, 89: 707–10.
- Heirbaut, S., X. P. Jing, B. Stefańska, E. Pruszyńska-Oszmałek, L. Buysse, P. Lutakome, M. Q. Zhang, M. Thys, L. Vandaele, and V. Fievez. 2023. 'Diagnostic milk biomarkers for predicting the metabolic health status of dairy cattle during early lactation', *Journal of Dairy Science*, 106: 690-702.
- Henschen, A., V. Brantl, H. Teschemacher, and F. Lottspeich. 1980. 'β-CASOMORPHINS—NOVEL OPIOID PEPTIDES DERIVED FROM BOVINE CASEIN—ISOLATION AND STRUCTURE.' in E. Leong Way (ed.), *Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists* (Pergamon).
- Henschen, A., F. Lottspeich, V. Brantl, and H. Teschemacher. 1979. 'Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone', *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 360: 1217-24.
- Henze, Laura J., Niklas J. Koehl, Joseph P. O'Shea, Edmund S. Kostewicz, René Holm, and Brendan T. Griffin. 2019. 'The pig as a preclinical model for predicting oral bioavailability and in vivo performance of pharmaceutical oral dosage forms: a PEARRL review', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71: 581-602.
- Herman, M. A., A. Alayan, N. Sahibzada, B. Bayer, J. Verbalis, K. L. Dretchen, and R. A. Gillis. 2010. 'micro-Opioid receptor stimulation in the medial subnucleus of the tractus solitarius inhibits gastric tone and motility by reducing local GABA activity', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299: G494-506.
- Hewa Nadugala, Barana, Charles N. Pagel, Jared K. Raynes, C. S. Ranadheera, and Amy Logan. 2022. 'The effect of casein genetic variants, glycosylation and phosphorylation on bovine milk protein structure, technological properties, nutrition and product manufacture', *International Dairy*

- Journal*, 133: 105440.
- Heyman, M., R. Ducroc, J. F. Desjeux, and J. L. Morgat. 1982. 'Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro', *Am J Physiol*, 242: G558-64.
- Ho, S., K. Woodford, S. Kukuljan, and S. Pal. 2014. 'Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study', *Eur J Clin Nutr*, 68: 994-1000.
- Hohmann, L. G., T. Yin, H. Schweizer, I. J. Giambra, S. Konig, and A. M. Scholz. 2020. 'Comparative Effects of Milk Containing A1 versus A2 beta-Casein on Health, Growth and beta-Casomorphin-7 Level in Plasma of Neonatal Dairy Calves', *Animals (Basel)*, 11.
- Holzer, P. 2004. 'Opioids and opioid receptors in the enteric nervous system: from a problem in opioid analgesia to a possible new prokinetic therapy in humans', *Neurosci Lett*, 361: 192-5.
- Horowitz, Arie, Sandra D. Chanez-Paredes, Xenia Haest, and Jerrold R. Turner. 2023. 'Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 20: 417-32.
- Horstman, Astrid M. H., and Thom Huppertz. 2023. 'Milk proteins: Processing, gastric coagulation, amino acid availability and muscle protein synthesis', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63: 10267-82.
- Hou, Xiaohua, Jieyun Yin, Jinsong Liu, Pankaj J. Pasricha, and J. D. Z. Chen. 2005. 'In Vivo Gastric and Intestinal Slow Waves in W/W<sup>v</sup> Mice', *Digestive Diseases and Sciences*, 50: 1335-41.
- Huizinga, Jan D., Amer Hussain, and Ji-Hong Chen. 2021. 'Interstitial cells of Cajal and human colon motility in health and disease', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 321: G552-G75.
- Huppertz, T., P. F. Fox, and A. L. Kelly. 2018. '3 - The caseins: Structure, stability, and functionality.' in Rickey Y. Yada (ed.), *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (Woodhead Publishing).
- Iwan, M., B. Jarmolowska, K. Bielikowicz, E. Kostyra, H. Kostyra, and M. Kaczmarek. 2008. 'Transport of micro-opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer', *Peptides*, 29: 1042-7.
- Iwata, H., S. Tsuchiya, T. Nakamura, and S. Yano. 2007. 'Morphine leads to contraction of the ileal circular muscle via inhibition of the nitrenergic pathway in mice', *Eur J Pharmacol*, 574: 66-70.
- Jacobj, C. 1891. 'Beiträge zur physiologischen und pharmakologischen Kenntniss der Darmbewegungen mit besonderer Berücksichtigung der Beziehung der Nebenniere zu denselben', *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 29: 171-211.
- James, Arul, and John Williams. 2020. 'Basic Opioid Pharmacology — An Update', *British Journal of Pain*, 14: 115-21.
- Jänig, Wilfrid. 2022. 'The Enteric Nervous System.' in Wilfrid Jänig (ed.), *The Integrative Action of the Autonomic Nervous System: Neurobiology of Homeostasis* (Cambridge University Press: Cambridge).
- Jarmolowska, B., M. Bukalo, E. Fiedorowicz, A. Cieslinska, N. K. Kordulewska, M. Moszynska, A. Swiatecki, and E. Kostyra. 2019. 'Role of Milk-Derived Opioid Peptides and Proline Dipeptidyl Peptidase-4 in Autism Spectrum Disorders', *Nutrients*, 11.
- Jensen, H. B., J. W. Holland, N. A. Poulsen, and L. B. Larsen. 2012. 'Milk protein genetic variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties', *J Dairy Sci*, 95: 2891-903.



