

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Nachweis und zelluläre Lokalisation des Peptidtransporters (PepT2) in extrarenalen Geweben

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Monika Nickolaus
Dipl. oec. troph.
Geboren in Edenkoben

Gießen 2000

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 1995 bis April 1999 am Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. H. Daniel angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die treibende Kraft des Peptidtransporters	2
1.2	Substrataffinität und Substratspezifität	3
1.3	Strukturelle Eigenschaften der Peptidtransporter	4
1.4	Bedeutung der intestinalen und renalen Peptidtransporter	7
1.4.1	Ernährungsphysiologische Bedeutung	7
1.4.2	Pharmakologische Bedeutung	9
1.4.3	Klinische Bedeutung	9
1.5	Peptidtransporter außerhalb des Dünndarms und der Niere.....	10
1.6	Ziel der Arbeit	11
2	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	Material	13
2.1.1	Herkunft der Organe.....	13
2.1.2	Geräte	13
2.1.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.4	Molekularbiologische Reagentien.....	14
2.1.5	Proteinbiochemische/Immunologische Reagentien	15
2.1.6	Radioaktive/fluoreszenzmarkierte Peptide.....	15
2.1.7	Dipeptide und Inhibitoren	15
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Immunologische und proteinbiochemische Methoden	16
2.2.1.1	Erzeugung polyklonaler Antikörper.....	16
2.2.1.2	Affinitätsreinigung der Peptid-Antikörper	17
2.2.1.3	Präabsorption von Antiseren	18
2.2.1.4	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)	18
2.2.1.5	Western-Blot	19
2.2.1.6	Färbungen von Gelen und Blots.....	19
2.2.1.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran	20
2.2.1.8	Dot-Blot.....	21
2.2.1.9	Membranpräparationen	21
2.2.1.10	Proteinbestimmung mit dem BIO-RAD Assay	23
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.2.1	Übernachtskultur.....	24
2.2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	24
2.2.2.3	Transformation von Bakterienzellen.....	24
2.2.2.4	Anlegen einer Glycerinkultur.....	25

2.2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA	25
2.2.2.6	Restriktionsanalyse rekombinanter Plasmid-DNA.....	26
2.2.2.7	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	27
2.2.2.8	Gene-Clean-Methode.....	27
2.2.2.9	Ligation.....	27
2.2.2.10	CIP-Behandlung	28
2.2.2.11	Phenolextraktion von Nukleinsäuren.....	28
2.2.2.12	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	28
2.2.2.13	In-vitro Transkription zur Herstellung einer komplementären RNA	29
2.2.2.14	RNA-Präparation	29
2.2.2.15	Northern-Blot-Analyse	31
2.2.2.16	Filterhybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Hybridisierungssonden	31
2.2.2.17	Stripping	33
2.2.2.18	RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion).....	33
2.2.2.19	Klonierung von PCR-Produkten.....	34
2.2.2.20	DNA-Sequenzierung.....	34
2.2.2.21	In-situ-Hybridisierung	35
2.2.2.22	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	37
2.2.3	Immunhistochemie	38
2.2.3.1	Herstellen von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten Kryostatschnitten.....	38
2.2.3.2	Immunhistochemie an Gewebe-Dünnschnitten.....	38
2.2.4	Zellkultur	39
2.2.4.1	Passagieren von Zellen	39
2.2.5	Aufnahmeexperimente.....	40
2.2.5.1	Zellkultur	40
2.2.5.2	Aufnahmeexperimente am isolierten Organ.....	40
2.2.5.3	Ganztierexperiment.....	41
2.2.6	Zwei-Elektroden Voltage Clamp Technik.....	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Peptidtransporter in verschiedenen extrarenalen Geweben	43
3.2	Zelluläre Lokalisation des Peptidtransporters (PepT2) in der Niere.....	45
3.3	Peptidtransporter im Gehirn.....	47
3.3.1	Nachweis der PepT2-mRNA	47
3.3.2	Nachweis auf Proteinebene.....	54
3.3.3	Funktioneller Nachweis von PepT2.....	56
3.3.3.1	Aufnahmeexperimente am Organ (ex vivo).....	56
3.3.3.2	Elektrogener Transport von Dipeptiden in PepT2-exprimierenden <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	57
3.3.3.3	Zelllinien.....	59
3.4	Peptidtransporter in der Lunge	60
3.5	Peptidtransporter im Pankreas.....	64
3.5.1	Aufnahmeexperimente an isolierten Inselzellen.....	65

3.6	Peptidtransporter in der Leber.....	66
3.7	Peptidtransporter in der Mamma	67
3.8	Peptidtransporter in anderen extrarenalen Geweben	70
3.9	Aufnahmeexperimente am Ganztier	75
3.9.1	Gewebeverteilung von β -Ala-Lys-AMCA in Mäusen nach Injektion in die Schwanzvene	75
4	DISKUSSION.....	77
4.1	Mögliche Substrate für PepT2 in extrarenalen Geweben	77
4.1.1	Niere	79
4.1.2	Gehirn.....	80
4.1.3	Lunge.....	83
4.1.4	Pankreas	84
4.1.5	Leber.....	85
4.1.6	Mamma.....	86
4.1.7	Andere Organe	88
4.1.8	Schlußbemerkung.....	89
5	ZUSAMMENFASSUNG	91
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	92
7	ABKÜRZUNGEN	102

1 Einleitung

Eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels ist die ständige Aufnahme kleiner organischer Moleküle aus dem Extrazellulärraum über bestimmte Transportsysteme in der Plasmamembran der Zelle.

Entsprechend ihrer Funktion und des Gewebeverbandes dem die Zellen angehören verfügen diese über unterschiedliche Transportsysteme. Beispiele hierfür sind der Oligopeptid-Transporter (PepT1) in der apikalen Membran von Epithelzellen des Dünndarms und des Nierentubulus (PepT2).

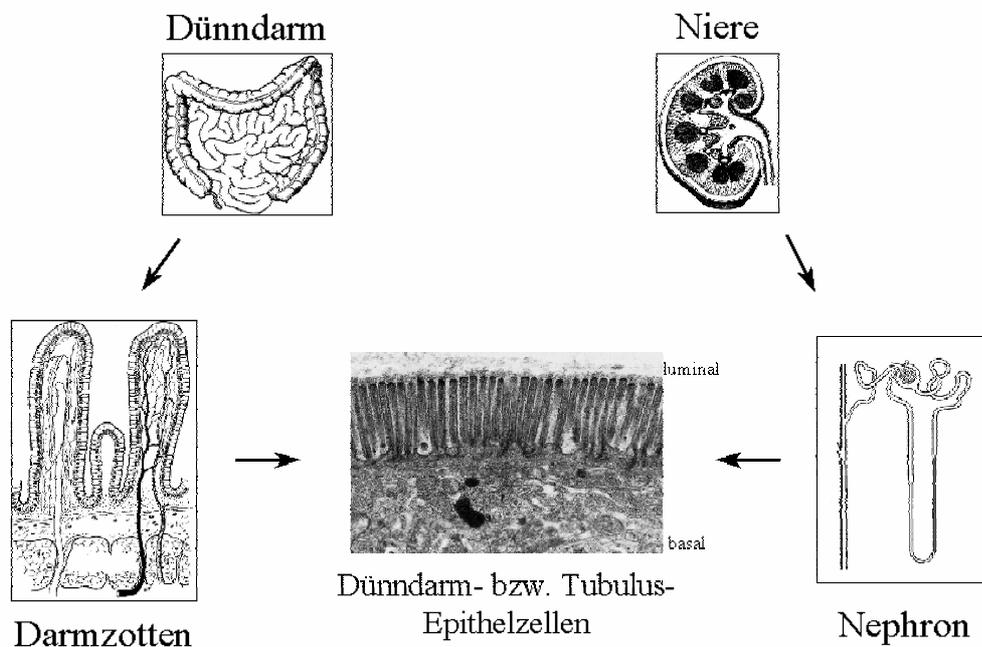


Abbildung 1: Lokalisation von epithelialen Peptidtransportern

Die für das Vorkommen von Peptidtransportern in der Natur verantwortlichen cDNAs wurden in den letzten Jahren unter anderem aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ptr2) (Perry et al. 1994), *Candida albicans* (CaPtr2) (Basrai et al. 1995), *Arabidopsis thaliana* (AtPTR2-A, AtPTR2-B) (Steiner et al. 1994 und 1995), dem Dünndarm des Kaninchens (PepT1) (Boll et al. 1994, Fei et al. 1994), der Niere des Kaninchens (rPepT2) (Boll et al. 1996), dem Dünndarm des Menschen (hPepT1) (Liang et al. 1995), der Niere des Menschen (hPepT2) (Liu et al. 1995), dem Dünndarm und der Niere der Ratte (Saito et

al. 1995) und dem Dünndarm des Schafes (Chen et al. 1999) kloniert. Alle genannten Peptidtransporter benötigen für den Transport ihrer Substrate einen Protonengradienten und werden deshalb zum einen zu der Gruppe der protonenabhängigen Transporter (POT) (Paulsen und Skurray 1994) und zum anderen zur Gruppe der Peptidtransporter (PTR) zusammengefaßt (Steiner et al. 1995). Alle Proteine der POT- bzw. der PTR-Familie zeichnen sich durch eine große Anzahl identischer und ähnlicher Sequenzmotive aus (Graul und Sadee 1997). Peptidtransporter sind in der Natur ubiquitär und scheinen eine früh in der Evolution entstandene Gruppe von Transmembransystemen darzustellen.

1.1 Die treibende Kraft des Peptidtransporters

Die Peptidtransporter unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Primärstruktur und ihres Transportmechanismus von denen, die für die Aufnahme freier Aminosäuren verantwortlich sind. Im Gegensatz zu vielen Aminosäuretransportern, bei denen der Transport über einen zelleinwärts gerichteten Na^+ -Gradienten oder eine erleichterte Diffusion erfolgt, nutzen die in der apikalen Membran der Dünndarm- und Nierentubulusepithelzellen lokalisierten Peptidtransporter einen zelleinwärts gerichteten Protonengradienten, um kurz-kettige Peptide aktiv in das Zellinnere zu transportieren (Ganapathy, et al. 1983; Ganapathy et al. 1984).

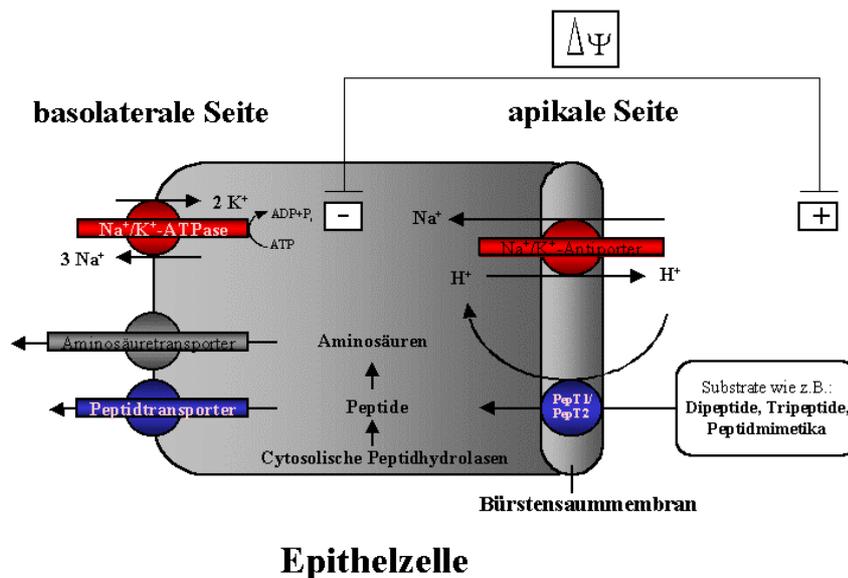


Abbildung 2: Zelluläre Ebene des Peptidtransportes

Protonengradienten sind an eukaryotischen Zellmembranen nicht generell vorhanden, sondern müssen über ATPasen oder verschiedene Austauschsysteme generiert werden. So wird der zelleinwärtsgerichtete Protonengradient in Epithelzellen durch einen apikal gelegenen Na^+/H^+ -Austauscher aufrecht erhalten, der an eine basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase gekoppelt ist (Leibach et al. 1996). Folglich handelt es sich beim intestinalen und renalen Peptidtransporter um ein tertiär aktives Transportsystem (Ganapathy et al. 1996; Mackenzie et al. 1995).

Daß ein Protonengradient als treibende Kraft für die Nährstoffaufnahme dienen kann, wurde bisher nur für Bakterien, Hefen und Pflanzenzellen beschrieben (Steiner et al. 1995); somit ist der Peptidtransporter vermutlich ein evolutionär konservierter Prozeß zur Versorgung von Zellen mit α -Aminostickstoff, als auch eine potentielle evolutionäre Verbindung zu bakteriellen Transportsystemen (Fei et al. 1998).

1.2 Substrataffinität und Substratspezifität

Studien an renalen Bürstensaummembranvesikeln zeigten einen sättigbaren und pH-abhängigen Transport für eine Vielzahl von Di- und Tripeptiden (Daniel 1993, Daniel und Adibi 1993, Daniel und Herget 1997, Daniel et al. 1991, Reis et al. 1994). Als potentielle Substrate für PepT1 und PepT2 kommen eine Vielzahl von Substanzen in Frage. Ausgehend von 20 proteinogenen Aminosäuren ergibt sich eine Anzahl von 400 Di- und 8000 Tripeptiden. Berücksichtigt man auch D-Aminosäuren in Di- und Tripeptiden, so steigt die Anzahl der potentiellen Substrate um ein Vielfaches an. Freie Aminosäuren und Peptide, die aus mehr als drei Aminosäuren bestehen, werden von den Peptidtransportern ausgeschlossen.

Außerdem akzeptieren der intestinale und renale Peptidtransporter Peptidmimetika wie z.B. β -Lactame (Cephalosporine und Penicilline) und Peptidaseinhibitoren. Inhibitoren des Angiotensin-Umwandlungsenzyms (ACE-Inhibitoren) werden wahrscheinlich nur vom intestinalen Peptidtransporter transportiert (Boll und Daniel 1995, Brandsch et al. 1995, Daniel und Adibi 1993, Daniel et al. 1992, Swaan et al. 1995).

Peptide, die L-Aminosäuren enthalten, interagieren mit den Peptidtransportern mit einer höheren Affinität als Peptide mit D-Aminosäuren. Dies gilt für Peptidmimetika. Verschiedene β -Lactamantibiotika, die bei physiologischem pH-Wert als Anionen vorliegen, werden zwar auch vom Peptidtransporter als Substrate transportiert, jedoch mit geringerer Affinität.

Neuere Studien, die den Mechanismus der Substraterkennung untersuchten, zeigen, daß eine Peptidbindung innerhalb des Substratmoleküls keine Voraussetzung ist, um von PepT1 bzw. PepT2 transportiert zu werden (Döring et al. 1998, Ganapathy et al. 1998). Als Minimalanforderung an ein Substrat gelten jedoch eine Carboxylgruppe und eine Aminogruppe, deren Abstand ≥ 500 pm und ≤ 630 pm voneinander beträgt. (Döring et al. 1998).

Neben bestehenden Gemeinsamkeiten zwischen dem intestinalen und dem renalen Peptidtransporter wurden jedoch hinsichtlich der kinetischen Eigenschaften Unterschiede gefunden (Daniel et al. 1991). Die verschiedenen Substratspezifitäten der Transporter aus Darm und Niere wurden eingehend an Vesikelmodellen untersucht. Der intestinale Peptidtransporter ist ein System mit niedriger Affinität und hoher Kapazität (Ganapathy et al. 1987, Tiruppathi et al. 1990). In der Niere gab es jedoch Hinweise auf zwei Peptidtransportsysteme, eines mit hoher Affinität (10 – 250 μ M) und eines mit deutlich niedrigerer Affinität im Bereich von mehr als 1 mM. Der hochaffine Peptidtransporter war eindeutig pH- und membranpotentialabhängig, wohingegen das niedrig affine Transportsystem auch in Abwesenheit eines Membranpotentials und pH-Gradienten meßbar agieren konnte (Daniel et al. 1991, Ries et al. 1994). Das pH-Optimum von PepT1 liegt zwischen pH 6,0 und pH 6,5, während das pH-Optimum von PepT2 bei pH-Werten von 5,5 bis 6,0 liegt. Die Erniedrigung des Membranpotentials von 0 mV auf –150 mV führt zu einem linearen Anstieg des vom PepT1 vermittelten Einwärtsstroms. Der PepT2 vermittelte Einwärtsstrom erhöht sich dagegen nur zwischen –50 mV und –150 mV proportional zum Membranpotential (Amasheh et al. 1997, Döring et al. 1996).

1.3 Strukturelle Eigenschaften der Peptidtransporter

1994 gelang die Klonierung der cDNA des intestinalen Peptidtransporters (PepT1) aus dem Intestinum eines Kaninchens (Boll et al. 1994, Fei et al. 1994) und 1996 konnte die cDNA des Peptidtransporters mittels Expressionsklonierung aus der Kaninchenniere (PepT2) isoliert werden (Boll et al. 1996). In der Zwischenzeit wurden die cDNAs verschiedener Spezies kloniert (PepT1: Mensch: Liang et al 1995; Ratte: Miyamoto et

al. 1996; Schaf: Chen et al. 1999; PepT2: Mensch: Liu et al. 1995, Ratte: Saito et al. 1995).

Die klonierte cDNA von PepT1 besteht aus 2756 bp und codiert für ein aus 707 Aminosäuren bestehendes Protein (Boll et al. 1994). Anhand von Hydrophobizitätsanalysen wurde ein Modell für die Primärstruktur des intestinalen Peptidtransporters vorgeschlagen, demzufolge es sich bei PepT1 um ein in die Membran integriertes Protein mit 12 Transmembrandomänen handelt. Zwischen der 9. und 10. Transmembrandomäne befindet sich eine große extrazelluläre Schleife. Sowohl der N- als auch der C-Terminus des Transportproteins sind vermutlich intrazellulär lokalisiert (Boll et al. 1994, Fei et al. 1994, Liang et al. 1995). Weiterhin wurden vier potentielle N-Glykosylierungsstellen, ein Proteinkinase C-Motiv und eine cAMP-abhängige Phosphorylierungsstelle beschrieben. Die in-vitro Transkription der PepT1 cRNA ergab ein Molekulargewicht von 60 kDa für die unglykosylierte Form des Proteins. In Anwesenheit von Mikrosomen während der in-vitro Transkription wurde ein apparentes Molekulargewicht von 71 kDa ermittelt (Boll et al. 1994, Fei et al. 1994). Mittels in-situ-Hybridisierung konnte die PepT1-mRNA in den Epithelzellen des gesamten Dünndarms lokalisiert werden (Freeman et al. 1995, Ogihara et al. 1996), wobei die Expression im Duodenum höher als im Jejunum und Ileum ist. Außerhalb des Dünndarms gelang der Nachweis der PepT1-Expression in Niere, Leber, Gehirn und Lunge (Fei et al. 1994).

PepT2 ist ähnlich aufgebaut wie PepT1; die Nukleotidsequenz der cDNA von PepT2 hat eine Länge von 4265 bp und codiert für ein aus 729 Aminosäuren bestehendes Protein. PepT2 besitzt ebenso wie PepT1 12 Transmembrandomänen und eine große extrazelluläre Schleife zwischen der 9. und 10. Transmembrandomäne. Neben fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen weist der Transporter anhand von Sequenzvergleichen vier intrazelluläre Proteinkinase C-Motive auf. Durch in-vitro Translation der PepT2-cRNA wurde für das Transportprotein ein Molekulargewicht von 83 kDa in unglykosilierter und 107 kDa in „core“-glykosilierter Form ermittelt (Boll et al. 1996). Die Photoaffinitäts-Markierung mit Cefadroxil in Bürstensaummembranvesikeln aus der Niere zeigte bereits früher, daß die monomere Masse des Peptidtransporters 105 kDa beträgt (Boll und Daniel 1995). Durch Verwendung der

„Radiation inactivation“-Größenanalyse wurde die funktionelle Masse des Peptidtransporters auf 414 ± 15 kDa bestimmt (Boll und Daniel 1995, Daniel 1987). Dies könnte bedeuten, daß der renale Peptidtransporter als Oligomer, z.B. als Homotetramer mit 105 kDa Einheiten, funktioniert (Boll et al. 1996). Die Expression der PepT2-mRNA konnte außerhalb der Niere in Gehirn, Lunge, Leber, Muskel und Herz nachgewiesen werden (Boll et al. 1996). Die Bedeutung von PepT2 in diesen Geweben ist bisher jedoch noch nicht bekannt.

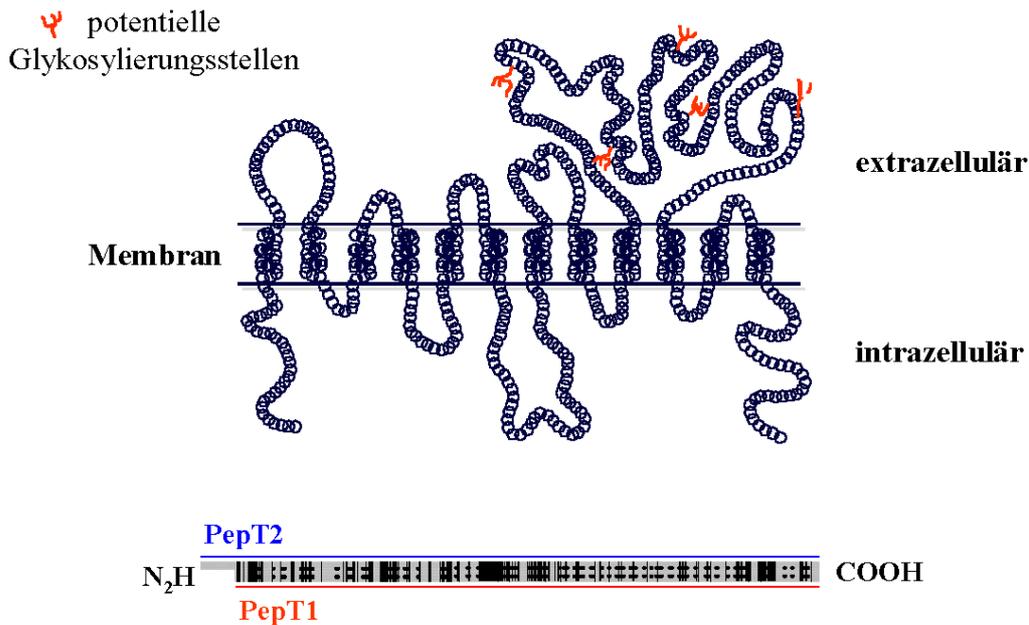


Abbildung 3: Modell des Peptidtransporters PepT1 und PepT2

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von PepT1 und PepT2 ergab eine 47%ige Identität und eine 67%ige Ähnlichkeit der beiden Transporterformen. Eine besonders große Übereinstimmung in der Identität (61%) ist im Bereich der Transmembrandomänen zu finden. Die größten Unterschiede bestehen hingegen in der Aminosäureabfolge (nur 21% Identität) innerhalb der extrazellulären Schleife zwischen der 9. und 10. Transmembrandomäne zu finden (Boll et al. 1996, Daniel 1996).

Die Rolle einzelner spezifischer Aminosäurereste für die Aktivität des intestinalen und renalen Peptidtransportsystems wurde bereits untersucht. Da bereits an isolierten Bürstensaummembranvesikeln gezeigt werden konnte, daß Histidinreste für die Transportaktivität der Peptidtransporter von Bedeutung sind (Kato et al. 1989, Miyamoto et al. 1986), wurden die Bedeutung der Histidinreste an verschiedenen

Positionen mittels direkter Mutagenese untersucht (His 57 PepT1, His 87 PepT2, His 121 PepT1, His 142 PepT2). Dabei führte ein Austausch der Histidine durch Glutamin (Terada et al. 1996) bzw. Arginin (Steel und Hediger 1997) zu inaktiven Transportproteinen. Daraus kann eine Beteiligung der Histidinreste in der zweiten und vierten Transmembrandomäne sowohl bei PepT1 als auch bei PepT2 an der Substraterkennung abgeleitet werden. Weitere Ergebnisse in Bezug auf die Identifizierung funktioneller Domänen im Transportprotein wurden durch den Einsatz von chimären Proteinen erreicht. Aufgrund dieser Studien wurde bekannt, daß der aminoternale Bereich für die Transportfunktion des Peptidtransporters von Bedeutung ist (Döring et al. 1998) und daß eine potentielle Substratbindungsstelle wahrscheinlich im Bereich der siebten bis neunten Transmembrandomäne von PepT2 zu finden ist (Fei et al. 1998). Weitere Versuche mit chimären Transportproteinen zeigten, daß der Bereich bis zur zweiten Transmembrandomäne wichtig für die Affinität der Peptidtransporter zu geladenen Substraten ist, während der Bereich der dritten bis vierten Transmembrandomäne möglicherweise eine Bedeutung für die „Registrierung“ des Membranpotentials besitzt.

1.4 Bedeutung der intestinalen und renalen Peptidtransporter

1.4.1 Ernährungsphysiologische Bedeutung

Die Hydrolyse von Nahrungsproteinen im Gastrointestinaltrakt durch pankreatische Proteasen zusammen mit an die Bürstensaummembran gebundenen Peptidhydrolasen generiert eine große Menge und Vielzahl von Oligopeptiden und freien Aminosäuren. Diese Produkte der luminalen Hydrolyse erreichen die apikale Membran des Enterozyten, werden dort durch Peptidtransporter und Aminosäuretransporter in die Zellen aufgenommen und von dort in die Zirkulation abgegeben (Ito et al. 1983).

Zahlreiche Veröffentlichungen legen nahe, daß dem Peptidtransporter im Gegensatz zu den Aminosäuretransportern eine quantitativ bedeutendere Rolle bei der Resorption von α -Aminosäure-Stickstoff zukommt (Adibi 1996, Leibach et al. 1996). Dies wird u.a. dadurch begründet, daß als Hauptverdauungsprodukte von Proteinen kurzkettige Peptide identifiziert wurden (Adibi 1997) und α -Aminosäure-Stickstoff nach Zufuhr von Peptiden schneller resorbiert wird als nach Gabe entsprechender

Aminosäurelösungen (Silk et al. 1972). Auch haben Patienten mit angeborenen Aminosäuretransportdefekten in Dünndarm und Niere (z.B. Cystinurie und Hartnup-Krankheit) meist kein Defizit an essentiellen Aminosäuren, obwohl diese aufgrund des genetischen Defekts nicht oder nur in geringem Maß in freier Form resorbiert werden können.

Bei der Hartnup-Erkrankung ist vor allem die Resorption der Aminosäuren Tryptophan, Arginin und Cystein beeinträchtigt. Ursache hierfür ist ein defektes Transportsystem für die genannten Aminosäuren in der Darmschleimhaut und der Niere. Bietet man jedoch dieselben Aminosäuren in Form eines Di- oder Tripeptides an, so ist die Erscheinungsrate dieser Aminosäuren im Blut normal (Matthews et al. 1976).

Cystinurie-Patienten haben einen genetischen Defekt in einem Aminosäuretransportsystem das für die Aufnahme von Cystin und basischen Aminosäuren verantwortlich ist. In in-vivo-Perfusionsstudien an Dünnsdarmsegmenten von Cystinurie-Patienten konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme der freien Aminosäure Arginin nur sehr gering war, das Dipeptid Arginyl-Leucin jedoch mit der Resorptionsrate von gesunden Probanden vergleichbar war (Silk et al. 1975).

Für diese Patienten ist der Peptidtransporter lebensnotwendig, da so die mangelhafte Resorption von freien Aminosäuren durch die Resorption der entsprechenden Di- und Tripeptide vollständig kompensiert werden kann (Leibach und Ganapathy 1996).

Die absorptiven Zellen des renalen proximalen Tubulus besitzen auch aktive Transportmechanismen für kleine Peptide. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß mehr als 50% des Plasmaaminoäurepools in peptidgebundener Form vorliegt, von dem ein Viertel bis die Hälfte Di- und Tripeptide ausmachen (Schlagheck et al. 1984, Seal et al 1991, Rérat et al. 1992). Die Oligopeptide entstammen einerseits der intestinalen Resorption intakter Di- und Tripeptide und andererseits dem ständigen Abbau von endogenen Proteinen in den Geweben. Unter physiologischen Bedingungen ist die Ausscheidung von peptidgebundenen Aminosäuren sehr gering. Darum ist es wahrscheinlich, daß das renale Peptidtransportsystem eine wichtige Funktion in der Konservierung peptidgebundenen Stickstoffs ausübt (Leibach und Ganapathy 1996).

1.4.2 Pharmakologische Bedeutung

Die in Dünndarm und Niere lokalisierten Peptidtransporter haben unter anderem auch pharmakologische Relevanz. Außer den vielen physiologischen Substraten gibt es auch oral verabreichte peptidomimetische Pharmaka, die sich dieses Aufnahmemechanismus bedienen (Bai und Amidon 1992). Beispiele hierfür sind eine Reihe von ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme)-Inhibitoren wie Captopril und Enalapril (Hu und Amidon 1988, Friedmann und Amidon 1989), β -Lactamantibiotika, wie Cefadroxil, Cephalexin und Cefaclor (Ries et al. 1994, Sinko und Amidon 1988, Sinko und Amidon 1989, Tsuji et al 1987, Boll et al. 1994), Renin-Inhibitoren (Kramer et al. 1990a) sowie auch Aminopeptidase-Inhibitoren wie beispielsweise Bestatin (Inui et al. 1992). Sie zeigen mit K_m -Werten im unteren mM-Bereich eine ähnliche Affinität zum Transporter wie die physiologischen Substrate.

Das intestinale Peptidtransportsystem akzeptiert die oben genannten Pharmaka als Substrate und ermöglicht somit deren orale Verfügbarkeit.

Das Peptidtransportsystem der Niere ist verantwortlich für die aktive Resorption dieser Antibiotika aus dem glomerulären Filtrat und steigert deshalb deren Halbwertszeit in der Zirkulation.

Auch für die funktionelle Charakterisierung der Peptidtransportsysteme spielen diese Peptidmimetika eine wichtige Rolle, da sie meist eine vergleichbare Affinität zu den Peptidtransportern besitzen wie die physiologisch vorkommenden Substrate. Gegenüber Di- und Tripeptiden haben sie jedoch den entscheidenden Vorteil, hydrolyseresistent zu sein, wodurch Nebeneffekte bei Aufnahmeexperimenten vermieden werden.

1.4.3 Klinische Bedeutung

Die klinische Bedeutung des intestinalen und renalen Peptidtransportsystems erlangte dadurch steigende Aufmerksamkeit, daß in den letzten Jahren vermehrt kurzkettige Peptide in enteralen und parenteralen Lösungen eingesetzt wurden.

Im Vergleich zu freien Aminosäuren (vor allem Tyrosin, Cystin, Glutamin) weisen die entsprechenden Di- und Tripeptide in enteralen Lösungen eine bessere Löslichkeit, eine größere Stabilität sowie einen geringeren osmotischen Wert auf. Außerdem besitzen Peptidlösungen den Vorteil, schneller von der Darmschleimhaut resorbiert werden zu können (Grimble et al. 1986, 1987, 1994). Bei Patienten mit reduzierter absorptiver

Kapazität im Gastrointestinaltrakt, wie z.B. bei Morbus Crohn oder Zöliakie und bei Patienten mit akut katabolen Zuständen, wie z.B. Trauma, Sepsis, Verbrennungen, ist durch den Einsatz von Peptidlösungen ein Resorptionsvorteil und somit eine verbesserte Stickstoffversorgung zu erzielen (Adibi 1997, Leibach und Ganapathy 1996).

Experimentelle Studien haben gezeigt, daß es auch möglich ist, den täglichen Aminosäurebedarf intravenös in Form kleiner Peptide zu liefern (Vazquez et al. 1993). Allerdings bleibt hier die Frage offen, über welche Mechanismen die Dipeptide von den Zellen der einzelnen Gewebe aufgenommen werden, d.h. ob die Peptide vor der Aufnahme in die Gewebe von membranständigen Peptidhydrolasen gespalten werden müssen oder ob die Di- und Tripeptide in intakter Form in die Gewebszellen aufgenommen werden.

1.5 Peptidtransporter außerhalb des Dünndarms und der Niere

Neben den gut untersuchten Peptidtransportern in Dünndarm und Niere liegen über das Vorkommen von Oligopeptid-Transportsystemen außerhalb dieser beiden Organe nur wenige Befunde vor.

