

Expression, Lokalisation und funktionelle Aspekte des Peptidtransporters
PEPT2 in den Atemwegen von Ratte, Maus und Mensch

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität-Gießen

vorgelegt von Jan David Alexander Groneberg

aus Frankfurt am Main

Gießen 2000

Aus der Medizinischen Betriebseinheit
Institut für Anatomie und Zellbiologie

Leiter : Prof. Dr. W. Kummer
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. A. Fischer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Tag der Disputation: 16. Mai 2001

Für meine Eltern

Inhaltsübersicht

Inhaltsübersicht	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	17
3 Ergebnisse.....	34
4 Diskussion.....	59
5 Zusammenfassung.....	73
6 Literaturverzeichnis.....	77
7 Veröffentlichungen.....	106
8 Lebenslauf.....	109
9 Danksagung.....	110

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Entwicklung des Atemtrakts.....	1
1.2 Das Bronchialepithel.....	1
1.3 Das Alveolarepithel.....	2
1.3.1 Pneumozyten Typ I.....	2
1.3.2 Pneumozyten Typ II.....	3
1.3.3 Weitere Zellen des Alveolarraums.....	3
1.4 Transportsysteme des respiratorischen Epithels.....	4
1.5 Oligopeptidtransporter.....	5
1.5.1 Peptidtransportvorgänge auf zellulärer Ebene.....	5
1.5.2 Einordnung der Transportprozesse.....	5
1.5.3 Substrate.....	7
1.5.3.1 Oligopeptide.....	7
1.5.3.2 Betalaktamantibiotika.....	8
1.5.3.3 Weitere Substrate.....	9
1.5.4 Molekulare Ebene des Peptidtransports.....	10
1.5.4.1 Der renale Peptidtransporter PEPT2.....	10
1.5.4.2 Der intestinale Peptidtransporter PEPT1.....	11
1.6 Mukoviszidose.....	13
1.7 Ziel der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Versuchstiere.....	17
2.1.2 RT-PCR und Northern-Blot.....	17
2.1.3 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung für Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung.....	17
2.1.3.1 Tierische Gewebe.....	17
2.1.3.2 Humane Gewebe.....	18
2.1.4 Ex-vivo-Aufnahmestudien.....	18
2.1.4.1 Tierische Gewebe.....	18
2.1.3.2 Humane Gewebe.....	19

2.2 Methoden	20
2.2.1 RNA-Isolation	20
2.2.3 Reverse-Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.2.3.1 Prinzip der PCR	20
2.2.3.2 Reverse-Transkription	20
2.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.2.3.4 Bedingungen und Primerdesign	21
2.2.3.4.1 PCR zum Nachweis der PEPT2-mRNA	21
2.2.3.4.2 PCR zum Nachweis der PEPT1-mRNA	21
2.2.3.4.3 PCR zum Nachweis der Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)-mRNA	22
2.2.3.5 Kontrollen	22
2.2.4 Sondenherstellung für In-situ-Hybridisierung und Northern-Blot	23
2.2.4.1 Präparation der cDNA-Matrizen	23
2.2.4.2 In-vitro-Transkription	23
2.2.5 Northern-Blot	24
2.2.5.1 Hybridisierung	24
2.2.5.2 Detektion der hybridisierten Riboproben	25
2.2.6 In-situ-Hybridisierung	25
2.2.6.1 Durchführung	25
2.2.6.2 Detektion der hybridisierten Riboproben	26
2.2.7 Immunhistochemie	27
2.2.7.1 Primärantikörper	27
2.2.7.2 Sekundärantikörper	28
2.2.7.3 Tertiärreagenz	28
2.2.7.4 Antikörperinkubation und Antikörperdetektion	29
2.2.7.5 Kontrollen	29
2.2.7.5.1 Präabsorption	29
2.2.7.5.2 Weitere Kontrollen	30
2.2.8 Ex-vivo-Aufnahmestudien	30
2.2.8.1 Inkubation	30
2.2.8.2 Verdrängungsstudien	30
2.2.8.3 Kontrollen	31
2.2.8.4 Gewebeprozessierung	32

2.2.9 Kombinierte Ex-vivo- und Histochemiestudien.....	32
2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie.....	33
2.2.11 Dokumentation.....	33
3 Ergebnisse.....	34
3.1 RT-PCR.....	34
3.2 Northern-Blot.....	35
3.3 In-situ-Hybridisierung.....	36
3.3.1 Atemwege.....	36
3.3.2 Alveolarbereich.....	36
3.4 Immunhistochemie.....	39
3.4.1 Ratte.....	39
3.4.1.1 Atemwege.....	39
3.4.1.2 Alveolarbereich.....	39
3.4.2 Maus.....	42
3.4.2.1 Atemwege.....	42
3.4.1.2 Alveolarbereich.....	42
3.4.3 PEPT1-Immunhistochemie in Mäusegeweben.....	45
3.4.3.1 Lungengewebe.....	45
3.4.3.2 Jejunum.....	45
3.4.4 Mensch.....	47
3.4.4.1 Normale Lunge.....	47
3.4.4.1.1 Atemwege.....	47
3.4.4.1.2 Alveolarbereich.....	47
3.4.4.2 Mukoviszidose.....	50
3.4.4.2.1 Atemwege.....	50
3.4.4.2.2 Alveolarbereich.....	50
3.5 Ex-vivo-Aufnahmestudien.....	53
3.5.1 Atemwege.....	53
3.5.2 Alveolarbereich.....	53
3.6 Kombinierte Ex-vivo-Aufnahmestudien und Histochemie.....	56
3.7 Ex-vivo-Aufnahmestudien in humanen Lungengeweben.....	57
3.7.1 Normale Lunge.....	57
3.7.2 Mukoviszidose.....	57

4 Diskussion	59
4.1 Methoden	59
4.1.1 Nachweis der Transporter-mRNA-Expression	59
4.1.2 Lokalisation der Transporter-mRNA	60
4.1.3 Nachweis des Transporterproteins	61
4.1.4 Nachweis des Oligopeptidtransports auf funktioneller Ebene	61
4.2 Biologische Bedeutung der Befunde	64
4.2.1 Pulmonaler Peptidmetabolismus	64
4.2.2 Endogene Substrate für PEPT2 mit Bedeutung für die lungeneigene Homöostase	67
4.2.3 Systemischer Peptidmetabolismus	68
4.2.4 Die Expression des Transporters in normalen und pathologischen humanen Geweben	68
4.2.5 Delta-Aminolävulinsäure	73
5 Zusammenfassung	74
6 Literaturverzeichnis	77
7 Veröffentlichungen	106
8 Lebenslauf	109
9 Danksagung	110

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Peptidtransport auf zellulärer Ebene.
- Abb. 2: Oligopeptide als Substrate von PEPT2 und PEPT1.
- Abb. 3: Strukturhomologie von Betalaktamen und Tripeptiden.
- Abb. 4: Struktur der Delta-Aminolävulinsäure.
- Abb. 5: Nachweismethoden der Lokalisation.
- Abb. 6: Struktur des PEPT2-Proteins und der Sequenz des Antikörpers.
- Abb. 7: Substrate der Ex-vivo-Aufnahmestudien.
- Abb. 8: Detektion der PEPT2-mRNA durch RT-PCR.
- Abb. 9: Detektion der PEPT2-mRNA durch Northern-Blot.
- Abb. 10: Lokalisation der PEPT2-mRNA im Rattenbronchiolus durch nonradioaktive In-Situ-Hybridisierung.
- Abb. 11: Lokalisation der PEPT2-mRNA in der peripheren Rattenlunge durch nonradioaktive In-Situ-Hybridisierung.
- Abb. 12: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität im Rattenbronchus.
- Abb. 13: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren Rattenlunge.
- Abb. 14: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität im Mäusebronchiolus.
- Abb. 15: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren Mäuselunge.
- Abb. 16: PEPT1-Immunhistochemie in Mäusegeweben.
- Abb. 17: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der humanen Trachea.
- Abb. 18: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren humanen Lunge.
- Abb. 19: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten.
- Abb. 20: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren Lunge von Mukoviszidosepatienten.
- Abb. 21: Funktionelle Ex-vivo-Aufnahmestudien in der Mäuselunge. Bronchiolus.
- Abb. 22: Funktionelle Ex-vivo-Aufnahmestudien in der peripheren Mäuselunge.
- Abb. 23: Kombinierte Ex-vivo-Aufnahmestudien und Lektin-Histochemie.
- Abb. 24: Funktionelle Ex-vivo-Aufnahmestudien in der humanen Lunge.
- Abb. 25: Pulmonale Lokalisation von Peptidasen.
- Abb. 26: Hydrolyse zu Oligopeptidfragmenten durch Lungenpeptidasen am Beispiel von Substanz P.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Abkürzungen der Nucleoside
Tab. 2:	Abkürzungen der Aminosäuren
Tab. 3:	Molekulare Merkmale der Oligopeptidtransporter PEPT1 und PEPT2
Tab. 4:	PEPT2-Primer
Tab. 5:	PEPT1-Primer
Tab. 6:	GAPDH-Primer
Tab. 7:	Hybridisierungssonden
Tab. 8:	Sekundärantikörper
Tab. 9:	Tertiär-Reagenz
Tab. 10:	Fluoreszenzfilter

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
δ-ALA	Delta-Aminolävulinsäure
AMCA	7-Amino-4-Methyl-Coumarin-3-Acetic-Acid
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	Mukoviszidose, Zystische Fibrose
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
Cy3	Indocarbocyanin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EtBr	Ethidiumbromid
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gly-(L)-Gln	Glycyl-(L)-Glutamin
MEM	Minimum Essential Medium
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEPT1	Intestinaler Oligopeptidtransporter
PEPT2	Renaler Oligopeptidtransporter
RER	Rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat

TBS	Tris Buffered Saline
TM	Transmembran-Domänen
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight
v/v	volume/volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

Alle hier nicht aufgeführten Einheiten sind SI- bzw. erweiterte SI-Einheiten. Die letzte Stelle aller angegebenen Werte ist gerundet.

Die Nucleoside werden mit den bekannten 1-Buchstaben-Abkürzungen abgekürzt (Tab. 1). Für die Aminosäuren gelten die 3-Buchstaben- und 1-Buchstaben-Abkürzungen (Tab. 2).

<i>Nucleosid</i>	<i>Abkürzung</i>
Adenosin	A
Guanosin	G
Cytidin	C
Thymidin	T
Uridin	U

Tabelle 1: Abkürzungen der Nucleoside

<i>Aminosäure</i>	<i>3-Buchstaben-Abkürzung</i>	<i>1-Buchstaben-Abkürzung</i>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I

<i>Aminosäure</i>	<i>3-Buchstaben-Abkürzung</i>	<i>1-Buchstaben-Abkürzung</i>
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Tabelle 2: Abkürzungen der Aminosäuren

1. Einleitung

1.1 Entwicklung und Aufbau des Atemtrakts

Der Atemtrakt gliedert sich in die luftleitenden Abschnitte Nasenhöhle, Nasopharynx, Larynx, Trachea, Bronchi, Bronchioli und Bronchioli terminales (Phalen und Oldham, 1983) und in die respiratorischen Abschnitte Bronchioli respiratorii und Alveolarbereich, in denen der Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut stattfindet (Staub und Albertine, 1988). Entwicklungsgeschichtlich beginnt die Anlage des Respirationstrakts mit der Abschnürung des ventralen Lungendivertikels vom Vorderdarm in der dritten Embryonalwoche. Das Epithel des Atemtraktes ist somit entodermaler Herkunft.

Die Entwicklung gleicht formal der einer exokrinen Drüse: Aus dem Lungendivertikel wachsen seitlich die beiden Lungenknospen, wobei durch dichotome Teilungen bis zum Ende des sechsten Monats der Bronchialbaum entsteht, der jedoch erst durch weitere nachgeburtliche Teilungen seine endgültige Form erhält. Die Entwicklung des Alveolarraums an den Endverzweigungen des Bronchialbaums setzt ab dem siebten Monat ein. Am Ende des siebten Monats differenzieren sich die einzelnen Alveolarzellen aus (Duncker, 1990).

1.2 Das Bronchialepithel

Das Bronchialepithel kleidet die luftleitenden Abschnitte des Atemtrakts aus. Es wurde traditionell als physikalische Barriere gegenüber schädlichen Umweltfaktoren betrachtet. Als Hauptaufgabe schien in dieser Hinsicht der Schutz vor inhalativen Noxen zu sein. Durch eine Vielzahl jüngerer Untersuchungen musste diese enge Sichtweise revidiert werden. Die Funktionen des Bronchialepithels sind tatsächlich von wesentlich komplexerer Natur: Elektrolyt- und Flüssigkeitstransporte und die mukoziliäre Clearance dienen zur Aufrechterhaltung der pulmonalen Homöostase. Darüber hinaus ist das Bronchialepithel aktiv an der Erregerabwehr und lokalen Regulation der Immunantwort und Entzündungsreaktion beteiligt (Rennard et al., 1991).

Morphologisch ist das Bronchialepithel durch ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel mit oraler Schlagrichtung der Kinozilien gekennzeichnet. Die basale Begrenzung wird durch eine Basalmembran aus Kollagen Typ IV, Laminin-Entaktin/Nidogen-Komplexen und Proteoglykanen gebildet (Paulsson, 1992).

Der häufigste Zelltyp ist die hochprismatische kinozilientragende Zelle mit ca. 300 Zilien pro Zelle und direktem Anschluss zum Lumen (McDowell und Beals, 1987). Ebenfalls

häufig vorkommend sind die Becherzellen mit polysaccharidhaltigen Schleimtröpfchen im apikalen Bereich und die Bürstensaumzellen, die als unreife Ersatzzellen für zugrunde gegangene Flimmer- und Becherzellen gelten. Sie besitzen einen dichten apikalen Bürstensaum und werden als Zellen mit mechano- oder chemosensitiver Funktion angesehen. Weitere Zelltypen sind Basalzellen ohne Kontakt zum Lumen, neuroendokrine Zellen, dendritische Zellen, Clara-Zellen, vereinzelte Lymphozyten und sensorische Nervenfasern (Söderberg et al., 1988). Die einzelnen Zelltypen sind untereinander über Desmosome und mit der Basalmembran über Hemidesmosome verbunden (Rennard et al., 1994). Die Barrierefunktion der Epithelzellen wird über Tight junctions aufrecht erhalten (Gumbiner, 1987).