- Jensen, Kevin P., Elise E. DeVito, Sarah Yip, Kathleen M. Carroll, and Mehmet Sofuoglu. 2018. 'The Cholinergic System as a Treatment Target for Opioid Use Disorder', *CNS Drugs*, 32: 981-96.
- Jeong, Huijin, Young-Seo Park, and Sung-Sik Yoon. 2023. 'A2 milk consumption and its health benefits: an update', *Food Science and Biotechnology*.
- Jespersen, B., N. R. Tykocki, S. W. Watts, and P. J. Cobbett. 2015. 'Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology research', *J Vis Exp*: 52324.
- Jianqin, S., X. Leiming, X. Lu, G. W. Yelland, J. Ni, and A. J. Clarke. 2016. 'Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk', *Nutr J*, 15: 35.
- Johnson, E. E., and D. G. Lambert. 2002. 'Molecular pharmacology of the opioid/nociceptin system', *Current Anaesthesia & Critical Care*, 13: 305-12.
- Johnson, Leonard R, and Thomas A Gerwin. 2007. *Gastrointestinal physiology* (Mosby Elsevier Philadelphia, PA).
- Kaminski, Stanislaw, Elżbieta Kostyra, Anna Cieślińska, and Ewa Fiedorowicz. 2012. 'Consumption of bovine  $\beta$ -casein variants (A1 or A2) does not affect basic hematological and biochemical indices', *Milchwissenschaft*, 67: 238-41.
- Kappes, R., V. Schneider, H. Schweizer, S. Nüske, D. A. Knob, A. Thaler Neto, and A. M. Scholz. 2024. 'Effect of  $\beta$ -casein A1 or A2 milk on body composition, milk intake, and growth in Holstein, Simmental, and crossbred dairy calves of both sexes', *Journal of Dairy Science*.
- Kawasaki, Eiji. 2023. 'Anti-Islet Autoantibodies in Type 1 Diabetes', *International Journal of Molecular Sciences*, 24: 10012.
- Kayser, H., and H. Meisel. 1996. 'Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins', *FEBS Lett*, 383: 18-20.
- Kerlin, Paul, and Sidney Phillips. 1982. 'Variability of motility of the ileum and jejunum in healthy humans', *Gastroenterology*, 82: 694-700.
- Kiela, P. R., and F. K. Ghishan. 2016. 'Physiology of Intestinal Absorption and Secretion', *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 30: 145-59.
- Klein, S., B. Seidler, A. Kettenberger, A. Sibaev, M. Rohn, R. Feil, H. D. Allescher, et al. 2013. 'Interstitial cells of Cajal integrate excitatory and inhibitory neurotransmission with intestinal slow-wave activity', *Nat Commun*, 4: 1630.
- Koch, F., R. Pieper, and C. Fischer-Tenhagen. 2023. '[Body temperature measurement in pigs: Are infrared thermometers a non-invasive alternative?]', *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 51: 84-92.
- Koch, G., K. Wiedemann, and H. Teschemacher. 1985. 'Opioid activities of human beta-casomorphins', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 331: 351-4.
- Kost, Natalya V., Oleg Yu Sokolov, Oksana B. Kurasova, Alexander D. Dmitriev, Julia N. Tarakanova, Marina V. Gabaeva, Yuriy A. Zolotarev, et al. 2009. ' $\beta$ -Casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development', *Peptides*, 30: 1854-60.
- Kotipoyina, H. R., E. L. Kong, R. J. Chen, and S. J. Warrington. 2024. 'Tetrodotoxin Toxicity.' in, *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL)).
- Koziolek, M., F. Schneider, M. Grimm, Chr Modeß, A. Seekamp, T. Roustom, W. Siegmund, and W. Weitschies. 2015. 'Intragastric pH and pressure profiles after intake of the high-caloric, high-