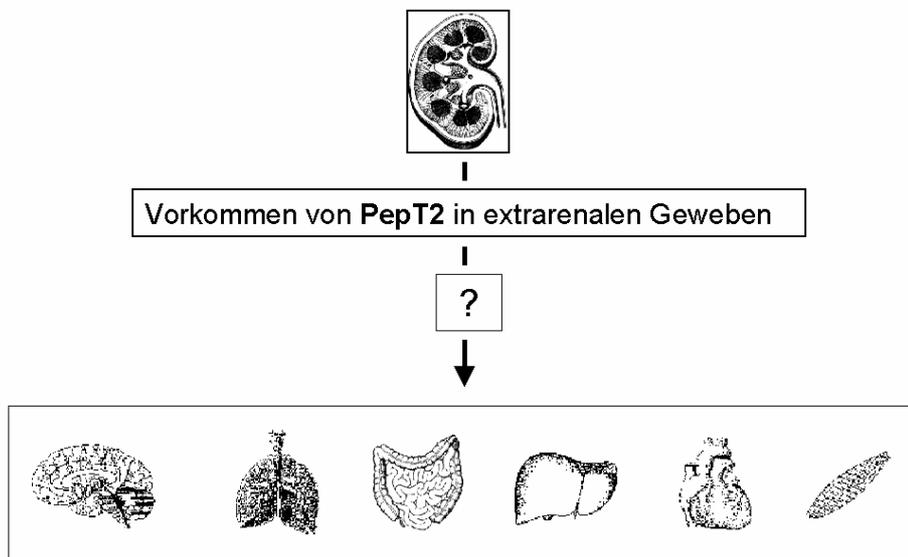


Abbildung 4: Potentielles Vorkommen von PepT2 in extrarenalen Geweben

Erste Hinweise für einen Dipeptidtransport im Gehirn wurden bereits 1964 und 1970 durch die Akkumulation des Dipeptids Carnosin (β -Ala-His) in Gehirnschnitten der

Ratte (Abraham et al. 1964) und der Maus (Yamaguchi et al. 1970) erbracht. Durch Untersuchung der Carnosinaufnahme in cerebrale Primärkulturen konnte gezeigt werden, daß diese Aufnahme durch ein energieabhängiges System vermittelt wird (Schulz et al. 1987).

Eine carriervermittelte Aufnahme von Peptiden in bestimmte Zellen der Lunge wurde 1985 von Ganapathy et al. beschrieben. Dieser in Pneumozyten lokalisierte Transporter ähnelte hinsichtlich seiner Substrataffinität der intestinalen Peptidtransporterform, wobei sich jedoch die Substratspezifität unterschied.

Weiterhin wurde die sättigbare und hemmbare Aufnahme von Dipeptiden in der menschlichen Plazenta beschrieben (Ganapathy et al. 1985), wobei es sich hier nicht um einen aktiven Transport handelt.

Neben diesen funktionellen Hinweisen auf eine mögliche Peptidaufnahme in extrarenalen Geweben konnte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die mRNA des renalen Peptidtransporters in Gehirn, Lunge und Leber der Ratte lokalisiert werden (Saito et al. 1996), während Boll et al. 1996 mittels RT-PCR der Nachweis der mRNA des renalen Peptidtransportere in Gehirn, Lunge, Muskel, Herz und in der Brustdrüse des Kaninchens gelang. Ob und in welchen Zellen das PepT2 Protein in den oben genannten extrarenalen Geweben funktionell exprimiert wird, bzw. welche Bedeutung dem Peptidtransporter in diesen Geweben zukommen könnte, konnte bislang noch nicht geklärt werden.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, extrarenale Peptidtransportsysteme in Geweben verschiedener Versuchstiere molekular zu identifizieren und ihre zelluläre Lokalisation auf mRNA-Ebene sowie Proteinebene zu bestimmen. Dabei sollten zuerst die dazu notwendigen molekularbiologischen und immunologischen sowie histologischen und immunhistochemischen Methoden etabliert werden, die nachfolgend für die Lokalisation des Peptidtransporters PepT2 in den verschiedenen Organen zu nutzen waren.

Der Nachweis für die Existenz von PepT2 in den verschiedenen Organen sollte:

- a) auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR, der Northern-Blot-Analyse und der in-situ-Hybridisierung und
- b) auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse und Immunhistochemie erbracht werden.
- c) Bei erfolgreichem Nachweis der PepT2-mRNA bzw. des exprimierten Proteins sollte die funktionelle Charakterisierung durch Aufnahmeexperimente und Transportstudien sowohl in ausgewählten Zellkulturen wie auch in ex vivo-Experimenten an Organen erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herkunft der Organe

Organe männlicher Kaninchen mit einem Gewicht von 2,5 kg, von Wistarratten mit einem Gewicht von 100-200g und von Hausmäusen mit einem Gewicht von 40-50g dienten sowohl für die organspezifische Präparation von Gesamt-RNA als auch für die Herstellung von Gefrierdünnschnitten für die in-situ-Hybridisierung und die Immunhistochemie.

2.1.2 Geräte

Neben den laborüblichen Geräten wurden folgende Geräte eingesetzt: Spektrophotometer DU 650 (Beckmann Instruments, Kalifornien), PCR-Maschine (Biometra, Göttingen), Tischzentrifuge Typ 5414 und 3200 (Eppendorf, Hamburg), Ultraviolettstrahler (Serva Feinbiometika GmbH, Heidelberg), Kühlzentrifugen (Sorvall RC2-B und RC5-B; Du Pont Instruments, Bad Nauheim), Zentrifugenrotoren (Sorvall GSA, Sorvall SS 34; Du Pont Instruments, Bad Nauheim), Scintillationszähler LS 6500 (Beckmann Instruments, Kalifornien), Sequenzierapparatur (Sonderanfertigung von A. Kratz, Institut für Ernährungswissenschaft, Gießen), Hybridisierungsofen OV1 (Biometra, Göttingen), Schüttelinkubator (B. Braun, Melsungen), Milliporeanlage „Milli-Q“ (Millipore, Neu-Isenburg), Autoklav (Webco GmbH, Schwartau), Exsikkator (Gebr. Becker GmbH, Wuppertal-Bremen),

2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Herkömmliche Chemikalien wurden hauptsächlich von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) sowie Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, Deutschland) in p.A. („pro analysis“) Qualität bezogen.

2.1.4 Molekularbiologische Reagentien

Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, T7/T3/SP6-RNA-Polymerase, CIP (Calf intestinal phosphatase) und Lambda DNA/*Eco* 911(*Bst*EII) Marker wurden von der Firma MBI Fermentas (Vilna, Litauen) bzw. von der Firma Biolabs (New England) bezogen. Des weiteren wurde verwendet: M-MULV Reverse Transkriptase von AGS (Heidelberg), Taq-Polymerase von TaKaRa Biochemicals (Japan) und Gibco BRL Life Technologies GmbH (Eggenstein), Reagentien zur Digoxigeninmarkierung und – detektion, sowie RNase A (Boehringer, Mannheim), Oligo (dT)25-Dynabeads (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg), Oligo(dT) Primer 15-mer (AGS, Heidelberg) Folgende Kits wurden benutzt: Clean-a-gene (Renner, Dannstadt), Plasmid Mini Prep (Promega Madison, USA), Mmessage mMaschine™-Kit (Ambion, USA), FlexiPrep®-Kit (Pharmacia, USA)

Primer: Die Synthese von Primern für die RT-PCR und die Sequenzierung wurde bei Eurogentec (Lüttich, Belgien) in Auftrag gegeben:

PepT1-Primer: R 4 (FW): 5'-CTC-TTC-CTG-TCT-TCC-C-3'
 UC (BW): 5'-CTG-CAG-CAC-CGA-CTT-C-3'
 UD (BW): 5'-CTG-GCA-TTG-TAG-CTG-G-3'

PepT2-Primer: 2F (FW): 5'-CTA-GCA-TGC-CTG-GCA-TTT-GCA-G-3'
 2B (BW): 5'-CCT-GTG-ACA-GAG-AAC-ATG-ACC-3'
 FD 76 (FW): 5'-ATG-GGT-ACA-CAC -AGT-CCT-ATC-AC-3'
 P 25 (BW): 5'-GCT-TGG-AGA-CTG-GTG-A-3'
 M2F 305 (FW): 5'-ATC-TTG-GGA-GCA-GCG-ATT-GCT-3'
 M2F 51 (FW): 5'- GCT-GCC-TAC-TGA-AGC-CAA-ATG-CTT-G-3'
 2B 773 (BW): 5'-GAG-CCA-CTA-TGT-TTC-CTT-CAG-G-3'
 2B 290 (BW): 5'-AGA-GGC-TGC TGA AGG-CAT-GGT-3'
 H2F 1251 (FW): 5'-CCA-GCC-AGG-TCC-CCA-GGA-GGT-TTT-CC-3'
 H2B 2154 (BW): 5'-GCT-GGA-CCC-CGC-ATA-TCC-TCT-GTC-3'

GAPDH-Primer: GAPDH-F (FW): 5'-GAC-CAC-AGT-CCA-TGA-CAT-CAC-T-3'
 GAPDH-B (BW): 5'-TCC-ACC-ACC-CTG TTG-CTG-TAG-3'

Vektoren: *pSport1*-Vektor (Gibco BRL Life Technologies), *pCR[®]II-Topo*-Vektor (Invitrogen), *pBluescript II KS⁻* (Stratagene)

2.1.5 Proteinbiochemische/Immunologische Reagentien

Proteinmolekulargewichtsmarker „BENCHMARK“ (Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein, Germany), Antikörper (Clontech, Heidelberg),

2.1.6 Radioaktive/fluoreszenzmarkierte Peptide

^3H -D-Phe-Ala (spezifische Aktivität: 22,5 Ci/mmol) und ^3H -D-Phe-Glu (spezifische Aktivität: 12 Ci/mmol) von der Firma Zeneca, Northwich.

AMCA-markiertes Dipeptid (Eigensynthese, Institut für Ernährungswissenschaft, Justus-Liebig-Universität Gießen)

2.1.7 Dipeptide und Inhibitoren

D-Phe-Ala von der Firma Bachem, Heidelberg; Gly-Asp, Gly-Arg; Gly-Gln, Gly-Glu und Gly-Lys von der Firma Sigma, Deisenhofen.

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist bei der Ersterwähnung im Text angegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunologische und proteinbiochemische Methoden

2.2.1.1 Erzeugung polyklonaler Antikörper

Als Versuchstiere für die Antikörperproduktion wurden Kaninchen gewählt. Vor dem ersten Immunisieren wurde den Versuchstieren Blut abgenommen, aus dem das Präimmenserum gewonnen wurde. Dieses Präimmenserum diente in den späteren Versuchen als Kontrolle. Für die erste Immunisierung wurde aus der Antigenlösung (Peptid der C-terminalen Region: AS 715-729 CQGNMIKLETKKTKL des humanen PepT2 Proteins) und dem gleichen Volumen an FAC (Freunds Adjuvant-Complete: 1 mg/ml Mycobacterium Tuberculosis, hitzeinaktiviert; 0,85 ml Mineralöl, 0,15 mg Mannitmonooleat) eine stabile Emulsion hergestellt. Für die weiteren Injektionen („Booster-Injektionen“), die in vierwöchigen Intervallen stattfanden, wurde die Antigenmenge verringert und die Emulsion mit FAI (Freunds Adjuvant-Incomplete: 0,85 ml Mineralöl, 0,15 ml Mannitmonooleat) hergestellt.

2.2.1.1.1 Gewinnung des Antiserums

Den Versuchstieren wurde Blut abgenommen, das zur Gerinnung 2-4 Stunden bei 4-8°C stehen blieb. Anschließend wurden die Proben bei 4000 rpm (GSA-Rotor) 10 min zentrifugiert, das gewonnene Serum abgenommen, nochmals kurz zentrifugiert, in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.1.2 ELISA

Das "enzyme-linked immuno sorbent assay" (ELISA) wurde in dieser Arbeit für den Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern im hergestellten PepT2-Immenserum eingesetzt.

Dazu wurde das zum Immunisieren verwendete Peptid in Beschichtungspuffer (NaXCO₃ pH 9,6; 0,1 M Na₂CO₃) verdünnt und damit die Immunoplaten über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Teil der Immunoplaten mit einem

unspezifischen Peptid beschichtet. Nach der Inkubation wurde die Immunplatte für 2 h bei RT mit Blockpuffer (1x PBS, 0,2 M NaCl, 0,5% BSA, 0,1% NaN₃) blockiert und mit Waschpuffer (1x PBS, 0,2 M NaCl, 0,05% Tween 20) gewaschen. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungsstufen (1:400, 1:800, 1:1600, bis zu einer Verdünnung von 1:409600) von Antiserum und Präimmunserum aufgetragen und zur Adsorption der Seren erst für 2 h bei RT und im Anschluß daran über Nacht bei 4°C inkubiert. Der in Blockpuffer verdünnte 2. Antikörper (entsprechend der Spezies in dem das Antiserum erzeugt wurde) wurde dazupipettiert und verblieb für 4 h im Reaktionsansatz. Nach Äquilibrieren (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL, pH 9,5) wurde die Substratlösung (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL, 5 mM MgCl₂, 1 mg/ml Sigma 104 Substrat, pH 9,5) 1h bei RT inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 100 mM EDTA pH 8,0 gestoppt wurde. Die optische Dichte der Reaktion wurde im ELISA-Reader bei dualer Wellenlänge (hier 405 nm und 450 nm) gemessen und der Immunserumtiter nach Subtraktion der Präimmunserumwerte von den entsprechenden OD-Werten als Verdünnung, bei der eine OD von 0,1 gemessen wurde, bestimmt.

2.2.1.2 Affinitätsreinigung der Peptid-Antikörper

200 mg Epoxysepharose wurden in 1 ml 0,2 M Na-Carbonat pH 10,5 aufgenommen und dazu 100 µg Peptid gegeben. Der Ansatz wurde mit 0,2 M Na-Carbonat pH 10,5 aufgefüllt und für 16 h bei 37°C inkubiert. Zur Abdeckung freier Bindungsstellen wurden 10 ml 0,1 M Ethanolamin/HCL (pH 10,5) zugeführt und der Ansatz für weitere 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Sepharose-Peptidkomplex mit Blockpuffer (0,1 M NaCl, 0,1 M Tris/HCL pH 7,5, mit 1% BSA, 0,1% Tween 20 und 0,5% Fischgelatine) gewaschen und die Sepharose mit 4,5 ml Blockpuffer und 450 µl Vollserum bzw. Präimmunserum bei 4°C für 10-16 h inkubiert. Der Sepharosekomplex wurde in eine Elutionssäule gefüllt, mit 50 ml 1x PBS gespült, danach der Antikörper durch Zugabe von 2 ml Elutionspuffer (0,1 M Citratpuffer, 0,1 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,8) eluiert und in Neutralisationspuffer (1:1 Blockinglösung(Boehringer Mannheim)/ 1,5 M Tris, pH 8,8) aufgefangen. Die Eluatfraktionen wurden auf Neutralität geprüft und bei 4°C gelagert.

2.2.1.2.1 Test der Antikörperkonzentrierung nach der Affinitätsreinigung

Die erfolgreiche Konzentrierung des affinitätsgereinigten Antikörpers wurde durch Dot-Blot-Analyse im Vergleich zum nichtkonzentrierten Serum nachgewiesen. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen der Seren auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft und mit Blockinglösung (1x TBST, 0,5% Tween 20, 2% Magermilchpulver) 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der 2. Antikörper (AK-HRP, Amersham ECL-System) in einer Verdünnung von 1 : 5000 dazugegeben und 30 min unter Schütteln inkubiert. Die Detektionsreaktion wurde mit ECL nach dem Herstellerprotokoll (Amersham) durchgeführt und auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

2.2.1.3 Präabsorption von Antiseren

1 ml unverdünntes Serum wurden mit 20 ng des für die Immunisierung verwendeten Peptids versetzt und für die Präabsorption bei 4°C für mindestens 16 h inkubiert. Als Kontrolle wurde bei der nachfolgenden Immunhistochemie immer eine Probe mit nicht-präabsorbiertem Serum mitgeführt.

2.2.1.4 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Das 10%ige Trenngel wurde wie folgt hergestellt: 13,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 10,0 ml Trenngelpuffer, 15,9 ml H₂O bidest., 400 µl 10%SDS, 16 µl TEMED, 400 µl 10% APS. Dieses 10%ige Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und nach 30 minütiger Polymerisation mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet: 1,7 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 6,8 ml H₂O bidest., 100 µl 10%SDS, 10 µl TEMED, 100 µl 10% APS. Nach weiteren 30 min wurde das Gel für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt.

2.2.1.4.1 Vorbereitung der Proben

Die Probenvorbereitung erfolgte durch Zugabe des halben Probenvolumens an Laemmli-Puffer (100 mM Tris-HCL pH 6,8; 4% SDS, 2% β-Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 0,002% Bromphenolblau) mit anschließender 30 minütiger Inkubation der Proben bei 37°C. Nach der Denaturierung wurden die Proben mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und bis zum Auftragen auf das Gel bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.4.2 Elektrophorese-Laufbedingungen

Die Elektrophorese wurde mit 10-15 mA und maximal 200 V ca. 16 Stunden über Nacht durchgeführt.

2.2.1.5 Western-Blot

Unmittelbar nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel als Vorbereitung für den Transfer der Proteine auf eine inerte Membran 3 Minuten in Anode II Puffer geschüttelt. Das "Blot-Sandwich" wurde auf der unteren Graphit-Bloteinheit folgendermaßen aufgebaut:

- 2 Lagen in Anode I Puffer getränktes Filterpapier
- 1 Lage in Anode II Puffer getränktes Filterpapier
- Nitrocellulosemembran getränkt in sterilem H₂O
- Trenngel
- 3 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier

Danach wurde die obere Graphiteinheit unter leichtem Druck aufgebracht und die negativ geladenen Proteine mit 1,5 mA/cm² für 2,5 h auf die Membran geblottet.

Die angelegte Stromstärke und die Dauer des Blottens ergaben sich aus der Effizienz der Proteinübertragung, die anhand von Coomassiefärbung des geblotteten Gels bzw. Ponceau-S-Färbung der Nitrocellulosemembran beurteilt wurde.

2.2.1.6 Färbungen von Gelen und Blots

2.2.1.6.1 Coomassie-Färbung von Gelen

Direkt im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Gele in einer 0,25%igen (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung in Methanol:Eisessig:Wasser (40:10:50, v/v) unter Schütteln für 1 Stunde angefärbt und anschließend in Methanol:Eisessig:Wasser (25:5:70, v/v) bis zur völligen Farbfreiheit des Hintergrundes entfärbt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 haftet dabei an den Proteinen und macht dadurch die nach ihrer Größe getrennten Makromoleküle sichtbar.

2.2.1.6.2 Ponceau-S-Färbung von Blots

Die nach dem Blotten auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine können mit Ponceau-S reversibel gefärbt werden. Diese Färbung dient dazu die Eichproteine auf dem Blot zu markieren, um bei einer nachfolgenden antigen-spezifischen Färbung eine Molekulargewichtsbestimmung zu ermöglichen. Desweiteren läßt sich anhand der Ponceau-S-Färbung die Effizienz des Transfers beurteilen.

Dazu wurde die Nitrozellulosemembran direkt nach Beendigung des Blots für 5 min in Ponceau-S-Färbelösung gegeben und anschließend bis zur Klärung des Hintergrunds in sterilem H₂O bidest. gewaschen. Die Markerproteine wurden markiert und der Blot bis zum Verschwinden der Färbung in H₂O bidest. gewaschen.

2.2.1.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 2 h in TBST-Puffer inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper in TBST verdünnt zugegeben und entweder für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Membran in TBST gewaschen und der sekundäre enzymgekoppelte (Peroxidase oder alkalische Phosphatase) Antikörper verdünnt in TBST zugegeben. Nach Waschen der Membran mit TBST schloß sich der jeweilige Farbnachweis an. Durch den Vergleich der Bande des Farbniederschlags mit einem Eichprotein gelang die Größenidentifizierung des nachgewiesenen Proteins.

2.2.1.7.1 Nachweis mittels NBT/BCIP

Bei diesem Farbnachweis ist der sekundäre Antikörper mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran in alkalischem Tris-Puffer äquilibriert und anschließend die Färbelösung bestehend aus 10 ml Puffer, 45 µl NBT und 35 µl BCIP zugegeben. Die Reaktion dauert etwa 2-10 Minuten und wird anschließend durch Waschen in H₂O gestoppt.

2.2.1.7.2 Nachweis mittels AEC

Der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper setzt 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zu einem rotbraunen Farbstoff um.

Nach Zugabe der Färbelösung (20 mg AEC, 2,5 ml Dimethylformamid, 47,5 ml 50 mM Acetatpuffer pH 6,0, 25 μ l H₂O₂) wurde der Blot unter Lichtausschluß 2-10 Minuten inkubiert und danach die Reaktion mit Wasser gestoppt.

2.2.1.7.3 Nachweis mittels ECL

Bei diesem Nachweissystem der Fa. Amersham Life Science handelt es sich um ein lichtemittierendes Nachweissystem, dessen Vorteil gegenüber den oben genannten Farbnachweissystemen darin liegt, daß es noch Antigenmengen in einer Größenordnung von kleiner als 1 pg nachweisen kann.

Die Detektionslösungen 1 und 2 wurden zu gleichen Teilen gemischt, auf die Membran gegeben und genau 1 min inkubiert. Danach wurde die Lösung abgegossen und das Ergebnis auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

2.2.1.8 Dot-Blot

Beim Dot-Blot erfolgt im Gegensatz zum Western-Blot keine elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben, sondern das Antigen wird direkt auf die Nitrocellulosemembran aufgebracht ("gedottet"). Der Antikörpernachweis erfolgte entweder mit dem BCIP/NBT-System, dem AEC-System oder mit dem ECL-System.

2.2.1.9 Membranpräparationen

2.2.1.9.1 Membranpräparation von Oozyten

3-7 Tage nach der Injektion von H₂O bzw. cRNA wurden 20-25 *Xenopus laevis* Oozyten zweimal mit Barth-Lösung (88 mM NaCl, 1mM KCl, 820 μ M MgSO₄, 410 μ M CaCl₂, 330 μ M Ca(NO₃)₂, 2,4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES/TRIS, 20 mg/ml Gentamycin) und einmal mit Homogenisationspuffer (83 mM NaCl; 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,9, 0,5 mM PMSF) gewaschen, bevor sie in 4 μ l Homogenisierungspuffer pro Oozyte aufgenommen wurden. Durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Nadel wurde die Lösung homogenisiert und zweimal für 10 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 10 min bei 10 000 g und 4°C zentrifugiert. Der

Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 5 μ l Homogenisierungspuffer aufgenommen.

2.2.1.9.2 Membranpräparation von Hefen

Die Proteinextraktion aus *P.pastoris* erfolgte durch alkalischen Zellaufschluß. Die Hefen wurden 5 min bei 5000 g abzentrifugiert, in 300 μ l 2 M NaOH, 5% β -Mercaptoethanol resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 33 μ l Tri-Chlor-Essigsäure (110 g/100 ml) wurde das Proteinpräzipitat 10 min bei 8000 g abzentrifugiert, mit 500 μ l 1 M Tris-HCl (pH 9,0) gewaschen und in 90 μ l Laemmli-Puffer aufgenommen.

2.2.1.9.3 Isolation von Membranvesikeln aus dem Gehirn

Die Isolation von Synaptosomen erfolgte nach der Methode von Booth und Clark 1978. Die Großhirnrinde wurde in eisgekühltem STE-Puffer (0,32 M Saccharose, 1 mM K-EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) in kleine Stücke geschnitten. Blut und kleine Fragmente wurden abgespült. Das Gewebe wurde mit dem 25-fachen Volumen an STE-Puffer versetzt, homogenisiert und 3 min bei 1300 g pelletiert. Durch nochmaliges Zentrifugieren des Überstandes (10 min, 17000 g) erhält man eine rohe Membranvesikelpräparation. Diese Membranvesikelpräparation besteht hauptsächlich aus Synaptosomen, Gliamembranen und Mitochondrien, die durch Ficoll-Gradientenzentrifugation voneinander getrennt werden können.

Das Membranpellet wurde in 10% Ficoll-400 in STE-Puffer resuspendiert und in Zentrifugationsröhrchen überführt. Anschließend wurde die Suspension aufeinanderfolgend mit 7,5% Ficoll in STE-Puffer und reinem STE-Puffer überschichtet und 30 min bei 9000 g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Synaptosomen wurden aus der 10%-7,5% Ficoll-Interphase mit einer Pasteurpipette abgezogen. Die Synaptosomenmembranen wurden in STE-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 g pelletiert.

2.2.1.9.4 Vesikelpräparation aus dem Dünndarm

Sofort nach Eintritt des Todes wurden dem Tier Duodenum und Jejunum entnommen, auf Eis die Epithelschicht der Darmsegmente abgeschabt und in 30 ml Mannitol-EGTA-

Puffer (60 mM D-Mannitol, 5mM EGTA, pH 7,1) aufgenommen. Das Mukosaschabsei wurde nach Zugabe von 120 ml H₂O bidest. 3 min homogenisiert. Nach Zugabe von 1,5 ml MgCl₂ wurde das Rohhomogenat 15 min auf Eis gestellt und danach 15 min (4°C, 8000 rpm, GSA-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde 30 min zentrifugiert (4°C, 15000 rpm, GSA-Rotor) und das entstandene Pellet in 70 ml Mannitol-EGTA-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Homogenisieren bei 1400 Umdrehungen/min in einem Glas-Teflon-Homogenisator und nach Zugabe von 0,7 ml 1 M MgCl₂ wurde 15 min bei 4°C und 8000 rpm (GSA-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde 40 min bei 15000 rpm (4°C, GSA-Rotor) zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Loading-Puffer (300 mM D-Mannitol, 10 mM Hepes, pH 7,4) aufgenommen. Durch mehrmaliges Aufsaugen der Membran mit einer Spritze mit einer 23 G-Kanüle erfolgt die spontane Bildung von Vesikeln. Die Lagerung der BBMV erfolgte bei -80°C.

2.2.1.9.5 Vesikelpäparation aus dem Nierenkortex

Direkt nach dem Tod der Tiere wurden die Nieren entnommen, auf Eis gelegt und das Nierenhäutchen entfernt. Die Nierenrinde wurde präpariert, ausgewogen, mit dem 10-fachen Volumen an EGTA-Puffer (5 mM EGTA, 300 mM D-Mannitol, 12 mM Tris, pH 7,5) versetzt und 90s mit einem Ultratorax homogenisiert. Dem Homogenat wurde 1 M MgCl₂ (Endkonzentration 10 mM) zugegeben, das Homogenat für 1 min gerührt und für 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Rohhomogenat 10 min zentrifugiert (4°C, 5000 rpm, SS34-Rotor). Der Überstand wurde abgenommen und 30 min bei 18000 rpm (SS34-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Loading-Puffer (50 mM Hepes, 75 mM Tris, 100 mM K₂SO₄, pH 7,4) resuspendiert und je 2x mit einer Spritze mit einer 20 G-Kanüle und einer 26 G-Kanüle aufgezogen. Die so erhaltene Suspension wurde 30 min zentrifugiert (4°C, 18000 rpm SS34-Rotor) und das Pellet in 2 ml Loading-Puffer aufgenommen. Durch mehrmaliges Aufsaugen der Lösung durch eine 23 G-Kanüle erfolgt die spontane Bildung von Vesikeln. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.1.10 Proteinbestimmung mit dem BIO-RAD Assay

Je 25 µl der verdünnten Standardlösung bzw. der jeweiligen Proteinproben sowie ein Leerwert wurden mit 1,25 ml Farbreagenz versetzt und gemischt. 5 - 60 min nach dem Ansetzen wurde die Extinktion der Proben gegen den Leerwert bei einer Wellenlänge

von 578 nm gemessen. Das Ergebnis wurde mit der Software Prism (Graph PAD, San Diego) graphisch dargestellt und durch Regressionsanalyse die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

Der Standard wurde aus Rinderserumalbumin (100 mg/100 ml) in 0,9% NaCl durch Verdünnung mit 0,9% NaCl in folgenden Konzentrationen angesetzt: 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml und 1 mg/ml.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Übernachtkultur

Zu 20 ml 2 YT-Medium (1,6% Pepton, 1,0% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) wurden 20 µl Ampicillin (50 mg/ml in 50% Ethanol) gegeben, mit einem Bakterienstamm beimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Als Bakterienstamm dienten entweder einzelne *E.coli* Kolonien einer Agarplatte oder eine Glycerinkultur.

2.2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Befähigung zur Aufnahme von Fremd-DNA erhalten die Bakterien durch Behandlung mit Mg^{2+} oder mit Ca^{2+} - Ionen. Zur Transformation wird der Bakterienstamm XL-1 Blue genutzt, der über ein Tetracyclinresistenz-Gen verfügt. Zur Herstellung der zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigten Bakterien wurde eine 5 ml Übernachtkultur von XL-1 Blue Bakterien in 500 ml frisches 2 YT- Medium (1,6% Pepton, 1,0% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) überführt. Die Bakterien wurden auf einem Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer OD_{590} von 0,375 wachsen lassen. Nach Zentrifugation (10 min, 4.000 g, 4°C) wird das Bakterienpellet in 1/5 der Mediummenge mit 0,1 M $CaCl_2/0,021 MgCl_2$ resuspendiert und bis zur erneuten Zentrifugation 1 h auf Eis gelassen. Die Zellen werden in 2 ml $CaCl_2/0,021 MgCl_2/15%$ Glycerin resuspendiert, in Eppendorfreaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Transformation von Bakterienzellen

Als Transformationsmethode wurde die Hitzeschocktechnik verwendet. Durch den Hitzeschock wird die Membran der Bakterien durchlässig, so daß Plasmide in das

Innere der Zelle eindringen können. Zu 100 µl kompetenten Zellen wurden 10 µl Plasmid-DNA aus der Ligationsreaktion hinzugegeben, 20 min auf Eis gestellt, danach 90 s bei 42°C inkubiert und sofort für 5 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden sofort nach dem Hitzeschock in 1 ml antibiotikafreies 2 YT-Medium (16 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl; ad 1l mit H₂O) überführt, suspendiert und 1h bei 37°C auf einem Schüttler bei 225 rpm inkubiert.

2.2.2.4 Anlegen einer Glycerinkultur

Glycerinkulturen erlauben die Konservierung transformierter *E.coli*-Zellen über einen längeren Zeitraum.

Dazu wurden 850 µl der Übernachtskultur mit 150 µl 100% Glycerin gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so hergestellte Dauerkultur kann bei -80°C gelagert werden.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.2.5.1 Minipräparation

Diese Methode wurde zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (1-20 µg) und zur Kontrolle der Kolonien angewendet.

Eine 2 ml Übernachtskultur wurde bei 13000 rpm 20 s bei RT pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) durch Vortexen vollständig resuspendiert. Danach wurden 200 µl 0,2 M NaOH/1% SDS zugegeben, vorsichtig gemischt und die Proben im Anschluß für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 150 µl 3 M Kaliumacetat dazupipettiert und der Ansatz wurde für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden dann 5 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand dann für 30 min bei -20°C mit 900 µl EtOH ausgefällt. Anschließend wurde abzentrifugiert (20 min, 10000 rpm, SS34-Rotor, 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 10000 rpm, SS34-Rotor, 4°C) wurde der Überstand quantitativ abgenommen, das Pellet im Exsikkator 2-5 min getrocknet und in 10-20 µl sterilem H₂O aufgenommen.

2.2.2.5.2 Midipräparation

Diese Methode wurde im Gegensatz zu der oben beschriebenen Minipräparation zur Gewinnung größerer und reinerer Mengen (50-200 µg) an Plasmid-DNA genutzt.

Aus 50-200 ml einer Übernachtskultur wurden die Zellen 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml Lysozym-Puffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8,0) aufgenommen. Die Proben wurden auf Eis gestellt und wiederholt gemischt bis das Pellet vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 5 ml 0,2% NaOH/1% SDS wurden die Proben für 10 min auf Eis gestellt, anschließend wurden 3,75 ml 3 M Natriumacetat zugegeben und nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (20 min, 10000 rpm, SS34-Rotor, 4°C), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und 10 min auf Eis gestellt. Die Zentrifugation wurde wiederholt, der klare Überstand wurde mit 10 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei -20°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 10000 rpm, SS34-Rotor, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet kurz getrocknet und in 750 µl sterilem H₂O aufgenommen und vollständig resuspendiert. Das gelöste DNA-Pellet wurde in ein 2 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt, mit 850 µl 5 M LiCl₂-Lösung versetzt und für genau 10 min bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde anschließend 8 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen, es wurden 3 µl RNase (10 mg/ml) dazugegeben und die Probe 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 850 µl Isopropanol zugefügt und der Ansatz 30 min bei -20°C inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand quantitativ abgenommen, das Pellet im Exsikkator getrocknet und in 50-200 µl sterilem H₂O gelöst.

2.2.2.6 Restriktionsanalyse rekombinanter Plasmid-DNA

Die präparierte Plasmid-DNA kann nun durch Schneiden mit geeigneten Restriktionsenzymen analysiert werden. Für den typischen **analytischen Restriktionsverdau** setzt man 0,1-0,5 µg DNA ein. Dazu gibt man den für das Enzym spezifischen Reaktionspuffer in einfacher Konzentration zu 0,3 U Enzym, füllt auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl auf und läßt den Reaktionsansatz 1 h bei der optimalen Temperatur des Restriktionsenzym inkubieren.