1.3 Das Alveolarepithel

Die Alveolen als Endabschnitte des Bronchialbaums sind kleine Aussackungen der Bronchioli respiratorii. Ihr mittlerer Durchmesser beträgt 250 bis 290 μm . Bei einer Anzahl von rund 300 Mio Alveolen errechnet sich eine innere Lungenoberfläche von ca. 70 bis 140 m^2 (Duncker, 1994). Das Alveolarepithel differenziert sich zu 2 Zelltypen, den Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ I und Typ II.

1.3.1 Pneumozyten Typ I

Die Pneumozyten Typ I sind zarte, flach ausgezogene Zellen, die den größten Teil der Alveolenoberfläche bekleiden. Sie stellen die eigentlichen Deckzellen des Alveolarepithels dar, wobei sie beim Menschen bei einem geringen Anteil von ca. 8 % aller Zellen der Interalveolarepten jedoch ca. 95 % der Oberflächenauskleidung ausmachen. Von ihrem Zellkörper, der vergleichsweise wenige Zellorganellen besitzt und in einer Masche des Kapillarnetzes liegt, überziehen Fortsätze mit einem Durchmesser von teilweise nur 0,1 μm die umgebenden Kapillaren. Die Funktion der Typ I-Pneumozyten besteht in der Gewährleistung einer möglichst dünnen Trennfläche zwischen Gefäßsystem und Alveolarraum zur Bildung der Blut-Luft-Schranke, die einerseits eine optimale Gasdiffusion zulässt und andererseits durch Haftkomplexe parazelluläre Transportwege und Wasserverlust verhindert. Als enddifferenzierte Zelle mit fehlender Regenerationsfähigkeit besitzt der Pneumozyt Typ I eine hohe Vulnerabilität (Rennard et al., 1991).

1.3.2 Pneumozyten Typ II

Die auch Nischenzellen genannten Pneumozyten Typ II bedecken ca. 7 % der Alveolaroberfläche. Sie liegen einzeln oder in kleinen Gruppen von 2 bis 3 Zellen „nischenförmig“ zwischen den flachen Pneumozyten Typ I und sind mit ihnen durch Desmosomen und Tight junctions verbunden. Dieser Zelltyp besitzt eine kubische Zellform und kann durch seine charakteristische Vorwölbung in das Alveolarlumen lichtmikroskopisch identifiziert werden (Martínez et al., 1997). Die Zelloberfläche ist an der freien apikalen Seite durch kurze Mikrovilli und dem Fehlen von größeren Zellausläufern gekennzeichnet. Der relativ große Zytoplasmakörper mit vielen Organellen und Einschlusskörpern gab ihnen ursprünglich die Bezeichnung „granulierter“ Alveolar-epithelzellen (Schiebler und Schneider, 1991).

Funktionell handelt es sich bei den Pneumozyten Typ II um sezernierende Zellen mit der Fähigkeit zur Proliferation. Die für die Integrität des Alveolarraums unentbehrlichen Funktionen der Pneumozyten Typ II liegen in der Weiterdifferenzierung zu Typ I-Pneumozyten (Adamson und Bowden, 1974) und in der Synthese und Sekretion von oberflächenaktivem Surfactant. Dieser Proteinphospholipidfilm, der als monomolekularer Film das Alveolarlumen auskleidet, setzt die Oberflächenspannung herab und verhindert so den expiratorischen Kollaps der Alveolen (Pattle, 1955, Johansson und Curstedt, 1997, Creuwels et al., 1997).

Darüber hinaus produzieren die Pneumozyten Typ II noch eine Reihe weiterer für das Immunsystem wichtige Proteine und Mediatoren. Hierzu gehören Komplementfaktoren, Wachstumsfaktoren wie die Interleukine 1, 6 und 8, TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor), TGF- β (transforming growth factor), Zytokine wie MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) und GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor [Khalil et al., 1991, Strunk et al., 1988, Paine et al., 1993, Driscoll et al., 1996]). Durch ihre hohe Zellstoffwechselaktivität verfügen die Typ II-Pneumozyten über einen sehr gut entwickelten Golgi-Apparat, große Mitochondrien, reichlich rauhes endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen und multivesikuläre/multilamelläre Körper. Hierbei handelt es sich um die Speicherkapazitäten für das Surfactantsystem (Mason und Crystal, 1998).

1.3.3 Weitere Zellen des Alveolarraums

Weitere Zellen des Alveolarraums sind Bürstenzellen und Alveolarmakrophagen. Bei den Alveolarmakrophagen handelt es sich um Knochenmarksmonozyten, die die periphere Blutbahn und die Kapillaren verlassen haben und aus den Alveolarsepten durch das

Alveolarepithel in das Lumen gewandert sind. Sie zeichnen sich durch Zytoplasmafortsätze und zahlreiche Lysosomen aus und tragen durch ihren Phagozytoseapparat wesentlich zur Selbstreinigung der Lunge bei.

1.4 Transportsysteme des respiratorischen Epithels

Durch die hohe Synthese- und Sekretionsleistung der Typ II-Pneumozyten und ihre wichtige Rolle in Bezug auf die lokale Homöostase besteht ein großer Bedarf an Grundsubstanzen. Um diesem Bedarf nachzukommen, müssen die stoffwechselaktiven Zellen über ausgeprägte Transportkapazitäten verfügen.

Verschiedene Transportsysteme konnten in den letzten Jahren in Typ II-Pneumozyten funktionell nachgewiesen werden. Neben den für den Wasserhaushalt wichtigen Aquaporin-Transportsystemen (Folkesson et al., 1994, Raina et al., 1995) wurden Glukosetransporter (Kemp und Boyd, 1992), Ionenporter (Ballard und Gatzky, 1991, Bland und Boyd, 1986, Kemp et al., 1994), sowie Transporter für Gluthation (Bai et al., 1994), Cystin und Cystein (Bukowski et al., 1995, Knickelbein et al., 1997), Glutamin (Hautamaki et al., 1992), Cholin (Fisher et al., 1992), Adenosin (Dipak und Steinberg, 1988), Ascorbat (Castranova et al., 1983) und Natrium-Aminosäure-Kotransporter (Brown et al., 1985) charakterisiert. Weitere Studien befassten sich mit dem Aufnahme-mechanismus synthetischer Polypeptide (Niven et al., 1990).

Es gibt einige Hinweise für das Vorkommen eines geregelten Oligopeptidtransports im respiratorischen Epithel. In Primärkulturen von Ratten-Typ II-Pneumozyten wurde eine Aufnahme des Dipeptids (L)-Trp-(L)-Tyr gemessen, jedoch konnte aufgrund der schnellen Hydrolyse keine genaue Aussage über den Transportvorgang gemacht werden (Meredith und Boyd, 1993). Demgegenüber konnte ein intakter transepithelialer Transport für das relativ hydrolysestabile Dipeptid (D)-Phe-(L)-Ala in einer luminal-vaskulären Lungenpräparation (Boyd et al., 1993) und in einem Type II-Pneumozyten-Isolat (Meredith und Boyd, 1995) der Rattenlunge nachgewiesen werden. In einer weiteren Studie wurde über die Aufnahme der Dipeptide (L)-Gly-(D)-Phe und (L)-Gly-(L)-Phe in Primärkulturen von Rattenalveolarepithelzellen berichtet (Morimoto et al., 1993). Schließlich konnte auch ein transepithelialer Transport des hydrolyseresistenten Tripeptids (L)-Ala-(D)-Phe-(L)-Ala in der Bürstensaummembran von Ratten-Typ II-Pneumozyten nachgewiesen werden (Helliwell et al., 1994).

Darüber hinaus wurde die Aufnahme des Dipeptids β -Ala-(L)-His (Carnosin) in isolierten Trachealepithelzellen nachgewiesen (Yamashita et al., 1998).

1.5 Oligopeptidtransporter

Epithelzellen aus Niere und Darm besitzen in ihren apikalen und basolateralen Membranen eine Vielzahl von Transportsystemen, die eine ein- und auswärtsgerichtete Substrattranslokation katalysieren.

1.5.1 Peptidtransportvorgänge auf zellulärer Ebene

Der renale Oligopeptidtransporter PEPT2 und seine intestinale Isoform PEPT1 vermitteln den protonengekoppelten Transport von Oligopeptiden aus dem glomerulären Filtrat in die Nierentubulusepithelzellen bzw. aus dem Darmlumen in die Enterozyten (Daniel, 1996). Ihre wesentliche physiologische Funktion liegt in der Gewinnung von extrazellulären Oligopeptiden aus der Peptidhydrolyse zur intrazellulären Bereitstellung von Stickstoff für Proteinbiosynthese und Konservierung von Stickstoffgruppen (Daniel, 1997).

Als treibende Kraft des Substrattransports in die Zelle dient ein Protonengradient, der durch die Aktivität des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporters aufrecht erhalten wird (Temple et al., 1995). Der apikale Einstrom der Na^+ -Ionen in die Zelle kann dabei in den Tubulusepithelzellen und Enterozyten von der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -ATPase in der basalen Membran kompensiert werden. Dadurch sind PEPT2 und PEPT1 als tertiär aktive Transportsysteme charakterisiert (Daniel und Herget, 1997, Abb. 1).

1.5.2 Einordnung der Transportprozesse

Die Oligopeptidtransporter PEPT2 und PEPT1 werden zusammen mit verschiedenen strukturell homologen Peptidtransportern aus Hefen (Ptr2, Ptr3, *Saccaromyces cerevisiae*), höheren Pflanzen, Pilzen (CaPtr2p, *Canidida albicans*) und Bakterien (DtpT, *Lactococcus lachs*) zur Familie der protonenabhängigen Peptidtransporter (Ptr) gerechnet (Steiner et al., 1995). Diese Familie ist eine Untergruppe der Familie der Protonen-Oligopeptid-Transporter (POT [Paulsen und Skurray, 1994]). Gemeinsam ist diesen Transportern die Abhängigkeit von einem Protonengradienten als treibende Kraft der Substrattranslokation.

Da der Transport von organischen Substanzen bei Säugetieren in eine Zelle in der Regel Na^+ -abhängig und bei den Mikroorganismen protonenabhängig verläuft, kann man die protonenabhängigen Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 der Säugetiere als phylogenetische Bindeglieder zwischen beiden Prinzipien sehen (Fei et al., 1994, Leibach und Ganapathy, 1996).

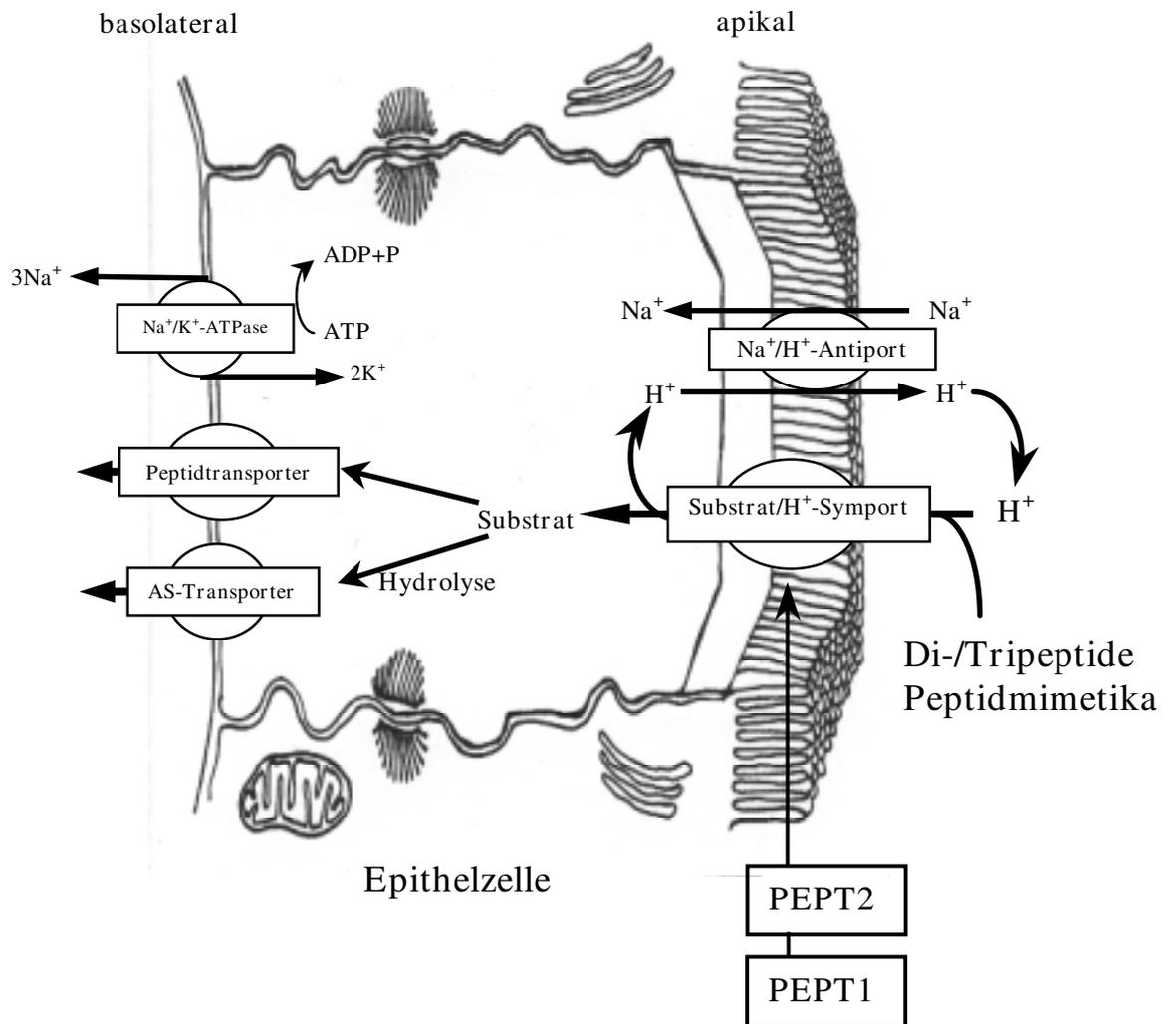


Abbildung 1: Peptidtransport auf zellulärer Ebene. Der renale Oligopeptidtransporter PEPT2 und seine intestinale Isoform PEPT1 vermitteln den Transport von Oligopeptiden und Peptidmimetika in Epithelzellen durch Kopplung der Substrattranslokation an einen Protonengradienten.