- fat meal as used for food effect studies', *Journal of Controlled Release*, 220: 71-78.
- Kullenberg de Gaudry, D., S. Lohner, C. Schmucker, P. Kapp, E. Motschall, S. Horrlein, C. Roger, and J. J. Meerpohl. 2019. 'Milk A1 beta-casein and health-related outcomes in humans: a systematic review', *Nutr Rev*, 77: 278-306.
- Kumar, Adesh, Ran Vir Singh, Anuj Chauhan, K. Ilayakumar, Sushil Kumar, Amit Kumar, Arvind Sonwane, Subodh Kumar, Manjit Panigrahi, and Bharat Bhushan. 2020. 'Genetic association analysis reveals significant effect of  $\beta$ -casein A1/A2 loci on production & reproduction traits in Frieswal crossbred cows', *Biological Rhythm Research*, 51: 1259-72.
- Kunze, W. A. A., and J. B. Furness. 1999. 'THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM AND REGULATION OF INTESTINAL MOTILITY', *Annual Review of Physiology*, 61: 117-42.
- Kurahashi, M., H. Zheng, L. Dwyer, S. M. Ward, S. D. Koh, and K. M. Sanders. 2011. 'A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles', *J Physiol*, 589: 697-710.
- Kural, Tomáš, Martina Grajciarová, Jáchym Rosendorf, Richard Pálek, Lenka Červenková, Anna Malečková, Sima Šarčević, Václav Liška, and Zbyněk Tonar. 2023. 'Histological mapping of healing of the small and large intestine – A quantitative study in a porcine model', *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 249: 152095.
- Kuznetsov, S. B., E. V. Solodneva, M. T. Semina, S. V. Beketov, I. S. Turbina, and Yu A. Stolpovsky. 2022. 'New Combinations of Alleles in the Variants of the Cluster of Bovine Casein Genes and Revision of the Nomenclature of These Genes', *Russian Journal of Genetics*, 58: 915-26.
- Lambers, Tim T., S. Broeren, J. Heck, M. Bragt, and T. Huppertz. 2021. 'Processing affects beta-casomorphin peptide formation during simulated gastrointestinal digestion in both A1 and A2 milk', *International Dairy Journal*.
- Lang, M E, J S Davison, S L Bates, and J B Meddings. 1996. 'Opioid receptors on guinea-pig intestinal crypt epithelial cells', *The Journal of Physiology*, 497: 161-74.
- Langley, J. N., and R. Magnus. 1905. 'Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves', *The Journal of Physiology*, 33: 34-51.
- Laugesen, M., and R. Elliott. 2003. 'Ischaemic heart disease, Type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein', *N Z Med J*, 116: U295.
- Lefebvre, R. A., C. Callens, I. Van Colen, and C. J. G. Delesalle. 2017. 'The 5-HT(4) receptor agonist prucalopride does not facilitate cholinergic neurotransmission in circular and longitudinal smooth muscle preparations of equine mid-jejunum', *Res Vet Sci*, 114: 153-62.
- Lenzen, S. 2008. 'The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes', *Diabetologia*, 51: 216-26.
- Li, Xu, Garrick W. K. Spencer, Lydia Ong, and Sally L. Gras. 2022. 'Beta casein proteins – A comparison between caprine and bovine milk', *Trends in Food Science & Technology*, 121: 30-43.
- Lin, Q., M. Qin, S. G. Zhao, Z. X. Liu, W. J. Dou, R. Zhang, Y. L. Li, et al. 2019. 'The roles of PDGFR $\alpha$  signaling in the postnatal development and functional maintenance of the SMC-ICC-PDGFR $\alpha$ + cell (SIP) syncytium in the colon', *Neurogastroenterol Motil*, 31: e13568.
- Lindmark-Månsson, Helena, Rangne Fondén, and Hans-Erik Pettersson. 2003. 'Composition of Swedish dairy milk', *International Dairy Journal*, 13: 409-25.
- Liu, B., W. Qiao, M. Zhang, Y. Liu, J. Zhao, and L. Chen. 2022. 'Bovine milk with variant  $\beta$ -casein types on immunological mediated intestinal changes and gut health of mice', *Front Nutr*, 9: 970685.
- Lord, J. A., A. A. Waterfield, J. Hughes, and H. W. Kosterlitz. 1977. 'Endogenous opioid peptides:

- multiple agonists and receptors', *Nature*, 267: 495-9.
- Loveday, Simon M. 2023. 'Protein digestion and absorption: the influence of food processing', *Nutrition Research Reviews*, 36: 544-59.
- Macedo Mota, L. F., V. Bisutti, A. Vanzin, S. Pegolo, A. Toscano, S. Schiavon, F. Tagliapietra, L. Gallo, P. Ajmone Marsan, and A. Cecchinato. 2023. 'Predicting milk protein fractions using infrared spectroscopy and a gradient boosting machine for breeding purposes in Holstein cattle', *Journal of Dairy Science*, 106: 1853-73.
- Martin, Patrice, Leonardo Bianchi, Christelle Cebo, and Guy Miranda. 1994. 'Genetic Polymorphism of Milk Proteins.' in.
- Martin, W. R., C. G. Eades, J. A. Thompson, R. E. Huppler, and P. E. Gilbert. 1976. 'The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog', *J Pharmacol Exp Ther*, 197: 517-32.
- Massella, Elisa, Silvia Piva, Federica Giacometti, Gaetano Liuzzo, Angelo Vittorio Zambrini, and Andrea Serraino. 2017. 'Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy', *Italian Journal of Food Safety*, 6.
- Mazzuoli-Weber, Gemma, and Michael Schemann. 2015. 'Mechanosensitivity in the enteric nervous system', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9.
- McCabe, L., L. D. Griffin, A. Kinzer, M. Chandler, J. B. Beckwith, and E. R. McCabe. 1990. 'Overo lethal white foal syndrome: equine model of aganglionic megacolon (Hirschsprung disease)', *Am J Med Genet*, 36: 336-40.
- McDonald, John, and David G. Lambert. 2013. 'Opioid mechanisms and opioid drugs', *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 14: 505-09.
- McLachlan, C. N. 2001. 'beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses', *Med Hypotheses*, 56: 262-72.
- McQuilken, Shona A. 2021. 'Gut motility and its control', *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 22: 339-42.
- Meng, Y., Y. Zhou, H. Li, Y. Chen, G. Dominik, J. Dong, Y. Tang, J. M. Saavedra, and J. Liu. 2023. 'Effectiveness of Growing-Up Milk Containing Only A2 beta-Casein on Digestive Comfort in Toddlers: A Randomized Controlled Trial in China', *Nutrients*, 15.
- Minekus, M., M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, et al. 2014. 'A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus', *Food Funct*, 5: 1113-24.
- Mønsted, Mia Øgaard, Nora Dakini Falck, Kristina Pedersen, Karsten Buschard, Laurits Juulskov Holm, and Martin Haupt-Jorgensen. 2021. 'Intestinal permeability in type 1 diabetes: An updated comprehensive overview', *Journal of Autoimmunity*, 122: 102674.
- Mosinska, Paula, Marta Zielinska, and Jakub Fichna. 2016. 'Expression and physiology of opioid receptors in the gastrointestinal tract', *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 23: 3-10.
- Mrinalini Saran, Manoj Kumar Kalwaniya, SK Kashyap, Manisha Doot, Lokendra and Mayank Kumar Agarwal. 2023. 'Assessment of the prevalence of A1/A2 type-β-casein variants among Rathi and Sahiwal breeds of cattle', *The Pharma Innovation*.
- Mueller, Jessica L., and Allan M. Goldstein. 2022. 'The science of Hirschsprung disease: What we know and where we are headed', *Seminars in Pediatric Surgery*, 31: 151157.

- Mukesh, M., S. Swami, G. Bhakhri, V. Chaudhary, V. Sharma, N. Goyal, P. Vivek, et al. 2022. 'Demographic pattern of A1/A2 beta casein variants indicates conservation of A2 type haplotype across native cattle breeds (*Bos indicus*) of India', *3 Biotech*, 12: 167.
- Murthy, K S, and G M Makhlof. 1996. 'Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle', *Molecular Pharmacology*, 50: 870-77.
- Nagahawatte, N. D., N. Paskaranandavivel, and L. K. Cheng. 2021. "Characterization of Slow Wave Activity in Ex-vivo Porcine Small Intestine Segments." In *2021 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*, 7296-99.
- Neunlist, Michel, Gisela Dobрева, and Michael Schemann. 1999. 'Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon', *The Journal of Physiology*, 517: 533-46.
- Noni, I. D. 2008. 'Release of  $\beta$ -casomorphins 5 and 7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine  $\beta$ -casein variants and milk-based infant formulas', *Food Chem*, 110: 897-903.
- North, R. Alan, and John T. Williams. 1983. 'How do opiates inhibit neurotransmitter release?', *Trends in Neurosciences*, 6: 337-39.
- Osborne, Simone, Wei Chen, Rama Addepalli, Michelle Colgrave, Tanoj Singh, Cuong Tran, and Li Day. 2014. 'In vitro transport and satiety of a beta-lactoglobulin dipeptide and beta-casomorphin-7 and its metabolites', *Food & Function*, 5: 2706-18.
- Pampusch, M. S., M. A. Osinski, D. R. Brown, and M. P. Murtaugh. 1998. 'The porcine mu opioid receptor: molecular cloning and mRNA distribution in lymphoid tissues', *J Neuroimmunol*, 90: 192-8.
- Pappenheimer, J. R., C. E. Dahl, M. L. Karnovsky, and J. E. Maggio. 1994. 'Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1942-5.
- Parashar, Abhishek, and Ramakrishna Saini. 2015. 'A1 milk and its controversy-a review', *International Journal of Bioassays*, 4: 4611-19.
- Pathan, Hasan, and John Williams. 2012. 'Basic opioid pharmacology: an update', *British Journal of Pain*, 6: 11-16.
- Paul, Alok K., Craig M. Smith, Mohammed Rahmatullah, Veeranoot Nissapatorn, Polrat Wilairatana, Mariana Spetea, Nuri Gueven, and Nikolas Dietis. 2021. 'Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review', *Pharmaceuticals*, 14: 1091.
- Peng, J., S. Sarkar, and S. L. Chang. 2012. 'Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR', *Drug Alcohol Depend*, 124: 223-8.
- Poonyachoti, S., A. Kulkarni-Narla, and D. R. Brown. 2002. 'Chemical coding of neurons expressing delta- and kappa-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum', *Cell Tissue Res*, 307: 23-33.
- Poonyachoti, S., P. S. Portoghese, and D. R. Brown. 2001a. 'Pharmacological evidence for a 7-benzylidenenaltrexone-preferring opioid receptor mediating the inhibitory actions of peptidic delta- and mu-opioid agonists on neurogenic ion transport in porcine ileal mucosa', *J Pharmacol Exp Ther*, 297: 672-9.
- Poonyachoti, Sutthasinee, Philip S. Portoghese, and David R. Brown. 2001b. 'Characterization of Opioid Receptors Modulating Neurogenic Contractions of Circular Muscle from Porcine Ileum and Evidence That  $\delta$ - and  $\kappa$ -Opioid Receptors Are Coexpressed in Myenteric Neurons', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297: 69-77.