Mit einem **präparativen Restriktionsverdau** wird eine größere Menge an DNA für nachfolgende molekularbiologische Arbeiten vorbereitet. Dazu werden 5-10 µg DNA mit 4-10 U Enzym und dem spezifischen Reaktionspuffer auf 40 µl aufgefüllt und 1h bei dem Temperaturoptimum des Enzyms inkubiert.

2.2.2.7 DNA-Agarosegelelektrophorese

1 g Agarose wurde in 100 ml 1x TAE-Puffer (4,84 g Tris-Base, 1,14 ml Eisessig, 0,744 g Na₂EDTA x 2H₂O) gegeben, die Agarose gelöst und nach Abkühlung wurden 0,7 µl Ethidiumbromid zugegeben. Als Laufpuffer diente 1x TAE.

Die vorbereiteten DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 des Volumens an Probenpuffer (40% Saccharose, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenxyanol) in die Probenaschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Größenmarker (Lambda DNA-BstE II-Größenmarker) aufgetragen. Die Proben wurden bei einer Spannung von 0,5 V/cm² getrennt.

2.2.2.8 Gene-Clean-Methode

Um DNA aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde die Methode der adsorptiven Bindung von DNA an eine Silikonmatrix verwendet. Dadurch ist es möglich, DNA aus einem Gel zurückzugewinnen und gleichzeitig von Salzen, EtBr und anderen Verunreinigungen zu befreien.

Die Präparation wurde nach den Empfehlungen des Herstellers (Renner, Dannstadt) durchgeführt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde mit dem 3-fachen Volumen an 6 M NaJ bei 55°C aufgelöst. Danach erfolgte eine 5 minütige Inkubation mit der Silikonmatrix (5 µl Bindungsmatrix binden 5 µg DNA) an die sich ein dreimaliges Pelletieren und Resuspendieren mit einer alkoholischen Waschlösung anschloß. Durch Zugabe von TE-Puffer wurde die DNA wieder von der Matrix eluiert.

2.2.2.9 Ligation

Das Enzym T4 Ligase katalysiert die Ligation von einem DNA-Fragment (Insert) in eine linearisierte Plasmid DNA (Vektor). Zur Ligation wurde das Insert in 3-fach höherer Konzentration als der Vektor eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit 2 µl 10x Ligationspuffer, 4 µl Polyethylenglycol, sowie 1 U T4 DNA Ligase versetzt und

mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz bei 14 - 16°C im Wasserbad inkubiert und die Proben bis zur Transformation auf Eis gestellt.

2.2.2.10 CIP-Behandlung

Zur Vermeidung der Selbstligation linearisierter Plasmid-DNA wurde eine CIP („calf intestinal phosphatase“) Behandlung durchgeführt. Dazu wurden zu 20 µl Reaktionsansatz 10 U CIP gegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert.

2.2.2.11 Phenolextraktion von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Phenolextraktion können Nukleinsäurepräparationen von Verunreinigungen befreit werden.

Die zu reinigende Nukleinsäureprobe wurde mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt, mit 200 µl TE-gepuffertem Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) versetzt und die Probe 8 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde vollständig in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und nochmals mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol vermischt. Nach erneuter Zentrifugation (1 min bei 13000 rpm) wurde der wäßrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte dann zur Ethanol-fällung eingesetzt werden.

2.2.2.12 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäureprobe wurde mit 1/10 ihres Volumens an 3 M Na-Acetatlösung (pH 5,2) und dem 2,5 – 3 fachen Volumen an 100%igem EtOH versetzt und mindestens für 1 h bei –20°C zur Fällung stehen gelassen. Nach Zentrifugation (SS34-Rotor, 12000 rpm, 20 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Nukleinsäure-Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (SS34-Rotor, 12000 rpm, 20 min, 4°C). Danach wurde der Überstand quantitativ entfernt, das Pellet im Exsikkator getrocknet und in einem kleinen Volumen (10 – 20 µl) sterilem H₂O aufgenommen.

2.2.2.13 In-vitro Transkription zur Herstellung einer komplementären RNA

1 µg des linearisierten Plasmids, in das die entsprechende cDNA einkloniert ist, wurde mit 5 µl Transkriptionspuffer, je 10 mM NTPs, 50 U RNase-Inhibitor, 50 U RNA-Polymerase versetzt und mit sterilem H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 70 min inkubiert, wobei nach 15 min 1 µl eines NTP-Gemisches (10 mM) zugesetzt wird. Nach der Gesamtinkubationszeit folgte für 15 min ein DNase-Verdau (10 U DNase) bei 37°C. Zur Reinigung und Konzentrierung der gewonnenen cRNA schloß sich eine Phenolextraktion mit Ethanol fällung an. Die cRNA wurde in einem kleinen Volumen an DEPC-H₂O aufgenommen. Die Konzentration und Intaktheit der cRNA wurde sowohl durch photometrische Messung als auch durch gelelektrophoretische Auftrennung bestimmt.

2.2.2.14 RNA-Präparation

2.2.2.14.1 Gesamt-RNA-Isolation und Poly(A)⁺-RNA-Isolation aus Geweben

Gesamt-RNA aus Geweben verschiedener Tierspezies wurde entweder nach dem ausführlichen Protokoll der sauren Guanidiniumthiocyanat-Methode nach Chromzynski und Sacchi (1987) isoliert bzw. mit einem optimierten Kit peqGOLD RNA PureTM (PeqLab, Erlangen, Deutschland) gewonnen.

Zu 150 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertem Gewebe wurden 0,8 ml Aufschlußpuffer (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM NaCitrat, 0,5% Lauroylsarkosin, 0,1 M β-Mercaptoethanol) gegeben, in einem Elvejem Potter mit maximaler Geschwindigkeit homogenisiert und anschließend mit 80 µl 2 M NaAcetat pH 4,0 und 800 µl Phenol gemischt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12000 g wurde die obere wäßrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol 1h bei -20°C gefällt. Nach erneutem Pelletieren der Probe (10 min, 12000 g, 4°C) wurde der Niederschlag in 300 µl Aufschlußpuffer gelöst und in Anwesenheit von 300 ml Isopropanol 1 h bei -20°C präzipitiert. Die Probe wurde nochmals zentrifugiert (10 min, 12000 g, 4°C), das Pellet in 300 µl H₂O bidest. gelöst und die RNA mit 30 µl 3 M NaAcetat pH 5,2 und 600 µl 100% Ethanol 1 h bei -20°C gefällt. Nach Pelletieren der

RNA (10 min, 12000 g, 4°C) wurde die RNA zweimal mit 80%igem EtOH gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in einem definierten Volumen H₂O bidest. aufgenommen.

Qualität und Menge der RNA-Präparation wurden in einem Aliquot der Präparation sowohl adsorptionsphotometrisch bei 260 und 280 nm als auch mittels der EtBr-Fluoreszenz in der Elektrophorese bestimmt.

Für die Poly(A)⁺-RNA-Isolierung wurde der oligo-dT₂₅ Dynabeads[®] mRNA Purification Kit (Dynal, Oslo, Norwegen) verwendet. Die mRNA wurde nach Anleitung des Herstellers präpariert.

2.2.2.14.2 Gesamt-RNA-Isolation und Poly(A)⁺-RNA-Isolation aus kultivierten Zellen

Von konfluent gewachsenen Zellen wurde das Medium abgesaut und die Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde 0,8 ml Aufschlußpuffer pro 75 cm²-Kulturflasche zu den Zellen gegeben um sie nach Lyse mit einem Gummischaber zu ernten. Die anschließenden Schritte entsprachen der vorher beschriebenen Präparation von Gesamt- bzw. Poly(A)⁺-RNA.

2.2.2.14.3 Präparation von Gesamt-RNA aus humaner Muttermilch

Gesamt-RNA aus humaner Muttermilch wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Chromzynski und Sacchi isoliert (Lindquist, S et al. 1994). 80 ml frische Muttermilch wurde 20 min bei 2000 rpm (GSA-Rotor) bei 4°C zentrifugiert und das aufgeschäumte Fett entfernt. Die so entstandene Magermilch wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml eiskaltem 1x PBS suspendiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren (20 min, 2000 rpm GSA-Rotor, 4°C) wurde der Überstand abgenommen, in 0,5 ml GITC-Puffer (4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Na-Citrat pH 7,0; 0,5% N-Lauroylsarcosin; 0,1 M β-Mercaptoethanol) resuspendiert und durch Zugabe von 50 µl 2 M Na-Acetat (pH 4,0), 500 µl Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) extrahiert. Nach mehreren Reinigungs- und Fällungsschritten wurde die RNA in einem finalen Zentrifugationsschritt 30 min bei 15000 g zentrifugiert und in 5 - 10 µl H₂O bidest aufgenommen. Die mittlere Ausbeute lag bei 0,5 - 1 µg Gesamt-RNA pro 80 ml Muttermilch.

2.2.2.15 Northern-Blot-Analyse

Mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse ist es möglich, RNA-Präparationen verschiedener Gewebe mit einer spezifischen Sonde auf das Vorhandensein einer bekannten mRNA zu untersuchen. Gesamt-RNA oder mRNA wird durch denaturierende Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und nachfolgend mit einer spezifischen Sonde hybridisiert. Die Hybride werden im Anschluß an das Hybridisieren durch Sekundärreaktionen sichtbar gemacht.

2.2.2.15.1 RNA-Gelelektrophorese

Probenvorbereitung: 10-20 µg Gesamt-RNA bzw. 2-5 µg mRNA wurden mit dem 3-fachen Volumen an Ladungspuffer (500 µl Formamid, 70 µl 14,3x MOPS-Puffer, 180 µl 37%iges Formaldehyd) versetzt und 5 min bei 65°C denaturiert. Vor dem Auftragen auf das 1%ige Agarosegel wurden die Proben mit dem 0,9 -fachen an Probenpuffer (50% Glycerin, 1mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol, 1% Ethidiumbromid) versetzt. Die Proben wurden in 1x MOPS-Laufpuffer (200 mM MOPS, 50 mM NaAcetat, 10 mM EDTA, pH 7,0) bei 4°C und 0,15 V/cm² getrennt.

2.2.2.15.2 Northern-Transfer

Die elektrophoretisch getrennte RNA wurde durch Kapillartransfer (Southern EM 1975) auf eine Membran transferiert. Bei dem hier angewendeten Vakuumblotting wird über ein angelegtes Niederdruckvakuum eine Sogwirkung erzeugt und so der Transfer von Nukleinsäuren aus dem Gel auf eine positiv geladene Membran bewirkt (100 mbar, 2-3 h). Als Transferpuffer diente 10x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M NaCitrat, pH 7,0). Im Anschluß an den Transfer wurde die RNA durch dreiminütige UV-Bestrahlung auf der Nylonmembran fixiert.

2.2.2.16 Filterhybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Hybridisierungssonden

Die Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sense-Hybridisierungssonden und RNA-Antisense-Hybridisierungssonden wurden nach dem Protokoll des Herstellers (Boehringer, Mannheim) synthetisiert. In dieser Arbeit wurden folgende RNA-

Hybridisierungs sonden für die Filter-Hybridisierung bzw. in-situ-Hybridisierung eingesetzt:

RNA-Hybridisierungssonde	verwendeter Vektor mit Insert	Enzym zur Linearisierung des Vektors	verwendete RNA-Polymerase
Antisense rat P2 KS	pCRII / rat P2 KS	Bam HI	T7
Sense rat P2 KS		Not I	SP6
Antisense rat P2 LS	pCRII / rat P2 LS	Xho I	SP6
Sense rat P2 LS		Bam HI	T7
Antisense rabbit P2 Pst	pBluescript SK / rabbit P2 Pst	Eco RI	T3
Sense rabbit P2 Pst		Not I	T7

Die Membran wurde 1-2 h bei 65°C mit 10 ml Vorhybridisierungslösung (50 % Formamid, 5xSSC (750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat, pH 7,0), 2% Blockierungslösung, 0,1% Lauroylsarcosin, 0,02% SDS) vorinkubiert. Die Vorhybridisierungslösung wurde durch die Hybridisierungslösung ersetzt, die die denaturierte DIG-markierte RNA-Hybridisierungssonde in einer Konzentration von 50 ng/ml Hybridisierungslösung enthielt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C durchgeführt.

Die Membran wurde zweimal 5 min bei RT mit 50 ml 2x SSC/0,1% SDS und zweimal 15 min bei 68°C mit 50 ml 0,1x SSC/0,1% SDS gewaschen. Vor der Detektion wurde die Membran 5 min in 50 ml Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3% Tween 20) gewaschen und anschließend 30 min mit Blockierungslösung (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 1% Blockierungsreagenz (Boehringer), pH 7,5) vorinkubiert bevor das Anti-DIG-AP-Konjugat (Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat) in einer Verdünnung von 1:20000 zugegeben wurde. Nach 30 min wurde die Membran zweimal mit 75 ml Waschpuffer gewaschen und mit alkalischem Tris-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) äquilibriert. Zur Nachweisreaktion wurde die Membran im Dunkeln mit 2 ml CDPTM-Star Lösung (CDPTM-Star 1:100 in alk. Tris-Puffer) inkubiert. CDP wird von der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, wobei ein metastabiles Dioxetanion entsteht, das spontan zerfällt und Licht mit einem Maximum bei 466 nm emittiert. Diese Chemilumineszenz wird durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

2.2.2.17 Stripping

Eine bereits hybridisierte Nylonmembran kann durch Entfernen der hybridisierten Sonde erneut zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Dazu wurde die Membran zweimal 20 min bei 68°C mit 20 ml Stripping-Lösung (50% N-N-Dimethylformamid, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl) inkubiert und anschließend jeweils 1 min mit 100 ml 2x SSC sowie 100 ml H₂O bidest. bei RT geschüttelt.

2.2.2.18 RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion)

2.2.2.18.1 Reverse Transkription (RT)

5 µg Gesamt-RNA wurden bei 70°C denaturiert und zu der RNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 2 µl 10x Reverse Transkriptase Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2 µl 50 mM DTT, 18 U RNase-Inhibitor, 100 ng Oligo-dT-Primer bzw. 100 ng spezifischer Antisense-Primer und 20 U M-MuLV Reverse Transkriptase gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben bei Verwendung von Oligo-dT-Primern 60 min bei 42°C und Verwendung von spezifischen Antisense-Primern 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.2.18.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Je 5 µl des RT-Ansatzes wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus dem spezifischen Puffer für die Taq-Polymerase, je 100 µM Sense- und Antisense-Primer und 100 µM dNTPs. Die Proben wurden mit 70 µl Mineralöl überschichtet und bei 95°C für 3 min denaturiert. Nach Zugabe von 2 U Taq-Polymerase durchliefen die Proben 30-35 Temperaturzyklen (1. Denaturierung 1 min 95°C, 2. Primeranlagerung 1 min 55°C, 3. Polymerase-Reaktion 2 min 72°C), gefolgt von einer 10 minütigen Endsynthese bei 72°C. Die PCR-Fragmente wurden auf einem 1% Agarosegel der Größe nach aufgetrennt.

2.2.2.19 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem TA Cloning-Kit von Invitrogen (San Diego, USA) in das Plasmid pCRIITM2.1 inseriert. Hierbei macht man sich zunutze, daß die Taq-Polymerase in einer Nebenreaktion der PCR ein dATP an die 3'-Enden der PCR-Produkte anfügt. Dadurch, daß das im Kit mitgelieferte Plasmid pCRIITM2.1 mit überhängenden dTTTs an den 5'-Enden versehen ist, erhält man eine effiziente Ligation der PCR-Produkte mit dem Plasmid.

Die Ligations- und Transformationreaktionen wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt (Invitrogen, San Diego, USA). Die transformierten Bakterienzellen wurden auf kanamycinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und in anschließenden Experimenten die Plasmide der Klone auf die Größe und Orientierung des Inserts im Vektor durch Restriktionsanalysen und Sequenzieren überprüft.

2.2.2.20 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von einklonierten cDNA-Fragmenten für die Sondenherstellung oder PCR-Produkten erfolgte durch die Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. 1977) mit einer T7-Polymerase (Sequenzenase Kit, Gibco BRL, Deutschland) und [³⁵S]-dATP, sowie nachfolgender vertikaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie.

Als Primer wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 16 bzw. 17 Basen verwendet, die mindestens 50% G- oder C-Nukleotide enthielten, weniger als 2 A- oder T-Nukleotide am 5'- oder 3'- Ende aufwiesen und keine länger als 3 Nukleotide umfassenden komplementären Sequenzbereiche aufwiesen. Die verwendeten Primer wurden von Eurogentec (Lüttich, Belgien) bezogen.

2 mg DNA wurden in 0,2 N NaOH/0,2 mM EDTA 30 min bei 37°C denaturiert und mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat pH 4,8 und dem 4-fachen Volumen Ethanol präzipitiert. Die gefällte DNA wurde 20 min bei 10000 rpm (SS34-Rotor) zentrifugiert und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

1 µg denaturierte DNA, 0,5 µl Primer (10 µM), 1 µl Reaktionspuffer (250 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 200 mM Tris, pH 7,5) wurden mit sterilem H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 5 µl aufgefüllt und zum Binden der Primer in 80°C warmes Wasser gestellt, das innerhalb von 30 min auf < 35°C abgekühlt wurde. Im Anschluß

daran wurde der auf Eis gelagerte Ansatz für die Markierungsreaktion eingesetzt. Zu den 5 µl Reaktionsansatz wurden 0,5 µl DTT (0,1 M), 1 µl Reaktionsmix (7,5 µM dGTP, dCTP, dTTP), 0,25 µl [³⁵S]-dATP und 3 U T7 DNA Polymerase pipettiert, der Ansatz 5 min bei RT inkubiert und anschließend für die Terminationsreaktion eingesetzt. Dazu wurden jeweils 2,5 µl des Ansatzes in 4 Reaktionsgefäße pipettiert, die jeweils 2,5 µl des jeweiligen Terminationsreaktionsmixes (50mM NaCl, 80 µM dNTP und 8 µM ddATP, ddTTP, ddGTP oder ddCTP) enthielten. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl Stopplösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol FF) gestoppt und auf Eis gestellt.

Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf einem 8%igen Polyacrylamidgel, das 50% Harnstoff enthielt, 8 h bei konstanten 55 W getrennt. Die DNA wurde mit 10% Essigsäure/10% Methanol 5 min fixiert und der im Gel enthaltene Harnstoff mit Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Gel über Nacht auf einen Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak, USA) exponiert.

2.2.2.21 In-situ-Hybridisierung

2.2.2.21.1 Silanisierung von Objektträgern

Um eine gute Adhäsion der Kryoschnitte auf den Objektträgern zu erreichen, wurden entweder Superfrost Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig) verwendet oder die Objektträger durch Silanisierung vorbehandelt. Hierzu wurden die Objektträger bei 70°C über Nacht in 1% Aminopropyltriethoxysilan/1% Essigsäure inkubiert anschließend in Wasser gespült und bei 100°C getrocknet. Nach Abkühlen wurden die Objektträger 30 min in 10% Glutaraldehyd inkubiert, gewaschen, für 10 min in 0,1 M Natriummetaperjodat behandelt, in Wasser gewaschen und staubfrei getrocknet.

2.2.2.21.2 Gewebepräparation und Vorbereitung von Kryoschnitten

Gewebe, das für die in-situ-Hybridisierung verwendet wurde, wurde sofort nach dem Tod des Tieres entnommen, in stickstoffgekühltem Isopentan schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Die Gewebe wurden vor dem Schneiden ca. 10 min auf eine ihrem Fettgehalt entsprechende Temperatur äquilibriert, mit Tissuetek[®] (Merck) auf dem Gefrierblock fixiert und in 5-10 µm dicke Sektionen geschnitten. Die Kryoschnitte wurden auf die beschichteten Objektträger aufgenommen, 10 min in 4% Paraformaldehyd/PBS (1x PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄) fixiert und zur Deproteinierung und Permeabilisierung 10 min in 0,1 M HCL inkubiert. Bei Nierengewebe erfolgte zur Verringerung unspezifischer Probenbindung eine Acetylierung in 0,1 M Triethanolamin-HCL pH 8,0, 0,25% Essigsäureanhydrid für 10 - 20 min. Im Anschluß daran wurden die Präparate luftgetrocknet.

2.2.2.21.3 Hybridisierung an Kryoschnitten

Vorbehandelte Kryoschnitte wurden mit 100 µl Prähybridisierungslösung (50% Formamid, 1x Denhardt's Lösung, 10 mM Triethanolamin, 5 mM EDTA, 6,25% Dextransulfat, 0,3 M NaCl, 1 mg/ml tRNA) bedeckt und in einer feuchten Kammer 2h bei 37°C bis 42°C inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung durch je 100 µl Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung plus 50 - 100 ng denaturierte RNA-Sonde/100 µl) ersetzt und die Hybridisierung über Nacht bei 42°C - 45°C fortgesetzt.

Die Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sense-Hybridisierungssonden und RNA-Antisense-Hybridisierungssonden wurden nach dem Protokoll des Herstellers (Boehringer, Mannheim) synthetisiert.

2.2.2.21.4 Waschen

Nach der Hybridisierung wurde ungebundene und unspezifisch hybridisierte Probe durch mehrere Waschstufen steigender Stringenz entfernt. Dazu wurden die Schnitte 30 min bei 60°C in 5x SSC, 30 min bei 55°C in 1x SSC/0,2% Triton X 100, 10 min bei 55°C in 0,2x SSC und 10 min in 1x PBS bei RT gewaschen.

2.2.2.21.5 Detektion

Die gewaschenen Objektträger wurden für 1 h mit 1x Blockinglösung (Boehringer Mannheim)/PBS behandelt und anschließend 4 h mit Antikörperlösung (100 mM Tris-

HCL pH 7,5, 150 mM EDTA, 1:200 Anti-DIG-AP-Konjugat (Boehringer Mannheim)) versetzt.

Zur Farbentwicklung wurden die Präparate 5 min in alkalischem Tris-Puffer (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) äquilibriert und mit Substratlösung (30 ml alkalischer Tris-Puffer, 135 µl NBT, 105 µl BCIP) über 16 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von Stopplösung (1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7,5) beendet und zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden die Dünnschnitte in Glycergel[→] eingebettet.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Hybridisierung wurde die RNase-Resistenz (RNase A 20 µg/ml in 0,1 M Tris, 0,4 M NaCl, 0,05 M EDTA) des Hybridisierungssignals überprüft, eine Hybridisierung mit der entsprechenden Sense-Sonde durchgeführt, ohne Antisense-Sonde hybridisiert und die Schnitte vor der Hybridisierung mit RNase behandelt.

2.2.2.22 Hämalaun-Eosin-Färbung

Mit Hilfe der HE-Färbung können Gewebekompartimente, Zellstrukturen sowie die Schnittqualität von Dünnschnitten, die für die in-situ-Hybridisierung bzw. Immunhistochemie eingesetzt werden, bestimmt werden.

Gefrierschnitte wurden dazu 1 min in Hämalaun (1 g Hämatoxylin, 0,2 g NaJO₃, 50 g Kalialaun, ad 1 l mit H₂O bidest, 50 g Chloralhydrat, 1 g Citrat) getaucht, anschließend 2 min in H₂O bidest gewaschen und für 20 s in Eosin (2 g Eosin in 100 ml 96% EtOH 1:1 mit 70% EtOH) getaucht. Nach der Entwässerung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und in Xylol wurden die Schnitte mit Glycergel[→] konserviert.

Paraffinschnitte werden 10 min in Xylol entparaffinisiert, in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) und in H₂O bidest. gewässert, 7 min in Hämalaun gefärbt und 10 min in H₂O bidest. gewaschen. Danach werden die Schnitte 4 min in Eosin gefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und in Xylol entwässert und in Glycergel[→] eingebettet.

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Herstellen von *Xenopus laevis* Oozyten Kryostatschnitten

Xenopus laevis Oozyten wurden 2 Tage nach der Injektion mit Peptidtransporter mRNA für 1h in 3%iger Paraformaldehydlösung bei 4°C fixiert und anschließend verblieben diese bei 4°C für 18 h in einer 30%igen Saccharoselösung. Die Oozyten wurden in O.C.T.-Medium eingebettet und bei -18°C in einem Gefriermikrotom in 5-8 µm dicke Schnitte geschnitten.

2.2.3.1.1 Immunhistochemie an Dünnschnitten von *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten-Schnitte werden 2 h mit 1x PBS/5% BSA inkubiert und vor der Inkubation mit dem Antiserum in 1x PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Die Inkubation mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Antiserums erfolgte für 1-4 h bei RT. Anschließend wurden die Schnitte 5x für je 5 min mit 1x PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und für 1 h mit dem sekundären FITC (Fluorescein Isothiocyanat)-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Schnitte wurden wie oben gewaschen, mit DAKO-Medium eingebettet und unter einem Leica-Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.3.2 Immunhistochemie an Gewebe-Dünnschnitten

Für den immunhistochemischen Nachweis des Peptidtransporters wurden 3 - 5 µm dicke Kryoschnitte auf silanierte Objektträger aufgebracht und 10 min in absolutem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Schnitte in 1% PBS/1% Tween 20 gewaschen und unspezifische Bindungsstellen für 1 h mit 1% Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim) blockiert. Für die Antikörperreaktion wurden die Schnitte 1 h bei 22 - 25°C mit dem Antiserum in einer Verdünnung von 1 : 1000 in PBS-T inkubiert. Vor der 1-stündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper (entweder enzymkonjugiert oder fluoreszenzkonjugiert) wurden die Schnitte in PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte unter einem Mikroskop ausgewertet.

Die Spezifität der Antikörperreaktion wurde dadurch geprüft, daß an Parallelschnitten Preimmunserum verwendet wurde, bzw. das Antiserum mit dem spezifischen antigenen Peptid blockiert wurde.

2.2.4 Zellkultur

Zellen, die ein unbegrenztes Wachstum zeigen, können als permanente Zelllinie in Kultur gehalten werden. Man versetzt die Zellen mit einem Nährmedium, das speziell an ihre Bedürfnisse angepaßt wurde und kultiviert sie unter sterilen Bedingungen in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C.

Die in DMSO-haltigem Medium eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und in eine kleine Kulturflasche (25 cm²) überführt, die bereits 5 ml Kulturmedium enthielt. Nach 1 - 2 Stunden waren die Zellen angeheftet und das vorhandene Medium wurde gegen 5 ml Kulturmedium (für neuronale Zellen: 500 ml Eagle Medium, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 100 I.U./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% fötales Kälberserum), das kein DMSO enthielt, ausgetauscht. Nach etwa 5 - 7 Tagen waren die Zellen konfluent und konnten passagiert werden.

2.2.4.1 Passagieren von Zellen

Um das Teilungsverhalten der Zellen zu gewährleisten, müssen die Zellen wenn sie eine Konfluenz von etwa 90% erreicht haben, in neue Kulturflaschen überführt werden. Dazu wird von den konfluent gewachsenen Zellen das gesamte Kulturmedium entfernt, die Zellen dreimal mit 5 ml 37°C warmen PBS-Puffer (136 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und mit 1,5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Das Ablösen der Zellen wird nach einer 10 minütigen Inkubationszeit bei 37°C durch Zugabe von 5 ml FKS-haltigem Medium gestoppt. Anschließend wird der Zellsuspension ein Volumen von 20 µl entnommen, das mit 80 µl Tryptanblau versetzt wird. Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein Aliquot dieser Mischung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung kann die in der Zellsuspension enthaltene Zellzahl berechnet werden. Damit wird gewährleistet, daß die neu auszusäenden Zellen mit einer definierten Zellzahl ausgesät werden. Die in dieser Arbeit verwendeten neuronalen Zellen wurden mit einer Zellzahl von 5×10^4 - 5×10^5 Zellen ausgesät. Der Medienwechsel erfolgte bei Farbumschlag des Mediums, was einem Zeitintervall von etwa 2 Tagen entsprach. Je nach Flaschengröße hatten die Zellen nach 5 - 7 Tagen eine 90%ige Konfluenz erreicht und wurden dann erneut passagiert. Konfluent gewachsene Zellen wurden für Aufnahmeexperimente oder z.B. für die Gewinnung von Gesamt-RNA geerntet.

2.2.5 Aufnahmeexperimente

2.2.5.1 Zellkultur

Die auf „sixwell“-Platten ausgesäten Zellen (5×10^5 Zellen pro well) wurden nach 3 bzw. 6 Tagen, nach Erreichen der Konfluenz, für Aufnahmeexperimente eingesetzt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit UPL-Puffer pH 6,0 (25 mM Hepes, 145 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM $\text{MgSO}_4 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 20 mM Glucose) gewaschen und 30 min bei 37°C mit radioaktiven Dipeptiden ($1 \mu\text{Ci/well}$) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem UPL-Puffer auf Eis gewaschen, in $600 \mu\text{l}$ TEN-Puffer (40 mM Tris, 1mM EDTA, 150 mM NaCl) aufgenommen und nach einer 1 - 2 stündigen Inkubation bei RT nach Zugabe von Szintillatorflüssigkeit im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Die Auswertung wurde mit dem Programm Prism (GraphPAD, Los Angeles, USA) durchgeführt.

2.2.5.2 Aufnahmeexperimente am isolierten Organ

Die Tiere (Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 200 g) wurden durch Chloroform-Inhalation getötet. Nach Eintritt des Todes wurde das zu untersuchende Organ herauspräpariert, in einer Vibratomkammer (4°C) in $200 \mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten und in Inkubationskammern mit MEM-Medium (37°C , Atmosphäre: 95% O_2 /5% CO_2) überführt. Die Aufnahmeexperimente wurden mit $2 \mu\text{M}$ AMCA-markiertem β -Ala-Lys in Anwesenheit und Abwesenheit von $50 \mu\text{M}$ Gly-Sar durchgeführt. Kontrollschnitte wurden parallel ohne Zugabe des markierten Dipeptids inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte 2×10 min in MEM (4°C) gewaschen, auf Objektträger aufgebracht und entweder als Quetschpräparat sofort unter dem Mikroskop ausgewertet oder für 30 min in 4%igem Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 fixiert. Die fixierten Schnitte wurden erst in PBS pH 7,4 und anschließend in PBS/18% Saccharose gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in $5 \mu\text{m}$ dicke Kryoschnitte geschnitten.

2.2.5.3 Ganztierexperiment

2.2.5.3.1 Injektion in die Schwanzvene

AMCA-markiertes β -Ala-Lys wurde in einer Konzentration von 1 mM direkt in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. 10 min nach der Injektion wurden die Tiere durch Chloroforminhalation getötet und verschiedene Organe herauspräpariert. Die Gewebe wurden in 4% PFA bei 4°C über Nacht immersionsfixiert, anschließend in eine 18% Saccharoselösung gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Organe wurden mit einem Gefriermikrotom in 5 μ m dicke Scheiben geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (360 - 380 nm).

2.2.5.3.2 Applikation der Substrate durch eine Schlundsonde

Mäusen wurden durch eine Schlundsonde 2 μ Ci an radioaktiv markierter Aminohexansäure verabreicht. 3 Stunden nach der Applikation wurden die Tiere durch Genickschlag getötet, in einer Mischung aus Trockeneis und Ethanol bei - 80°C eingefroren und in Einbettungsmedium fixiert.

Anschließend wurden von den Mäusen in einem Gefriermikrotom 200 μ m dicke Ganztierschnitte angefertigt, die zur Untersuchung der Verteilung des applizierten Substrats einer Autoradiografie unterzogen wurden.

2.2.6 Zwei-Elektroden Voltage Clamp Technik

Die Zwei-Elektroden Voltage Clamp Technik wurde angewendet, um den durch die Substrataufnahme generierten Einwärtsstrom in PepT2 exprimierenden Oozyten näher zu charakterisieren.

Xenopus laevis Oozyten wurden nach der Entnahme durch Collagenasebehandlung vereinzelt, die cRNA des Transporters injiziert und nach drei Tagen die funktionelle Expression des Transportproteins gemessen.

Die Oozyten wurden mit 50 nl Wasser (Kontrollen) oder 50 nl RNA-Lösung mit 5 ng der komplementären PepT2 RNA (cRNA) injiziert. Als Kontrolle dienten Oozyten, die jeweils mit dem gleichen Volumen Wasser injiziert waren.

Die Aufnahmeexperimente wurden in einem Puffer bestehend aus 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM Mes/Tris pH 6,5 in An- und Abwesenheit von verschiedenen Substraten durchgeführt. Bei der verwendeten „two-electrode voltage clamp“-Technik kann während der Messung das Membranpotential auf einen festen Wert (-60 mV) fixiert werden, wobei der Einwärtsstrom durch die Substrattranslokation registriert wird. (Amasheh et al. 1997)

3 Ergebnisse

3.1 Peptidtransporter in verschiedenen extrarenalen Geweben

Der Nachweis der Expression der mRNA des Peptidtransporters PepT2 in einer Reihe von Geweben durch Boll et al. 1996 und Saito et al. 1995 gab erste Hinweise darauf, daß die Expression dieses Proteins offenbar nicht ausschließlich auf die Niere beschränkt ist. Durch Northern-Blot Analyse sowie RT-PCR-Anwendung konnten PepT2- identische und/oder ähnliche Transkripte auch in anderen Organen wie z.B. in Gehirn, Lunge, Leber, sowie Muskel und Herzmuskel des Kaninchens (Boll et al. 1996), und in Gehirn, Lunge und Milz der Ratte nachgewiesen werden (Saito et al. 1996).