1.5.3 Substrate

1.5.3.1 Oligopeptide

Der Oligopeptidtransport umfasst Di- (Daniel, 1993) und Tripeptide (Tiruppathi et al., 1990a, 1990b, 1990c, 1991). Singuläre Aminosäuren und Peptide mit einer Kettenlänge über 3 Aminosäuren werden nicht als Substrat akzeptiert. Theoretisch können alle Di- und Tripeptide als Substrate von PEPT1 und PEPT2 erkannt werden (Abb. 2). Daher kommen von den 20 proteinogenen (L)-Aminosäuren ausgehend, 400 Di- und 8000 Tripeptide in Betracht. Berücksichtigt man darüber hinaus D-Aminosäuren, so steigt die Anzahl auf 57200. Unter Berücksichtigung von Fremdstoffen steigt die Zahl auf ca. 10^6 potentielle Substrate.

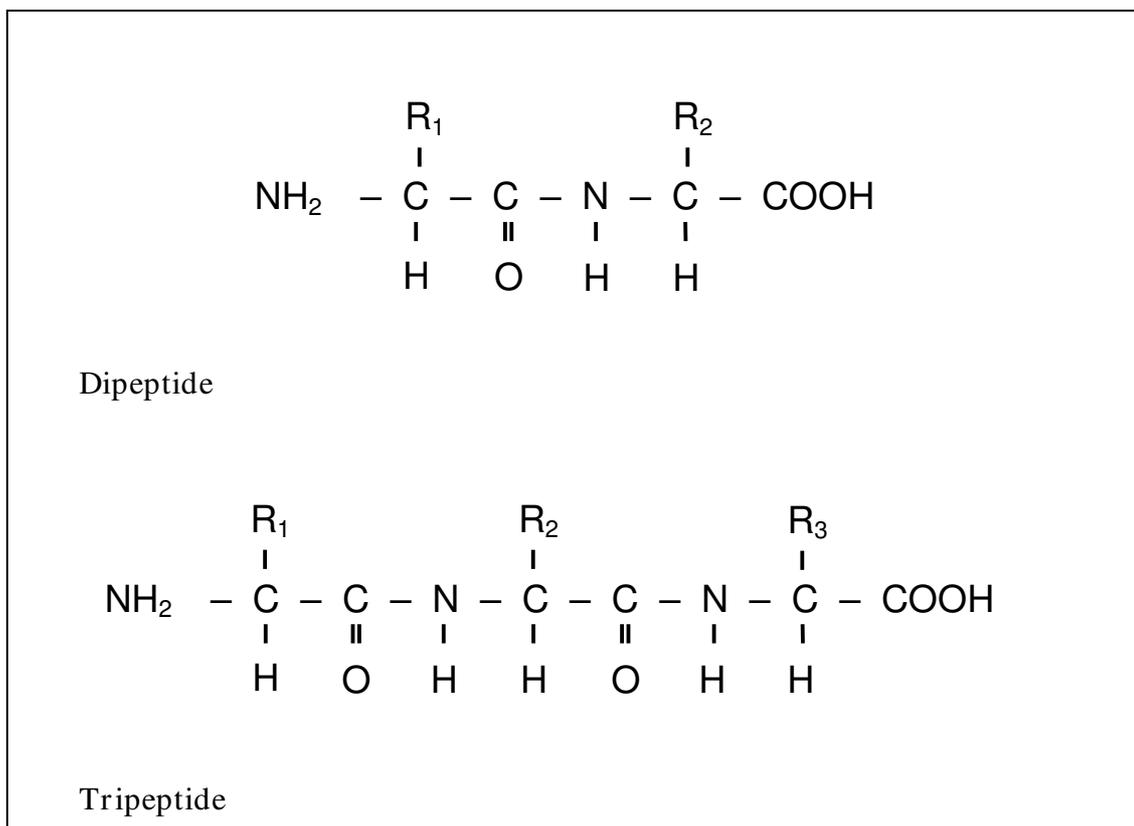


Abbildung 2: Oligopeptide als Substrate von PEPT2 und PEPT1. R₁-R₃ = Reste

1.5.3.2 Betalaktamantibiotika

Zusätzlich zu den körpereigenen Di- und Tripeptiden konnte in den letzten Jahren eine Reihe von Betalaktamantibiotika wie z. B. Cefadroxil als Substrate für PEPT2 (Inui et al., 1984; Daniel und Adibi, 1993; Naasani et al., 1995; Tamai et al., 1997, Takahashi et al., 1998,) und PEPT1 (Inui et al., 1988, Wenzel et al., 1995, Bretschneider et al., 1999) charakterisiert werden (Abb. 3). Bei der Erkennung von Betalaktamantibiotika als Substrate scheinen Histidinreste von PEPT1 und PEPT2 mit der Aminogruppe dieser Substanzklasse zu interagieren (Terada et al., 1998).

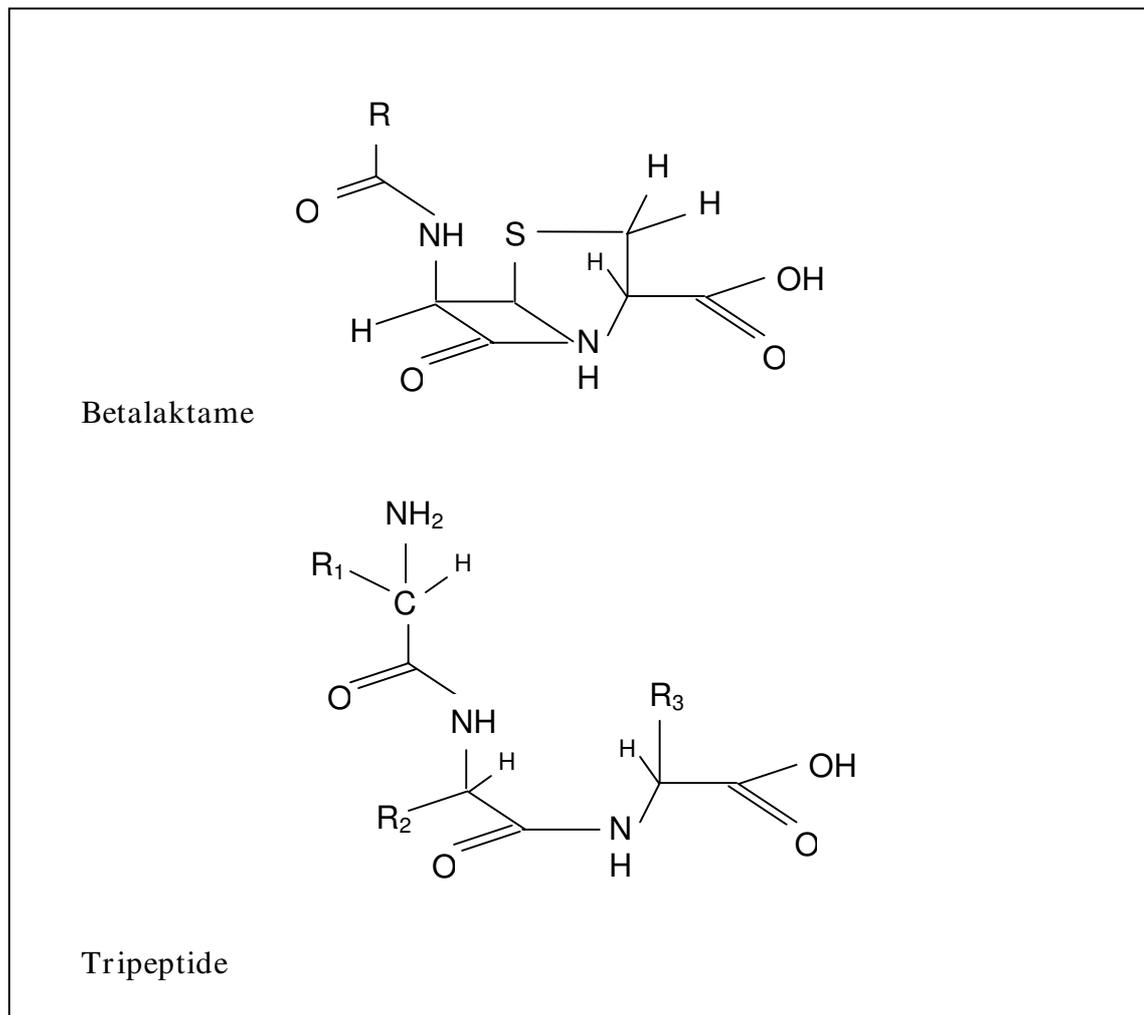


Abbildung 3: Strukturhomologie von Betalaktamen und Tripeptiden.

1.5.3.3 Weitere Substrate

Neben den Betalaktamen konnten weitere Peptidmimetika wie Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (Akarawut et al., 1999, Lin et al., 1999), Virustatika (Ganapathy et al., 1998, Balimane et al., 1998, Amidon et al., 1999, Guo et al., 1999) und Antimetabolite wie Bestatin (Inui et al., 1992) als Substrate identifiziert werden. Darüber hinaus zählt die endogene Delta-Aminolävulinsäure (δ -ALA [Döring et al., 1998] Abb. 4) zu den Substraten. Das hochaffine Transportsystem PEPT2 bevorzugt Di- und Tripeptide und Peptidmimetika mit einer α -Aminogruppe und akzeptiert keine Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (Daniel et al., 1992, Temple und Boyd, 1998).

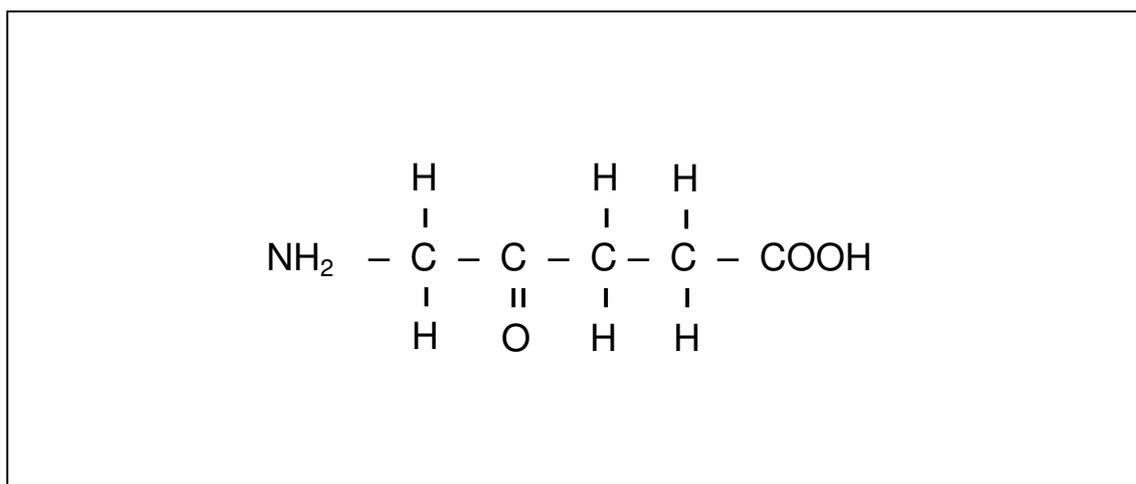


Abbildung 4: Struktur der Delta-Aminolävulinsäure.

Im Rahmen neuerer Studien zur Substraterkennung der beiden Oligopeptidtransporter konnte gezeigt werden, dass eine Peptidbindung innerhalb des Substratmoleküls keine Voraussetzung des Transportes ist (Döring et al., 1998a, 1998b, Ganapathy et al., 1998, Temple et al., 1998), sondern lediglich als Minimalanforderung eine Kettenlänge von mindestens 4 C-Atomen zwischen Carboxy- und Aminoterminus gilt (Döring et al., 1998a, 1998b, Abb. 4). Auch konnten durch Transportstudien an Chimären aus PEPT1 und PEPT2 phenotypische Merkmale (Döring et al., 1996) und mögliche Substratbindungsstellen im Bereich der Transmembrandomänen 7, 8 und 9 charakterisiert werden (Fei et al., 1998).

1.5.4 Molekulare Ebene des Peptidtransports

1.5.4.1 Der renale Peptidtransporter PEPT2

Die Funktion des hochaffinen renalen Peptidtransporters PEPT2 liegt in der Rückresorption von Di- und Tripeptiden aus dem glomerulären Filtrat und der damit verbundenen Rückgewinnung von Stickstoffgruppen aus dem Primärharn.

PEPT2-cDNA konnte bisher aus der Niere von Mensch (Liu et al., 1995), Kaninchen (Boll et al., 1996) und Ratte (Saito et al., 1996) sowie dem ZNS der Ratte (Wang et al., 1998) kloniert werden.

Die cDNA des Peptidtransporters PEPT2 der Ratte besitzt einen offenen Leserahmen von 2190 bp und codiert für ein Protein aus 729 Aminosäuren, das über 12 putative transmembranäre Domänen mit einer Molekülmasse von ungefähr 81 kDa (Saito et al., 1996) verfügt.