- Quito, F. L., V. S. Seybold, and D. R. Brown. 1991. 'Opiate binding sites in mucosa of pig small intestine', *Life Sci*, 49: PL219-22.
- Radu, Petru, Mihai Zurzu, Vlad Paic, Mircea Bratucu, Dragos Garofil, Anca Tigora, Valentin Georgescu, et al. 2023. 'Interstitial Cells of Cajal—Origin, Distribution and Relationship with Gastrointestinal Tumors', *Medicina*, 59: 63.
- Raffaelli, W., V. Malafoglia, A. Bonci, M. Tenti, S. Ilari, P. Gremigni, C. Iannuccelli, et al. 2020. 'Identification of MOR-Positive B Cell as Possible Innovative Biomarker (Mu Lympho-Marker) for Chronic Pain Diagnosis in Patients with Fibromyalgia and Osteoarthritis Diseases', *Int J Mol Sci*, 21.
- Ramakrishnan, M., X. Zhou, U. Dydak, and D. A. Savaiano. 2023. 'Gastric Emptying of New-World Milk Containing A1 and A2 Beta-Casein Is More Rapid as Compared to Milk Containing Only A2 Beta-Casein in Lactose Maldigesters: A Randomized, Cross-Over Trial Using Magnetic Resonance Imaging', *Nutrients*, 15.
- Reed, James F. 2005. 'Contributions to two-sample statistics', *Journal of Applied Statistics*, 32: 37-44.
- Rees, W. D., J. R. Malagelada, L. J. Miller, and V. L. Go. 1982. 'Human interdigestive and postprandial gastrointestinal motor and gastrointestinal hormone patterns', *Dig Dis Sci*, 27: 321-9.
- Rohm, Florian, Hannelore Daniel, and Britta Spanier. 2019. 'Transport Versus Hydrolysis: Reassessing Intestinal Assimilation of Di- and Tripeptides by LC–MS/MS Analysis', *Molecular Nutrition & Food Research*, 63: 1900263.
- Rumessen, J. J., and L. Thuneberg. 1996. 'Pacemaker cells in the gastrointestinal tract: interstitial cells of Cajal', *Scand J Gastroenterol Suppl*, 216: 82-94.
- Salles, Léa, Juliane Floury, and Steven Le Feunteun. 2021. 'Pepsin activity as a function of pH and digestion time on caseins and egg white proteins under static in vitro conditions', *Food & Function*, 12: 12468-78.
- Sanchón, J., S. Fernández-Tomé, B. Miralles, B. Hernández-Ledesma, D. Tomé, C. Gaudichon, and I. Recio. 2018. 'Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation', *Food Chemistry*, 239: 486-94.
- Sanders, K. M., S. M. Ward, and S. D. Koh. 2014. 'Interstitial cells: regulators of smooth muscle function', *Physiol Rev*, 94: 859-907.
- Sarna, S. K., B. L. Bardakjian, W. E. Waterfall, and J. F. Lind. 1980. 'Human colonic electrical control activity (ECA)', *Gastroenterology*, 78: 1526-36.
- Sarna, S. K., K. H. Soergel, J. M. Harig, F. D. Loo, C. M. Wood, K. M. Donahue, R. P. Ryan, and R. C. Arndorfer. 1989. 'Spatial and temporal patterns of human jejunal contractions', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 257: G423-G32.
- Sasselli, Valentina, Vassilis Pachnis, and Alan J. Burns. 2012. 'The enteric nervous system', *Developmental Biology*, 366: 64-73.
- Schemann, Michael, Gunther Mai, Marcello Costa, and Paul Enck. 2021. 'Translating the seminal findings of Carl Lüderitz: A description in English of his extraordinary studies of gastrointestinal motility accompanied by a historical view of peristalsis', *Neurogastroenterology & Motility*, 33: e13995.
- Schneider, L, and J Szathmáry. 1938. *Immunity of Newborn Mammals. I.*
- Sebastiani, C., C. Arcangeli, M. Ciullo, M. Torricelli, G. Cinti, S. Fisichella, and M. Biagetti. 2020. 'Frequencies Evaluation of beta-Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central