Ob die PepT2-mRNA noch in anderen extrarenalen Geweben exprimiert wird, bzw. ob das PepT2-Protein in diesen Geweben auch funktionell exprimiert wird und in welchen Zellen die mRNA bzw. das Protein lokalisiert ist, ist noch nicht bekannt. Auch über die Frage, welche Funktion einem Peptidtransporter in diesen Geweben zukommen könnte, konnte bisher nur spekuliert werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen nachfolgend exemplarisch die Gewebeverteilung der PepT2-mRNA sowie die Verteilung des PepT2 Proteins in den Spezies Ratte, Kaninchen, Maus und Mensch, sowie Ansätze einer funktionellen Charakterisierung des extrarenalen Peptidtransporters.

Die erfolgreiche Klonierung des Peptidtransporters PepT2 aus der Niere erlaubte den Nachweis der Expression dieses Transportproteins auch in Geweben, für die eine Existenz von PepT2 nicht bekannt war, bzw. für die es keine funktionelle Hinweise auf einen Peptidtransporter gab. Zum "Screenen" dieser Gewebe wurden die Northern-Blot-Analyse und die RT-PCR eingesetzt.

Im Northern-Blot konnte mit einer PepT2-spezifischen Digoxigenin-markierten Antisense Hybridisierungssonde im Gehirn, in der Lunge, in der Leber und im Herzen eine mRNA mit der gleichen Größe (4,8 kb) wie in der Niere nachgewiesen werden (Abb. 5a).

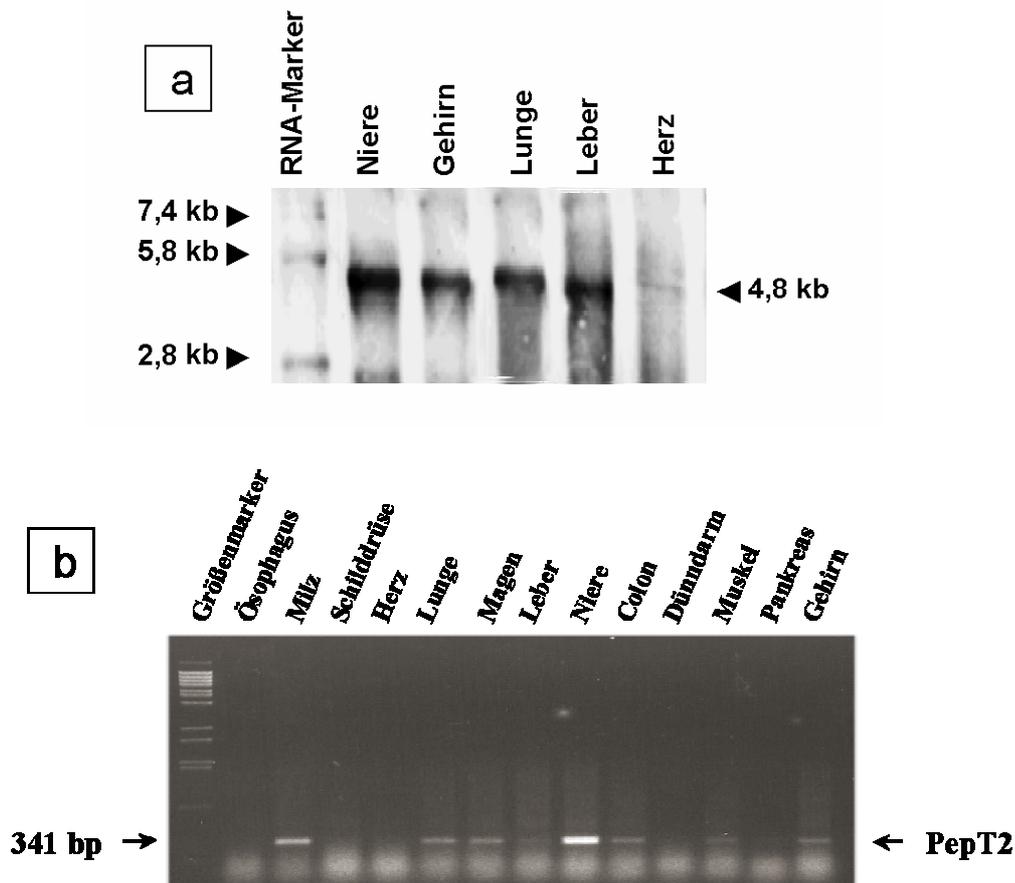


Abbildung 5: Nachweis der PepT2-mRNA in verschiedenen Geweben der Ratte mittels Northern-Blot-Analyse (a) und RT-PCR (b)

a: 5 µg Gesamt-RNA bzw. 2,5 µg Poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Geweben der Ratte wurden auf einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde über Nacht mit einer 340 bp langen PepT2-spezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Antisensesonde bei 68°C hybridisiert und nach mehrmaligem Waschen auf einem Röntgenfilm exponiert.

b: 5 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Ratte wurden unter Verwendung von 10 pmol PepT2-spezifischer Antisenseprimer zur RT-Reaktion eingesetzt. In der folgenden PCR-Reaktion wurde der erhaltene Erststrang nach Denaturierung der Proben (1 min 95°C) durch anschließende Zugabe von 10 pmol PepT2-spezifischem Senseprimer und 2 U Taq DNA-Polymerase in 35 Temperaturzyklen amplifiziert (1 min 95°C; 2 min 55°C, 1 min 72°C). Ein Aliquot der Proben wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe (nicht abgebildet); als Positivkontrolle wurden die gleichen Proben mit GAPDH-Primern amplifiziert. Die jeweiligen Primersequenzen sind im Methodenteil dieser Arbeit angegeben.

Als weitere, sensitivere Nachweismethode der PepT2-mRNA wurde die RT-PCR Technik eingesetzt. Das mit PepT2-spezifischen Primern amplifizierte, ca. 341 bp lange PCR-Fragment, konnte in Milz, Lunge, Magen, Leber, Niere, Colon, Muskel und Gehirn der Ratte nachgewiesen werden, während in Ösophagus, Schilddrüse, Herz, Dünndarm und Pankreas kein PCR-Produkt detektierbar war (Abb. 5b).

3.2 Zelluläre Lokalisation des Peptidtransporters (PepT2) in der Niere

Zunächst waren der Nachweis und die Lokalisation der PepT2-mRNA und des PepT2-Proteins in der Niere von Bedeutung. Hierbei interessierte vor allem, in welchen Regionen bzw. in welchen Zellen der Niere die mRNA und das Protein exprimiert werden. Zudem dienten RNA-Präparationen bzw. Proteinpräparationen aus der Niere als Positivkontrolle sowohl für die verwendeten Hybridisierungssonden und die ausgewählten RT-PCR-Primer, als auch für den Nachweis der Spezifität des eingesetzten PepT2-Antiserums.

Abbildung 6 zeigt den Nachweis der Funktionalität und der Spezifität des hergestellten PepT2-Antiserums. Dazu wurden Proteinpräparationen aus der Nierentubulummembran (NTM) der Rattenniere sowie Proteinpräparationen aus dem Dünndarm (DDM) der Ratte einer Western-Blot-Analyse unterzogen. In der NTM-Präparation wurde mit dem PepT2-Antiserum ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 97 kDa detektiert, während das Präimmunserum weder in der Proteinpräparation der Niere noch in der des Dünndarms ein Protein erkannte. Das verwendete PepT2-Antiserum reagierte mit keinem Protein der aufgetragenen Proteinpräparation aus dem Dünndarm.

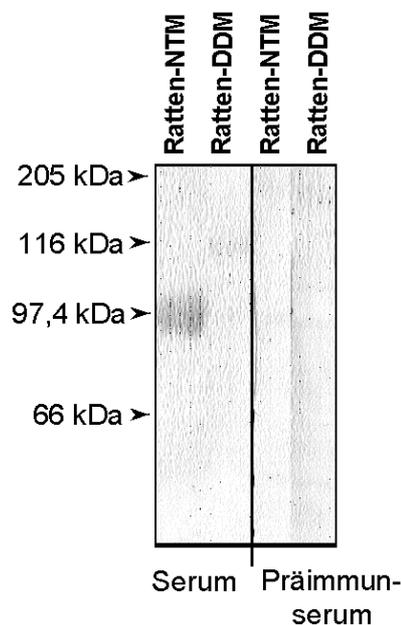


Abbildung 6: Immunologischer Nachweis des PepT2-Proteins mit PepT2-Antiserum bzw. Präimmunserum

Je Laufspur wurden 50 µg der Proteinpräparation aufgetragen und durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Der Blot wurde mit PepT2-Antiserum bzw. Präimmunserum in einer Verdünnung von 1:1000 und mit dem Detektionsantikörper anti-Kaninchen IgG-PO-Konjugat in einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit dem AEC-System.

Um die PepT2-mRNA Expression in der Niere genauer zu lokalisieren, wurde eine in-situ-Hybridisierung an Gefrierschnitten der Rattenniere mit einer Digoxigenin-markierten RNA-Antisense-Hybridisierungssonde durchgeführt. Abb. 7 a-c zeigt die PepT2-mRNA Expression in den proximalen und distalen Tubuli der Niere, sowie in einigen Zellen der Glomeruli. Eine Immunolokalisation des PepT2 Proteins auf Parallelschnitten zeigt die PepT2-Immunoreaktivität in den gleichen Zellstrukturen wie die in-situ-Hybridisierung (Abb. 7 d).

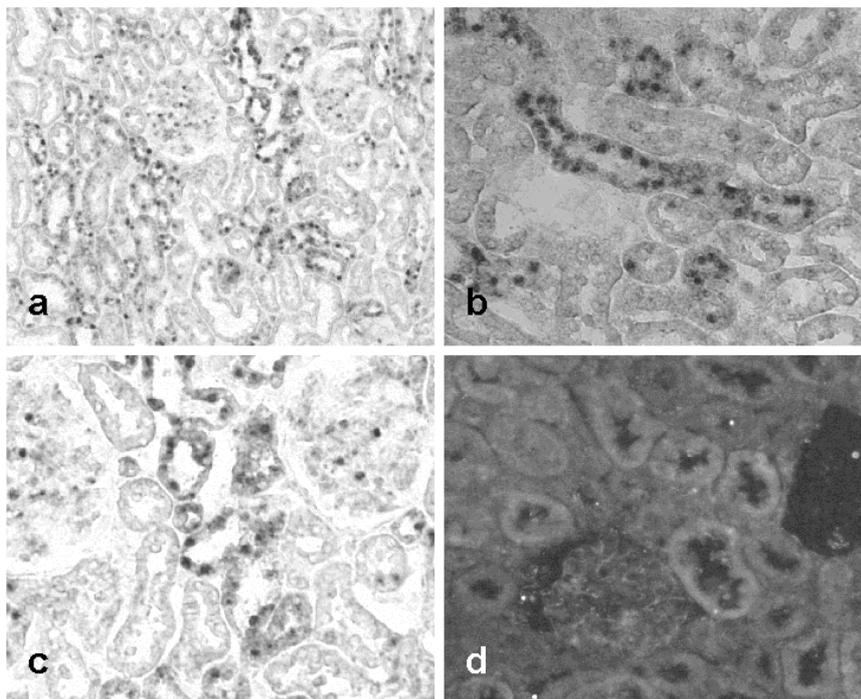


Abbildung 7: Zelluläre Lokalisation der PepT2-mRNA und der PepT2 Immunoreaktivität in der Rattenniere

5 μm dicke Gefrierschnitte der Rattenniere wurden mit PepT2-spezifischen Antisense Sonden hybridisiert (a-c) bzw. mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert (d). Die Digoxigenin-markierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen; das Antiserum wurde mit einem sekundären, Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert. Mit der Sense Sonde bzw. dem Präimmunserum wurde kein Signal erhalten (nicht abgebildet).

3.3 Peptidtransporter im Gehirn

3.3.1 Nachweis der PepT2-mRNA

Aufgrund einer ausgeprägten PCR-Bande des PepT2-Fragments und der Bande im Northern-Blot im Gehirn (Abb. 5) wurde sich zunächst verstärkt auf dieses Organ konzentriert.

Hierzu wurde aus Gehirnen verschiedener Spezies Gesamt-RNA präpariert und mit Hilfe von PepT2-spezifischen Primern eine RT-PCR durchgeführt. Dabei zeigte sich in beiden Organen auf der Höhe von 341 bp eine Bande (Abb. 8 a). Zusätzlich war in einer Northern-Blot-Analyse mit einer PepT2-spezifischen Sonde ebenfalls im Gehirn eine mRNA der gleichen Größe wie in der Niere nachweisbar (Abb. 8 b). Der Einsatz von Poly(A)⁺-RNA bei der Northern-Blot-Analyse, die nur etwa 2-4% der Gesamt-RNA ausmacht, diente einer Steigerung der Nachweisempfindlichkeit.

Bei der anschließenden Sequenzierung der PCR-Fragmente zeigte sich, daß die in der RT-PCR erscheinende Bande tatsächlich weitgehend mit der entsprechenden mRNA aus der Niere identisch ist, woraus sich schließen läßt, daß der renale Peptidtransporter auch im Gehirn exprimiert wird und vermutlich keine gehirnspezifische Variante darstellt (Abb. 9).

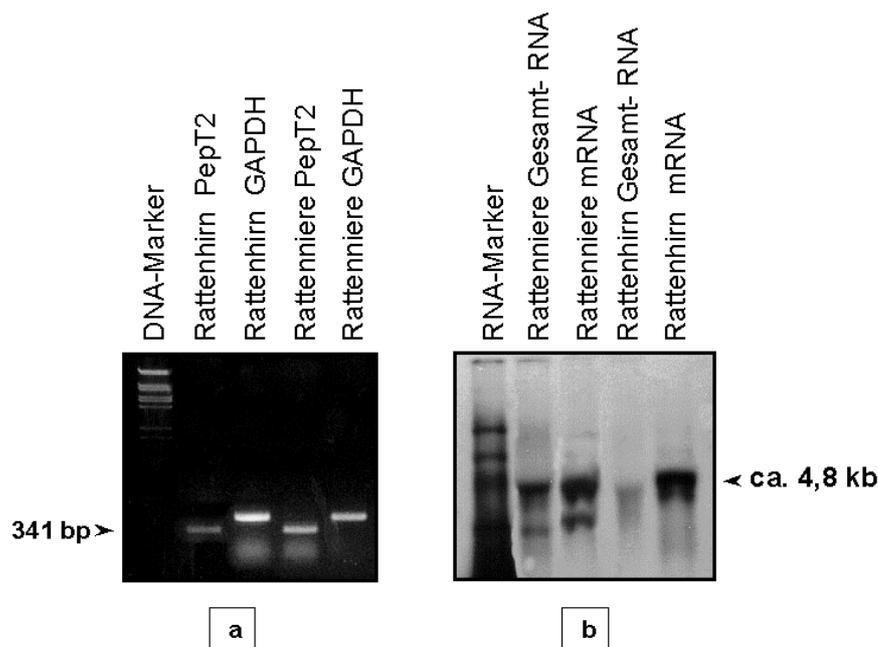


Abbildung 8: Nachweis von PepT2-mRNA in Niere und Gehirn der Ratte mittels (a) RT-PCR und (b) Northern-Blot-Analyse

a: 5 µg Gesamt-RNA aus Rattengehirn bzw. Rattenniere wurden unter Verwendung von 10 pmol PepT2-spezifischer Antisenseprimer zur RT-Reaktion eingesetzt. In der folgenden PCR-Reaktion wurde der erhaltene Erststrang nach Denaturierung der Proben (1 min 95°C) durch anschließende Zugabe von 10 pmol PepT2-spezifischem Senseprimer und 2 U Taq DNA-Polymerase in 35 Temperaturzyklen amplifiziert (1 min 95°C; 2 min 55°C, 1 min 72°C). Ein Aliquot der Proben wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe (nicht abgebildet); als Positivkontrolle wurden die gleiche Proben mit GAPDH-Primern durchgeführt. Die jeweiligen Primersequenzen sind im Methodenteil dieser Arbeit angegeben.

b: 5 µg Gesamt-RNA bzw. 2,5 µg Poly(A)⁺-RNA aus Rattengehirn bzw. Rattenniere wurde auf einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde über Nacht mit einer 340 bp langen PepT2-spezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Antisensesonde bei 68°C hybridisiert und nach mehrmaligem Waschen auf einem Röntgenfilm exponiert.

1167	ctagcatgcc	tggcatttgc	agctgcagca	actgtagaaa	taaaaataaa	tgaatggcc
1	ctagcatgcc	tggcatttgc	agctgcagca	actgtagaaa	taaaaataaa	tgaatggcc
1	ctagcatgcc	tggcatttgc	agctgcagca	actgtagaaa	taaaaataaa	tgaatggcc
1227	ccaccccagc	caggatccca	agagattctc	ctacaagtct	tgaacctggc	agatgatgag
61	ccaccccagc	caggatccca	agagattctc	ctacaagtct	tgaacctggc	agatgatgag
61	ccaccccagc	caggatccca	agagattctc	ctacaagtct	tgaacctggc	agatgatgag
1287	gtgaagctga	cagtgtctggg	aaacaataat	aactctctat	tggcagattc	catcaaatcc
121	gtgaagctga	cagtgtctggg	aaacaataat	aactctctat	tggcagattc	catcaaatcc
121	gtgaagctga	cagtgtctggg	aaacaataat	aactctctat	tggcagattc	catcaaatcc
1347	tttcagaaaa	cacctcacta	ttccaaaata	caactgaata	caaaaagcca	agatttctac
181	tttcagaaaa	cacctcacta	ttccaaaata	caactgaata	caaaaagcca	agatttctac
181	tttcagaaaa	cacctcacta	ttccaaaata	caactgaata	caaaaagcca	agatttctac
1407	ttccacctga	aatatcacia	tttgtctata	tacactgaac	attctgtaga	ggagagaaac
241	ttccacctga	aatatcacia	tttgtctata	tacactgaac	attctgtaga	ggagagaaac
241	ttccacctga	aatatcacia	tttgtctata	tacactgaac	attctgtaga	ggagagaaac
1467	tggtacagtc	tgatcatccg	agaggatggg	aaaagtatct	ccagcataat	ggtaaaggat
301	tggtacagtc	tgatcatccg	agaggatggg	aaaagtatct	ccagcataat	ggtaaaggat
301	tggtacagtc	tgatcatccg	agaggatggg	aaaagtatct	ccagcataat	ggtaaaggat
1527	atggaaaatg	aaacaactta	tgggatgaca	gctataaggt	ttattaacac	tttgcaagaa
361	atggaaaatg	aaacaactta	tgggatgaca	gctataaggt	ttattaacac	tttgcaagaa
361	atggaaaatg	aaacaactta	tgggatgaca	gctataaggt	ttattaacac	tttgcaagaa
1587	aatgtcaaca	tctccctggg	taagatatac	tccctcaatg	ttggtgaaaa	ctatgggggtg
421	aatgtcaaca	tctccctggg	taagatatac	tccctcaata	ttggtgaaaa	ctatgggggtg
421	aatgtcaaca	tctccctggg	taagatatac	tccctcaata	ttggtgaaaa	ctatgggggtg
1647	tctgcttaca	gaactgtgca	aagaggagaa	tacctgcag	tcattgttaa	aacagaagat
481	tctgcttaca	gaactgtgca	aagaggagaa	tacctgcag	tcattgttaa	aacagaagat
481	tctgcttaca	gaactgtgca	aagaggagaa	tacctgcag	tcattgttaa	aacagaagat
1707	aaagactttt	ctttgaatct	gggtctgcta	gactttgggtg	cttcgtacct	gtttgttata
541	aaagactttt	ctttgaatct	gggtctgcta	gactttgggtg	cttcgtacct	gtttgttata
541	aaagactttt	ctttgaatct	gggtctgcta	gactttgggtg	cttcgtacct	gtttgttata
1767	actaatagca	ccaagcaggg	acttcaggcc	tggaaagatgg	aagacattcc	agccaacaaa
601	actaatagca	ccaagcaggg	acttcaggcc	tggaaagatgg	aagacattcc	agccaacaaa
601	actaatagca	ccaagcaggg	acttcaggcc	tggaaagatgg	aagacattcc	agccaacaaa
1827	gtttccattg	catggcaact	gccacagtat	gccctggtaa	cagctgggga	ggtcatgttc
661	gtttccattg	catggcaact	gccacagtat	gccctggtaa	cagctgggga	ggtcatgttc
661	gtttccattg	catggcaact	gccacagtat	gccctggtaa	cagctgggga	ggtcatgttc
1887	tctgtcacag	g				
721	tctgtcacag	g				
721	tctgtcacag	g				

PepT2-cDNA (original)
 RT-PCR-Clon der Nieren-RNA
 RT-PCR-Clon der Gehirn-RNA

Abbildung 9: Sequenzvergleich der aus der RT-PCR erhaltenen PepT2-Clone von Niere und Gehirn sowie der Sequenz der PepT2-cDNA

Als nächste Fragestellung wurde geprüft, in welchen Gehirnregionen respektive Zelltypen die mRNA des Transporters nachgewiesen werden kann. Dazu wurde die in-situ-Hybridisierungstechnik eingesetzt.

An eingebetteten Dünnschnitten des Gehirns von Kaninchen, Ratte und Mensch wurde die Lokalisation des Peptidtransporters mit spezifischen DIG-markierten RNA-Hybridisierungssonden nachgewiesen. Menschliche Gehirnschnitte wurden uns freundlicherweise von Prof. H. Koepsell, Institut für Anatomie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

5 µm Kryostat-Gewebedünnschnitte wurden auf silanisierte Objektträger aufgebracht und nach Fixierung mit den jeweiligen PepT2 Sense- oder Antisense-Hybridisierungssonden hybridisiert. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgte mittels eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Konjugats und NBT und BCIP als Substrate.

Zunächst wurde sichergestellt, daß die für die in-situ-Hybridisierung eingesetzte Sonde spezifisch nur die mRNA von PepT2 erkennt. Dies erfolgte 1. durch Hybridisierung mit einer spezifischen PepT2-RNA-Sense-Hybridisierungssonde 2. durch einen RNase-Verdau vor der Hybridisierung und 3. durch Weglassen der markierten Sonde aus der Hybridisierungslösung. Alle drei Ansätze ergaben keine Signale, woraus geschlossen werden kann, daß die Hybridisierungssonde keine unspezifischen Signale produzierte und keine endogene alkalische Phosphatase-Aktivität mehr in den Schnitten vorhanden war.

Aus Abbildung 10 geht hervor, daß nur die Hybridisierung mit der RNA-Antisense-Sonde zu einem spezifischen Nachweis der PepT2-mRNA führt.

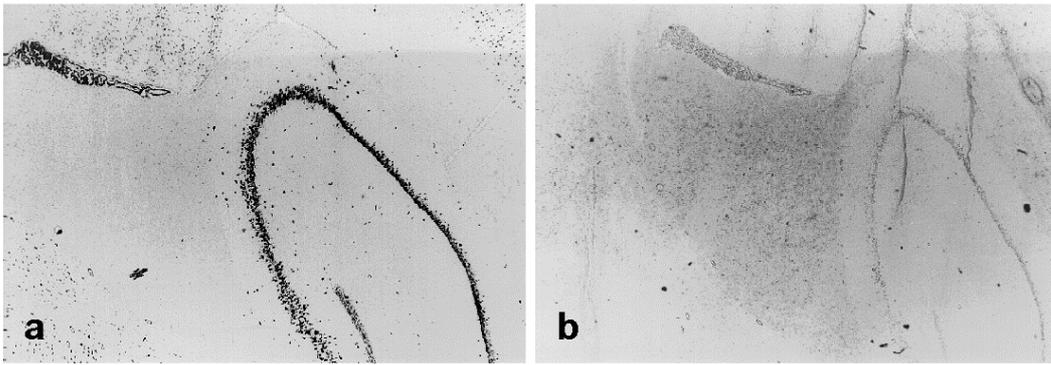


Abbildung 10: Spezifität des Nachweises von PepT2-mRNA - Vergleich zwischen Sense und Antisense

5 µm dicke Gefrierschnitte des Kaninchen-Großhirns wurden (a) mit einer PepT2-spezifischen Antisense Sonde bzw. (b) mit einer PepT2 spezifischen Sense Sonden hybridisiert. Die Digoxigenin-markierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen.

Die Lokalisation der PepT2-mRNA im Gehirn wurde in den Spezies Mensch, Kaninchen und Ratte durchgeführt. Wie den folgenden Abbildungen (Abb. 11 und Abb. 12) entnommen werden kann, ließ sich die mRNA des renalen Peptidtransporters in allen drei untersuchten Spezies vor allem in Neuronen des Hippocampus, des Cortex und des Kleinhirns nachweisen. Auch in der Großhirnrinde konnte der Peptidtransporter in neuronalen Strukturen lokalisiert werden, während in Gliazellen kein Signal zu gefunden wurde. Außerdem wurde ein starkes Signal in den Epithelzellen des Plexus choroideus nachgewiesen. Astrogliareiche Domänen des Gehirns ließen keine Reaktion erkennen.

Abbildung 11 zeigt die Lokalisation der PepT2-mRNA in verschiedenen Regionen des Kaninchenhirns. Hierbei erhielt man mit der Antisense-Sonde ein starkes Signal in Neuronen des Cortex (a), in Pyramidenzellen und Granularzellen des Hippocampus (b) sowie in der Region des Bulbus olfaktorius (c). Im Bildausschnitt (e) wird darüber hinaus ein starkes Hybridisierungssignal in der Region des Plexus choroideus erkennbar. Bei dieser mit einer Epithelschicht ausgekleideten Struktur handelt es sich um eine Gehirnregion, die am Austausch von Nährstoffen, Fremdstoffen und Elektrolyten zwischen der cerebrospinalen Flüssigkeit und dem Blut beteiligt ist. Mit der Sense-Sonde (d) wurde kein Hybridisierungssignal erhalten.

Abbildung 12 dokumentiert, daß die PepT2-mRNA sowohl im Gehirn des Menschen (a,b) als auch im Gehirn der Ratte (c, d) vorkommt und daß die Verteilung der Transkripte der im Gehirn des Kaninchens entspricht. Exemplarisch für den Nachweis der PepT2-mRNA ist hier eine Region aus der Großhirnrinde des Menschen abgebildet, in der ein deutliches Hybridisierungssignal in den Pyramidenzellen zu sehen ist (a). Ein Ausschnitt aus der Kleinhirnregion der Ratte zeigt den Nachweis der PepT2 Transkripte in Granularzellen der Granularschicht und in neuronalen Strukturen der Molekularzellschicht (c). In beiden Spezies blieben die Kontrollschnitte, die mit der Sense-Sonde hybridisiert wurden, ohne Anfärbung (b,d).

Das Expressionsmuster des Peptidtransporters in ähnlichen Gehirnregionen bei allen drei untersuchten Spezies läßt vermuten, daß es sich dabei um einen hochkonservierten Prozeß handelt.

In keiner der untersuchten Spezies konnte in den Endothelzellen der Blut-Hirnschranke die PepT2-mRNA nachgewiesen werden, so daß man davon ausgehen kann, daß einem möglichen Transport von Dipeptiden vom Blut in das Gehirn durch Vermittlung von PepT2 keine Bedeutung zukommt.

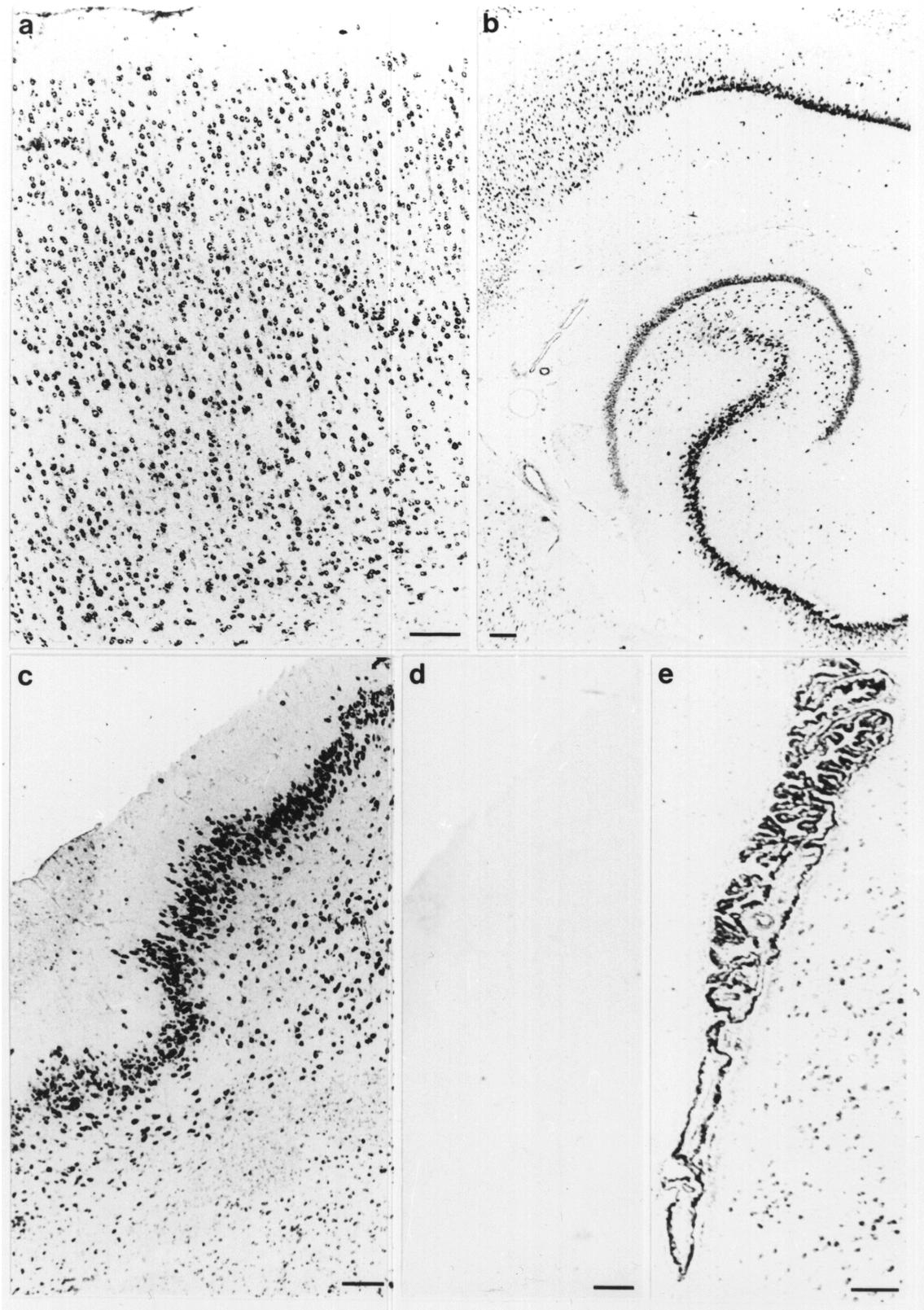


Abbildung 11: Nachweis von PepT2-spezifischer mRNA in Gewebedünnschnitten aus dem Gehirn des Kaninchens

5 μm dicke Gefrierschnitte des Kaninchen-Großhirns wurden mit PepT2-spezifischen Antisense Sonden (a-c, e) bzw. mit einer PepT2 spezifischen Sense Sonde hybridisiert (d). Die Digoxigenin-markierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen.

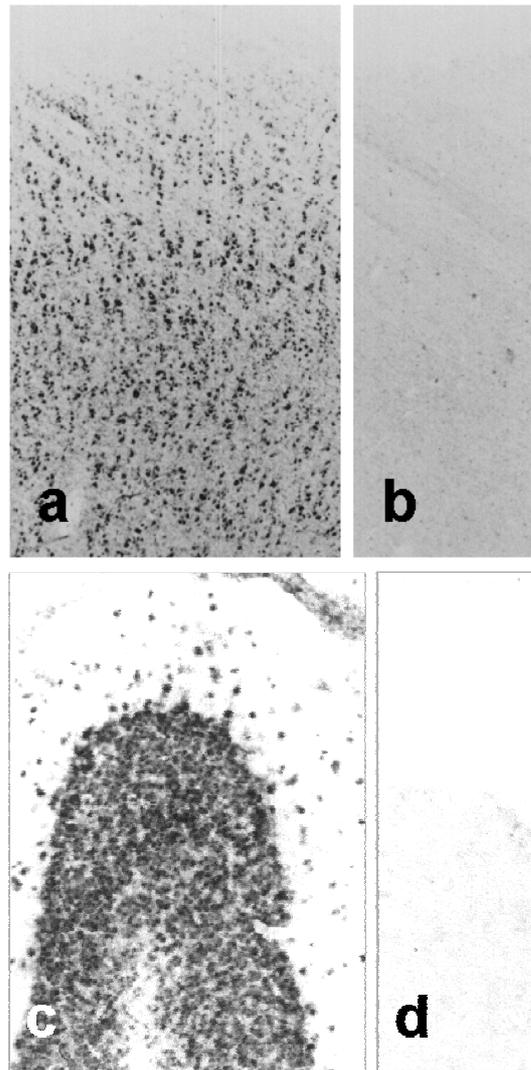


Abbildung 12: Nachweis von PepT2-spezifischer mRNA in Gewebedünnschnitten aus dem Gehirn des Menschen und der Ratte

5 μm dicke Gefrierschnitte aus unterschiedlichen Gehirnregionen des Menschen und der Ratte wurden mit einer PepT2-spezifischen Antisense Sonde (a,c) bzw. mit einer PepT2 spezifischen Sense Sonde (b, d) hybridisiert. (a) und (b) zeigt Gewebedünnschnitte aus dem humanen Gehirn während bei (c) und (d) Gewebedünnschnitte aus dem Rattenhirn zu sehen sind. Die Digoxigenin-markierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen.