Bei einer 48 %igen Homologie in der Aminosäuresequenz von PEPT2 der Ratte zu PEPT1 der Ratte liegt die geringste Homologie in der extrazellulären hydrophilen Schleife zwischen der neunten und zehnten transmembranären Domäne (Saito et al., 1996). Die Homologie zwischen Ratten- und Menschen PEPT2 beträgt 83 %.

Mittels Northern-Blot konnte man bisher PEPT2-mRNA Expression in Organen wie Niere, Gehirn, Lunge, Leber, Herz, Milz und Niere verschiedener Spezies nachweisen (Liu et al., 1995, Boll et al., 1996, Saito et al., 1996). Histologisch wurde PEPT2-mRNA mittels Mikrodisektions-PCR und In-situ-Hybridisierung im proximalen Tubulus in der Ratteniere (Smith et al., 1998, Shen et al., 1999), sowie in Gliazellen des Ratten-ZNS (Dringen et al., 1998, Tom Dieck et al., 1999, Berger und Hediger, 1999) lokalisiert. Zur genaueren funktionellen Charakterisierung des Transportsystems wurde PEPT2 in Zelllinien aus dem proximalen Tubulus (Brandsch et al., 1995, Wenzel et al., 1998, 1999) und in Expressionssystemen wie *Xenopus laevis* Oozyten (Amasheh et al., 1997) untersucht, wobei anhand elektrophysiologischer Messungen und Kinetikuntersuchungen einzelne Substrate sowie deren Aufnahmekinetik charakterisiert wurden. Hierbei konnte bei PEPT2 im Vergleich zu PEPT1 bei einer höheren Substrataffinität eine geringere Transportkapazität nachgewiesen werden. Der elektrogene Substrattransport durch PEPT2 ist sättigbar und wird von pH-Wert sowie Membranpotential beeinflusst (Daniel et al., 1991, 1992).

1.5.4.2 Der intestinale Peptidtransporter PEPT1

Die enterale Funktion des intestinalen Peptidtransporters PEPT1 ist die Resorption von Di- und Tripeptiden aus der Darmflüssigkeit zur Bereitstellung von Stickstoffgruppen und Aminosäuren für den Organismus. Bisher konnte man PEPT1 aus dem Dünndarm von Kaninchen (Fei et al., 1994, Boll et al., 1995), Mensch (Liang et al., 1995) und Ratte (Saito et al., 1995, Miyamoto et al., 1996) klonieren. Die PEPT1-cDNA des Kaninchens besitzt einen offenen Leserahmen von 2124 bp und codiert für ein Protein aus 707 Aminosäuren mit 12 putativen transmembranären Domänen (Boll et al., 1995)

Histologisch konnte PEPT1-mRNA durch In-situ-Hybridisierung im Dünndarm des Kaninchens lokalisiert werden (Freeman et al., 1995), sowie PEPT1-Immunreaktivität durch Immunhistochemie an der apikalen Membran der Enterozyten (Ogihara et al., 1996, 1999).

Durch Expressionsstudien von PEPT1 in Caco-2 Zellen (Wenzel et al., 1996, Terada et al., 1999), CHO-Zellen (Han et al., 1999), HeLa-Zellen (MacKenzie et al., 1996), LLC-PK 1-Zellen (Terada et al., 1997, Wenzel et al., 1998), *Xenopus laevis* Oozyten (Amasheh et al., 1997) und *Pichia pastoris* (Döring et al., 1997, 1998c) konnte die Kinetik des Transports charakterisiert werden. Im Gegensatz zu PEPT2 hat PEPT1 eine niedrigere Substrataffinität und eine höhere Transportkapazität, die unter anderem von einem pH-abhängigen Regulationsfaktor (hPEPT1-RF) beeinflusst wird (Saito et al., 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass die vermehrte enterale Zufuhr von Peptiden eine von hormoneller oder neuronaler Kontrolle unabhängig gesteigerte Expression von hPEPT1 zur Folge hat (Walker et al., 1998). Eine Darmmukosaverletzung beeinflusst den intestinalen Peptidtransport nur gering, was auf eine gesteigerte PEPT1-Expression zurückgeführt wird (Tanaka et al., 1998). Neben Oligopeptiden werden verschiedene Peptidpharmaka von PEPT1 als Substrat erkannt (s. 1.6.3).

<i>Transporter</i>	<i>cDNA</i>	<i>Protein</i>	<i>Topologie</i>
Human PEPT1 (Human intestinal peptide transporter)	Ca. 3.1 kb (2127 bp)	708 AS, ca. 79 kDA pI = ca. 8.58	12 TM N-Glykosylierung: N50, N404, N408, N409, N509, N514, N562
Rat PEPT1 (Rat intestinal peptide transporter)	Ca. 3.0 kb (2133 bp)	710 AS, ca. 79 kDA pI = ca. 7.39	12 TM N-Glykosylierung: N415, N439, N510, N532, N539
Rabbit PEPT1 (Rabbit intestinal peptide transporter)	Ca. 2.7 kb (2124 bp)	707 AS, ca. 79 kDA pI = ca. 7.47	12 TM N-Glykosylierung: N50, N439, N513
HPEPT2 (Human kidney peptide transporter)	Ca. 2.7 kb (2190 bp)	729 AS, ca. 82 kDA pI = ca. 8.26	12 TM N-Glykosylierung: N435, N472, N528
Rat PEPT2 (Rat intestinal kidney transporter)	Ca. 3.9 kb (2190 bp)	729 AS, ca. 81 kDA pI = ca. 7.99	12 TM N-Glykosylierung: N435, N448, N528, N587
Rabbit PEPT2 (Rabbit kidney peptide transporter)	Ca. 4.2 kb (2190 bp)	729 AS, ca. 82 kDA pI = ca. 7.39	12 TM N-Glykosylierung: N435, N472, N508, N528, N587

Tabelle 3: Molekulare Merkmale der Oligopeptidtransporter PEPT1 und PEPT2

1.6 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose (CF, Synonym: zystische Fibrose) ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Von 2000 bis 3000 Neugeborenen leidet ein Kind an der Erkrankung. Jährlich werden in der Bundesrepublik ca. 325 Kinder mit CF geboren. Die Prognose war noch vor 20 Jahren so ungünstig, dass 85 bis 90 % der Patienten im Kindesalter verstarben. Bei einer Lebenserwartung von ca. 20 Jahren (Elborn et al., 1991) liegt die Prävalenz bei ca. 6500 Patienten in der BRD (Falbel und Smaczny, 1993). Pathogenetisch handelt es sich um eine Mutation am CF-Locus auf dem Chromosom 7 mit einer Veränderung des CF-Transmembran Regulators (CFTR) (McPherson und Goodchild, 1988, Riordan et al., 1989, Kubesch et al., 1993). Die Erkrankung verläuft unter Beteiligung aller exogenen Drüsen in Lunge und Bronchialbaum, Nasennebenhöhlen, Pancreas, Cervix uteri, Nebenhoden und Gallenwegen und bedingt eine erhöhte Viskosität der Sekrete. Im Vordergrund der Erkrankung stehen Lunge und Atemwege, wobei bereits in den ersten Lebenswochen eine Hyperplasie der Becherzellen und Hypertrophie der mukösen Drüsen zu Retention von zähem Schleim, Atelektasen, Bronchiektasen, Obstruktion und chronischer Bronchitis führen. Trotz großer Fortschritte im Bereich der Antibiotikatherapie spielen bakterielle Infektionen der Lunge und Atemwege eine wesentliche Rolle bei der Progredienz der Erkrankung und führen über eine schrittweise Zerstörung des Lungengewebes zu respiratorischer Insuffizienz. So bilden pulmonale Komplikationen die Hauptmortalitätsursache im Kindes- und Erwachsenenalter.

1.7 Ziel der Arbeit

Insgesamt ist der Wissensstand über molekulare und funktionelle Eigenschaften der Peptidtransporter in den Organen Darm und Niere sehr detailliert. Darüber hinaus gibt es profunde Kenntnisse über die subzelluläre Lokalisation der Proteine in der Zellmembran. Demgegenüber gibt es nur wenige Studien über definierte Oligopeptidtransportsysteme in der Lunge. Man konnte bisher anhand einiger Aufnahmestudien Hinweise für das Vorliegen eines Transports von Di- und Tripeptiden in Typ II-Pneumozyten-Kulturen und Trachealepithelzellkulturen finden. Auch konnte durch Northern-Blot eine Expression von PEPT2 nicht aber PEPT1 in der Rattenlunge nachgewiesen werden. Hingegen ist über die genaue Lokalisation auf histologischer und zytologischer Ebene nur wenig bekannt und der Nachweis des Proteins in der Lunge bisher noch nicht gelungen. Für ein Verständnis der genauen Transportvorgänge ist jedoch die Kenntnis über die zelluläre Lokalisation unerlässlich. Aus diesen Vorbefunden ergibt sich folgende Zielsetzung (Abb. 6):

Nachweis der Synthese- und Wirkorte des Peptidtransporters PEPT2 innerhalb des Atemtrakts auf transkriptioneller und translationler Ebene durch physiologische, histologische und molekularbiologische Methoden.

I.

Nachweis der Expression von PEPT2-mRNA in Lungenextrakten durch verschiedene Nachweissysteme (RT-PCR und Northern-Blot).

II.

Lokalisation der PEPT2-mRNA Expression in der Rattenlunge mittels nonradioaktiver In-situ-Hybridisierung.

III.

Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität durch Immunhistochemie

- in gesunden tierischen
- und gesunden humanen Lungengeweben.

IV.

Neben der Expression in normalen Lungengeweben sollen insbesondere Mukoviszidosegewebe untersucht werden, um so eine Aussage bezüglich einer Rolle des antibiotika-transportierenden Transportsystems bei der Hauptindikation der aerosolischen Antibiotikatherapie, den rekurrenten Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose zu machen.

V.

Schließlich soll mittels Ex-vivo-Aufnahmestudien eine Lokalisation des funktionellen Transportes von PEPT2-Substraten an verschiedenen Geweben erfolgen.

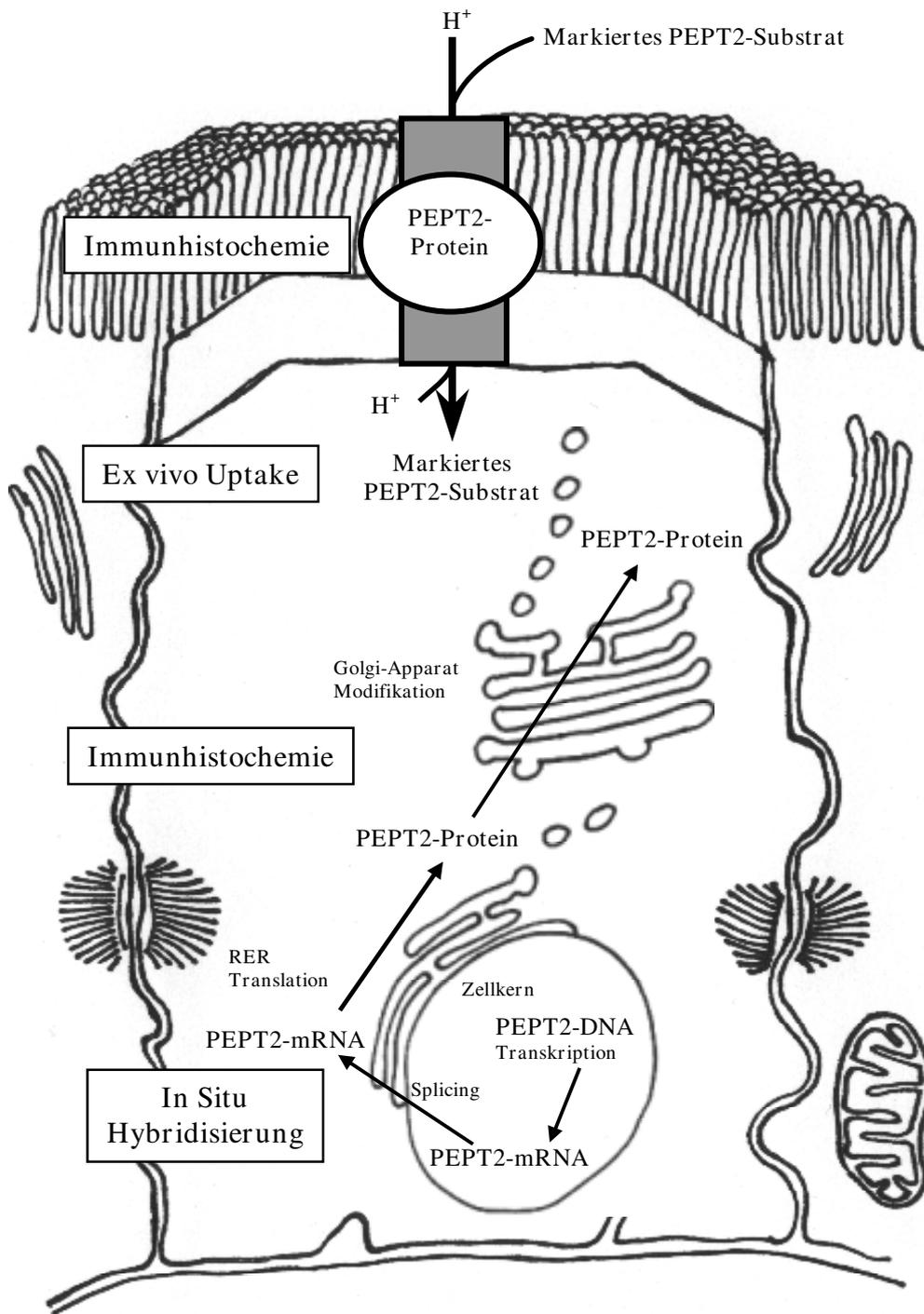


Abbildung 6: Nachweismethoden der Lokalisation.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden insgesamt 18 adulte Sprague-Dawley Ratten und 15 Balb/c Mäuse verwendet. Die Tiere wurden unter Standardlaborrichtlinien gehalten.