- Italy', *Animals (Basel)*, 10.
- Seidl, H., F. Gundling, A. Pfeiffer, C. Pehl, W. Schepp, and T. Schmidt. 2012. 'Comparison of small-bowel motility of the human jejunum and ileum', *Neurogastroenterology & Motility*, 24: e373-e80.
- Sharkey, Keith A., and Gary M. Mawe. 2023. 'The enteric nervous system', *Physiological Reviews*, 103: 1487-564.
- Sheng, X., Z. Li, J. Ni, and G. Yelland. 2019. 'Effects of Conventional Milk Versus Milk Containing Only A2 beta-Casein on Digestion in Chinese Children: A Randomized Study', *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 69: 375-82.
- Shimizu, M. 1999. 'Modulation of intestinal functions by food substances', *Nahrung*, 43: 154-8.
- Shimizu, M., and D. O. Son. 2007. 'Food-derived peptides and intestinal functions', *Curr Pharm Des*, 13: 885-95.
- Sienkiewicz-Szłapka, E., B. Jarmołowska, S. Krawczuk, E. Kostyra, H. Kostyra, and M. Iwan. 2009. 'Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties', *International Dairy Journal*, 19: 258-63.
- Singh, R. D., S. J. Gibbons, S. A. Saravanaperumal, P. Du, G. W. Hennig, S. T. Eisenman, A. Mazzone, et al. 2014. 'Ano1, a Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel, coordinates contractility in mouse intestine by Ca<sup>2+</sup> transient coordination between interstitial cells of Cajal', *J Physiol*, 592: 4051-68.
- Sobczak, M., M. Salaga, M. A. Storr, and J. Fichna. 2014. 'Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives', *J Gastroenterol*, 49: 24-45.
- Sokolov, Oleg, Natalya Kost, Olga Andreeva, Ekaterina Korneeva, Viktor Meshavkin, Yulia Tarakanova, Aleksander Dadayan, et al. 2014. 'Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity', *Peptides*, 56.
- Song, Jiahui, Chi Pan, Feifei Li, Yu Guo, Pei Pei, Xiaocao Tian, Shaojie Wang, et al. 2022. 'Association between dairy consumption and ischemic heart disease among Chinese adults: a prospective study in Qingdao', *Nutrition & Metabolism*, 19: 11.
- Sternini, C., S. Patierno, I. S. Selmer, and A. Kirchgessner. 2004. 'The opioid system in the gastrointestinal tract', *Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 2: 3-16.
- Stetter, Franziska. 2021. 'Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von peripheren mononukleären Blutzellen des Schweins durch Beta-Casomorphin-7 und selektive Opioidliganden', *Dissertation med. vet.*
- Stevens, C. W. 2009. 'The evolution of vertebrate opioid receptors', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14: 1247-69.
- Stotzer, P. O., E. S. Björnsson, and H. Abrahamsson. 1996. 'Interdigestive and postprandial motility in small-intestinal bacterial overgrowth', *Scand J Gastroenterol*, 31: 875-80.
- Surma, Stanisław, Amirhossein Sahebkar, and Maciej Banach. 2024. 'Whether and Why Do We Need a Vaccine Against Atherosclerosis? Can We Expect It Anytime Soon?', *Current Atherosclerosis Reports*.
- Surratt, C. K., P. S. Johnson, A. Moriwaki, B. K. Seidleck, C. J. Blaschak, J. B. Wang, and G. R. Uhl. 1994. '-mu opiate receptor. Charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity', *J Biol Chem*, 269: 20548-53.
- Szurszewski, J. H. 1969. 'A migrating electric complex of canine small intestine', *Am J Physiol*, 217: 1757-63.