Außerhalb des Gehirns konnten PepT2-Transkripte in weiteren neuronalen Strukturen nachgewiesen werden. Abbildung 13 dokumentiert den Nachweis der PepT2-mRNA in Spinalganglien von 3 Tage alten Ratten. Auch hier erhält man bei der Hybridisierung mit PepT2-spezifischen Sonden ein Hybridisierungssignal, das ausschließlich auf die neuronalen Strukturen beschränkt ist (a).

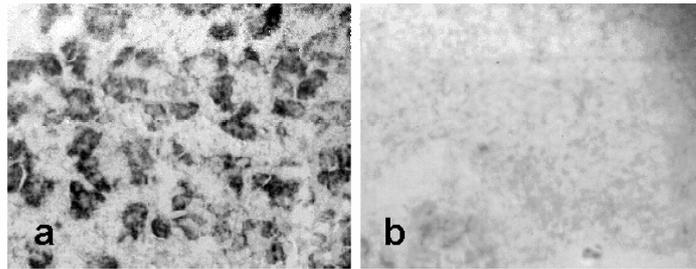


Abbildung 13: Nachweis von PepT2-spezifischer mRNA in Gewebedünnschnitten aus Rückenmarksganglien 3 Tage alter Ratten

5 µm dicke Gefrierschnitte Spinalganglien von 3 Tage alten Ratten wurden mit einer PepT2-spezifischen Antisense Sonde (a) bzw. mit einer PepT2 spezifischen Sense Sonde hybridisiert (b). Die Digoxigeninmarkierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen.

3.3.2 Nachweis auf Proteinebene

Zusätzlich zum Nachweis der PepT2-Transkripte auf mRNA-Ebene wurde mittels eines spezifischen Peptid-Antiserums der Nachweis des Transporters auch auf Proteinebene geführt.

Als erstes war von Interesse, ob es sich bei dem im Gehirn gefundenen Peptidtransporter um ein mit dem in der Niere exprimierten Peptidtransporter identisches Protein handelt.

Dazu wurde eine Western-Blot Analyse von einer Gehirnmembran-Präparation und einer Nierenbürstensaummembran-Präparation durchgeführt. Die Membranproteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet. In beiden Membranpräparationen wurde mit einem im Kaninchen generierten PepT2-Antiserum ein Protein mit einer Molmasse von 97,6 kDa (Abb. 14 a) nachgewiesen.

Wurde in diesem Versuch anstelle des Antiserums Präimmunserum verwendet, konnte kein Signal nachgewiesen werden (Abb. 14 b); das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn das Präimmunserum vorher mit dem spezifischen Antigen blockiert wurde (ohne Abbildung).

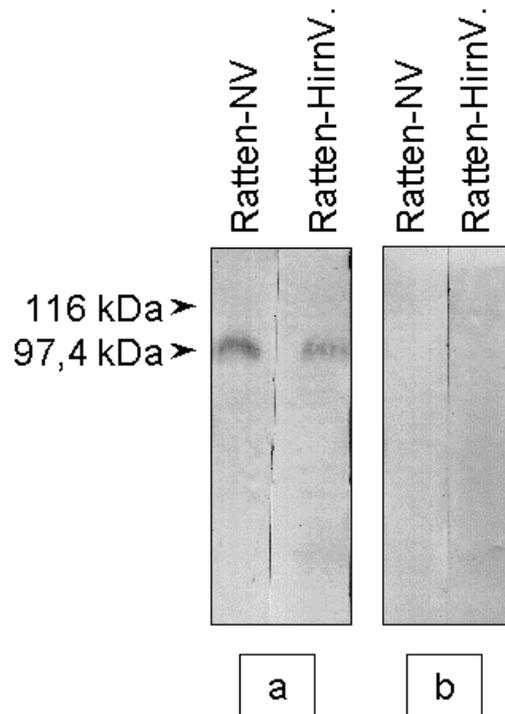


Abbildung 14: Nachweis des PepT2-Proteins in Membranpräparationen des Rattenhirns und der Rattenniere mit einem spezifischen PepT2-Antiserum

Je Laufspur wurden 50 µg der Proteinpräparation aufgetragen und durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Der Blot wurde mit PepT2-Antiserum (a) bzw. Präimmunsereum (b) in einer Verdünnung von 1:1000 und mit dem Detektionsantikörper anti-Kaninchen IgG-PO-Konjugat in einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit dem AEC-System.

Durch Immunolokalisation von PepT2 in Gewebedünnschnitten des Rattenhirns (Abb. 15) konnte das PepT2-Protein in den gleichen Strukturen nachgewiesen werden, in denen zuvor durch in-situ-Hybridisierung auch die PepT2-mRNA lokalisiert werden konnte. Es handelt sich hierbei ausschließlich um neuronale Strukturen der Großhirnrinde (b) und des Kleinhirns. Wie bei der in-situ-Hybridisierung konnte auch mit dem PepT2-spezifischen Antiserum keine PepT2-Immunoreaktivität in Gliazellen gezeigt werden. Weder mit dem Präimmunsereum noch mit dem zuvor präabsorbierten Antiserum konnte ein spezifisches Signal erhalten werden.

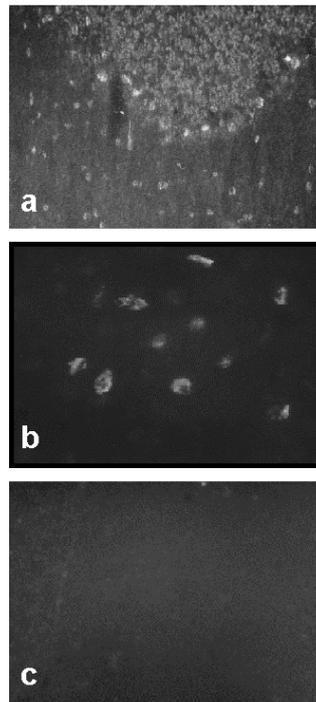


Abbildung 15: Nachweis des PepT2 Proteins in Gewebedünnschnitten des Rattenhirns

5 μm dicke Gefrierschnitte des Rattengehirns wurden mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert (a,b). Das Antiserum wurde mit einem sekundären, Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert. Mit dem Prämimmunserum wurde kein Signal erhalten (c).

3.3.3 Funktioneller Nachweis von PepT2

Zur Klärung der möglichen physiologischen Rolle von PepT2 im Gehirn wurde nun geprüft, inwieweit der Transporter in der Lage ist, ausgewählte Substrate zu transportieren, für die eine neuroaktive Funktion belegt ist oder vermutet wird (Myers 1994, Kranich et al. 1996, Smyth et al. 1993, Parish et al. 1983, Ueda et al. 1989, Sassoe-Pongetto et al. 1993)

3.3.3.1 Aufnahmeexperimente am Organ (ex vivo)

Durch den Einsatz eines fluoreszenz-markierten Dipeptidkonjugats konnte die Aufnahme von Dipeptiden in zelluläre Strukturen des Gehirns nachgewiesen werden. Dazu wurden 200 μm dicke Schnitte aus dem Rattenhirn mit 2 μM β -Ala-Lys-AMCA inkubiert, was in der Aufnahme und in der intrazellulären Akkumulation des Dipeptids ausschließlich in neuronalen Strukturen (Abb. 16 a) und in Zellen des Plexus

Choroideus resultierte. Die Signale wurden sowohl in Quetschpräparaten, die sofort nach der Inkubation unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden, nachgewiesen, als auch in 5 μm dicken Gefrierschnitten, die aus Inkubationspräparaten angefertigt wurden.

Durch gleichzeitige Inkubation der Gehirnschnitte in Gegenwart von 2 μM β -Ala-Lys-AMCA und 50 μM Gly-Sar wurde das Signal deutlich vermindert (Abb. 16 b). Wurde der Inkubationslösung kein markiertes Dipeptid zugesetzt, war in den neuronalen Strukturen kein Fluoreszenzsignal nachweisbar.

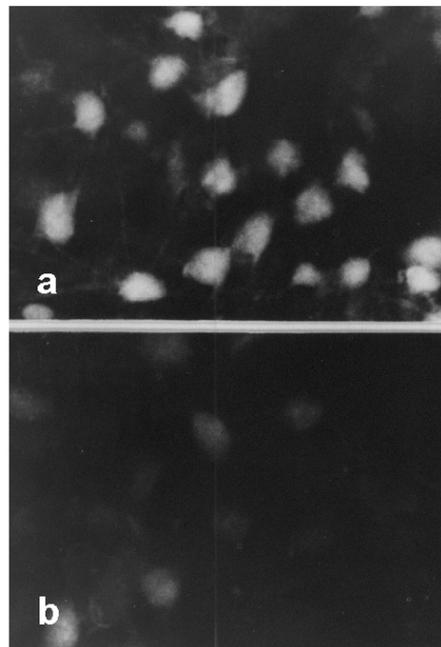


Abbildung 16: Aufnahme von β -Ala-Lys-AMCA in neuronale Zellen des Ratten-Gehirns

200 μm dicke Vibratomschnitte des Rattenhirns wurden mit 2 μM AMCA-markiertem Dipeptid inkubiert. (a) zeigt die Aufnahme des fluoreszenz-markierten Dipeptids ausschließlich in Neuronen, während bei gleichzeitiger Inkubation von 2 μM β -Ala-Lys-AMCA und 50 μM Glycyl-Sarkosin die Aufnahme stark gehemmt wurde (b)

3.3.3.2 Elektrogener Transport von Dipeptiden in PepT2-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten

In einem weiteren Experiment wurde der direkte Nachweis des Transports ausgewählter Neuropeptide unter Anwendung des Oozytenexpressionsmodells geführt. Hierzu wurden Substrate gewählt, für die eine Rolle bei der Neurotransmission belegt ist oder zumindest vermutet wird. Die neuroaktiven Dipeptide werden vorwiegend als solche mit Transmitteraufgaben beschrieben, wobei sie vor allem bei der Prozessierung

größerer Neuropeptide im Gehirn entstehen (Myers 1994, Smyth et al. 1983, Parisch et al. 1983)

Die cRNA des Transporters wurde in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert und nach drei Tagen die funktionelle Expression der Transportaktivität durch Messung der während der Substrattranslokation generierten Einwärtsströme bestimmt. Die Perfusion der Oozyten mit 1 mM freiem Histidin oder Glutamin verursachte keine meßbaren Einwärtsströme (Abb. 17 a). Im Gegensatz dazu wurden mit 1 mM Carnosin, Tyrosyl-Arginin, Cysteinyl-Glycin oder Glycyl-Glutamin Einwärtsströme von 100 bis 150 nA gemessen (Abb. 17 b). Die Dosisabhängigkeit des Transports wird exemplarisch für Glycyl-Glutamin gezeigt, wobei bei einer Substratkonzentration von $> 500 \mu\text{M}$ das Maximum erreicht wurde (Abb. 17 c). Bei wasserinjizierten Kontrollloocyten konnte bei Substratperfusion kein Einwärtsstrom gemessen werden (ohne Abbildung).

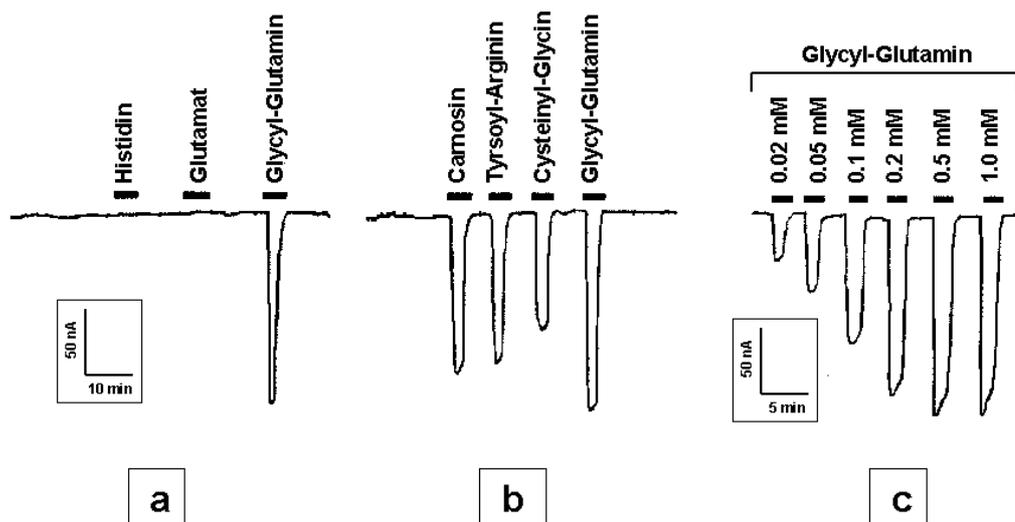


Abbildung 17: Messung der Einwärtsströme beim Transport „neuroaktiver“ Dipeptide in PepT2-exprimierenden Oozyten

50 nl (5 ng) PepT2-cRNA wurde in die Oozyten injiziert und 3 Tage nach der Injektion die vom Transporter generierten Transportströme während der Substrattranslokation gemessen. (a, b) zeigt die durch den Transport verschiedener Dipeptide verursachten Einwärtsströme, während bei (c) die Dosisabhängigkeit des Transports exemplarisch für Gly-Gln zu sehen ist.

Aus Abbildung 17 wird erkennbar, daß die Dipeptide Carnosin, Tyrosyl-Arginin, Cysteinyl-Glycin und Glycyl-Glutamin mit positivem Einwärtsstrom transportiert werden und damit ohne Zweifel als Substrate des Peptidtransporters fungieren.

3.3.3.3 Zelllinien

Für eine weitere funktionelle Charakterisierung des Peptidtransporters in neuronalen Zellen wurden drei transformierte murine und humane Zelllinien in Zellkultur auf die Anwesenheit eines Peptidtransporters mittels der RT-PCR und anschließenden Transportstudien untersucht.

Folgende Zelllinien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Schätzl, Max-von-Pettenhofer-Institut, München zur Verfügung gestellt:

N₂a – Zelllinie (ATCC) = murine Neuroblastomzellen

IMR-Zelllinie (ATCC) = humane Neuroblastomzellen

GT1-Zelllinie (ATCC) = murine Hypothalamuszellen

Zum Nachweis, ob die ausgewählten Zelllinien auch den Peptidtransporter exprimieren, wurden die Zelllinien unter Standardbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert und die Gesamt-RNA der Zellen präpariert.

Jeweils 5 µg Gesamt-RNA wurden für eine RT-PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Plasmid mit der insertierten PepT2-cDNA; als Negativkontrolle wurde eine Wasserprobe verwendet.

Bei den 3 untersuchten Zelllinien konnte nur in der murinen Hypothalamus-Zelllinie GT1 die PepT2-mRNA mit schwachem Signal nachgewiesen werden (Abb. 18).

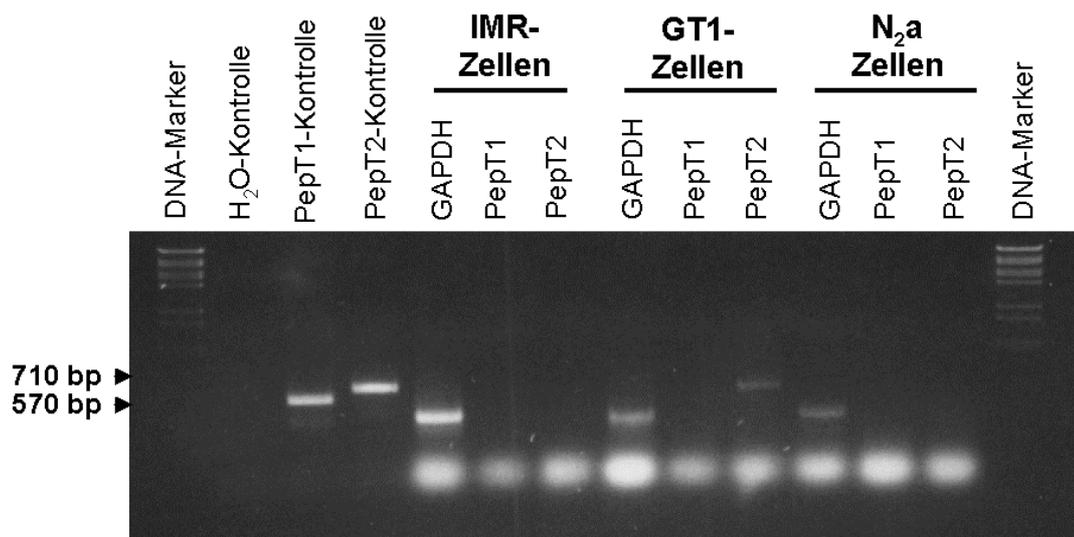


Abbildung 18: Nachweis der PepT2-mRNA in neuronalen Zelllinien durch RT-PCR

5 µg Gesamt-RNA, die aus verschiedenen neuronalen Zelllinien präpariert wurden, dienten unter Verwendung von 10 pmol PepT1- und PepT2-spezifischer Antisenseprimer zur RT-Reaktion. In der folgenden PCR-Reaktion wurde der erhaltene Erststrang nach Denaturierung der Proben (1 min 95°C) durch anschließende Zugabe von 10 pmol PepT1- bzw. PepT2-spezifischem Senseprimer und 2 U Taq DNA-Polymerase in 35 Temperaturzyklen amplifiziert (1 min 95°C; 2 min 55°C, 1 min 72°C). Ein Aliquot der Proben wurde auf einem 1%iges Agarosegel analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe, als Positivkontrolle wurden die gleichen Versuche mit GAPDH-Primern durchgeführt. Die jeweiligen Primersequenzen sind im Methodenteil dieser Arbeit angegeben.

Nachdem die Expression der PepT2-mRNA in der murinen Hypothalamus-Zelllinie GT1 nachgewiesen werden konnte, wurden Transportstudien mit radioaktiv markierten Dipeptiden durchgeführt.

GT1-Zellen wurden auf „sixwell“-Platten kultiviert bis sie konfluent waren. In einer Dreifachbestimmung wurden die Zellen parallel für 30 min bei 37°C mit ³H-D-Phe-Gln (Nachweis der Aufnahme), ³H-D-Phe-Gln/Cefadroxil, ³H-D-Phe-Gln/Gly-Gln (Verdrängung) oder ³H-D-Phe-Gln/Benzylpenicillin inkubiert.

Eine signifikante Peptidaufnahme anhand des Influxes des radioaktiv markierten Dipeptids ³H-D-Phe-Gln war nicht detektierbar. Damit war es leider nicht möglich, Funktionsstudien zur Aufnahme neuroaktiver Dipeptide an vitalen neuronalen Zellen durchzuführen.

3.4 Peptidtransporter in der Lunge

Das Vorkommen des protonengekoppelten Oligopeptidtransporters PepT2 wurde in Lungengewebe von Mensch, Ratte und Maus untersucht.

Mittels RT-PCR konnte die mRNA von PepT2 in Gesamt-RNA-Präparationen aus Lungengewebe nachgewiesen werden. Abbildung 19 a zeigt das Ergebnis einer Northern-Blot-Analyse aus der Niere und Lunge der Ratte. Bei beiden Organen ist eine Bande in identischer Höhe von ca. 4,8 kb zu sehen. Mittels RT-PCR konnte in der Rattenlunge eine Bande für PepT2 mit der Größe von 341 bp nachgewiesen werden, während der Nachweis mittels PepT1-spezifischen Primern negativ blieb (Abb. 19 b).

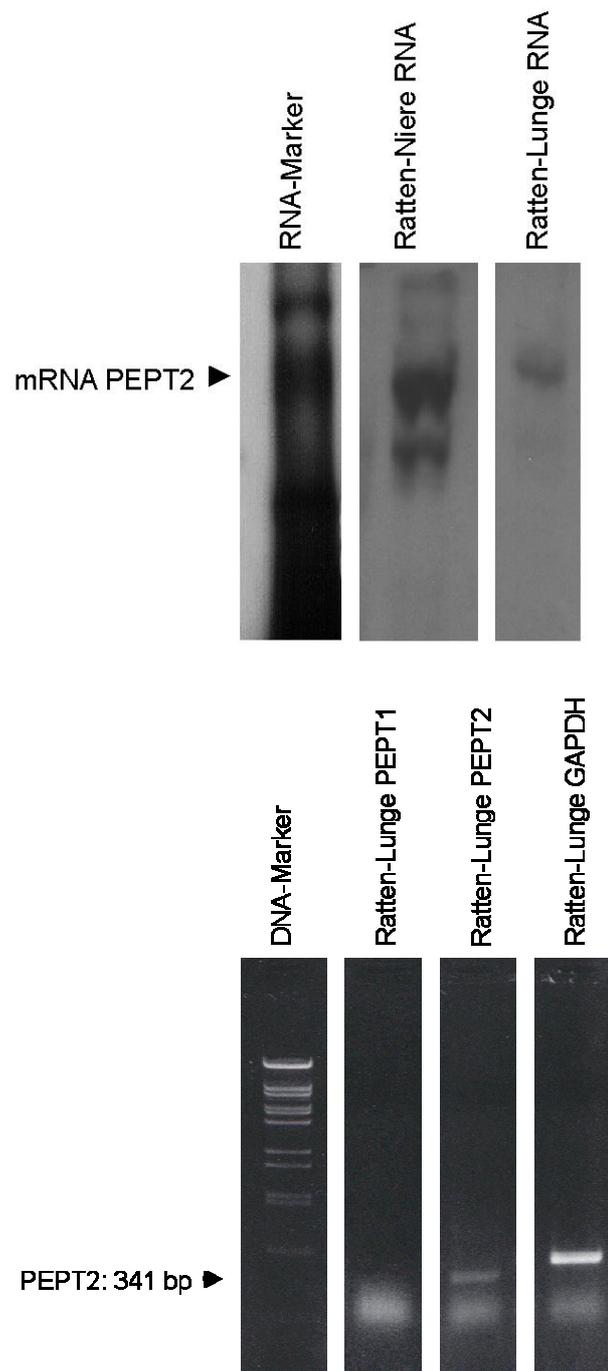


Abbildung 19: Nachweis der PepT2-mRNA durch Northern-Blot und RT-PCR in Lungengewebe

a: 5 μ g Gesamt-RNA aus der Rattenlunge wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde über Nacht mit einer 340 bp langen PepT2-spezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Antisenseprobe bei 68°C hybridisiert und nach mehrmaligem Waschen auf einem Röntgenfilm exponiert. Als Vergleich diente Gesamt-RNA aus der Rattenniere.

b: 5 μ g Gesamt-RNA aus der Rattenlunge wurden unter Verwendung von 10 pmol PepT1- und PepT2-spezifischer Antisenseprimer zur RT-Reaktion eingesetzt. In der folgenden PCR-Reaktion wurde der erhaltene Erststrang nach Denaturierung der Proben (1 min 95°C) durch anschließende Zugabe von

10 pmol PepT1- bzw. PepT2-spezifischen Senseprimer und 2 U Taq DNA-Polymerase in 35 Temperaturzyklen amplifiziert (1 min 95°C; 2 min 55°C, 1 min 72°C). Ein Aliquot der Proben wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe (nicht abgebildet); als Positivkontrolle wurden die gleichen Versuche mit GAPDH-Primern durchgeführt. Die jeweiligen Primersequenzen sind im Methodenteil dieser Arbeit angegeben.

Durch in-situ-Hybridisierung konnte die PepT2-mRNA in den oberen Atemwegen im Epithel der Luftröhre und der großen Bronchien lokalisiert werden, während im Bindegewebe und in der glatten Muskulatur keine Signale nachzuweisen waren. Abbildung 20 (b,c) demonstriert die Expression von PepT2 im Bronchialgewebe mit einer klaren Begrenzung auf die Epithelzellen und einer Färbung der apikalen Membran in der Immunocytochemie. In der peripheren Lunge konnten die Hybridisierungssignale Typ-II-Pneumozyten zugeordnet werden, während die Alveolarwand und der Alveolarraum kein Signal zeigten (Abb. 20 a).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der in-situ-Hybridisierung wurde eine PepT2-Immunoreaktivität im Bronchialepithel von großen und kleinen Bronchien in Ratten- und Mäusegewebe gefunden. Die Signale sind sowohl betont apikal als auch zytoplasmatisch zu finden. Im Alveolarbereich lassen sich zytoplasmatisch angefärbte Typ-II Pneumozyten erkennen. Das Endothel kleinerer Gefäße erscheint ebenfalls positiv (ohne Abbildung).

Bei den Gewebeschnitten war kein Signal zu finden, wenn das Antiserum vorher mit dem antigenen Peptid präabsorbiert wurde (ohne Abb.).

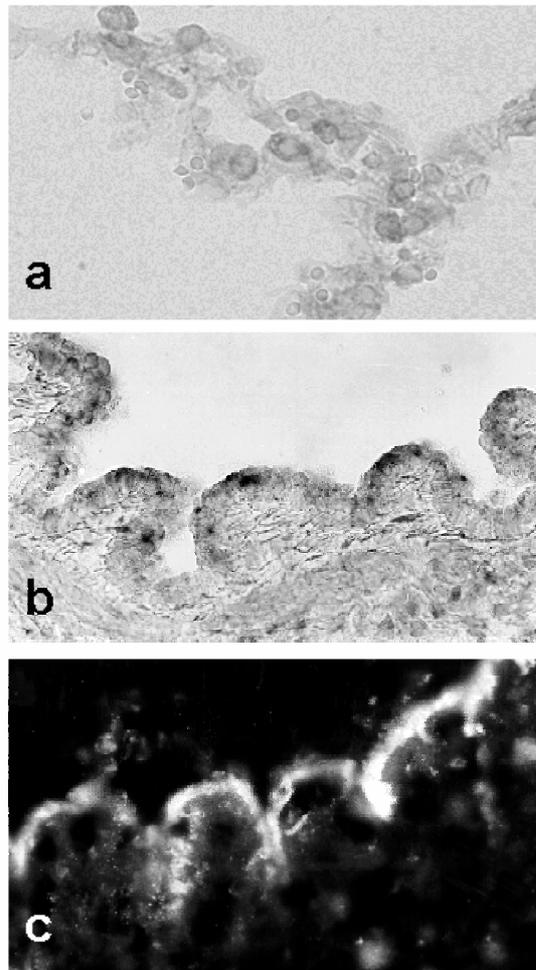


Abbildung 20: Nachweis der PepT2-mRNA und Immunreaktivität in Lungengewebe

5 μm dicke Gefrierschnitte der Rattenlunge wurden mit PepT2-spezifischen Antisense-Sonden hybridisiert (a-b) bzw. mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert (c). Die Digoxigenin-markierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen (a-b); das Antiserum wurde mit einem sekundären, Cy3-gekoppelten, gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert (c). Mit der Sense-Sonde bzw. dem Präimmunserum wurde kein Signal erhalten (nicht abgebildet).

Aufnahmestudien unter Verwendung des fluoreszierenden Dipeptidkonjugats β -Ala-Lys-AMCA (25 μM) an isolierten Mäusethoraces führten zum Nachweis der Funktionalität von PepT2 im Bronchialepithel und Typ-II-Pneumozyten. Die Akkumulation des fluoreszierenden Substrats im Zytoplasma der Zellen konnte darüber hinaus im Verdrängungsexperiment durch Zugabe von 1 mM unmarkiertem Cefadroxil oder alternativ 1 mM unmarkiertem Glycyl-Glutamin auf ein Minimum reduziert werden (ohne Abbildung).

3.5 Peptidtransporter im Pankreas

Die Untersuchung der mRNA Expression im Pankreas gestaltete sich schwierig, da die Präparation einer intakten Gesamt-RNA, wie sie zur Durchführung einer RT-PCR oder einer Northern-Blot-Analyse gebraucht wird, aufgrund der vielen Nukleasen im Pankreas nicht möglich war. Das gleiche gilt für die Durchführung einer in-situ-Hybridisierung, bei der die endogenen Pankreasnukleasen die RNA schneller abbauen als sie die Hybridisierungssonde binden kann.

Durch Einsatz des PepT2-Antiserums konnte im Pankreas der Ratte eine PepT2-Immunoreaktivität in den peripheren Zellen der endokrinen Inseln erzielt werden. Abbildung 21 zeigt, daß die PepT2-Immunoreaktivität ausschließlich auf die α -Zellen beschränkt ist. Dieses Ergebnis wird durch eine Doppelinkubation mit kommerziellen, spezifischen Antikörpern gegen Somatostatin (δ -Zellen), Glukagon (α -Zellen) und Insulin (β -Zellen) auf Parallelschnitten bestätigt (ohne Abbildung). Es zeigt sich, daß die PepT2-Immunoreaktivität identisch mit der Glukagon-Immunoreaktivität ist und endokrinen α -Zellen zugeordnet werden kann. Für Somatostatin bzw. Insulin positive Zellen zeigen keine Immunoreaktivität für PepT2.

Im murinen Pankreas konnte das Signal des PepT2-Antikörpers außer in peripheren Zellen der Langerhansschen Inseln auch in einigen wenigen zentral gelegenen Zellen beobachtet werden. Auch hier konnte durch eine Doppelinkubation mit einem Glukagon-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, daß es sich bei allen fluoreszierenden Zellen um Glukagon-produzierende α -Zellen handelt (ohne Abbildung).

Die Schnitte blieben ohne Signal, wenn sie mit Präimmunserum, präabsorbiertem Anti-PepT2-Serum oder ohne Zugabe des sekundären Antikörpers inkubiert wurden.

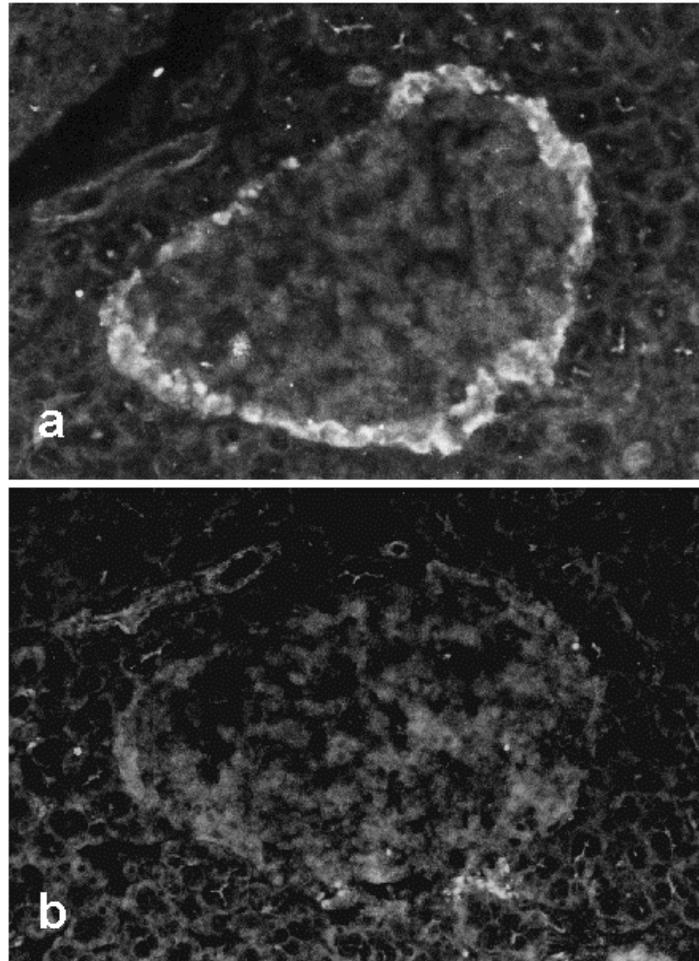


Abbildung 21: Immunolokalisation von PepT2 in α -Zellen des Pankreas

(a) 5 μ dicke Gefrierschnitte aus dem Pankreas der Ratte wurden mit gegen PepT2-gerichteten Antiserum inkubiert und das Antiserum mit einem sekundären, Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert. Mit dem Präimmenserum wurde kein Signal erhalten (b).