2.1.2 RT-PCR und Northern-Blot

Für RT-PCR und Northern-Blot wurden Organe von sechs Ratten frisch entnommen und entweder sofort weiterprozessiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.1.3 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung für Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung

2.1.3.1 Tierische Gewebe

Vor der transkardialen Perfusion wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von Ketamin-HCl (50 mg/kg [Parke Davis, Freiburg]) und Xylazin (20 mg/kg [Bayer, Leverkusen]) vorbehandelt. Der Thorax wurde eröffnet, die A. thoracica interna durch das transversale Einbringen einer Klemme in den Interkostalraum abgeklemmt und das Mediastinum freigelegt. Nach Eröffnung des Herzbeutels und Injektion von 0,5 ml Heparin (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) in den linken Ventrikel wurde nachfolgend das rechte Herzohr zum Druckausgleich geöffnet. Über einen Einschnitt in den linken Ventrikel wurde ein mit dem Perfusionssystem verbundener Polyethylenschlauch unter Sichtkontrolle in den aufsteigenden Teil der Aorta eingebracht und dort fixiert. Bei einem konstanten Perfusionsdruck von 1,50 m Wassersäule wurden zuerst 200 ml einer Vorspüllösung (2,5 % Polyvinylpyrrolidon [Roth, Karlsruhe], 0,9 % NaCl, 0,5 % Procainhydrochlorid [Merck, Darmstadt], 2 ml Heparin [Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen], pH 7,4 [Forssmann et al. 1977]) perfundiert. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 500 ml Paraformaldehyd-Fixierlösung (4 % Paraformaldehyd [T. J. Baker, Deventer, Niederlande], 1x Phosphat-puffer (PBS [136 mM NaCl, 3 mM KCl, 9 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4], pH 7,4) für die In-Situ-Hybridisierung oder Zamboni-Fixierlösung (2% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure, 0,1 M PBS, pH 7,4 [Zamboni, 1972]) für die Immunhistochemie. Das Paraformaldehyd (T. J. Baker, Deventer, Niederlande)

wurde vor jeder Perfusions-reihe als 4 %ige Lösung in 1x PBS frisch angesetzt und auf pH 7,4 eingestellt (Kummer et al., 1990). Nach der Fixierung wurde 15 min mit 0,1 M PBS perfundiert, die Lungen entnommen und zum Schutz vor Gefrierartefakten über Nacht bei 4°C in einer Saccharose-PBS Lösung (800 mOsm/kg H₂O, pH 7,4) immersiert. Anschließend wurden die Lungen mit dem Gefrierschutzeinbettungsmedium Tissue Tek (Vogel, Gießen) aufgebläht, auf Filterpapier aufgebracht und in Stickstoff-gekühltem Isopentan (Riedel-de Haen, Seelze) schockgefroren und danach bei -80°C aufbewahrt.

2.1.3.2 Humane Gewebe

Von fünf Patienten, die anamnestisch keine Atemwegserkrankung aufwiesen, wurden zwischen 24 und 36 Stunden postmortal im Rahmen von Routineautopsien in den Pathologischen Instituten der Universitäten Marburg und Gießen Gewebeproben (Trachea, Haupt-/Lappenbronchus, peripheres Lungengewebe) entnommen. Von fünf Patienten mit Mukoviszidose, die einer Lungentransplantation unterzogen wurden, wurde Gewebe des Resektats entnommen (Hauptbronchus, peripheres Lungengewebe), National Heart and Lung Institute London, Royal Brompton Hospital, Imperial College of Science Technology and Medicine, London, Großbritannien (freundlichst überlassen von Dr. H. Patel).

Die Gewebe wurden in Zamboni-Lösung für 20 bis 32 Stunden abhängig von der Gewebeprobengröße immersionsfixiert. Nach der Fixierung wurden die Gewebe 3x 2 h in 0,1 M PBS, pH 7,4 gewaschen und anschließend über Nacht in Saccharose-PBS Lösung (800 mOsm/kg H₂O, pH 7,4) immersiert. Danach wurden die Gewebe mit Tissue Tek (Vogel, Gießen) auf Filterpapier aufgebracht und in Stickstoff-gekühltem Isopentan (Riedel-de Haen, Seelze) schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.1.4 Ex-vivo-Aufnahmestudien

2.1.4.1 Tierische Gewebe

Zehn adulte Balb/c Mäuse wurden mit einer intramuskulären Injektion von Ketamin-HCl (50 mg/kg [Parke Davis, Freiburg]) und Xylazin (20 mg/kg [Bayer, Leverkusen]) narkotisiert. Nach Eintreten der Narkose wurde der Thorax eröffnet und von der oberen Thoraxapertur ausgehend das obere Mediastinum freigelegt, mit einem Faden angeschlungen und vorsichtig durchtrennt. Das Herzlungenpaket wurde nun von kranial nach kaudal freipräpariert, nach Durchtrennung von Aorta descendens, V. cava inferior und umliegenden Strukturen entnommen und in sofort eine mit Eagle's minimum essential medium (MEM-21011, GIBCO, BRL, Paisley, UK) gefüllte Inkubationskammer überführt.

Die Kammer mit einem Volumen von 200 ml wurde bei 37°C mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast. Nach Lösen der Anschlingung wurde eine mit dem Perfusionssystem verbundene Kanüle intratracheal positioniert und die Schlinge wieder angezogen.

2.1.4.2 Humane Gewebe

Für die Aufnahmestudien wurden Gewebe von fünf Patienten verwendet, die einer Pneumonektomie oder Lobektomie in der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-Liebig-Universität unterzogen wurden. Die Ursache der chirurgischen Intervention lag in neoplastischen Erkrankungen der Lunge. Die Patienten litten nicht an einer Mukoviszidose. Die Gewebe wurden sofort nach der Entnahme in Ringerlösung aufbewahrt und direkt aus dem Operationssaal in das Pathologische Institut gebracht, dort von einem Pathologen makroskopisch begutachtet und gesundes, tumorfernes Randgewebe für die Aufnahmestudien freigegeben. Zentrale Abschnitte der Lunge konnten aufgrund der weiteren pathologischen Untersuchung nicht verwendet werden.

Darüber hinaus wurden Gewebe aus fünf frischen Resektaten von lungentransplantierten Patienten mit Mukoviszidose verwendet (Dr. H. Patel, National Heart and Lung Institute London, Royal Brompton Hospital, Imperial College of Science Technology and Medicine, London, Großbritannien).

Die frischen Gewebe wurden nach der Freigabe sofort in MEM-21011 überführt und die Ex-vivo-Aufnahmestudien durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolation

RNA wurde aus frisch entnommenen Rattenlungen und Rattennieren isoliert. Dazu wurden die gemörserten Gewebe durch Guanidinisothiocyanat- und β -mercaptoethanolhaltigen Puffer lysiert und homogenisiert. Die gesamte RNA wurde anschließend unter einer hohen Konzentration chaotropher Salze über eine Silicagelmatrix aus den verschiedenen Zellphasen separiert. Nach Elution der RNA mit autoklaviertem A. bidest., Präzipitation mit Isopropanol, Waschschritten in 80 %igem Ethanol und Aufnahme in A. bidest. erfolgte die Kontrolle über eine Gelelektrophorese in 1 %igem Agarosegel. Alle Puffer sowie die Silicagelmatrix entstammten dem Rneasy Kit der Fa. Qiagen, Heiden.

2.2.3 Reverse-Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 Reverse-Transkription

Ausgehend von der RNA-Isolation wurde eine Reverse-Transkription zur Umschreibung der gewonnenen RNA in DNA durchgeführt. Dabei wird nach Anlagerung spezifischer Primer mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase vom 3'-Ende einer mRNA eine cDNA synthetisiert (Bleyavsky et al., 1989). Dazu wird die Gesamt-RNA in Gegenwart von Puffer 1 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,4 [Pharmacia Biotech, Freiburg]), 1 mM dNTP Mix (Pharmacia Biotech, Freiburg), RNase Inhibitor (2000 U/ml [Pharmacia Biotech, Freiburg]) und der Moloney-Maus-Leukämie-Virus-Reverse-Transkriptase (10 U/ml, M-MLV [GIBCO, BRL, Paisley, UK]) bei 37⁰C für 1 h in einem Blockthermostaten inkubiert. Als Primer dienten Oligo-dTs (25 μ g/ml [MWG Biotech, Ebersberg]), die komplementär zu den Poly-A Enden der RNA sind.

2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein Aliquot des Transkriptionsansatzes wurde mit Puffer 2 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, pH 7,4 [Pharmacia Biotech, Freiburg]), Primer (50 pmol [MWG Biotech, Ebersberg]) und Taq-Polymerase (25 U/ 100 ml [MWG Biotech, Ebersberg]) versetzt und mit autoklaviertem A. bidest. auf ein Volumen von 100 μ l aufgefüllt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 95⁰C folgten 25 bis 35 Zyklen dreier Reaktionsschritte in einem Thermocycler (Perkin-Elmer Cetus DNA Thermocycler 2400). Ein Zyklus besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem „Annealing“ genannten Anlagerungszeitraum für die Primer und einem Amplifikationsschritt, der zur Verlängerung der Primer dient

(„Amplification“). Die „Annealing“-Temperatur lag jeweils primerspezifisch ca. 10°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer. Nach den Zyklen wurden die unvollständig transkribierten PCR-Produkte bei einer Temperatur von 72 °C vervollständigt. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte in Lösung bei 4 °C. Die Überprüfung der Größe und Menge des PCR-Produkts erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung (1 %) und Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose).

2.2.3.3 PCR-Bedingungen und Primerdesign

2.2.3.3.1 PCR zum Nachweis der PEPT2-mRNA

Die Primer der PCR waren gegen die Basen 111 bis 134 und 437 bis 417 der Ratten PEPT2-cDNA gerichtet (Tab. 4). Nach einer Denaturierungsphase von 95°C über 5 min folgten 35 Zyklen: 1,5 min 94°C, 1,5 min 55°C, 1 min 72°C. Abschließend erfolgte die Auffüllung von PCR-Fragmenten für 7 min bei 72°C.

<i>Richtung</i>	<i>Sequenz</i>
Vorwärtsprimer	5'-GCT-GCC-TAC-TGA-AGC-CAA-ATG-CTT-G-3'
Rückwärtsprimer	5'-AGA-GGC-TGC-TGA-AGG-CAT-GGT-3'

Tabelle 4: PEPT2-Primer (MWG Biotech, Ebersberg)

2.2.3.3.2 PCR zum Nachweis der PEPT1-mRNA

Die Primer der PCR waren gegen die Basen 1105 bis 1125 und 1859 bis 1839 der Ratten PEPT1-cDNA gerichtet (Tab. 5). Nach der Denaturierungsphase folgten 35 Zyklen mit 1,5 min 94°C, 1,5 min 55°C und 1 min 72°C.

<i>Richtung</i>	<i>Sequenz</i>
Vorwärtsprimer	5'-GGT-TTC-AAC-TTC-ACC-TCC-CTG-3'
Rückwärtsprimer	5'-CAC-TGT-CTC-TTC-TGG-TGG-AGC-3'

Tabelle 5: PEPT1-Primer (MWG Biotech, Ebersberg)

2.2.3.3.3 Polymerasekettenreaktion mit Primern zum Nachweis der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-mRNA

Die Primer waren gegen die Basen 558 bis 579 und 1010 bis 990 der GAPDH-cDNA gerichtet (Tab. 6). Der 5-minütigen Denaturierungsphase bei 95 °C folgten 30 Zyklen bestehend aus 1,5 min bei 95 °C, 1,5 min bei 61 °C und 3 min bei 72 °C. Danach folgte ein 7-minütiger Schritt bei 72 °C

<i>Richtung</i>	<i>Sequenz</i>
Vorwärtsprimer	5'-TCC-ACC-ACC-CTG-TTG-CTG-TAG-3'
Rückwärtsprimer	5'-GAC-CAC-AGT-CCA-TGA-CAT-CAC-T-3'

Tabelle 6: GAPDH-Primer (MWG Biotech, Ebersberg)

2.2.3.4 Kontrollen

Zur Kontrolle wurde die PCR ohne Template oder ohne Polymerase durchgeführt. Als Positivkontrolle für PEPT2 wurde die Gesamt-RNA von Nieren der Ratte benutzt, da der Transporter ursprünglich aus Nierenzellen kloniert wurde (Saito et al., 1996).

2.2.4 Sondenherstellung für In-situ-Hybridisierung und Northern-Blot

2.2.4.1 Präparation der cDNA-Matrizen

Zur Herstellung der Riboproben wurde ein Plasmid mit einem für PEPT2 kodierenden Fragment von 340 bp aus dem Labor von Frau Prof. Daniel verwendet. Das rattenspezifische cDNA-Fragment (Nukleotide 51-290) war bereits in die Eco RI site eines PCRII vector (Invitrogen, Leck, Niederlande) subkloniert. Diese Klonierungsstelle wird jeweils von einer Promotorsite für die Transkriptionspolymerasen SP6 und T7 flankiert. Die Linearisierung erfolgte mit den Restriktionsenzymen Xho I und BamH I (Boehringer, Mannheim, Tab. 7). Durch Extraktion mittels Phenol/Chloroform (T. J. Baker, Deventer, Niederlande) und Lithium-Chlorid/Ethanol fällung (4 M LiCl [Merck, Darmstadt], 100 % Ethanol [T.J.Baker, Deventer, Niederlande]) wurde die DNA aufgereinigt. Zur Qualitätskontrolle und zur Quantifizierung der DNA wurden Agarosegel-Elektrophoresen (Seakem-ME Agarose [Biozym, Oldendorf]) und photometrische Bestimmungen (GeneQuantII [Pharmacia Biotech, Freiburg]) durchgeführt.