- Tailford, K. A., C. L. Berry, A. C. Thomas, and J. H. Campbell. 2003. 'A casein variant in cow's milk is atherogenic', *Atherosclerosis*, 170: 13-9.
- Teschemacher, H. 2003. 'Opioid receptor ligands derived from food proteins', *Curr Pharm Des*, 9: 1331-44.
- Thakur, Neha, Geeta Chauhan, B. P. Mishra, S. K. Mendiratta, A. K. Pattanaik, Thakur Uttam Singh, M. Karikalan, Somesh Kumar Meshram, and Lalita Garg. 2020. 'Comparative evaluation of feeding effects of A1 and A2 cow milk derived casein hydrolysates in diabetic model of rats', *Journal of Functional Foods*, 75: 104272.
- Thiruvengadam, M., B. Venkidasamy, P. Thirupathi, I. M. Chung, and U. Subramanian. 2021. 'beta-Casomorphin: A complete health perspective', *Food Chem*, 337: 127765.
- Thompson, A. A., W. Liu, E. Chun, V. Katritch, H. Wu, E. Vardy, X. P. Huang, et al. 2012. 'Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic', *Nature*, 485: 395-9.
- Thorsdottir, I., B. E. Birgisdottir, I. M. Johannsdottir, D. P. Harris, J. Hill, L. Steingrimsdottir, and A. V. Thorsson. 2000. 'Different beta-casein fractions in Icelandic versus Scandinavian cow's milk may influence diabetogenicity of cow's milk in infancy and explain low incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Iceland', *Pediatrics*, 106: 719-24.
- Threadgill, D. W., and J. E. Womack. 1990. 'Genomic analysis of the major bovine milk protein genes', *Nucleic Acids Res*, 18: 6935-42.
- Townsend, D. th, and D. R. Brown. 2002. 'Predominance of delta-opioid-binding sites in the porcine enteric nervous system', *J Pharmacol Exp Ther*, 300: 900-9.
- Townsend, DeWayne, Philip S. Portoghese, and David R. Brown. 2004. 'Characterization of Specific Opioid Binding Sites in Neural Membranes from the Myenteric Plexus of Porcine Small Intestine', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308: 385-93.
- Trendelenburg, Paul. 1917. 'Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik', *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 81: 55-129.
- Truswell, A. S. 2005. 'The A2 milk case: a critical review', *European Journal of Clinical Nutrition*, 59: 623-31.
- Ukponmwan, H. Nosakhare, and F. Bright Ajibade. 2017. 'Evaluation of Techniques for Univariate Normality Test Using Monte Carlo Simulation', *American Journal of Theoretical and Applied Statistics*, 6: 51-61.
- Ul Haq, M. R., R. Kapila, and S. Kapila. 2015. 'Release of beta-casomorphin-7/5 during simulated gastrointestinal digestion of milk beta-casein variants from Indian crossbred cattle (Karan Fries)', *Food Chem*, 168: 70-9.
- Ul Haq, M. R., R. Kapila, R. Sharma, V. Saliganti, and S. Kapila. 2014. 'Comparative evaluation of cow beta-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut', *Eur J Nutr*, 53: 1039-49.
- Van Helden, Dirk F., Derek R. Laver, John Holdsworth, and Mohammad S. Imtiaz. 2010. 'Generation and propagation of gastric slow waves', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37: 516-24.
- Vanderwinden, Jean-Marie, and Jüri J. Rumessen. 1999. 'Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease', *Microscopy Research and Technique*, 47: 344-60.
- Vonderfecht, S.L., A. Trommershausen Bowling, and M. Cohen. 1983. 'Congenital Intestinal Aganglionosis in White Foals', *Veterinary Pathology*, 20: 65-70.

- Wang, Junli, Xiao Yan, Ronghua Lu, Xiaolin Meng, and Guoxing Nie. 2017. 'Peptide transporter 1 (PepT1) in fish: A review', *Aquaculture and Fisheries*, 2: 193-206.
- Watson, C. J., M. Rowland, and G. Warhurst. 2001. 'Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281: C388-C97.
- Weström, Björn, Ester Arévalo Sureda, Kateryna Pierzynowska, Stefan G. Pierzynowski, and Francisco-José Pérez-Cano. 2020. 'The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals', *Frontiers in Immunology*, 11.
- Wood, JD. 1972. 'Excitation of intestinal muscle by atropine, tetrodotoxin, and xylocaine', *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 222: 118-25.
- Xie, T., Z. Wu, T. J. Foutz, X. Sheng, X. Zhu, E. C. Leuthardt, J. T. Willie, L. Chen, and P. Brunner. 2023. 'Slow-wave modulation analysis during states of unconsciousness using the novel tau-modulation method', *J Neural Eng*, 20.
- Yadav, Shikha, Nakul Dev S. Yadav, Atish Gheware, Ankur Kulshreshtha, Pankaj Sharma, and V. P. Singh. 2020. 'Oral Feeding of Cow Milk Containing A1 Variant of  $\beta$  Casein Induces Pulmonary Inflammation in Male Balb/c Mice', *Scientific Reports*, 10: 8053.
- Yan, G. C., D. Croaker, A. L. Zhang, P. Manglick, T. Cartmill, and D. Cass. 1998. 'A Dinucleotide Mutation in the Endothelin-B Receptor Gene Is Associated with Lethal White Foal Syndrome (LWFS); A Horse Variant of Hirschsprung Disease (HSCR)', *Human Molecular Genetics*, 7: 1047-52.
- Yuan, Chun-Su, Joseph F. Foss, and Jonathan Moss. 1995. 'Effects of methylnaltrexone on morphine-induced inhibition of contraction in isolated guinea-pig ileum and human intestine', *European Journal of Pharmacology*, 276: 107-11.
- Yuan, P. Q., T. Li, M. Million, M. Larauche, K. Atmani, J. P. Bellier, and Y. Taché. 2023. 'New insight on the enteric cholinergic innervation of the pig colon by central and peripheral nervous systems: reduction by repeated loperamide administration', *Front Neurosci*, 17: 1204233.
- Zhang, Q., G. Widmer, and S. Tzipori. 2013. 'A pig model of the human gastrointestinal tract', *Gut Microbes*, 4: 193-200.
- Zhang, Wei, Jinfeng Miao, Chang Ma, Dongning Han, and Yuanshu Zhang. 2012. ' $\beta$ -Casomorphin-7 attenuates the development of nephropathy in type I diabetes via inhibition of epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells', *Peptides*, 36: 186-91.
- Zhao, Y., H. Luo, X. Ren, B. Jia, J. Li, L. Wang, and J. Li. 2024. 'The P2Y(1) receptor in the colonic myenteric plexus of rats and its correlation with opioid-induced constipation', *BMC Gastroenterol*, 24: 23.
- Zhuang, Pan, Xiaohui Liu, Yin Li, Yang Ao, Yuqi Wu, Hao Ye, Xuzhi Wan, et al. 2023. 'Dairy consumption and incident cardiovascular disease: a global analysis', *medRxiv*: 2023.11.14.23298545.
- Ziv, Ehud, and Moïse Bendayan. 2000. 'Intestinal absorption of peptides through the enterocytes', *Microscopy Research and Technique*, 49: 346-52.