3.5.1 Aufnahmeexperimente an isolierten Inselzellen

Präparierte Inselzellen aus humanem Pankreas und aus dem Pankreas der Ratte wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jahn aus der Poliklinik der Justus-Liebig-Universität, Gießen zur Verfügung gestellt. Die Inselzellen wurden entweder mit 25 μ M β -Ala-Lys-AMCA oder mit 25 μ M β -Ala-Lys-AMCA und 10 mM Gly-Gln für 30 min bei 37°C inkubiert und nach Abstoppen der Reaktion im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Sowohl in den humanen Inseln als auch in den Inselzellen der Ratte war eine Akkumulation des fluoreszierenden Dipeptids zu sehen. Die Inseln, die in Anwesenheit von β -Ala-Lys-AMCA und einem Überschuß von Gly-Gln inkubiert wurden, zeigten keine Fluoreszenz. Aufgrund dieser Ergebnisse läßt sich vermuten, daß es sich hier um

einen PepT2-vermittelten, hemmbaren Transport von Dipeptiden in die Inseln, vermutlich die α -Zellen des Pankreas handelt.

3.6 Peptidtransporter in der Leber

Obwohl sich eine ganze Reihe von Studien mit dem Transport von Peptiden in der Leber beschäftigte, ist es bisher noch nicht gelungen einen überzeugenden Beweis für die Existenz von PepT2 in der Leber zu erbringen. Boll et al. gelang es 1996 mittels RT-PCR einen ersten Hinweis auf die Expression der PepT2-mRNA in der Leber zu erhalten. In dieser Arbeit gelang es durch den Einsatz spezifischer PepT2-Hybridisierungssonden und eines gegen PepT2 gerichteten Antiserums die Expression von PepT2 in der Leber bzw. im Gallengangsepithel zu lokalisieren (Abb. 22). In Hepatozyten war der Peptidtransporter nur vereinzelt nachweisbar, was erklären könnte, daß durch eine RT-PCR aus Gesamt-RNA der Leber (die zu einem Großteil aus RNA der Hepatozyten besteht) kein oder nur ein sehr schwaches Signal für die PepT2-mRNA erhalten wurde.

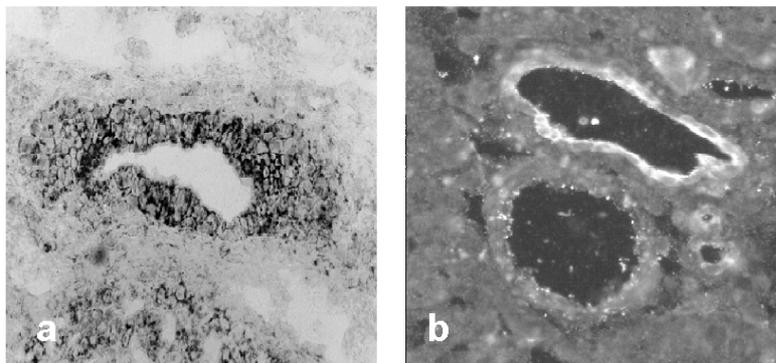


Abbildung 22: Nachweis der PepT2 Expression durch in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie in der Leber

5 μm dicke Gefrierschnitte der Rattenleber wurden mit PepT2-spezifischen Antisense Sonden hybridisiert (a) bzw. mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert (b). Die Digoxigeninmarkierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine anschließende Farbreaktion nachgewiesen, das Antiserum wurde mit einem sekundären mit Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert. Mit der Sense Sonde bzw. dem Präimmunserum wurde kein Signal erhalten (nicht abgebildet).

3.7 Peptidtransporter in der Mamma

Auf der Grundlage der RT-PCR Befunde zur Verteilung der mRNA von PepT1 und PepT2 in verschiedenen Geweben (Döring et al. 1998) wird deutlich, daß auch die Brustdrüse eine starke Bande beim PepT2-Fragment aufweist.

Nachfolgend sind die Ergebnisse des mRNA-Nachweises und des Proteinnachweises sowohl auf Organebene als auch auf zellulärer Ebene dargestellt.

Humane Gewebeproben resezierter Mammateile, aus humaner Muttermilch isolierte Zellen bzw. deren RNA, sowie Gewebeproben laktierender Brustdrüse der Ratte wurden auf die Existenz des renalen Peptidtransporters PepT2 untersucht.

Humane Gewebeproben resezierter Mammateile wurden uns aus dem Institut für Pathologie der Universität Gießen durch freundliche Vermittlung von Herrn Dr. Franke zur Verfügung gestellt. Aus diesen Geweben wurde Gesamt-RNA präpariert und mit spezifischen Primern auf die Expression von PepT2 untersucht. Abbildung 23 a zeigt zwei ausgewählte humane Gewebeproben in denen die Demonstration der Expression der PepT2-mRNA zu sehen ist. In Parallelversuchen mit PepT1-Primern konnte in einigen humanen Gewebeproben auch die Expression der PepT1-mRNA gezeigt werden (ohne Abb.), womit zum ersten Mal die Expression beider Peptidtransporter PepT1 und PepT2 im Brustgewebe der Frau nachgewiesen ist.

Auffallend bei den insgesamt 40 untersuchten humanen Resektionsproben ist, daß in einzelnen Gewebeproben nur jeweils eine Isoform, in anderen jedoch beide Formen des Peptidtransporters nachweisbar sind. Da es sich bei den untersuchten Gewebeproben ausschließlich um Resektionsmaterial mit unterschiedlicher zugrundeliegender Indikationsstellung handelte, ist nicht auszuschließen, daß es sich bei der unterschiedlichen Expression um eine mit der Pathogenese der Erkrankung assoziierte veränderte Expression handelt.

Auch in einer RNA-Präparation von sedierten Zellen aus humaner Muttermilch konnte durch RT-PCR die PepT2-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 23 b).

Die PepT2-Expression wurde auch im laktierenden Organ von Kaninchen und Ratte untersucht. Im Vergleich zur ruhenden Mamma ist die PepT2-Expression im Laktationsstadium stark erhöht, so daß vermutet werden kann, daß bei erhöhter Proteinbiosynthese mit steigendem Aminosäurebedarf möglicherweise PepT2 verstärkt exprimiert wird (Abb. 20 c).

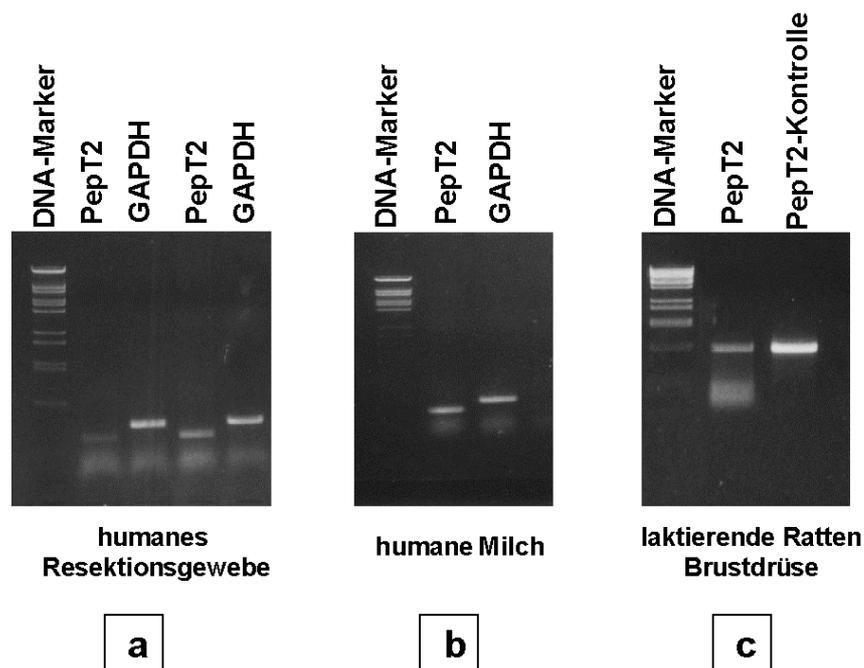


Abbildung 23: Nachweis der Transkription der PepT2-mRNA in RNA-Präparationen aus humanem Resektionsgewebe, humaner Muttermilch und der laktierenden Brustdrüse

5 µg Gesamt-RNA wurden unter Verwendung von 10 pmol PepT2-spezifischer Antisenseprimer zur RT-Reaktion eingesetzt. In der folgenden PCR-Reaktion wurde der erhaltene Erststrang nach Denaturierung der Proben (1 min 95°C) durch anschließende Zugabe von 10 pmol PepT1- bzw. PepT2-spezifischem Senseprimer und 2 U Taq DNA-Polymerase in 35 Temperaturzyklen amplifiziert (1 min 95°C; 2 min 55°C, 1 min 72°C). Ein Aliquot der Proben wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe, als Positivkontrolle wurden die gleiche Proben mit GAPDH-Primern amplifiziert. Die jeweiligen Primersequenzen sind im Methodenteil dieser Arbeit angegeben.

Die Gewebeverteilung der PepT2-Expression in der adulten laktierenden Brustdrüse der Ratte wurde durch in-situ-Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Antisense Hybridisierungssonden bzw. durch den Einsatz eines PepT2-spezifischen Antiserums nachgewiesen (Abb. 24).

Die PepT2-mRNA konnte durch deutliche Hybridisierungssignale in den Epithelzellen des Milchhauptausführungsgangs und der Milchnebangänge sowie in den Milchdrüsen lokalisiert werden. Umgebendes Bindegewebe und Gefäße zeigten im Gegensatz dazu kein Signal. Parallele Kontrollschnitte, die mit einer DIG-markierten Sense-Hybridisierungssonde hybridisiert bzw. vor der Hybridisierung mit RNase behandelt wurden, blieben ohne Anfärbung.

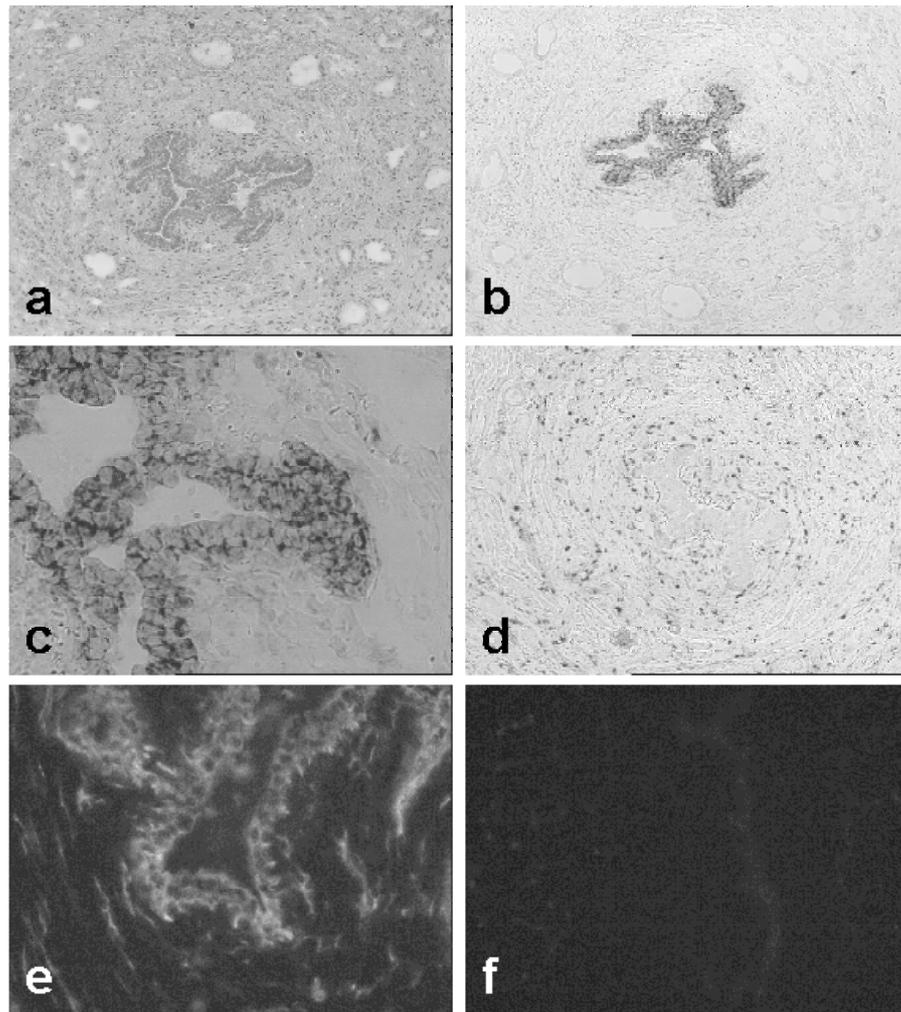


Abbildung 24: In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie zum Nachweis der PepT2-mRNA bzw. einer PepT2-Immunoreaktivität in der Brustdrüse der Ratte

5 µm dicke Gefrierschnitte der Ratten-Brustdrüse wurden mit PepT2-spezifischen Antisense Sonden hybridisiert (**b-d**) bzw. mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert (**e,f**). Die Digoxigenin-markierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen (**b-d**); das Antiserum wurde mit einem sekundären, Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert (**e-f**). Mit der Sense Sonde (**d**) bzw. dem Präimmunserum (**f**) wurde kein Signal erhalten. (**a**) zeigt einen HE-gefärbten parallelen Dünnschnitt der Ratten-Brustdrüse, der als histologische Kontrolle diente.

Der Versuch einer funktionellen Charakterisierung des in der Brustdrüse lokalisierten renalen Peptidtransporters durch Aufnahmeexperimente an Zelllinien blieb bislang ohne Erfolg. So konnte in Brustkrebszelllinie MCF7 nach 3 bzw. 8 tägiger Konfluenz keine hemmbare Aufnahme von $^3\text{H-D-Phe-Ala}$ demonstriert werden.

3.8 Peptidtransporter in anderen extrarenalen Geweben

Auf der Grundlage der RT-PCR Befunde zur Verteilung der mRNA der Peptidtransporter wurde deutlich, daß PepT2 auch in anderen peripheren Geweben als den oben genannten, ausführlicher beschriebenen Geweben exprimiert wird.

Mittels der in-situ-Hybridisierung und unter Einsatz des Peptidantikörpers gegen PepT2 gelang es, sowohl die mRNA als auch eine PepT2-Immunoreaktivität in weiteren Geweben und Zelltypen nachzuweisen.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen repräsentative Nachweise der PepT2-mRNA und der PepT2-Immunoreaktivität in einigen ausgewählten Geweben. Für die Mehrzahl der aufgezählten Organe wurde der Nachweis für eine Reihe von Spezies erbracht, so daß man davon ausgehen kann, daß die Expression bei allen Säugern – einschließlich des Menschen – dasselbe Verteilungsmuster aufweist.

Peptidtransporter in peripheren Nerven

Ein weiterer interessanter Befund der Immunhistochemie war der Nachweis einer PepT2-Immunoreaktivität in neuronalen Strukturen des Gastrointestinaltrakts. Abbildung 25 zeigt ein deutliches Signal für PepT2 im Plexus myentericus des Oesophagus, des Magens und des Jejunums.

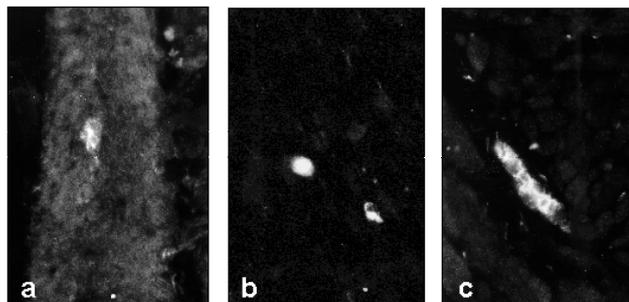


Abbildung 25: Nachweis einer PepT2-Immunoreaktivität in neuronalen Zellen des Gastrointestinaltrakts

5 µm dicke Gefrierschnitte aus verschiedenen Regionen (a = Oesophagus, b = Magen, c = Jejunum) der Ratte wurden mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert das wiederum durch einen sekundären, Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert wurde. Bei einer Inkubation mit dem Präimmunserum wurde kein Signal erhalten (nicht abgebildet).

Der Befund, daß verschiedene periphere Nerven ebenfalls PepT2 exprimieren, deckt sich mit dessen Nachweis in Neuronen des Zentralnervensystems.

Peptidtransporter im Gastrointestinaltrakt

Desweiteren konnte eine PepT2-Immunoreaktivität durch Immunhistochemie in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts lokalisiert werden.

Durch den Einsatz eines PepT2-spezifischen Antiserums wurde eine Anfärbung in den Epithelzellen des Oesophagus der Ratte erhalten, woraus man auf dort lokalisierte Expression von PepT2 schließen kann (Abb. 26).

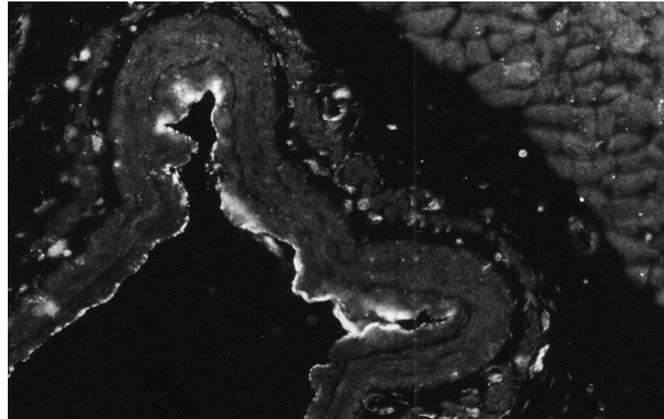


Abbildung 26: Lokalisation einer PepT2-Immunoreaktivität in Epithelzellen des Ratten-Oesophagus

5 µm dicke Gefrierschnitte des Oesophagus der Ratte wurden mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert, das wiederum durch einen sekundären, Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert wurde. Bei einer Inkubation mit dem Präimmunserum wurde kein Signal erhalten (nicht abgebildet).

Desweiteren konnte der Nachweis von PepT2-spezifischer mRNA und einer PepT2-Immunoreaktivität in Gewebedünnschnitten aus dem Magen der Ratte nachgewiesen werden. In Abbildung 27 (a,b) sind Hybridisierungssignale im Bereich mehrerer quer angeschnittener Foveolae gastricae zu sehen. Abbildung 27 c zeigt die Lokalisation einer PepT2-Immunoreaktivität durch Immunhistochemie in den gleichen Regionen wie die Ergebnisse der in-situ-Hybridisierung.

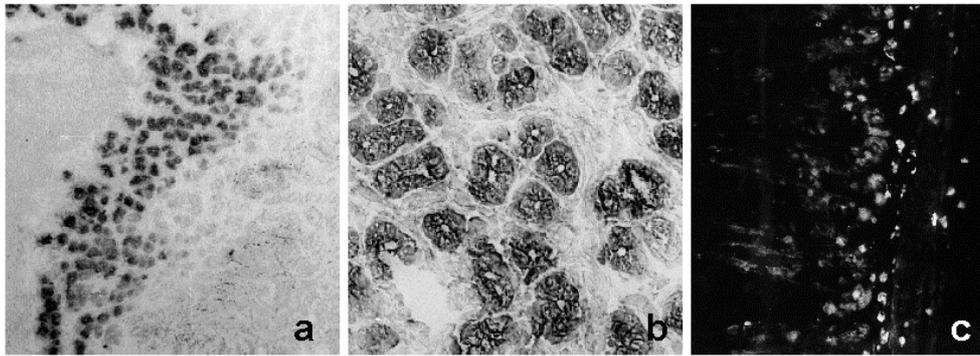


Abbildung 27: Lokalisation der PepT2-mRNA und einer PepT2-Immunoreaktivität im Magen der Ratte

5 μm dicke Gefrierschnitte aus dem Rattenmagen wurden mit PepT2-spezifischen Antisense Sonden hybridisiert (a,b) bzw. mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert (c). Die Digoxigeninmarkierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine anschließende Farbreaktion nachgewiesen (a,b); das Antiserum wurde mit einem sekundären, Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert (c).

Immunhistochemische Versuche an Gewebedünnschnitten aus dem Dünndarm der Ratte zeigen für PepT2 spezifische Fluoreszenzsignale in sogenannten Rundzellen im Zottenstruma (Abb. 28). Spekulationen, daß es sich hier um immunkompetente Zellen handelt, erfordern eine Colokalisation mit spezifischen Antikörpern, die diese Zellen dann als Makrophagen, Lymphozyten oder Plasmazellen identifizieren können.



Abbildung 28: Lokalisation einer PepT2-Immunoreaktivität im Dünndarm der Ratte

5 μm dicke Gefrierschnitte des Dünndarms der Ratte wurden mit einem gegen PepT2 gerichteten Antiserum inkubiert, das wiederum durch einen sekundären, Cy3-gekoppelten und gegen Kaninchen gerichteten Antikörper detektiert wurde. Bei einer Inkubation mit dem Präimmunserum wurde kein Signal erhalten (nicht abgebildet).

Peptidtransporter im Myocard

Abbildung 29 demonstriert die Expression von PepT2-mRNA im Myocard des Rattenherzens mit einer deutlichen Begrenzung des Hybridisierungssignals auf das Sarkoplasma.

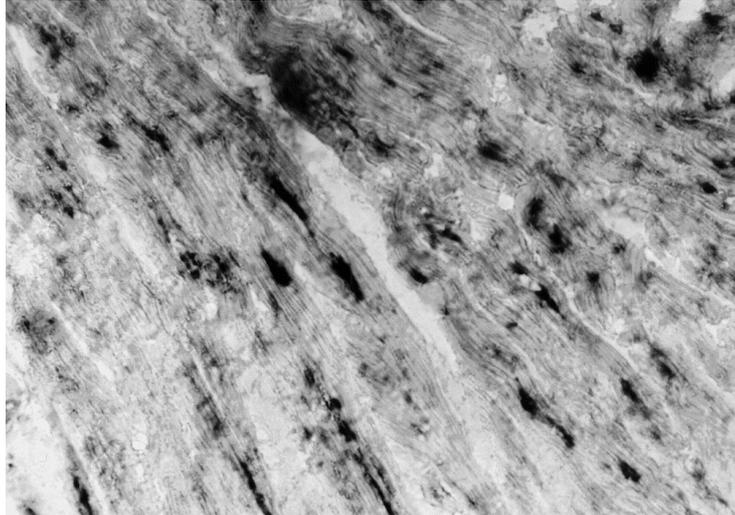


Abbildung 29: In-situ-Hybridisierung des Herzmuskels

5 µm dicke Gefrierschnitte des Myocards der Ratte wurden mit PepT2-spezifischen Antisense Sonden hybridisiert. Die Digoxigenin-markierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen.

Peptidtransporter in der Haut

Durch in-situ-Hybridisierung konnte die Expression der PepT2-mRNA auch in der Haut lokalisiert werden. In Abbildung 30 (a,b) sind positive Hybridisierungssignale im Stratum germinativum, einer unter der Hornschicht gelegenen zellkernhaltigen Zellschicht zu finden. Eine Hybridisierung mit der Sense-Sonde ergab keine Anfärbung (Abb. 30 c).

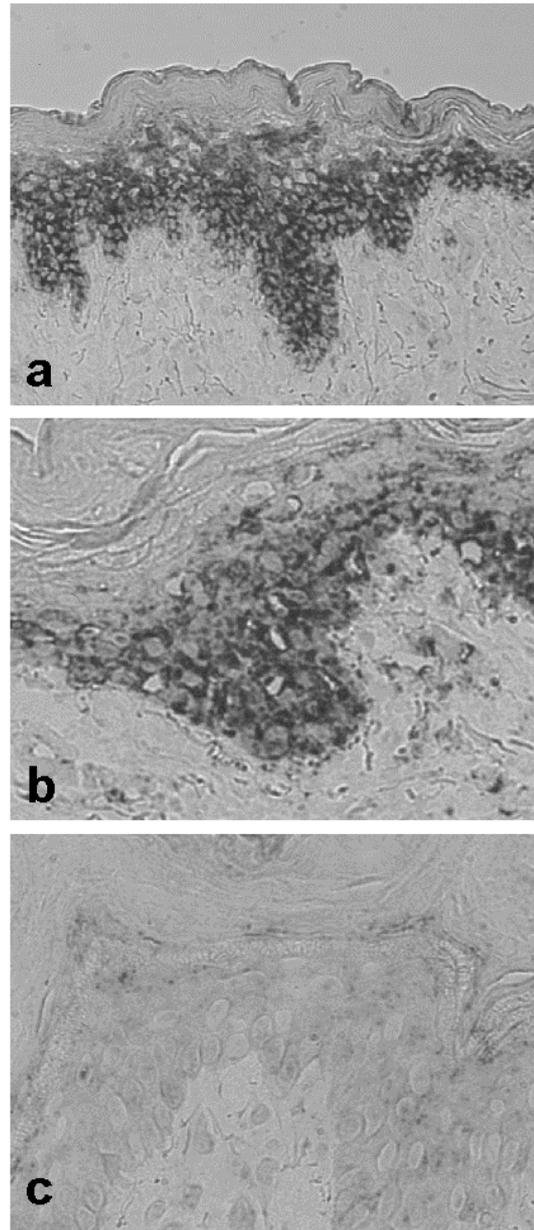


Abbildung 30: Nachweis der PepT2-mRNA durch in-situ-Hybridisierung in der Haut

5 μm dicke Gefrierschnitte der Rattenhaut wurden mit PepT2-spezifischen Antisense Sonden hybridisiert (a,b) bzw. mit einer PepT2-Sense Sonde hybridisiert (c). Die Digoxigenin-markierten Proben wurden durch einen AP-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und durch eine sich anschließende Farbreaktion nachgewiesen.

Zusätzlich zu den oben genannten Organen wurde mit einem PepT2-spezifischen Antiserum der Transporter im Hoden, in den Spermienköpfen, in der Milz und in der Plazenta lokalisiert. Um hier jedoch genauere Angaben machen zu können, müssen weitere Untersuchungen zur Kolo-kalisation mit kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörpern durchgeführt werden bzw. die PepT2-mRNA nachgewiesen werden.

3.9 Aufnahmeexperimente am Ganztier

3.9.1 Gewebeverteilung von β -Ala-Lys-AMCA in Mäusen nach Injektion in die Schwanzvene

Bei diesem Perfusionsversuch wurden zwei Mäusen 1 mM β -Ala-Lys-AMCA bzw. 1 mM β -Ala-Lys-AMCA und 20 mM Gly-Gln appliziert. 10 min nach der Applikation wurden die Tiere getötet, verschiedenen Gewebe herauspräpariert, in 4%igem PFA fixiert und anschließend die Gewebeverteilung von β -Ala-Lys-AMCA im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

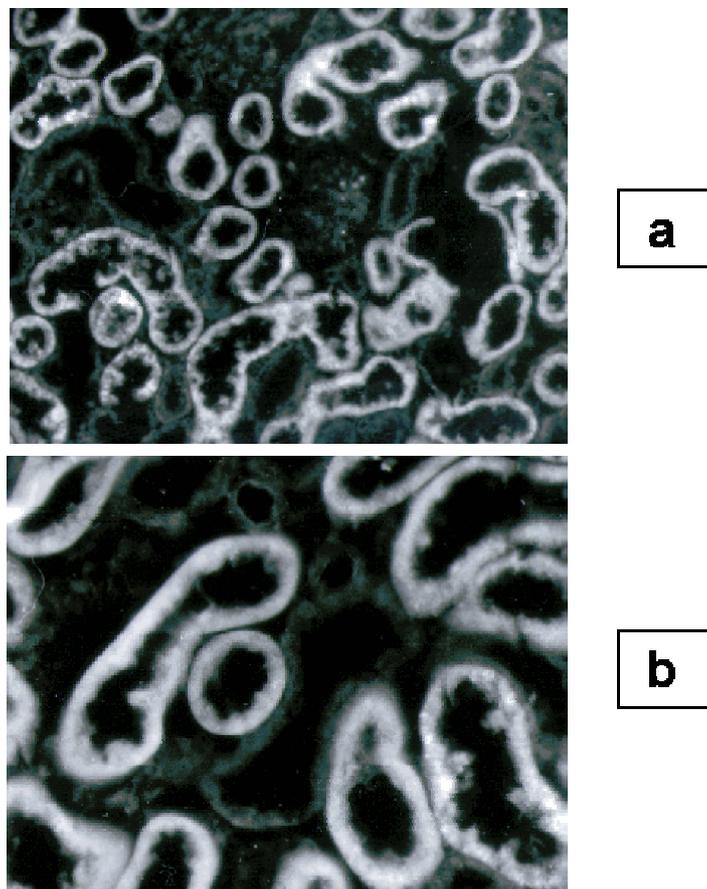


Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung 10 μ m dicker Nierenschnitte nach i.v. Applikation von 50 μ l 1 mM β -Ala-Lys-AMCA in die Schwanzvene adulter Mäuse.

Abbildung 31 zeigt, daß das fluoreszenzmarkierte Dipeptid vor allem in den Tubuli der Niere zu finden war. Andere Organe zeigten bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung keinen Hinweis auf eine Akkumulation des Dipeptids. Keine Fluoreszenz in den viszeraleen Organen wurde für das Tier beobachtet, dem zusätzlich zum

markierten Substrat 20 mM eines anderen Dipeptides appliziert wurde, was die Aufnahme von β -Ala-Lys-AMCA in die verschiedenen Organe hemmen oder zumindest vermindern sollte.

4 Diskussion

Die beiden renalen und intestinalen Peptidtransporter PepT1 und PepT2 besitzen die Fähigkeit, Di- und Tripeptide sowie eine Vielzahl an Peptidmimetika mit Hilfe eines zelleinwärts gerichteten Protonengradienten elektrogen in die Zelle zu transportieren. Die Klonierung der Peptidtransporter cDNAs aus Darm und Nierengewebe ermöglichte sowohl die Identifizierung ihrer molekularen Struktur und die Charakterisierung ihrer Transportfunktion, als auch die Herstellung von Primern, Hybridisierungssonden und Antisera zur Lokalisation der Peptidtransporter in verschiedenen extraintestinalen und extrarenalen Geweben.

Durch in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie ist es in dieser Arbeit gelungen, den renalen Peptidtransporter (PepT2) in verschiedenen extrarenalen Geweben nachzuweisen, und ihn in bestimmten Zelltypen zu lokalisieren. Die erzielten Ergebnisse bilden eine wertvolle Grundlage für weitere Studien zur Klärung der physiologischen Rolle des Peptidtransporters in diesen Geweben. Dies kann mit Hilfe von transformierten Zelllinien, heterologen Expressionssystemen oder Ganztierexperimenten erfolgen.

4.1 Mögliche Substrate für PepT2 in extrarenalen Geweben

Den epithelialen Nährstofftransportsystemen in Dünndarm und Niere wurde schon seit geraumer Zeit großes Interesse entgegen gebracht. Sie sind essentiell für die Bereitstellung und Reutilisierung der vom Organismus benötigten Nährstoffe und spielen somit eine wichtige Rolle für deren metabolische Verwertung.

Während die physiologische Bedeutung der Peptidtransporter im Dünndarm und in der Niere durch umfangreiche Studien schon weitgehend bekannt ist, stellt sich die Frage, welche physiologischen Substrate den Peptidtransportern in peripheren Geweben zur Verfügung stehen und von ihnen transportiert werden, und welche spezifische Funktion PepT2 damit in extrarenalen Geweben zukommt.

Im Organismus gibt es viele Quellen für die Bildung von Di- und Tripeptiden z.B. durch den Abbau von Proteinen und Peptiden in der Zirkulation oder der Proteolyse in Organen mit Freisetzung ins Blut. Dazu kommt das Angebot von extern zugeführten Di- und Tripeptiden aus der Nahrung bzw. durch oral oder intravenös verabreichte

Pharmaka mit Peptidcharakter. So resultiert z.B. der Abbau von Nahrungsprotein im Gastrointestinaltrakt durch pankreatische Hydrolasen und membranständige Peptidhydrolasen in einer Vielzahl von Oligopeptiden und freien Aminosäuren. Wie von Matthews 1991 beschrieben, können Di- und Tripeptide, die einer weiteren Hydrolyse im Gastrointestinaltrakt und im Enterozyten entgehen in der Zirkulation nachgewiesen werden.

Obwohl einzelne Di- und Tripeptide im Plasma bereits nachgewiesen werden konnten, ist die Konzentration aller im peripheren Blut zirkulierenden Peptide bisher unbekannt. Tierexperimente lassen vermuten, daß bis zu 50% der zirkulierenden Aminosäuren in peptidgebundener Form vorliegen und davon wiederum die Mehrheit als Di- und Tripeptide (Rérat et al. 1992, Schlagheck et al. 1984, Seal und Parker 1991).