2.2.4.2 In-vitro-Transkription zur Herstellung Digoxigenin-markierter Riboproben

Die In-vitro-Transkription zur Herstellung markierter RNA-Proben wurde mit Hilfe einer T7 Polymerase bzw. einer SP6 Polymerase (Boehringer, Mannheim) unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem Substrat durchgeführt. Bei der Herstellung der Antisense-cRNA-Probe wurde der mit Xho I linearisierte Vektor mit einer SP6 RNA-Polymerase in-vitro transkribiert (Tab. 7). Für die Sense-cRNA-Probe wurde der mit Bam HI linearisierte Vektor mit einer T7 RNA-Polymerase in-vitro transkribiert (Tab. 7). Die Antisense-cRNA-Probe, die das komplementäre Gegenstück zur zellulären mRNA bildet, diente als Nachweis der mRNA-Expression, während die Sense-Probe als Kontrollsonde benutzt wurde.

Für die Transkription wurde jeweils 1 µg des linearisierten Plasmids als Matrize eingesetzt und zusammen mit 13 µl Diethyl-Pyrocyanat (DEPC [Sigma, Deisenhofen]) behandeltem H₂O, 2 µl Transkriptionspuffer (Boehringer, Mannheim), 2 µl Nukleotidgemisch mit Digoxigenin-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (DIG-Labeling Mix [Boehringer, Mannheim]) und 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) für 2 h 15 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte der Verdau der DNA-Matrize durch eine Inkubation mit RNase freier DNase (Boehringer, Mannheim) über 15 min. Die RNA wurde mit Lithium-Chlorid und 100 % Ethanol gefällt, mit 80 % Ethanol gewaschen und nach anschließendem Trocknen in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Um die RNA zu quantifizieren und die Güte des Transkriptionsproduktes zu beurteilen, wurden photometrische Bestimmungen und Agarosegel-Elektrophoresen durchgeführt.

<i>cRNA-Sonde</i>	<i>Vektor</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>RNA-Polymerase</i>
PEPT2-Antisense	pCR II	Xho I	SP6
PEPT2-Sense	pCR II	Bam HI	T7

Tabelle 7: Hybridisierungssonden

2.2.5 Northern-Blot

2.2.5.1 Hybridisierung

Je 10 µg Gesamt-RNA aus Rattenlunge und -Niere wurden durch ein denaturierendes Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen (Boehringer, Mannheim) überführt. Die Bahnen wurden mittels der Digoxin-markierten PEPT2 cRNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung wurde nach einer Prähybridisierung mit Prähybridmix über Nacht bei 65°C mit einer Konzentration von 50 ng cRNA-Sonde pro ml Hybridisierungslösung (50 % deionisiertes Formamid [Merck, Darmstadt], 5x SSC, 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 2 % Blockingmedium [Boehringer, Mannheim]) durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen in 1x PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungen durch Waschschrte in 2x Standard Sodium Citrat (SSC = 18 % NaCl, 15 % Na-Citrat [beides Merck, Darmstadt]), 0,1 % SDS (2x 15 min) bei 65°C und 0,5x SSC, 0,1 % SDS (2x 15 min) bei 65°C entfernt.

2.2.5.2 Detektion der hybridisierten Riboproben

Zur Detektion der DIG-markierten Hybride wurden die Membranen in 1x PBS gewaschen und mit Blocklösung (Boehringer, Mannheim) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte eine Inkubation mit Anti-Digoxigenin Antikörper (1:400 in der Blocklösung bei Raumtemperatur über 2 Stunden) und Entfernung des ungebundenen Antiköpers durch Waschen mit 100 mM Maleat, 150 mM NaCl und 0,3 % Tween (Sigma, Deisenhofen). Die Detektion erfolgte mittels Chemiluminiszenznachweis durch CDPTM-Star (Boehringer, Mannheim) und Auflage eines Röntgenfilms (Entwicklungszeit 30 bis 60 min).

2.2.6 In-Situ-Hybridisierung

2.2.6.1 Durchführung

Für die In-situ-Hybridisierung wurden in horizontaler Schnittführung geschnittene Gefrierschnitte aus Rattenlungen ($n = 5$) zwischen 8 und 12 μm Schnittdicke verwendet. Die bei einer Temperatur von -20°C im Kryostat (Jung Frigocut 2800E der Firma Leica, Bensheim) angefertigten Gewebeschnitte wurden auf silanisierte (1 % Aminopropyltriethoxysilan in H_2O [Sigma, Deisenhofen]) Objektträger aufgebracht und für 15 min in eisgekühltem 4 % Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,4) nachfixiert. Nach mehreren Waschschritten (3x 5 min PBS; 2x 5 min H_2O ; 2x 5 min PBS) und einem Deproteinierungsschritt (10 min 0,1 M HCl) wurden die Schnitte für 20 min in 0,25 % Essigsäure (T. J.Baker, Deventer, Niederlande) in 0,1 M Triethanolamin (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Es folgten zwei weitere 5-minütige Waschschrritte in PBS und die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 min in 70 %, 80 % und 96 % Ethanol). Nach der Lufttrocknung der Schnitte bei Raumtemperatur für 20 min wurden sie mit einem Prähybridmix (50 % deionisiertes Formamid [Merck, Darmstadt], 40 mM Tris-HCl [Trometamol, Merck, Darmstadt; HCl, T. J.Baker, Deventer, Niederlande; pH 7,4], 25 mM EDTA [Roth, Karlsruhe], 20 mM NaCl, 0,25 mg/ml tRNA, 2,5x Denhardt-Lösung [100 x = 0,05 % Ficoll, 0,05 % Polyvinylpyrrolidon, Roth, Karlsruhe und 0,05 % bovines Serumalbumin], alle Produkte - soweit nicht anders angegeben - von Boehringer, Mannheim) bedeckt, und für 1-2 h bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Entfernen des Prähybridmixes wurden die Schnitte mit dem Hybridmix (50 % deionisiertes Formamid, 200 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA [pH 8], 0,2 M Dithiothreitol [Sigma, Deisenhofen], 0,33 M NaCl, 5 mg/ml tRNA, 1 mg/ml Heringsperma [beides Boehringer, Mannheim], 10x Denhardt-Lösung, 10 % Dextransulfat [Sigma, Deisenhofen], mit 2 bis 8 pg Digoxigenin-markierter Riboprobe [die optimale Sondenkonzentration wurde für jede Riboprobe austitriert]) überschichtet. Es wurden jeweils Sense- und Antisense-Hybridisierungen parallel durchgeführt. Um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern, wurden sie mit silikonisierten (Sigmacote, Sigma, Deisenhofen) Deckgläschen bedeckt und für 18 bis 20 h bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die silikonisierten Deckgläschen wurden in einer Lösung aus 2x Standard Sodium Citrate (SSC = 18 % NaCl / 15 % Na-Citrat [beides Merck, Darmstadt]) abgelöst und die Schnitte für 30 min in 2x SSC bei 40°C gewaschen. Es folgten weitere Waschschrritte in verschiedenen Waschlösungen bei unterschiedlichen Temperaturen (30 min in 0,38x SSC /

50 % deionisiertes Formamid und 1 h in 0,1x SSC / 50 % deionisiertes Formamid, beide Waschschrte bei 40°C; 2x 10 min in 0,5x SSC und 10 min in 0,2x SSC bei Raumtemperatur).

2.2.6.2 Detektion der hybridisierten Riboproben

Zur Detektion der hybridisierten Riboproben wurden die Schnitte nach einer halbstündigen Inkubation mit Blockingmedium (1 % Boehringer Blocking Reagenz [Boehringer, Mannheim], 0,5 % bovines Serum Albumin [Roth, Karlsruhe] in 100 mM Tris-HCl [pH 7,5] / 150 mM NaCl gelöst), mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper (Kessler et al., 1990 [Boehringer, Mannheim]) in einer Verdünnung von 1:500 in Blockingmedium beschichtet. Nach einer 1 bis 2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert.

Die enzymatische Farbentwicklung der Schnitte wurde unter Verwendung eines Entwicklungspuffers nach Boehringer (enthält Nitroblue Tetrazolium und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat als Enzymsubstrate [beides Boehringer, Mannheim], sowie Levamisol [Sigma, Deisenhofen] zur Hemmung endogener Phosphatasen; pH 9,5) unter Lichtabschluss bei 4°C oder bei Raumtemperatur durchgeführt und in Abhängigkeit von der Zielintensität der Nachweisreaktion nach 4 bis 48 h. abgestoppt. Nach Waschschrten in Abstopppuffer (100 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) über 2x 15 min, folgten zwei weitere Waschschrte für jeweils 15 min in PBS. Abschließend wurden die Schnitte mit 50 % Glycerin (Merck, Darmstadt)/PBS eingedeckt und mit einem Olympus Mikroskop mit Interferenzkontrastlicht ausgewertet.

2.2.7 Immunhistochemie

Zur in-situ Lokalisation des Oligopeptidtransporterproteins wurde die Methode der Immunhistochemie verwendet (Coons et al., 1955, 1958). Es wurden Ratten- und Mäuseorgane sowie Gewebeschnitte humaner normaler und Mukoviszidoseleungen untersucht. Für jedes betrachtete Organ (bei n = 5 Individuen) wurden jeweils drei zeitlich voneinander unabhängige Inkubationen durchgeführt.

2.2.7.1 Primärantikörper

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete polyklonale Antikörper gegen PEPT2 aus dem Labor von Frau Prof. Dr. H. Daniel ist bereits in früheren Studien eingesetzt und charakterisiert worden (Döring et al., 1998c). Der Antikörper wurde gegen das C-terminale Ende des humanen PEPT2-Transporters generiert. Das synthetisierte Polypeptid (Sequenz: H₂N-CQGNMIKLETKKTKL-COOH) wurde in Kombination mit Freuds Adjuvant Kaninchen subkutan injiziert. Für den Nachweis von PEPT1 wurde ein gegen die C-terminale Sequenz des Transporters gerichteter polyklonaler Antikörper benutzt (Sequenz: H₂N-FRHRSKAYPKREHWC-COOH), der ebenfalls im Kaninchen hergestellt wurde. Nach Verdünnungsreihen mit den Antisera konnte eine optimale Verdünnung des PEPT2-Antikörpers von 1:1000 und des PEPT1-Antikörpers von 1:800 festgestellt werden.

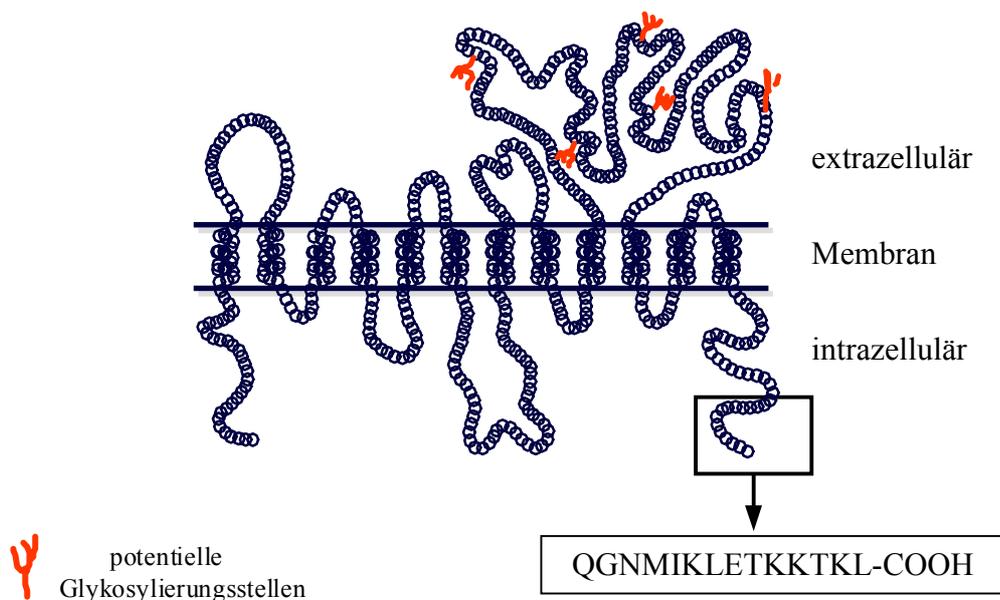


Abbildung 6: Struktur des PEPT2-Proteins und Sequenz des Antikörpers.

Zum Nachweis einer möglichen Expression von PEPT1-Protein im Atemtrakt wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das carboxyterminale Ende von PEPT1 aus dem Labor von Frau Prof. Daniel verwendet. Eine Austestung im Rattenjejunum ergab eine ideale Konzentration von 1: 800. Mit dem Antikörper wurden sowohl murine Lungenschnitte als auch Jejunalschnitte inkubiert, die als Positivnachweis dienten.

2.2.7.2 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper dienten wahlweise Indocarbocyanin (Cy3)-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG Serum, Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG Serum oder biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG Serum (Tab. 8).

<i>Antigen</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Wirtsspezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Kaninchen-IgG	Biotin	Schaf	1 : 100	Amersham-Buchler, Braunschweig
Kaninchen-IgG	Indocarbocyanin	Ziege	1 : 250	Dianova, Hamburg
Kaninchen-IgG	Fluoreszein-Isothiocyanat	Ziege	1 : 250	Organon Teknika Corporation, Eppelheim

Tabelle 8: Sekundärantikörper

2.2.7.3 Tertiärreagenz

Bei der Verwendung des biotinylierten Anti-Kaninchen IgG Serums wurde die Biotin-Streptavidin-Brückentechnik (Bonnard et al. 1984) verwendet. Diese führt durch die Bindung von vier Streptavidinmolekülen an einen biotinylierten Sekundärantikörper (Streptavidin-Texasrot) zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals (Tab. 9).