## 9 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Cornelia A. Deeg, meinen herzlichen Dank aussprechen. Du hast mich immer unterstützt und mich auf dem rechten Weg gehalten, selbst wenn es mal nicht so lief, wie erwartet. Vielen Dank dafür, dass du mir auch neben diesem Projekt dein Vertrauen geschenkt und mich gefördert hast. Deine ständige Erreichbarkeit und Unterstützung sind nicht selbstverständlich, und ich wusste dies jederzeit sehr zu schätzen.

Ein großer Dank geht auch an unsere Postdocs Dr. Roxane Degroote, Dr. Margarete Swadzba, Dr. Kristina Kleinwort und Dr. Adrian Schmalen. Ihr habt mir immer gute Ratschläge und wissenschaftliche Hilfe gegeben. Vor allem du, Adrian, hast mir von Anfang an dein Wissen weitergegeben und mich besonders unterstützt.

Meinen lieben Kolleginnen Dr. Claudia Barfüßer, Dr. Lea Lorenz, Dr. Lucia Korbonits, Dr. Marie Schilloks, Dr. Anne Hoffmann, Heidi Duda, Amelie Fleischer, Ronja Söth, Lili Flad, Carolin Sprengel, Sabrina Trapp und Sabrina Albinger danke ich dafür, dass ihr jeden Tag im Institut zu einem besonderen gemacht habt. Auch wenn es mal in der Forschung nicht so lief wie erwartet (obwohl dies selbstverständlich eigentlich nie vorkam), standet ihr hinter mir und habt mich aufgebaut. Ihr hab die Arbeitstragödie in eine Komödie verwandelt und mich zum stolzen Wallach eurer Stutenherde gemacht. Auch privat seid ihr mir sehr ans Herz gewachsen und ich bin sehr froh, euch Freunde nennen zu dürfen. Ein besonderer Dank gilt dir, liebe Lili. Dein Teamgeist und deine Unterstützung in unserem Projekt waren enorm. Vielen Dank dafür!

Ein weiterer Dank geht an unsere technischen Assistenten für die fantastische Unterstützung. Vielen Dank liebe Sieglinde Hirmer, Bärbl, Hannah Chepliaka, Lydia Hoffmann, Stefanie Püls, Tanja Weißer, Mirjam Telorac, Ursula Kramer und Jonas Liedl. Ihr habt mich immer tatkräftig unterstützt, und wir hatten gemeinsam großartige Stunden in den Laboren. Vielen Dank für all dein geteiltes Wissen zu Beginn der Doktorarbeit, liebe Sieglinde. Danke liebe Bärbl für die Weitergabe deines unendlichen Weltwissens und die endlosen Diskussionen, die uns doch auf den gleichen Nenner und zum Ziel gebracht haben. Vielen Dank für die spaßigen Stunden, die hervorragende Arbeit im Labor und deine Gesangseinlagen, liebe Tanja. Vielen Dank

für deine akribische Arbeit, liebe Mirjam, und vielen Dank für das Korrekturlesen, liebe Steffi.

Auch meiner Familie gebührt ein besonderer Dank für ihre liebevolle und bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit. Liebe Mama und lieber Papa, ich danke euch von Herzen, dass ihr mir stets den Rücken gestärkt habt und immer für mich da wart, auch wenn ihr nicht immer genau verstanden habt, was ich eigentlich im Labor so treibe. Ein besonderer Dank geht auch an dich, liebe Léonie. Du hast die Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit miterlebt und mich jederzeit seelisch und moralisch liebevoll unterstützt. Ich schätze sehr, dass du nur für mich dein Staatsexamen in meine Schreibezeit gelegt hast, damit wir unser Leid gemeinsam teilen konnten. Ebenfalls danke ich dir, liebes Tantchen Sabine, für deine Hilfe beim Korrekturlesen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Gemma Mazzuoli-Weber und ihrem Team bedanken für das geteilte Wissen aus der Welt des zappelnden Darmes.

Vielen Dank auch dir, liebe Dr. Elisabeth Kremmer, für das geteilte Wissen und deinen stundenlangen Einsatz im Labor.

Ein weiterer Dank geht an meine Projektpartner Prof. Dr. Hermann Ammer, Karina Schechner und Dr. Elena Gerdes für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Des Weiteren gilt großer Dank dem Schlachthof Hasenheide und der Münchner Schweineschlachtung für die großartige Zusammenarbeit und die bedingungslose Bereitstellung des Probenmaterials.