Andere Studien, die die Utilisation von Peptiden aus parenteralen Lösungen untersuchten, konnten nachweisen, daß infundierte oder injizierte Peptide schnell aus der Zirkulation eliminiert werden. Da diese Peptide aber nicht als solche im Urin nachweisbar sind, kann davon ausgegangen werden, daß sie entweder zu einzelnen Aminosäuren hydrolysiert oder als intakte Peptide, möglicherweise als Di- oder Tripeptide in die einzelnen Gewebe aufgenommen werden (Adibi 1987, Adibi et al. 1977, Hubl et al. 1989). Diese Aufnahme wird vom Befund gestützt, daß man den direkten Einbau von Phenylalanin und Leucin, die in Form eines radioaktiv markierten Dipeptids intravasculär verabreicht wurden, im Milchcasein laktierender Ziegen nachweisen konnte (Backwell et al. 1994).

Geht man davon aus, daß der renale Peptidtransporter als ein Transportsystem mit einer einmaligen Bandbreite an Substraten alle 8000 Tripeptide und 400 Dipeptide, die aus den 20 proteinogenen Aminosäuren gebildet werden können als Substrate erkennt und transportiert, bietet sich ein breites Substratspektrum auch für die in peripheren Organen exprimierten Transportproteine. Außer Di- und Tripeptiden kommen noch eine Vielzahl anderer Substrate in Frage, sofern sie die Minimalanforderungen für die Substraterkennung erfüllen. Diese sind zwar für PepT2 bisher nicht ausreichend gut definiert, doch kann davon ausgegangen werden, daß sie ähnlich sind wie die von PepT1 für die die Minimalanforderungen der Substratbindung vor kurzem beschrieben wurde (Döring et al. 1998; Ganapathy et al. 1998).

Welche Dipeptide in welchen Geweben vermehrt vorkommen und vom Peptitransporter transportiert werden könnten, soll im Folgenden diskutiert werden. Ob diese Funktion primär nutritiver Natur ist und in der Reutilisation und Konservierung von α -Aminostickstoff liegt, oder ob PepT2 in einzelnen Geweben bzw. Zelltypen darüber hinaus sehr spezifische Funktionen besitzt, bleibt weiteren Studien überlassen.

4.1.1 Niere

In dieser Arbeit stand nicht die physiologische Rolle des renalen Peptidtransporters, nämlich die Reabsorption von Di- und Tripeptiden aus dem glomerulären Filtrat im Mittelpunkt, sondern die Lokalisation der mRNA und des Proteins in definierten Gewebestrukturen und Zelltypen der Niere. Substrate, die vom renalen Peptidtransporter auch unter physiologischen Bedingungen transportiert werden, sind in der Literatur ausführlich beschrieben (siehe Übersichtsartikel Daniel et al. 1998 und Daniel und Herget 1997).

Die mRNA des renalen Peptidtransporter sowie das exprimierte Protein konnten in den hier durchgeführten in-situ Experimenten durch Hybridisierung und Immunhistochemie in den Tubuli der Niere und vereinzelt in Zellen der Glomeruli nachgewiesen werden. Allerdings war es mit diesen Methoden nicht möglich, die Transkription bzw. Translation des PepT2-Gens definierten Zellen bzw. Zellorganellen zuzuordnen, was in weiterführenden Experimenten z.B. durch Colokalisation mit kommerziell erwerblichen Antikörpern oder durch den Einsatz der Elektronenmikroskopie möglich wäre.

Die hier erzielten Ergebnisse decken sich aber insofern mit denen von Smith et al. 1998, als daß auch hier die PepT2-mRNA durch in-situ-Hybridisierung in diversen Regionen der Niere nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurden von Smith et al. auch ein Signal für PepT1 in der Niere detektiert. PepT1 wurde dabei verstärkt im vorderen (pars convoluta) und PepT2 im hinteren Teil (pars recta) des proximalen Tubulus gefunden. Diese Verteilung der Peptidtransporter läßt darauf schließen, daß durch PepT1 mit geringer Affinität aber hoher Transportkapazität große Mengen an Peptiden aus dem oberen Teil des Tubulus reabsorbiert werden, während PepT2 mit hoher Affinität und niedriger Transportkapazität die verbleibenden Peptide mit großer Effizienz aus weiter distal gelegenen Abschnitten reabsorbiert. Die Verteilung resultiert somit in einer optimalen Reabsorption von Di- und Tripeptiden aus dem glomerulären Filtrat und

damit auch in einer optimalen Konservierung von Aminosäurenstickstoff. Mit diesen Ergebnissen würde PepT1 eine neue Bedeutung als Hauptvermittler der Di- und Tripeptidreabsorption und damit als hauptverantwortliches Protein für die Konservierung von peptidgebundenen Aminosäuren erlangen.

4.1.2 Gehirn

Die renale Peptidtransporterform konnte in dieser Arbeit in Gehirnen von Kaninchen, Ratte und Mensch nachgewiesen werden, wobei ausschließlich neuronale Zellen die Expression der PepT2-mRNA zeigen. Dagegen konnte weder in Endothelzellen der Bluthirnschranke noch in Gliazellen die Expression der PepT2-mRNA demonstriert werden. Bei der anschließenden Sequenzierung des RT-PCR-Fragments aus dem Gehirn konnte auf eine identische Aminosäuresequenz wie PepT2 der Niere geschlossen werden. Auf Proteinebene wurde mit 97,6 kDa ein immunoreaktives, identisch großes Protein wie in der Niere gefunden. Durch Aufnahmeexperimente mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Dipeptiden, sowohl in Zellmodellen als auch am isolierten Organ, konnte die Aufnahme dieser Substrate auch in Zellen des Gehirns demonstriert werden.

Der neuartige Befund, daß PepT2 in Neuronen des Zentralnervensystems und dem Plexus choroideus exprimiert wird, stellt die Frage nach der möglichen Bedeutung des Peptidtransporters in diesen Gehirnregionen. Da Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke PepT2 nicht exprimieren, beschränkt sich ein möglicher Transport von im Blut zirkulierenden Peptiden (z.B. von parenteral verabreichten Peptiden) lediglich auf die Region des Plexus Choroideus und seinen Epithelzellen.

Arbeiten von Huang et al. 1981 lassen vermuten, daß die Aufnahme von Di- und Tripeptiden im Plexus Choroideus durch PepT2 vermittelt werden. Die hier demonstrierte Aufnahme des Tripeptids Tyr-D-Ala-Gly gegen ein bestehendes Konzentrationsgefälle war stereoselektiv und war durch andere kurzkettige Peptide hemmbar, während freie Aminosäuren nicht transportiert wurden. Diese Transporteigenschaften sind weitgehend mit denen von PepT2 identisch (Boll et al. 1995, Teuscher et al. 2000). In-vivo Experimente am Choroid Plexus des Rattenhirns zeigen einen aktiven Peptidtransport in dem der cerebrospinalen Flüssigkeit zugewandten Epithel, während im Plasma zugewandten Epithel kein Transport zu

dokumentieren war (Huang et al. 1982). Nach intravenöser Administration von Gly-Glu und Gly-Tyr im Menschen konnte kein nennenswerter Transport dieser Dipeptide in die cerebrospinale Flüssigkeit beobachtet werden (Himmelseher et al. 1996). Kürzlich konnte durch Teuscher et al. 2000 und Novotny et al. 2000 die funktionelle Expression von PepT2 in in-vitro Aufnahmeexperimenten im Plexus Choroideus der Ratte gezeigt werden. Die Aufnahme von Gly-Sar bzw. 5-Aminolävulinsäure ließ sich sowohl durch verschiedene Di- und Tripeptide, durch das Neuropeptid Carnosin als auch durch alpha-Aminocephalosporine hemmen. Aus diesen in der Literatur publizierten Ergebnissen läßt sich ableiten, daß die Expression von PepT2 im Choroid Plexus sehr wahrscheinlich mit der Aufnahme bzw. Reutilisation von Di- und Tripeptiden aus der cerebrospinalen Flüssigkeit und nicht mit der Aufnahme von systemisch angebotenen Di- und Tripeptiden ins Gehirn im Zusammenhang steht.

Im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen postulieren Dringen et al. 1998 und Dieck et al. 1999, daß PepT2 in astrogliareichen Primärkulturen exprimiert wird und dort die Aufnahme verschiedener markierter Dipeptide vermittelt. Dieser Befund konnte jedoch bisher an Gewebeschnitten des adulten Gehirns von Kaninchen, Ratte und Mensch nicht bestätigt werden.

Die Tatsache, daß PepT2 weder auf RNA-Ebene noch auf Proteinebene in der Blut-Hirnschranke nachgewiesen werden konnte, ist in Übereinstimmung mit publizierten Daten von Vazquez et al. (1992). Hier konnte nach der intravenösen Applikation von Glycyl-Glutamin keine Aufnahme des Substrats über die Bluthirnschranke gemessen werden. Die Aufnahme des radioaktiv markierten Dipeptids entsprach der Aufnahme von Saccharose, was darauf schließen läßt, daß dieses Dipeptid keinen nennenswerten Transport über die Bluthirnschranke zeigt.

Zur Klärung der möglichen Rolle von PepT2 in Neuronen war es von Bedeutung zu prüfen, inwieweit der Transporter in der Lage ist, ausgewählte Substrate, für die eine Rolle als neuroaktives Dipeptid belegt ist oder vermutet wird, zu transportieren. Aus den durchgeführten elektrophysiologischen Experimenten läßt sich ableiten, daß Dipeptide wie Gly-Gln, Tyr-Arg, Carnosin und Cys-Gly von PepT2 mit positivem Einwärtsstrom transportiert werden und damit ohne Zweifel als Substrate des Peptidtransporters fungieren. Die ausgewählten neuroaktiven Dipeptide werden vorwiegend als solche mit Beteiligung an der Neurotransmission beschrieben, wobei sie

vor allem bei der Prozessierung größerer Neuropeptide im Gehirn entstehen (Myers et al. 1994, Parish et al. 1983, Smyth et al. 1983).

Als interessanter Befund ist der Nachweis des Transports von Cys-Gly zu werten, der mit der Regeneration von Glutathion (GSH) in Neuronen in Zusammenhang gebracht werden kann. Befunde an neuronreichen Primärkulturen aus dem Gehirn der Ratte weisen darauf hin, daß das Dipeptid Cys-Gly aus dem extrazellulären Abbau von Glutathion freigesetzt wird und den Neuronen als Vorläufer für die Resynthese von GSH dienen kann (Kranich et al. 1996). Damit käme dem Peptidtransporter im Gehirn u.a. eine Rolle beim oxidativen Streß und der daraus resultierenden neurodegenerativen Schädigung zu.

Das Dipeptid Kyotorphin (Tyr-Arg), das als Neuropeptid ausschließlich in der synaptosomalen Fraktion des Gehirns lokalisiert ist (Ueda et al. 1982) wird dort für die Freisetzung des intrazellulären Calciums verantwortlich gemacht und gilt unter anderem auch als potentieller Met-Enkephalin-Freisetzer (Ueda et al. 1980, Ueda et al. 1986). Kyotorphin wird wie Lysyl-Tryptophan eine Rolle in der Schmerzkontrolle zugesprochen (Ueda et al. 1980, Gracia-Lopez et al. 1986).

Dem Dipeptid Carnosin (β -Ala-His) wird eine antioxidative membranstabilisierende Wirkung in Endothelzellen des Gehirns zugeschrieben (Hipkiss et al. 1997).

Vor kurzem wurde delta-Aminolävulinsäure (ALA) - eine Vorstufe in der Porphyrinsynthese - als weiteres Substrat für PepT2 identifiziert (Döring et al. 1998). Die Aufnahme von ALA in bestimmte Gehirnbereiche wie Plexus Choroideus als auch in Neuronen in Primärkultur wurde bereits beschrieben (Durko und Juhasz 1986, Terr und Weiner 1983).

Als weiteres Substrat für PepT2 wurde N-Acetyl-Asparagyl-Glutamat (NAAG), ein in hohen Konzentrationen vorkommender Neurotransmitter im Gehirn postuliert (Wang et al. 1998). Wroblewska et al. 1997 zeigte, daß NAAG als selektiver Antagonist von Klasse-II Glutamat-Rezeptoren fungiert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß PepT2 vor allem im Intraorganstoffwechsel des Gehirns eine Rolle spielt, wobei der Transporter einerseits an der Wiederaufnahme von Abbauprodukten der extrazellulären Hydrolyse größerer Neuropeptide beteiligt sein könnte bzw. durch den Transport spezifischer neuroaktiver Peptide in der

Neurotransmission involviert ist. Inwieweit PepT2 tatsächlich solche Funktionen im Gehirn wahrnimmt, muß in weiteren Studien z.B. in verschiedenen transformierten neuronalen Zelllinien in Zellkultur bzw. in entsprechenden Tiermodellen geprüft werden.

4.1.3 Lunge

Das Vorkommen der renalen Isoform des protonengekoppelten Peptidtransporters wurde in dieser Arbeit mittels RT-PCR, Northern-Blot, in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie in Lungengewebe von Ratte, Maus und Mensch dokumentiert. Die Expression der PepT2-mRNA bzw. der Proteinimmunoreaktivität konnte im Bronchialepithel, Typ-II Pneumozyten und im Endothel kleinerer Gefäße lokalisiert werden. Aufnahmestudien unter Verwendung hydrolyseresistenter fluoreszierender Dipeptide an isolierten Mäusethoraces führten zum Nachweis des Transports dieser Substrate in die gleichen Zelltypen.

In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise auf das Vorkommen eines Transportsystems für Di- und Tripeptide in der Lunge. Neben Helliwell et al. 1994, der den Transport von Tripeptiden in der Lunge zeigt, beschreibt Morimoto et al. 1993 den Transport von Dipeptiden in alveoläre Epithelzellen.

Helliwell et al. gelang 1994 erstmalig der Nachweis, daß Tripeptide, die eine L-Aminosäure an ihrem N-Terminus besitzen als solche die Lungenepithelien passieren können und, ohne vorher hydrolysiert zu werden von Typ-II Pneumozyten aufgenommen werden. Diese Ergebnisse werden von Meredith et al. 1995 unterstützt, die eine stimulierbare Aufnahme des Dipeptids D-Phe-L-Ala durch einen zelleinwärts gerichteten Protonengradienten in Typ II Pneumozyten beschreiben. Diese Versuche lassen die Existenz eines protonengekoppelten Peptidtransportsystems – identisch mit PepT2 - in der Lunge vermuten.

Generell wird eine Bedeutung von PepT2 in der Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase vermutet (Meredith et al. 1995). So ist bekannt, daß Aminosäuren und Peptide aus dem ständigen Abbau von Oberflächenproteinen in signifikanten Mengen in der Alveolarflüssigkeit vorkommen. Die Aufnahme von Aminosäuren und Peptiden aus dem Alveolarraum der Lunge ist u.a. wichtig für die Aufrechterhaltung

eines osmotischen Gradienten, für die Regulation der Viskosität der Flüssigkeit, die diesen Raum auskleidet und für die Beseitigung von Nährstoffen, die das Wachstum von Mikroorganismen begünstigen würde (Helliwell et al. 1994).

Als potentielle physiologische Bedeutung des Peptidtransporters in der Lunge wäre auch der Transport von membranstabilisierenden Substanzen denkbar, die aufgrund des erhöhten Sauerstoffstresses des Lungengewebes hier von großer Bedeutung sind.

Die Ergebnisse von Yamashita et al. 1998 dokumentieren eine Aufnahme des Dipeptids Carnosin in das Lungengewebe, mit kinetischen Charakteristika der protonenabhängigen Peptidtransporter PepT1 und PepT2. Carnosin zeigt bei humanen Lungenfibroblasten Effekte auf den intrazellulären pH-Wert (Tekhomirova et al. 1993) und hat einen die Regeneration fördernden Effekt bei Lungenverletzungen (Perel'man et al. 1989), was unter anderem mit der proliferationsfördernden Wirkung von Carnosin auf Fibroblasten und seiner membranstabilisierenden Funktion als Antioxidanz begründet wird (Boldyrev et al. 1993, Tekhomirova et al. 1993). McFarland et al. (1994) beschreiben, daß Carnosin auch den Alterungsprozeß von fetalen Lungenzellen verzögert.

Eine weitere Funktion von PepT2 in der Lunge könnte die Resorption von Cystein in Di- oder Tripeptidform sein. Cystein ist limitierend für die Glutathionsynthese, einem wichtigen Bestandteil des pulmonalen Antioxidationsystems.

Plumley et al. 1990 weist der Lunge bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Blut-Glutamin- und des Blut-Alanin-Stoffwechsels eine Rolle in der Größenordnung der Gesamt-Skelettmuskelmasse zu.

Die Fähigkeit von PepT2 zusätzlich zu Oligopeptiden auch pharmakologisch aktive Substanzen, wie z.B. delta-Aminolävulinsäure oder Cefadroxil als Vertreter der Cephalosporine, zu transportieren, rückt den Transporter auch ins Blickfeld einer möglichen therapeutischen Anwendung bei akuten und chronischen Atemwegserkrankungen durch direkte Applikation in die Atemwege bzw. Lunge.

4.1.4 Pankreas

In dieser Arbeit konnte erstmals die Expression des PepT2 Proteins im Pankreas durch den Einsatz der Immunhistochemie vorgenommen werden. Sowohl die

Immunoreaktivität als auch die Anwendung von β -Ala-Lys-AMCA weist glucagonproduzierenden alpha-Zellen der Pankreasinseln als Ort des Vorkommens von PepT2 aus. Diese konnte durch Doppelinkubation mit Glucagon-spezifischen Antikörpern bestätigt werden.

Der endokrine Teil des Pankreas spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutglucosespiegels. Es ist bekannt, daß sowohl Proteine als auch freie Aminosäuren einen stimulierenden Effekt auf die Glucagonfreisetzung aus α -Zellen des Pankreas haben (Unger et al. 1969). Bisher sind die molekularen Mechanismen dieser Stimulation jedoch noch nicht geklärt, ebensowenig wie es bisher gelang, die dafür verantwortlichen Transportmechanismen zu identifizieren.

Neben der Freisetzung von Glucagon werden den α -Zellen des Pankreas noch andere Funktionen wie z.B. die Synthese von Opioiden und corticotropinähnlichen Peptiden zugeschrieben (Stern et al. 1982, Larrson 1977). Da diese Zellen damit einen hohen Bedarf an Aminostickstoff haben, könnte das PepT2-Protein in α -Zellen des Pankreas sowohl an der Regulation der Glucosehomöostase des Organismus beteiligt sein, als auch eine spezifische nutritive Funktion für die α -Zellen erfüllen.

Erste Hinweise auf eine Wirkung von Dipeptiden am endokrinen Pankreas lieferten Studien von Iwatsuki et al. 1993, die einen Effekt des Dipeptids Histidin-Isoleucin auf die exokrine Sekretion des Pankreas zeigen, wobei Einflüsse auf die endokrine Funktion des Pankreas nicht charakterisiert wurden.

Daten aus der Literatur weisen auch auf eine Expression des intestinalen Peptidtransporters PepT1 in verschiedenen Bereichen des Pankreas hin. Gonzales et al. 1998 konnte PepT1 in intrazellulär gelegenen vesikulären Strukturen der beiden Karzinomzellen AsPc-1 und Capan-2 lokalisieren. Durch immunhistochemische Methoden wurden von Bockmann et al. 1997 immunpositive Signale für PepT1 in Lysosomen der Azinuszellen, in Kernen Schwannscher Zellen der Pankreasnerven und in Kernen glatter Muskelzellen von Arteriolenwänden beobachtet.

4.1.5 Leber

Der Leber als dem größten und wichtigsten Stoffwechselorgan des Organismus kommen vielfältige Funktionen in der Homöostase des Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Proteine und Lipide zu. Neben diesen nutritiven Aufgaben hat die

Leber auch exkretorische Funktionen und spielt bei der Metabolisierung bzw. Ausscheidung von Pharmaka eine entscheidende Rolle.

Zwar gab es schon eine Reihe von Studien, die sich mit dem Transport von Peptiden in der Leber beschäftigten, doch konnte für die Existenz von Peptidtransportern in der Leber bislang noch kein überzeugender Beweis erbracht werden (Lochs et al. 1986, Lombardo et al. 1988).

In experimentellen Studien konnten Adibi et al. 1986 keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines Transportsystems für Dipeptide in der Leber finden und vermuteten daher die Aufnahme nach Hydrolyse in Form von Aminosäuren.

Andere Ergebnisse aus der Literatur lassen vermuten, daß ein Transport von Dipeptiden in Lysosomen der Leber stattfindet. Die Transportcharakteristika entsprechen dabei weitgehend denen von PepT2, der möglicherweise den Transport von Dipeptiden aus den Lysosomen als Kompartiment mit geringer Dipeptidaseaktivität (intralysosomal) in eine Region mit hoher Dipeptidaseaktivität (Zytosol) vermittelt und auf diese Weise einen vollständigen Proteinabbau gewährleistet (Thamotharan et al. 1997). Tamai et al. 1985 berichtet auch vom Transport von β -Lactamantibiotika in isolierte Hepatozyten. Da deren Aufnahme jedoch nicht durch Dipeptide gehemmt werden konnte, handelt es sich wohl nicht um einen Peptidtransporter der hier die Aufnahme vermittelt.

Der ausgebliebene Nachweis von Peptidtransportern in der Leber könnte nach unseren Ergebnissen dadurch erklärt werden, daß z.B. die renale Form des Peptidtransporters eben nicht in Hepatozyten exprimiert wird, sondern wie die Ergebnisse dieser Arbeit nahelegen, PepT2 ausschließlich in den Gallengangsepithelien vorkommt.

Welche Funktion PepT2 in den Epithelzellen der Gallengänge zukommt, soll in weiterführenden Studien geklärt werden.

4.1.6 Mamma

Auf der Grundlage der RT-PCR Befunde in der laktierenden Brustdrüse der Ratte sowie anhand der in-situ-Hybridisierung und dem immunhistochemischen Befund an Gewebedünnschnitten der Brustdrüse wird dokumentiert, daß PepT2 auch in Zellen der Brustdrüse exprimiert wird.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die laktierende Brustdrüse einen hohen Bedarf an Aminosäuren hat, den sie durch die Utilisation von im Blut zirkulierenden Dipeptiden decken könnte. Zwar wird durch Shennan et al. 1998 postuliert, daß die Aufnahme und somit die Nutzung der Dipeptide für die Milchproteinsynthese erst nach vorheriger Hydrolyse zu einzelnen Aminosäuren erfolgen kann, dennoch gibt es auch Hinweise darauf, daß auch intakte Dipeptide in die laktierende Mamma aufgenommen werden. Entsprechende Hinweise auf die Präsenz eines Peptidtransporters im Mammagewebe lieferten kürzlich Versuche zur Proteinbiosynthese an der isolierten Mamma der Maus, in denen gezeigt werden konnte, daß Dipeptide offensichtlich als Substrate für die Bereitstellung intrazellulärer Aminosäuren für die umfangreiche Proteinbiosynthese im laktierenden Organ effizient genutzt werden können (Backwell et al. 1994 und 1996, Wang et al. 1996). Wenngleich mit diesen Versuchen zwar nicht der Nachweis der Existenz eines Peptidtransporters erbracht werden kann, weisen die Studien dennoch auf dessen Existenz hin, da konkurrierende Dipeptide die Utilisation und den Einbau der markierten Aminosäuren aus dem bereitgestellten Dipeptid in die Proteine hemmten. Gleichzeitig scheint nach vorläufigen Befunden an Mäusen und Ratten die Genexpression von PepT2 in der Milchdrüse beim Einsetzen der Laktation sehr stark erhöht zu werden, so daß vermutet werden kann, daß bei erhöhter Proteinbiosynthese mit gewachsenem Aminosäurebedarf möglicherweise PepT2 verstärkt exprimiert wird. Daß PepT2 auch in der laktierenden Mamma des Menschen eine Rolle spielt, konnte mittels RT-PCR aus RNA von isolierten Zellen humaner Muttermilch nachgewiesen werden.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse bietet die laktierende Brustdrüse ein ideales Gewebe für Studien zur Kontrolle der Genexpression von PepT2 unter der Wirkung von Hormonen.

Daß PepT2 auch in humanem Brustgewebe exprimiert wird, konnte durch RT-PCR an RNA-Proben aus humanem Resektionsgewebe gezeigt werden. Da bei Kaninchen und Ratte ausschließlich die PepT2-Isoform nachgewiesen wurde, ist der Befund der Expression von PepT1 in humanen Gewebeproben besonders interessant.

Hinsichtlich des Nachweises der beiden Peptidtransporter PepT1 und PepT2 in humanem Mammagewebe, insbesondere in Mammatumoren, scheint die Vermutung naheliegend, daß die Expression in transformiertem Gewebe ansteigt. Dies würde

bedeuten, daß Brustdrüsentumore möglicherweise verstärkt eine oder gar beide Transporterisoformen exprimieren, um über die Aufnahme von Dipeptiden auch ihren extremen Bedarf an Aminosäuren für die Proteinsynthese für Tumorwachstum und Vascularisierung zu decken. Damit würden die Peptidtransporter einerseits zum Target einer gezielten Tumorthherapie (z.B. mit Bestatin), andererseits würde möglicherweise ein vermehrtes alimentäres Peptidangebot auch die Nährstoffversorgung des Tumors ungewollt verbessern. Die Peptidtransporter der Mamma werden daher sowohl aus nutritiver wie auch aus diagnostischer und therapeutischer Sicht zum interessanten Forschungsfeld.

4.1.7 Andere Organe

Die Expression des renalen Peptidtransporters konnte in dieser Arbeit außer in den oben ausführlicher beschriebenen Geweben in anderen extrarenalen Geweben, wie in Epithelzellen des Oesophagus, in den Foveolae gastricae des Magens, immunkompetenten Zellen des Gastrointestinaltrakts, im Myocard, sowie im Stratum germinativum der Haut nachgewiesen werden. Außerdem zeigten sich immuno-positive Signale für das PepT2-Protein in Zellen der Milz, der Plazenta sowie im Hoden.

Vereinzelt liegen in der Literatur schon Hinweise zur Peptidaufnahme in diesen Organen/Zellen vor, allerdings ohne sie in Zusammenhang mit dem hier untersuchten renalen Peptidtransporter PepT2 zu bringen.

Magen:

Denkbar ist ein Transport von Substraten, die positive Effekte auf die Magenschleimhaut ausüben, wie Ashmarin et al. 1998 für prolinhaltige Peptide beschreibt. Die gesteigerte Wundheilung chronischer Magengeschwüre bei Ratten durch ein Lysyl-Prolinderivat untermauert diese Überlegung (Brandt et al. 1990).

Eine weitere Bedeutung des Peptidtransporters PepT2 könnte im Transport von Substraten liegen, die einen Einfluß auf die sekretorische Funktion des Magens ausüben. So zeigte Mattsson et al. 1982, daß das Dipeptid Histidyl-Phenylalanin, ein kompetitiver Inhibitor der Histidin-Decarboxylase, eine verzögerte HCl-Sekretion nach Pentagastringabe bei Ratten mit chronischer Magen fistel bewirkt.

Immunkompetente Zellen im Gastrointestinaltrakt:

Hinweise auf eine Peptidaufnahme in Zellen des menschlichen Immunsystems lieferten bereits eine Reihe klinischer Studien und in vitro Experimente an isolierten Zellen (Brand et al. 1989, Ghana et al. 1991, Li et al. 1998, McCain et al. 1986 und 1987, Morlion et al. 1998). Besonders der Nutzen einer Glutaminsupplementation in Dipeptidform für Zellen des menschlichen Immunsystems wurde dabei überzeugend gezeigt. Möglicherweise liefert die Existenz von PepT2 in immunkompetenten Zellen dazu die molekulare Grundlage.

Herz:

Eine Reihe von Autoren berichtet von protektiven Effekten durch die membranstabilisierende Wirkung von Histidin-haltigen Dipeptiden wie Carnosin auf das isolierte Herz (Alabovskiy et al. 1997, Prokop'eva et al. 1992). Carnosin gilt als Modulator des intrazellulären Calciums in Myocyten, dessen Dysregulation mit mangelnder Kontraktilität einhergeht (Zagola et al. 1997).

Für Glycyl-L-Glutamin wird ein trophischer Effekt auf mindestens eine der Komponenten des postsynaptischen cholinergen Systems im Rattenherz gezeigt (Nyquist-Battie et al. 1993).

Raghunath et al. 1990 postulieren, daß die Aufnahme von Dipeptiden in Vesikeln von Skelettmuskeln, zu denen auch als besonderer Form der Herzmuskel zählt, zu einem geringen Teil durch Diffusion und überwiegend nach Hydrolyse in Form von Aminosäuren erfolgt.

4.1.8 Schlußbemerkung

Die Lokalisation der Expression der PepT2-mRNA und der Immunoreaktivität des PepT2-Proteins in spezifischen Zelltypen peripherer Gewebe ist sehr überraschend und es stellt sich unweigerlich die Frage, welche Bedeutung dem Transporter in diesen Zellen zukommt.

Eine ausschließlich nutritive Funktion macht es schwierig, das doch recht spezifische Expressionsmuster zu erklären, da jede Zelle für die Bedarfsdeckung mit Aminosäuren Peptidtransporter exprimieren könnte bzw. sollte. Insbesondere das Vorkommen von PepT2 z.B. in zentralen und peripheren Nerven, in α -Zellen des Pankreas oder in

Epithelzellen der Milchausführungsgänge lassen organspezifische zusätzliche Funktionen vermuten.

Durch weitergehende Studien an Zellkulturen, an perfundierten Organen, und am Ganztier, sowie durch Generierung von PepT2-knock-out Tieren könnte die physiologische Rolle des renalen Peptidtransportes in diesen peripheren Geweben weiter geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Der aktive Transport von Di- und Tripeptiden sowie Peptidpharmaka wird in der Bürstensaummembran des Dünndarms und im proximalen Tubulus der Niere durch H⁺-gekoppelte Peptidtransporter vermittelt. Obwohl sich der intestinale Peptidtransporter (PepT1) und der renale Peptidtransporter (PepT2) funktionell und strukturell sehr ähnlich sind, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer transportkinetischen Eigenschaften, wie z.B. in der Substrataffinität und der pH- bzw. membranpotential-abhängigen Transportaktivität.

Durch die erfolgreiche Klonierung der beiden Oligopeptidtransporter PepT1 und PepT2 war der Grundstein gelegt, um die Peptidtransporter mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zu identifizieren, zu charakterisieren und sie in ihren Ursprungsgeweben, sowie in peripheren Geweben und auf Zellebene zu lokalisieren.

In dieser Arbeit konnte der Peptidtransporter PepT2 in einer Reihe von Geweben mit einer diskreten Verteilung auf spezialisierte Zellen nachgewiesen werden. Interessante Befunde sind hierbei die Lokalisation des Transporters ausschließlich in Neuronen des Zentralnervensystems sowie in peripheren Nerven; das Vorkommen von PepT2 in Gallengangsepithelien der Leber, in α -Zellen des Pankreas und in den Epithelien der Milchausführungsgänge der laktierenden Mamma. Außerdem konnte die renale Isoform der Peptidtransporter im Bronchusepithel der Lunge, in immunokompetenten Zellen des Gastrointestinaltrakts, im Herzen, in Spermien und in der Plazenta lokalisiert werden. Teilweise konnte in diesen Geweben durch Aufnahmeexperimente der Transport ausgewählter Substrate exemplarisch demonstriert werden.

Mit diesen neuen Ergebnissen zur zellspezifischen Expression von PepT2 eröffnet sich ein weites Feld weiterführender Studien zur nutritiven Bedeutung und pharmakologischen Relevanz des Peptidtransporters PepT2, sowie die Möglichkeit einer umschreibenden Charakterisierung der Physiologie eines sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich weit verbreiteten Transportproteins.