<i>Reagenz</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Streptavidin-Texas-Rot	1 : 200	Amersham-Buchler, Braunschweig

Tabelle 9: Tertiär-Reagenz

2.2.7.4 Antikörperinkubation und Antikörperdetektion

Für die Immunhistochemie wurden Gefrierschnitte verwendet. Bei einer Temperatur von -20°C wurden im Kryostat horizontale Lungenschnitte bzw. Jejunalschnitte mit einer Dicke von 8 bis 12 μm angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden auf Chromgelatinebeschichtete (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat [Riedel-de Haen, Seelze]) Objektträger aufgebracht, 1 bis 2 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen (Hauri und Bucher, 1986) mit Blockingmedium für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Inkubationskammer inkubiert. Als Blockingmedium diente entweder 5 % Milchpulver (Magermilch, Uelzena, Uelzen) verdünnt in PBS oder 2 % Bovines Serum-Albumin (Roth, Karlsruhe) in PBS. Nach Entfernen des Blockingmediums wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern gegen PEPT2 oder PEPT1, in ausgetesteter Verdünnung von 1: 1000 für PEPT2 und 1: 800 für PEPT1 in PBS/NaCl (PBS mit doppelter Salzkonzentration zur Verringerung der Hintergrundreaktion [Grube et al., 1980]) verdünnt, überschichtet und für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert. Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Schnitte sorgfältig gespült (3x 8 min in PBS) und mit den Sekundärantikörpern beschichtet. Als Sekundärantikörper dienten wahlweise Cy3-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG Serum (Dianova, Hamburg), FITC-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG Serum (Dianova, Hamburg), und biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG Serum (Tab. 8 und 9). Nachdem die ungebundenen Antikörper nach 1 h Inkubation durch 3x 5 min Waschen in PBS entfernt worden waren, wurden die Schnitte mit PBS/Glycerin (pH 8,6) eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert und fotografiert.

2.2.7.5 Kontrollen

2.2.7.5.1 Präabsorption

Kontrollen auf unspezifischen Bindungen wurden durch eine Präabsorption des polyklonalen PEPT2-Antiserums über Nacht bei 4°C mit korrespondierenden PEPT2-Protein (Konzentration: 20 μg Antigen/ml Antiserum) durchgeführt. Danach erfolgte die weitere immunhistochemische Bearbeitung wie oben beschrieben. Eine Positivkontrolle ohne Antigenzugabe wurde mitgeführt.

2.2.7.5.2 Weitere Kontrollen

Als weitere Kontrolle wurde der Primärantikörper unter Beibehaltung aller anderen Schritte ausgelassen, um somit unspezifische Bindungen durch die Sekundärantikörper nachzuweisen.

2.2.8 Ex-vivo-Aufnahmestudien

Zum funktionellen Nachweis des Oligopeptidtransporters in normalen humanen und murinen Lungen sowie in Mukoviszidosepräparaten wurde eine Technik entwickelt, durch welche die Aufnahme und Akkumulation eines markierten PEPT2-Substrats fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Hierbei wurde als Reportermolekül das Dipeptidderivat (D)-Ala-(L)-Lys-N-epsilon-7-amino-4-Methyl-Kumarin-3-Azetat ((D)-Ala-(L)-Lys-AMCA) gewählt. Die Synthese des Substrats erfolgte durch das Labor von Frau Prof. Dr. H. Daniel nach der Methode von Anderson (Anderson et al., 1964). Bisher wurde dieses Nachweissystem nur auf der Ebene von Zellkulturen verwendet (Otto und Bauer, 1996, Otto et al., 1996).

2.2.8.1 Inkubation

Direkt nach der Präparation des murinen Herzlungenpakets (Kap. 2.1.4.1) wurden die Aufnahmestudien durch langsame intratracheale Infusion von 25 µM (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA in 1,0 ml Eagle's Minimum Essential Medium 21011 (MEM; 37°C [GIBCO, BRL, Paisley, UK]) begonnen. Die Inkubation wurde nach 20 min beendet: Nach basaler Anschlitzung beider Lungenhälften zum Druckausgleich wurde die Lösung mit dem Reportermolekül durch Spülung mit frischen MEM (4°C) über 20 min entfernt.

Bei der Inkubation der menschlichen Gewebe (normale Lunge n = 5, Mukoviszidose n = 5) wurde die Inkubationslösung (25 µM (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA in MEM 21011) direkt in die Lungenproben infundiert. Nach der Inkubationszeit von 20 bis 40 min wurde die Inkubationslösung durch kräftiges Spülen über 40 min in eiskaltem MEM entfernt.

2.2.8.2 Verdrängungsstudien

Für kompetitive Verdrängungsstudien wurden MEM-Lösungen verwendet, die neben 25 µM (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA zusätzlich andere nichtmarkierte PEPT2-spezifische Substrate in einer wesentlich höheren Konzentration (1 mM) enthielten. Neben dem Dipeptid Glycylglutamin (je n = 3) wurde das Betalaktam Cefadroxil (je n = 3) und der ACE-Inhibitor Captopril (n = 3, nur bei humanen Geweben) verwendet (Abb. 8). Auch

diese Inkubationen wurden jeweils nach 20 bis 40 min durch Spülung mit eiskaltem MEM beendet.

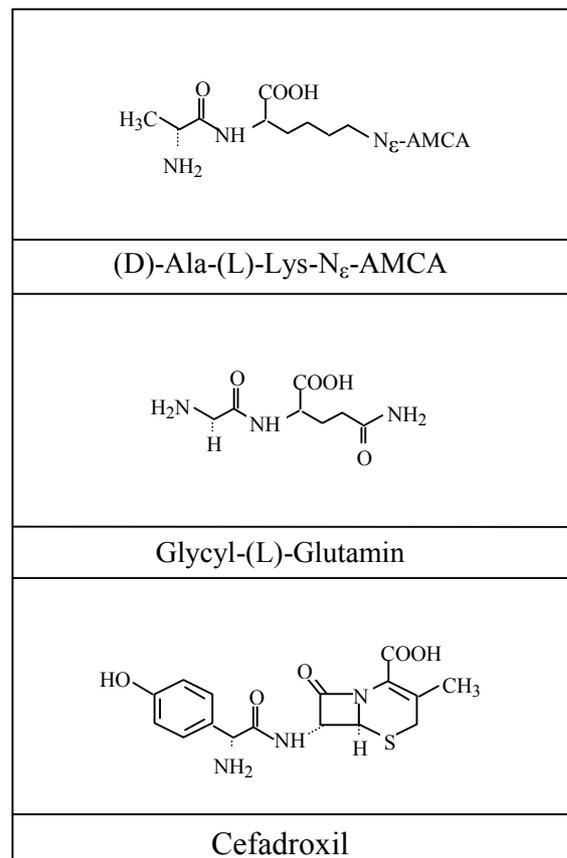


Abbildung 7: Substrate der Ex-vivo-Aufnahmestudien

2.2.8.3 Kontrollen

Um die unspezifische Akkumulation des Reportermoleküls zu bestimmen, wurden parallel murine und humane Gewebepreparationen auf 4°C abgekühlt und die Inkubationen bei diesen Temperaturen durchgeführt.

Als weitere Kontrolle wurde der unspezifische Inhibitor DEPC (Kramer, 1988, Meredith und Laynes, 1996, Terada et al., 1998) in einer Konzentration von 1 mM der Inkubationslösung zugefügt.

Zusätzlich wurde eine Inkubation mit einer MEM-Lösung ohne Zusatz von (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA bei 37°C durchgeführt.

2.2.8.4 Gewebeprozessierung

Zur Auswertung der Aufnahmestudien wurden sowohl die murinen als auch humanen Gewebe nochmals in 0,1 M PBS gespült, nicht fixiert und zum Schutz vor Gefrierartefakten über Nacht bei 4°C in einer Saccharose-PBS Lösung (800 mOsm/kg H₂O, pH 7,4) immersiert. Am folgenden Tag wurden die Lungen mit Tissue Tek aufgebläht, auf Filterpapier aufgebracht, in Stickstoff-gekühltem Isopentan (Riedel-de Haen, Seelze) schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt bzw. direkt mit dem Kryostat zu 8 bis 10 µm dicken Schnitten weiterverarbeitet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.9 Kombinierte Ex-vivo- und Histochemiestudien

Um einen PEPT2-vermittelten Transport in Typ I-Pneumozyten auszuschließen, wurden die Aufnahmestudien mit histochemischen Methoden kombiniert. Zuerst wurden wie oben beschrieben die Aufnahmestudien an murinen Lungenpräparationen durchgeführt. Danach wurden die Gewebe jedoch perfusionsfixiert: Bei einem konstanten Perfusionsdruck von 1,50 m Wassersäule wurden die murinen Präparationen mit 50 ml einer Vorspüllösung (2,5 % Polyvinylpyrolidon [Roth, Karlsruhe], 0,9 % NaCl, 0,5 % Procainhydrochlorid [Merck, Darmstadt], 2 ml Heparin [Hoffmann-La Roche, Schweiz], pH 7,4; Forssmann et al. 1977) und anschließend mit 250 ml 4 %igen Paraformaldehyd (0,1 M PBS pH 7,4) perfundiert. Zur Lokalisation der Typ I-Pneumozyten diente biotinyliertes Lycopersicon esculentum Lektin (LEA [Vector Laboratories, Burlingame, USA]). Dieses Lektin ist ein spezifischer Typ I-Zellmarker (Fehrenbach et al., 1999, Kasper et al., 1993). Nach der Fixierung und Weiterverarbeitung zu 8 bis 10 µm dicken Kryostatschnitten wurden die Schnitte in PBS gewaschen, präinkubiert in 2% Milchpulver in 1x PBS (Magermilch, Uelzena, Uelzen) sowie vorbehandelt mit Methyl- α -D-Mannopyranosid. Anschließend erfolgte eine Übernachtinkubation mit LEA (1:160 verdünnt in der Präinkubationslösung). Nach Entfernung der Inkubationslösung mittels zweimaligen Waschens in PBS für 10 min, folgte die Detektion mit Texas Rot (Dianova, Hamburg).

2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der immunhistochemisch und AMCA-Aufnahme markierten Gewebeschnitte erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Diese Methode der Mikroskopie beruht auf der Eigenschaft verschiedener Fluorochrome durch Bestrahlung mit kurzwelligem oder ultraviolettem Licht angeregt zu werden und Licht einer längeren Wellenlänge zu emittieren. Zur Kontrolle autofluoreszierender Strukturen wurden Sperrfilter und Anregungsfilter mit unterschiedlichen Wellenlängen verwendet (Tab. 10).

Je nach Filterkombination passiert emittiertes Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs den Sperrfilter und kann wahrgenommen werden.

Als Lichtquelle diente die Quecksilberdampfcurzbogenlampe eines BX 60 F Foto-Fluoreszenzmikroskops der Firma Olympus, Hamburg.

<i>Filterkombination</i>	<i>Fluorochrom</i>	<i>Erregerfilter</i>	<i>Sperrfilter</i>
U-MWIY	Texas-Rot	band pass 545-580 nm	long pass 610 nm
U-MNIB	FITC	band pass 470-490 nm	band pass 515-550 nm
U-M41007A	Cy-3	band pass 525-560 nm	band pass 570-650 nm
U-MNUA	AMCA	band pass 360-370 nm	band pass 420-460 nm

Tabelle 10: Fluoreszenzfilter

2.2.11 Dokumentation

Zur Dokumentation und Auswertung der Untersuchungsreihe wurden Schwarz-Weiß-Fotos und Dias in Farbbelichtung mittels eines an das Mikroskop angeschlossenen Fotoapparates angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 RT-PCR

Die RT-PCR führte bei $n = 5$ Rattenlungen zu einem identischen Ergebnis, welches sich in der Gelelektrophorese als Bande darstellte. Im Vergleich zu dem Kontrollgewebe Niere ($n = 5$) zeigte sich eine identische Länge der Amplifikate. Die Intensität des Lungensignals war deutlich schwächer (Abb. 8). Die im Vergleich mit einem Längenmarker festgestellte Länge der Amplifikate aus Lunge und Niere lag bei der errechneten Ziellänge von 341 bp. Die Expression von PEPT1 wurde ebenfalls durch eine RT-PCR untersucht, wobei im Kontrollgewebe Dünndarm, nicht jedoch in den Lungenextrakten ein Signal für PEPT1 mit der Länge von 754 bp gefunden wurde.

In den untersuchten Geweben zeigte sich in den parallelen Kontrollen eine Bande für das Amplifikat des „house keeping genes“ GAPDH, welche mit der Ziellänge des errechneten Produktes übereinstimmte (Abb.8).

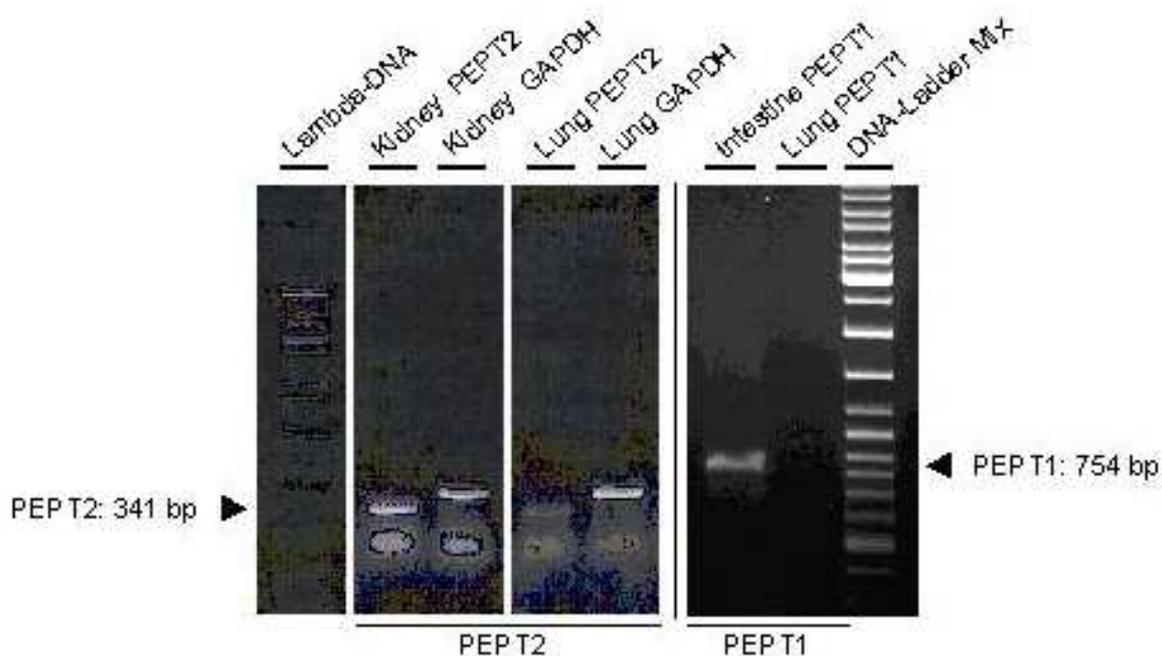


Abbildung 8: Detektion von PEPT2-mRNA durch RT-PCR.