6 Literaturverzeichnis

Abraham D, Pisano JJ, Udenfried S: Uptake of carnosine and homocarnosine by rat brain slices. *Arch. Biochem. Biophys.* 104, 160-165, **1964**

Adibi SA, Johns BA: Utilization of intravenously infused tripeptides in baboons: effect on plasma concentration and urinary excretion of amino acids. *Metabolism* 32, 103-105, **1983**

Adibi SA, Krzysik BA, Drash AL: Metabolism of intravenously administered dipeptides in rats: effect on amino acid pools, glucose concentration and insulin and glucagon secretion. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52, 193-204, **1977**

Adibi SA, Krzysik BA: Effect of nephrectomy and enterectomy on plasma clearance of intravenously administered dipeptides in rats. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52, 205-218, **1977**

Adibi SA, Paleos GA, Morse EL: Influence of molecular structure on half-life and hydrolysis of dipeptides in plasma: importance of glycine as N-terminal amino acid residue. *Metabolism* 35, 830-836, **1986**

Adibi SA: Intestinal oligopeptide transporter: From hypothesis to cloning. *News Physiol. Sci.* 11, 133-137, **1996**

Adibi SA: Renal assimilation of oligopeptides: Physiological mechanisms and metabolic importance. *Am. J. Physiol.* 272, E723-E736, **1997**

Adibi SA: The oligopeptide transporter (PepT1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterol.* 113, 332-340, **1997**

Alabovskiy VV, Boldyrev AA, Vinokurov AA, Shchavratsky VKH: Effect of histidine-containing dipeptides on isolated heart under ischemia/reperfusion. *Biochemistry* 62, 77-87, **1997**

Amasheh S, Wenzel U, Boll M, Dorn D, Weber WM, Clauss W, Daniel H: Transport of charged dipeptides by the intestinal H⁺/Peptide Symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membrane Biol.* 155, 247-246, **1997 (a)**

Amasheh S, Wenzel U, Boll M, Weber WM, Clauss W, Daniel H: Transport of charged dipeptides by the intestinal H⁺/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membrane Biol.* 155, 247-256, **1997 (b)**

Amasheh S, Wenzel U, Weber WM, Clauss W, Daniel H: Electrophysiological analysis of the mammalian renal peptide transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol.* 487, 773-779, **1997**

Ashmarin IP, Karazeeva EP, Lyapina LA, Samonina GE: The simplest proline-containing peptides PG, GP, PGP, and GPGG: regulatory activity and possible sources of biosynthesis. *Biochemistry* 63, 119-124, **1998**

Backwell FR, Bequette BJ, Wilson D, Metcalf JA, Franklin MF, Beaver De, Lobley GE, MacRae JC: Evidence for the utilization of peptides for milk protein synthesis in the lactating dairy goat in vivo. *Am. J. Physiol.* 271, R955-R960, **1996**

- Backwell FR**, Bequette BJ, Wilson D, Metcalf JA, Wray-Cahen D, MacRae JC, Beever DE, Lobley GE: Utilization of dipeptides by the caprine mammary gland for milk protein synthesis. *Am. J. Physiol.* 267, R1-R6, **1994**
- Bai JPF**, Amidon GL: Structural specificity of mucosa-cell transport and metabolism of peptide drugs: Implication for oral peptide drug delivery. *Pharm. Res.* 9(8), 969-977, **1992**
- Basrai MA**, Lubkowitz MA, Perry JR, Miller D, Krainer E, Naider F, Becker JM: Cloning of a *Candida albicans* peptide transport gene. *Microbiology* 141, 1147-1156, **1995**
- Berger UV**, Hediger MA: Distribution of peptide transporter PepT2 mRNA in the rat nervous system. *Anat. Embryol.* 199, 459-449, **1999**
- Bockmann DE**, Ganapathy V, Oblak TG, Leibach FH: Localization of peptide transporter in nuclei and lysosomes of the pancreas. In: *J. Pancreatol.* 22, 221-225, **1997**
- Boldyrev AA**, Koldobski A, Kurella E, Matseva V, Stvolinski S: Natural histidine-containing dipeptide carnosine as a potent hydrophilic antioxidant with membrane stabilizing function. A biomedical aspect. *Mol. Chem. Neuropathol.* 19, 185-192, **1993**
- Boll M**, Daniel H: Target size analysis of the peptide/H⁺-symporter in kidney brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1233, 145-152, **1995**
- Boll M**, Herget M, Wagener M, Weber WM, Markovich D, Biber J, Clauss W, Murer H, Daniel H: Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 284-289, **1996**
- Boll M**, Markovich D, Weber WM, Korte H, Daniel H, Murer HH: Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton coupled transport of peptides, β -lactam antibiotics, and ACE-inhibitors. *Plügers Arch. Eur. J. Physiol.* 429, 146-149, **1994**
- Booth RFG** und Clark JB: A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically component synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.* 176, 365-370, **1978**
- Brand K**, Feki W, von Hitzenstern J, Langer K, Lupp P, Schoerner C: Metabolism of glutamine in lymphocytes. *Metabolism* 38, 29-33, **1989**
- Brandsch M**, Brandsch C, Ganapathy ME, Chew CS, Ganapathy V, Leibach FH: Identification of a renal cell line which constitutively expresses the kidney specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter. *FASEB J.* 9, 1489-1495, **1995**
- Brandt W**, Modersohn D, Buntrock P, Johannsen B, Berndt H: Effect of an angiogenesis-promoting dipeptide on microcirculation in experimental chronic stomach ulcer in the rat. *Gastroenterol. J.* 50, 88-90, **1990**
- Burger-Kentischer A**, Müller E, Klein HG, Schober A, Neuhofer W, Beck FX: Cationic amino acid transporter mRNA expression in rat kidney and liver. *Kidney Int. Suppl.* 67, S136-S138, **1998**
- Chen H**, Wong EA, Webb KE jr: Tissue distribution of a peptide transporter mRNA in sheep, dairy cows, pigs and chickens. *J. Anim. Sci.* 77(5), 1277-1283, **1999**

Chromczynski P und **Sacchi N**: Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* 162, 156-159, **1987**

Daniel H, **Adibi SA**: Transport of β -lactam antibiotics in kidney brush border membrane. Determination of their affinity for the oligopeptide/ H^+ -symporter. *J. Clin. Invest.* 92, 2215-2223, **1993**

Daniel H, **Herget M**: Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am. J. Physiol.* 273, F1-F8, **1997**

Daniel H, **Morse EL**, **Adibi SA**: Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/ H^+ symporter in the renal brush border membrane. *J. Biol. Chem.* 267(14), 9565-9573, **1992**

Daniel H, **Morse EL**, **Adibi SA**: The high and low affinity transport systems for dipeptides in kidney brush border membrane respond differently to alterations in pH gradient and membrane potential. *J. Biol. Chem.* 266, 19917-19924, **1991**

Daniel H: First insights into the operational mode of epithelial peptide transporters. *J. Physiol.* 498, 561, **1997**

Daniel H: Function and molecular structure of brush border membrane peptide/ H^+ -symporters. *J. Mem. Biol.* 154, 197-203, **1996**

Daniel H: Transport von Oligopeptiden an Bürstensaummembranen von Dünndarm und Nierentubulus. *Z. Gastroenterol.* 33(4), 50-53, **1993**

Dieck ST, **Heuer H**, **Ehrchen J**, **Otto C**, **Bauer K**: The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-AMCA in astrocytes. *Glia* 25, 10-20, **1999**

Döring F, **Dorn D**, **Bachfischer U**, **Amasheh S**, **Herget M**, **Daniel H**: Functional analysis of a chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J. Physiol.* 497(3), 773-779, **1996**

Döring F, **Walter J**, **Föcking M**, **Amasheh S**, **Daniel H**: The aminoterminal region of the renal peptide transporter PepT2 determines its high substrate affinity. *Nov. Act. Leop. NF* 78(306), 269-274, **1998**

Döring F, **Walter J**, **Föcking M**, **Boll M**, **Amasheh S**, **Clauss W**, **Daniel H**: Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J. Clin. Invest.* 101, 2761-2767, **1998**

Dringen R, **Hamprecht B**, **Broer S**: The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor Cys-Gly in astroglia-rich primary cultures. *J. Neurochem.* 71, 388-393, **1998**

Durko I und **Juhász A**: Porphyrin synthesis in primary nervous tissue cultures from 10(-3)M delta-aminolevulinic acid in the presence of melatonin and neuropeptides. *Neurochem.* 11, 607-615, **1986**

Fei JF, **Kanai Y**, **Nussberger S**, **Ganapathy V**, **Leibach FH**, **Romero MF**, **Singh SK**, **Boron WF**, **Hediger MA**: Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 368, 563-566, **1994**

Fei YJ, **Liu JC**, **Fujita T**, **Liang R**, **Ganapathy V**, **Leibach FH**: Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporter PepT1 and

PepT2 using PepT1-PepT2 and PepT2-PepT1 chimeras. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 246, 39-44, **1998**

Freeman TC, Bentsen BS, Twaites DT, Simmons NL: H⁺/di-, tripeptide transporter (PepT1) expression in the rabbit intestine. *Plügers Arch. Eur. J. Physiol.* 430, 394-400, **1995**

Friedmann DI, Amidon GL: Intestinal absorption mechanisms of two prodrug ACE inhibitors in rats: Enalapril maleate and fosinopril sodium. *Pharm. Res.* 6, 1043-1047, **1989**

Friedmann DI, Amidon GL: The intestinal absorption mechanism of dipeptide ACE inhibitors of the lysyl-proline type: Lisinopril and SQ 29,852. *J. Pharm. Sci.* 18, 995, **1989**

Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH: Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PepT1 and PepT2. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 246, 470-475, **1998**

Ganapathy V, Burckard G, Leibach FH: Characteristics of glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 259, 8954-8959, **1984**

Ganapathy V, Leibach FH: Carrier-mediated reabsorption of small peptides in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 251, F945-F953, **1986**

Ganapathy V, Leibach FH: Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient? *Am. J. Physiol.* 249, G153-160, **1985**

Ganapathy V, Leibach FH: Role of pH-gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from rabbit. *J. Biol. Chem.* 258, 14189-14192, **1983**

Ganapathy V, Miyamoto Y, Leibach FH: Driving force for peptide transport in mammalian kidney and intestine. *Contrib Infusion Ther. Clin. Nutr.* 17, 54-68, **1987**

Garcia-Lopez MT, Herranz R, Gonzalez-Muniz R, Naranjo JR, De Ceballos ML, Del Rio J: Antinociceptive effects in rodents of the dipeptide Lys-Trp (Nps) and related compounds. *Peptides* 7, 39-43, **1986**

Ghanta VK, Rogers CF, Hsueh CM, Hiramoto NS, Soong SJ, Hiramoto RN: In vivo enhancement of NK cells activity with met-enkephalin and glycyl-glutamine: their possible role in the conditioned response. *Int. J. Neurosci.* 61, 135-143, **1991**

Gonzales DE, Covitz KM, Sadee W, Mrsny RJ: An oligopeptide transporter is expressed at high levels in the pancreatic carcinoma cell lines *AsPc-I* and *Capan-2*. *Cancer Res.* 58, 519-525, **1998**

Graul RC, Sadee W: Sequence alignments of the H⁺-dependent oligopeptide transporter family PTR: Inferences on structure and function of the intestinal PEPT1 transporter. *Pharmaceut. Res.* 14, 388-400, **1997**

Grimble GK, Keohane P, Higgins BE, Kaminski MV, Silk DB: Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.* 71, 65-69, **1986**

Grimble GK, Rees RG, Keohane PP, Raimundo AH, Cartwright T, Desreumaux S, Silk DB: Effect of peptide chain length on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum. *Gastroenterol.* 92, 136-142, **1987**

- Grimble GK:** The significance of peptides in clinical nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 419-447, **1994**
- Helliwell PA,** Meredith D, Boyd RCA, Bronk JR, Lister N, Bailey PD: Tripeptide transport in rat lung. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 430-434, **1994**
- Himmelseher S,** Pfenninger E, Herrmann P: Cerebrospinal and plasma amino acid concentration after administration of i.v. glycyl-glutamine and glycyl-tyrosine containing amino acid solutions in humans. *JPEN* 20, 281-286, **1996**
- Hipkiss AR,** Preston JE, Himsworth DT, Worthington VC, Abbot NJ: Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 238, 135-138, **1997**
- Hu M,** Amidon GL: Passive and carrier-mediated intestinal absorption components of captopril. *J. Pharm. Sci.* 77, 1007-1011, **1988**
- Huang JT:** Accumulation of peptide Tyr-D-Ala-Gly by choroid plexus during ventriculocisternal perfusion of rat brain. *Neurochem. Res.* 7, 541-548, **1982**
- Huang JT:** Accumulation of peptides by choroid plexus in vitro: Tyr-D-Ala-Gly as a model. *Neurochem. Res.* 6, 681-689, **1981**
- Hubl W,** Druml W, Langer K, Lochs H: Influence of molecular structure and plasma hydrolysis on the metabolism of glutamine-containing dipeptides in humans. *Metabolism* 38, 59-62, **1989**
- Inui K,** Tomita Y, Katsura T, Okano T, Takano M, Hori R: H⁺-coupled active transport of bestatin via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 482-486, **1992**
- Ito H,** Fukada Y, Murate K, Kimura A: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168, **1983**
- Iwatsuki K,** Ren LM, Chiba S: Effects of peptide histidine-isoleucine on pancreatic exocrine secretion in anaesthetized dogs. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 20, 501-507, **1993**
- Kato M,** Maegawa H, Okano T, Inui K, Hori R: Effect of various chemical modifiers on H⁺-coupled transport of cephradine via dipeptide carriers in rabbit intestinal brush-border membranes: role of histidine residues. *J. Pharm. Exp. Ther.* 251, 745-749, **1989**
- Kramer W,** Girbig F, Gutjahr U, Kleemann HW, Leipe I, Urbach H, Wagner A: Interaction of renin inhibitors with the intestinal uptake system for oligopeptides and β -lactam antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* 1027, 25-30, **1990**
- Kramer W,** Girbig F, Petzoldt E, Leipe I: Inactivation of the intestinal uptake system for β -lactam antibiotics by diethylpyrocarbonate. *Biochim. Biophys. Acta* 943, 288-296, **1990**
- Kranich O,** Hambrecht B, Dringen R: Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. *Neurosci. Lett.* 219(3), 211-214, **1996**
- Larsson LI:** Corticotropin-like peptides in central nerves and in the endocrine cells of gut and pancreas. *Lancet* II, 1321-1323, **1977**
- Leibach FH,** Ganapathy V: Peptide transporters in the intestine and in the kidney. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 99-119, **1996**

- Leibach FH**, Ganapathy V: Peptide transports in the intestine and in the kidney. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 99-119, **1996**
- Li J**, King BK, Janu PG, Renegar KB, Kudsk KA: Glycyl-L-glutamine-enriched total parenteral nutrition maintains small intestine gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. *JPEN* 22, 31-36, **1998**
- Liang R**, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH: Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* 270, 6456-6463, **1995**
- Lindquist S**, Hansson L, Hernell O, Lönnerdal B, Normark J, Strömquist M, Bergström S: Isolation of mRNA and Genomic DNA from epithelial cells in human milk and amplification by PCR. *Bio. Techniques* 17, 692-694, **1994**
- Liu W**, Liang R, Ramamoorthy S, Fei YJ, Ganapathy ME, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH: Molecular cloning of PEPT2, a member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1235, 461-466, **1995**
- Lochs H**, Morse EL, Adibi SA: Mechanism of hepatic assimilation of dipeptides. Transport versus hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 261, 14976-14981, **1986**
- Lombardo YB**, Morse EL, Adibi SA: Specificity and mechanism of influence of amino acid residue on hepatic clearance of oligopeptides. *J. Biol. Chem.* 263, 12920-12926, **1988**
- Mackenzie B**, Loo D, Fei YJ, Liu W, Ganapathy W, Leibach FH, Wright ME: Mechanisms of the human intestinal H⁺-coupled oligopeptide transporter hPepT1. *J. Biol. Chem.* 271(10), 5430-5437, **1996**
- Matthews DM**, Adibi SA: Peptide absorption. *Gastroenterol.* 71, 151-161, **1976**
- Matthews DM**: Protein Absorption. Development and present state of the subject. New York: Wiley-Liss, **1991**
- Mattson M**, Henningson AC, Henningson S, Hammar L: Effects of His-Phe, a competitive inhibitor of histidine decarboxylase, on gastric secretion in chronic gastric fistula rats: delay in acid secretion response to pentagastrin. *Agents Actions* 12, 176-178, **1982**
- Mc Cain HW**, Bilotta J, Lamster IB: Endorphinergic modulation of immune function: potent action of the dipeptide glycyl-glutamine. *Life Sci.* 4, 169-176, **1987**
- McCain HW**, Lamster IB, Bilotta J: Modulation of human T-cell suppressor activity by beta-endorphin and glycyl-L-glutamine. *Int. J. Immunopharmacol.* 8, 443-446, **1986**
- McFarland GA**, Holliday R: Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp. Cell Res.* 212, 167-175, **1994**
- Meredith D**, Boyed CA: Dipeptide transport characteristics of the apical membrane of rat lung type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.* 269, L137-L143, **1995**
- Miyamoto K**, Ganapathy V, Leibach FH: Identification of histidyl and thiol groups at the active site of rabbit renal dipeptide transporter. *J. Biol. Chem.* 261(34), 16133-16140, **1986**

- Miyamoto K**, Shiraga T, Morita K, Yamamoto H, Haga H, Taketani J, Tamai I, Sai J, Tsuji A, Takeda E: Sequence, tissue distribution and developmental changes in rat intestinal oligopeptide transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1305, 34-38, **1996**
- Morimoto K**, Yamahara H, Lee VH, Kim KJ: Dipeptide transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.* 10, 1668-1674, **1993**
- Morlion BJ**, Stehle P, Wachtler P, Siedhoff HP, Koller M, König W, Fürst P, Puchstein C: Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann. Surg.* 227, 302-308, 1998
- Myers RD**: Neuroactive peptides: unique phases in research on mammalian brain over three decades. *Peptides* 15, 367-381, **1994**
- Novotny A**, Xiang J, Stummer W, Teuscher NS, Smith DE, Keep RF: Mechanisms of 5-aminolevulinic acid uptake at the choroid plexus. *J. Neurochem.* 75, 321-328, **2000**
- Nyquist-Battie C**, Hagler KE, Millington WR: Glycyl-L-glutamine regulates the expression of asymmetric acetylcholinesterase molecular forms in cultured cardiac post-natal myocytes. *J. Mol. Cell Cardio.* 25, 1111-1118, **1993**
- Ogihara H**, Saito HS, Shin BC, Terada T, Takenoshita S, Nagamachi Y, Inui K, Takata K: Immuno-localisation of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220, 848-852, **1996**
- Otto C**, Bauer K: Dipeptide uptake: A novel marker for testicular and ovarian macrophages. *Anat. Rec.* 245, 662-667, **1996**
- Parish DC**, Smyth DG, Normanton JR, Wostencroft JH: Glycyl-glutamine, an inhibitory neuropeptide derived from beta-endorphin. *Nature* 306, 267-270, **1983**
- Paulsen IT**, Skurray RA: The POT family of transport proteins. *Trends Biochem. Sci.* 19, 404, **1994**
- Perel'man MI**, Kornilova ZKh, Paukonv VS, Boikov AK, Priimak AA: The effect of carnosine on the healing of a lung wound. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 108, 352-356, **1989**
- Perry JR**, Basarai MA, Steiner HY, Naider F, Becker JM: Isolation and characterisation of a *Saccaromyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol. Cell Biol.* 14(1): 104-115, **1994**
- Prokop'eva VD**, Laptev BI, Afanas'ev SA: The protective effect of carnosine in hypoxia and reoxygenation of the isolated rat heart. *Biokhimiia* 57, 1389-1392, **1992**
- Rerat A**, Simoes-Nunes C, Vaissade P, Vaugelade P: Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids of oligopeptides in the non anaesthetized pig. *Brit. J. Nutr.* 68, 111-138, **1992**
- Ries M**, Wenzel U, Daniel H: Transport of cefadroxil in rat kidney brush border membranes is mediated by two electrogenic H⁺-coupled systems. *J. Pharm. Exper. Ther.* 271, 1327-1333, **1994**
- Saito H**, Okuda M, Terada T, Sasaki S, Inui K: Cloning and characterization of a rat H⁺/peptide cotransporter mediating absorption of β -lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J. Pharmaco. Exp. Ther.* 274, 1631-1637, **1995**
- Saito S**, Terada T, Okuda M, Sasaki S, Inui K: Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PepT2. *BBA* 1280, 173-177, 1996

- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467, **1977**
- Sassoe-Pongetto M**, Cantino D, Panzanelli P, Verdun di Cantogno L, Margolis FL, De Biasi S, Fasolo A: Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. Neuroreport 5, 7-10, **1993**
- Schlagheck TG** und Webb KE: Characterization of peptides from the gastrointestinal tract from calves. Fed. Proc. 43, 671-677, **1984**
- Schlagheck TG**, Webb KE: Characterization of peptides from the gastrointestinal tract of calves. Fed. Proc. 43, 671-677, **1984**
- Schulz M**, hambrecht B, Kleinkauf H, Bauer K: Peptide uptake by astroglia-rich cultures. J. Neurochem. 49, 748-755, **1987**
- Seal CJ**, Parker DS: Isolation and characterization of circulating low molecular weight peptides in steer, sheep, and rat portal and peripheral blood. Comp. Biochem. Physiol. 99B, 679-685, **1991**
- Shennan DB**, Calvert KT, Backwell FRC, Boyd CAR: Peptide aminonitrogen transport by the lactating rat mammary gland. Biochim. Biophys. Acta 1373, 252-260, **1998**
- Silk DB**, Perrett D, Clark M: Absorption of amino acids and peptides in man. Gut. 13, 854-855, **1972**
- Silk DB**, Perrett D, Clark M: Jejunal and ileal absorption of dibasic amino acids and an arginine containing dipeptide in cystinuria. Gastroenterol. 68, 1426-1432, **1975**
- Sinko PJ**, Amidon GL: Characterisation of the oral absorption of β -lactam antibiotics. I. Cephalosporins. Determination of intrinsic membrane absorption parameters in the rat intestine in situ. Pharm. Res. 5, 645-650, 1988
- Sinko PJ**, Amidon GL: Characterisation of the oral absorption of β -lactam antibiotics. II. Competitive absorption and peptide carrier specificity. J. Pharm. Sci. 78, 723-726, **1989**
- Smith DE**, Pavlova A, Berger UV, Hediger MA, Huang YG, Schnermann JB: Tubular localization and tissue distribution of peptide transporters in rat kidney. Pharm. Res. 15, 1244-1249, **1998**
- Smyth DG**, Parish DC, Normanton JR, Wolstencroft JH: The C-terminal dipeptide of beta-endorphin: a neuropeptide with inhibitory activity. Life Sci. 33, 575-578, **1983**
- Southern E**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Bio. 98, 503-517, **1975**
- Steel A**, Nussberger S, Romero MF, Boron WF, Boyd CA, Hediger MA: Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. J. Physiol. 498(3), 563-569, **1997**
- Steiger B**, Meier PJ: Bile acid and xenobiotic transportes in liver. Curr. Opin. Cell Biol. 10, 462-467, **1998**
- Steiner HY**, Naider F, Becker JM: The PTR family: a new group of peptide transporters. Mol. Microbiol. 16, 825-834, **1995**

- Steiner HY**, Song W, Zang L, Naider F, Becker JM, Stacey G: An Arabidopsis peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *Plant Cell* 6, 1289-1299, **1994**
- Stern AS**, Würzburger RJ, Barkey R, Süector S: Opioid polypeptides in the guinea pig pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6703-6706, **1982**
- Swaan PW**, Stehouwer MFC, Tukker JJ: Molecular mechanisms for the relative binding affinity to the intestinal peptide carrier. Comparison of three ACE inhibitors: enalapril, enalaprilat, and lisinopril. *Biochim. Biophys. Acta* 1236, 31-38, **1995**
- Tamai I**, Terasaki T, Tsuji A: Evidence for the existence of a common transporter system of beta-lactam antibiotics in isolated rat hepatocytes. *J. Antibiol.* 38, 1774-1780, **1985**
- Tekhomirova EV**, Kornilova ZKh, Ogloblina TA, Perel'man MI: The effect of carnosine of the intracellular pH in cultured human embryonic lung fibroblasts. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 16, 218-220, **1993**
- Terada T**, Daito H, Mukai M, Inui K: Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by rat H⁺/peptide cotransporter PepT1. *FEBS Letters* 394, 196-200, **1996**
- Terada T**, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, Inui K: N-terminal halves of rat H⁺/peptide transporters are responsible for their substrate recognition. *Pharm. Res.* 17, 15-20, **2000**
- Terr L** und Weiner LP: An autoradiographic study of delta-aminolevulinic acid uptake by mouse brain. *Exp. Neurol.* 79, 564-568, **1983**
- Teuscher NS**, Novotny A, Keep RF, Smith DE: Functional evidence for presence of PEPT2 in rat choroid plexus: studies with glycylsarcosine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 494-499, **2000**
- Thamotharan M**, Lombardo YB, Bawani SZ, Adibi SA: An active mechanism for completion of the final stage of protein degradation in the liver, lysosomal transport of dipeptides. *J. Biol. Chem.* 272, 11786-11790, **1997**
- Tiruppathi C**, Kulanthaivel P, Ganapathy V, Leibach FH: Evidence for tripeptide-proton symport in renal brush border membrane vesicles. Studies in a novel rat strain with a generic absence of dipeptidyl peptidase IV. *Biol. Chem.* 265(4), 2048-2053, **1990**
- Tiruppathi C**, Kulanthaivel P, Ganapathy V, Leibach FH: Evidence for tripeptide/H⁺ cotransport in rabbit renal brush-border membrane vesicles. *Biochem. J.* 268, 27-33, **1990**
- Tsuji A**, Terasaki T, Tamai I, Hirooka H: H⁺-gradient-dependent and carrier-mediated transport of cefexime, a new cephalosporin antibiotic, cefdinir, mediated by dipeptide and monocarboxylic acid transport systems in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 45, 996-998, **1993**
- Ueda H**, Shiomi H, Talagi H: Regional distribution of a novel analgesic dipeptide kyotorphin (Tyr-Arg) in the rat brain and spinal cord. *Brain Res.* 198, 460-464, **1980**
- Ueda H**, Tatsumi K, Shiomi H, Takagi H: Analgesic dipeptide, kyotorphin (Tyr-Arg), is highly concentrated in the synaptosomal fraction of the rat brain. *Brain Res.* 231, 222-224, **1982**

- Ueda H**, Yoshihara Y, Misawa H, Fukushima N, Katada T, Takagi H, Satoh M: The kyotorphin (tyrosine-arginine) receptor and a selective reconstruction with purified G_i, measured with GTPase and phospholipase C assays. *J. Biol. Chem.* 264, 3732-3741, **1989**
- Ueda H**, Yoshihara Y, Takagi H: A putative met-enkephalin releaser, kyotorphin enhances intracellular Ca²⁺ in the synaptosomes. *Biochem Biophys Res. Commun.* 137, 897-902, **1986**
- Unger RH**, Ohneda A, Aguilar-Parada E: The role of aminogenic glucagon secretion in blood glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 48, 810-822, **1969**
- Vazquez JA**, Daniel H, Adibi SA: Dipeptides in parenteral nutrition: From basic science to clinical applications. *Nutr. Clin. Pract.* 8, 95-105, **1993**
- Vazquez JA**, Raghunath M, Adibi SA: Uptake and hydrolysis of glycylglutamine at the blood-brain barrier. *Metabolism* 41, 121-124, **1992**
- Wang H**, Fei YJ, Ganapathy V, Leibach FH: Electrophysiologic characteristics of the proton-coupled peptide transporter PepT2 cloned from rat brain. *Am. J. Physiol.* 275, C967-C975, **1998**
- Wang S**, Webb KE, Akers MR: Peptide-bound methionine can be a source of methionine for the synthesis of secreted proteins by mammary tissue explants from lactating mice. *J. Nutr.* 126, 1662-1672, **1996**
- Weaver CD**, Gundersen V, Verdoorn TA: A high affinity glutamate/aspartate transport system in pancreatic islets of Langerhans modulates glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 1647-1653, **1998**
- Wroblewska B**, Wroblewski JT, Pshenichkin S, Surin A, Sullivan SE, Neale JH: N-Acetylaspartylglutamate selectively activates mGluR3 receptors in transfected cells. *J. Neurochem.* 69, 174-181, **1997**
- Yamaguchi T**, Yamaguchi M, Lajtha A: Inhibition of dipeptide transport in mouse brain slices. *J. Neurol. Sci.* 10, 323-329, **1970**
- Yamashita F**, Kim KJ, Lee VH: Dipeptide uptake and transport characteristics in the rabbit tracheal epithelial cell layers cultured at an air interface. *Pharm. Res.* 15, 979-983, **1998**
- Zaloga GP**, Roberts PR, Black KW, Lin M, Zapata-Sudo G, Sudo RT, Nelson TE: Carnosine is a novel peptide modulator of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *Am. J. Physiol.* 272, H462-H468, **1997**

7 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin convering enzyme
AK	Antikörper
Anti-DIG-AP	Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase
aqua bidest.	Aqua bidestillata
A _{nm}	Absorption
AS	Aminosäuren
AP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
BSM	Bürstensaummembran
BSMV	Bürstensaummembranvesikel
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CDP	2-Chlor-5-(4-methoxy Spiro(1,2-Dioxetan-3,2'-(5'Chlor)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan)-4-yl)-1-Phenylphosphat
ca.	circa
Ci	Curie
CIP	Calf intestinal phosphatase
cRNA	Zur cDNA komplementäre RNA
c-Terminus	Carboxy-Terminus
CSPD	3-(4-methoxy-spiro {1,2-dioxetan 3,2-(5'chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]-4-yl)-Phenylphosphat
CTP	Cytosintriphosphat
D-AS	Rechtsdrehende Aminosäuren
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
DNase	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
ddNTP	Didesoxynukleotid
dpm	Desintegrations per minute
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
evtl.	eventuell
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung

x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
³ H	Tritium Isotop
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
K _m	Michaelis Menten Konstante
l	Liter
L-AS	Linksdrehende Aminosäure
λ	Wellenlänge
M	Molar (mol/l)
mM	Millimolar
mA	Milliampere
MCS	Multiple cloning site (multiple Klonierungsstelle)
MES	2-(N-Morpholin)ethansulfat
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
M-MULV	Moloney Murine Leukemia Virus
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
μ	mikro
ng	Nanogram
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
NTB	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate-buffered-Saline
PepT1	Intestinaler Peptidtransporter
PepT2	Renaler Peptidtransporter
pmol	Pikomol
PTR	Peptidtransporter
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RNase Inhibitor	Ribonuklease Inhibitor

rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate
s	Sekunde
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Taq	Thermus aquaticus
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetraethylendiamin
Tris	Tri(hydroxymehtyl)methylamin
T _m	Schmelztemperatur
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit
UV	ultraviolett
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
z.B.	Zum Beispiel

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben:

Danken möchte ich vor allem Frau Prof. Dr. H. Daniel, die mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen durchzuführen. Ich danke ihr besonders für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihr großes Engagement, ihr wissenschaftliches Interesse und ihre konstante Kritik, was wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Ernährungswissenschaft (Abteilung Biochemie) für die vielen kleinen und großen Hilfen, ohne die eine wissenschaftliche Arbeit nicht entstehen kann. Besonders hervorheben möchte ich Frau Dipl. oec. troph. Heidi Post, die mich im Rahmen ihrer Diplomarbeit bei der RNA-Präparation, der RT-PCR und in-situ-Hybridisierung stets engagiert unterstützt hat.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. H. Koepsell (Anatomisches Institut der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg) bedanken, der es mir ermöglicht hat, erste Gehversuche bei der in-situ-Hybridisierung in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Danken möchte ich besonders Herrn Dr. U. Karbach für die freundliche Aufnahme während meiner Würzburg-Aufenthalte, die sehr gute Betreuung und die Bereitschaft mich mit den mir neuen Methoden wie in-situ-Hybridisierung, Immunhistochemie und Antikörperreinigung vertraut zu machen.

Besonders hervorheben möchte ich die Unterstützung von PD Dr. A. Fischer und cand. med. D. Groneberg (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen), die mir bei der Durchführung der Immunhistochemie und der Interpretation der histologischen Ergebnisse geholfen haben. Vielen Dank auch für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial wie Gewebepreparationen, Zellen, Antikörper, für die vielen guten Anregungen sowie die wertvolle Hilfe bei der Auswertung der Versuchsergebnisse.

Danken möchte ich auch der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung die das Promotionsvorhaben finanziell unterstützt hat und es mir somit ermöglicht hat, die in dieser Arbeit dargestellten neuartigen und interessanten Befunde zu erheben.

Zu guter letzt, aber dennoch nicht weniger herzlich, möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und bei allen meinen Freunden für ihre großartige Unterstützung und Motivation bedanken, die ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Herrn Martin Nickolaus und Herrn Holger Keßler sei für die Hilfe bei der Lösung von hard- und software-bedingten Problemen besonders gedankt. Ohne sie alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Allen anderen, die einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, hier jedoch nicht namentlich genannt sind, sei ebenfalls herzlich gedankt.

Lebenslauf

Monika Nickolaus

Erbgasse 1
67487 Maikammer

Zur Person

Geboren am 02. Oktober 1970 in Edenkoben/Pfalz
ledig

- 1977 – 1981 **Grundschule Maikammer**
- 1981 - 1990 **Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Neustadt / Weinstraße**
Abschluß : Allgemeine Hochschulreife
- Justus-Liebig-Universität Gießen**
- 10/90 Aufnahme des Studiums der Oecotrophologie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
- 06/93 – 10/94 Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Daniel am Institut für Ernährungswissenschaft mit dem Thema: "*Northern-Blot-Analyse zum Nachweis des mdr 1b Gens in Rattenhepatozyten in Primärkultur*".
- 09/95 Diplomprüfung (Fachrichtung Ernährungswissenschaft)
- Justus-Liebig-Universität Gießen**
- 11/95 - 04/99 Praktische Arbeiten zur Promotion bei Prof. Dr. H. Daniel am Institut für Ernährungswissenschaft mit dem Thema: "*Nachweis und zelluläre Lokalisation des Peptidtransporters (PepT2) in extrarenalen Geweben*".
- 28.05.2001 Disputation