3.2 Northern-Blot

Der mit der Digoxigenin-markierten PEPT2-cRNA-Sonde durchgeführte Northern Blot zeigte in der Geldetektion Banden bei $n = 5$ untersuchten Rattenlungen. Das Signal lag in einer Höhe von ca. 4,2 kbp. Der Vergleich mit dem Kontrollgewebe Niere ($n = 5$) zeigte ebenfalls Produkte im gleichen Bereich. Das Signal für Lunge war schwächer ausgeprägt (Abb. 9).

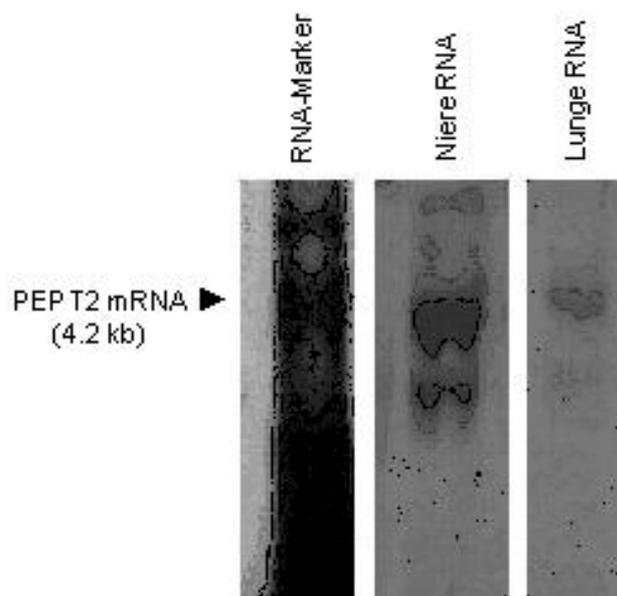


Abbildung 9: Detektion von PEPT2-mRNA durch Northern-Blot.

3.3 Nachweis von PEPT2-mRNA durch In-situ-Hybridisierung

Die zur histologischen Lokalisation von PEPT2-mRNA durchgeführte nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung führte in drei unabhängigen Versuchsreihen bei jeweils $n = 5$ untersuchten Rattenlungen zu identischen Ergebnissen. Die mit der Antisense-Sonde durchgeführten Inkubationen resultierten in einer gleichmäßigen Anfärbung der unter 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Strukturen. Die zur Kontrolle in Parallelschnitten ausgeführten Sense-Hybridisierungen ($n = 5$) bzw. mit RNase behandelten Antisense-Hybridisierungen ($n = 5$) führten zu einem kompletten Ausbleiben der Farbreaktionen.

3.3.1 Atemwege

In den größeren Atemwegen wie Trachea und Hauptbronchien war das PEPT2-mRNA-Hybridisierungssignal im Zytoplasma des respiratorischen Epithels lokalisiert. Ebenfalls zeigte das respiratorische Epithel subsegmentaler Bronchien und Bronchiolen ein zytoplasmatisches Signal (Abb. 10 a). Darüber hinaus konnte man an einigen Gefäßen positive Endothelzellen erkennen. Es wurden keine Signale im Bindegewebe, der Glatten Muskulatur, intrinsischen Ganglien oder Nervenfasern gefunden. Die Hybridisierung mit der korrespondierenden Sense-cRNA-Sonde zeigte keine spezifische Anfärbung zellulärer Strukturen (Abb. 10 b).

3.3.2 Alveolarbereich

In peripheren Lungenschnitten wurde das Hybridisierungsspezifische Signal im Zytoplasma von Typ II-Pneumozyten gefunden, die morphologisch anhand des in die Alveolarlichtung ragenden Zellkörpers charakterisiert wurden (Abb. 11 a). Die Sense-Hybridisierung zeigte keine spezifischen Signale (Abb. 11 b).

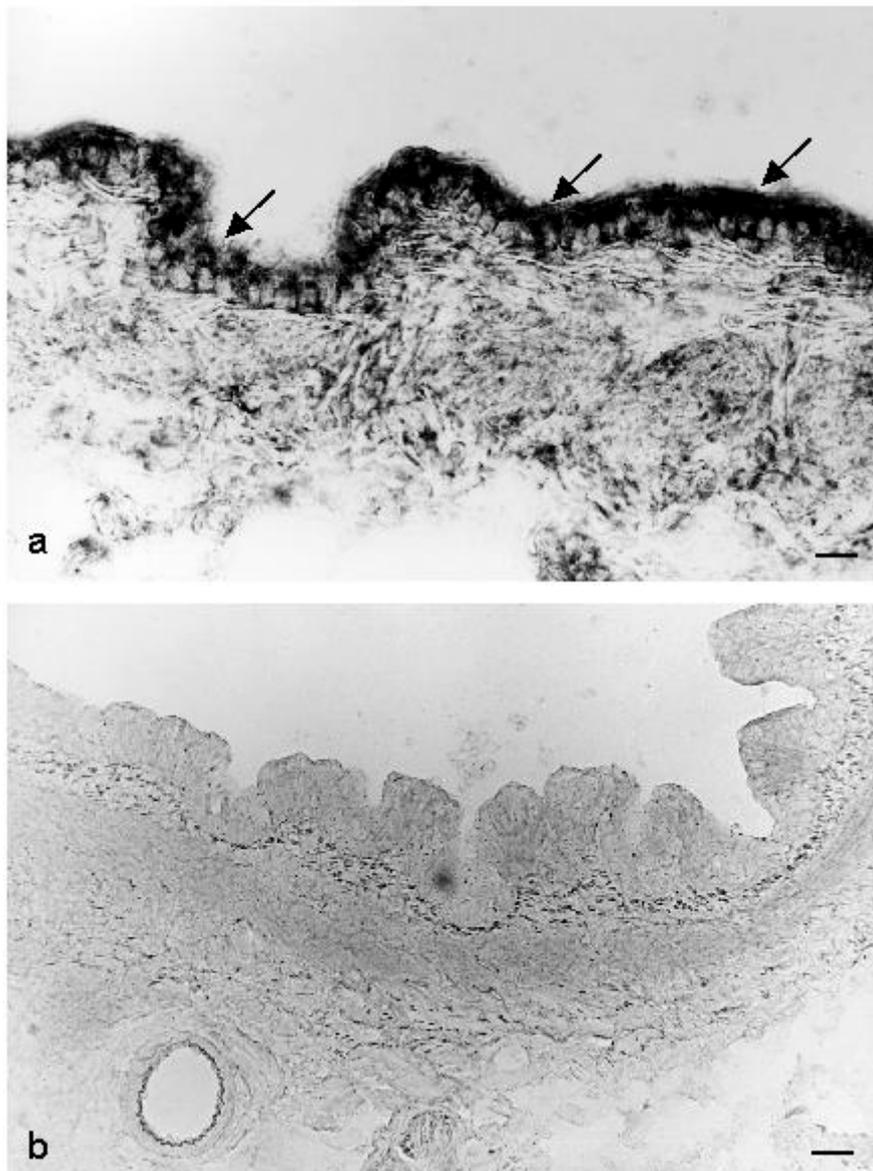


Abbildung 10: Lokalisation der PEPT2-mRNA im Rattenbronchiolus durch nonradioaktive In-situ-Hybridisierung. Hybridisierungssignale der Antisense-Sonde finden sich in den Zellen des respiratorisches Epithels (Pfeile in A). Keine spezifischen Signale bei der Inkubation mit der Sense-Sonde (B). Balken = 30 μ m (A, B).

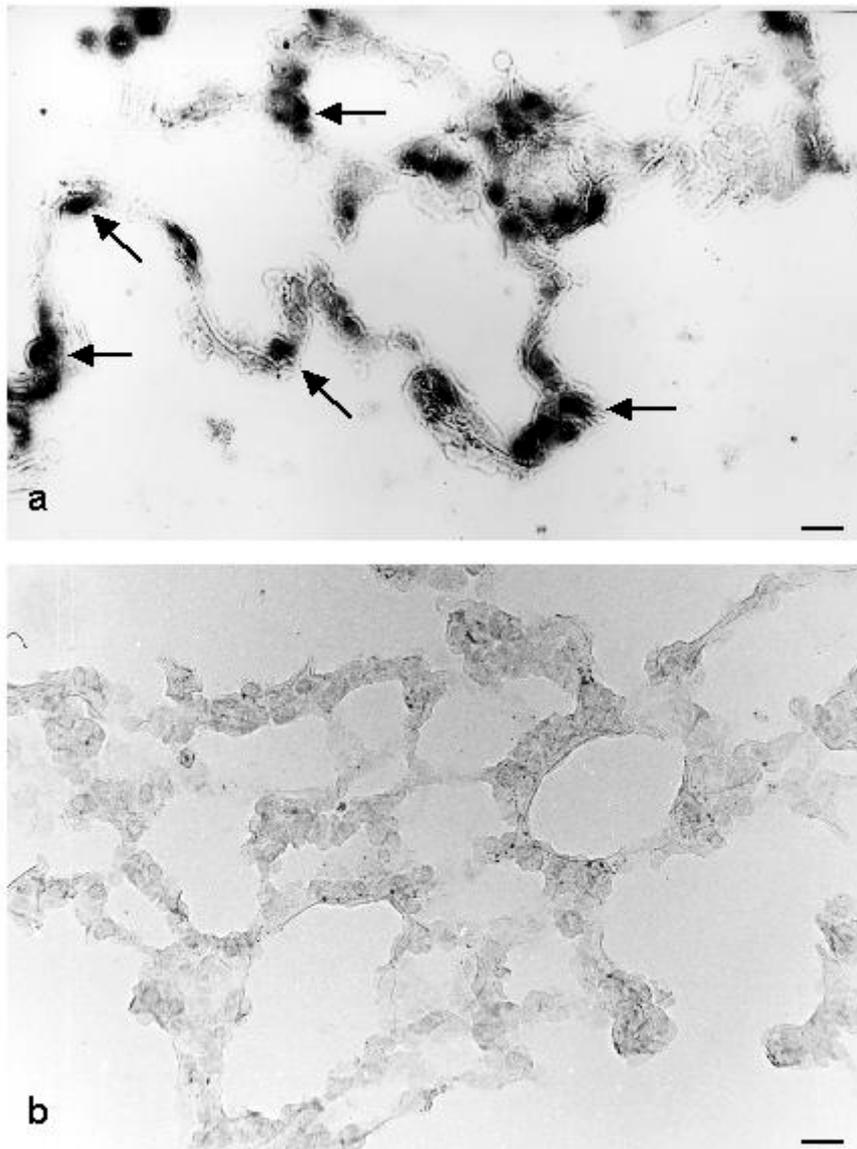


Abbildung 11: Lokalisation der PEPT2-mRNA in der peripheren Rattenlunge durch nonradioaktive In-situ-Hybridisierung. Hybridisierungssignale der Antisense-Sonde finden sich in den Typ II-Pneumozyten (Pfeile in A). Keine spezifischen Hybridisierungssignale bei der Inkubation mit der Sense-Sonde (B). Balken = 16 μm (A, B).

3.4 Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität

Die zu Beginn durchgeführten Verdünnungsreihen zeigten eine optimale Antikörperkonzentration für das PEPT2-Antiserum von 1: 1000 in Rattenlungenschnitten. Auch in humanen und Mäusegeweben führte diese Konzentration zu einem optimalen Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund. Für das PEPT1-Antiserum wurde eine Konzentration von 1: 800 ermittelt.

3.4.1 Ratte

3.4.1.1 Atemwege

In Rattenlungengewebe führte die Applikation von PEPT2-Antiserum in der Trachea und den Bronchien zu einer Markierung des respiratorischen Epithels (Abb. 12 a, b).

Die Zellen waren in ihrer Gestalt hochprismatisch und durch Kinozilien gekennzeichnet. Die Immunreaktivität war sehr intensiv und von einem nicht-granulären Typ mit einer apikalen Mehranreicherung. Es konnte kein spezifisches intrazelluläres Verteilungsmuster erkannt werden.

Darüber hinaus zeigte das Endothel einzelner Gefäße PEPT2-Immunreaktivität vom nicht-granulären Typ.

Es stellte sich keine Reaktion in glatter Muskulatur, subepithelialelem Bindegewebe oder hyalinem Knorpel dar.

Bei der Präabsorption des PEPT2-Antiserums mit korrespondierendem Antigen blieb eine Reaktion aus (Abb. 12 c).

3.6.1.2 Alveolarbereich

In der peripheren Rattenlunge führte die Inkubation mit PEPT2-Antiserum zu einer Fluoreszenz von nischenförmig zwischen den flachen Typ I-Pneumozyten gelegenen Zellen ohne Ausläufer. Durch ihre charakteristische Morphologie mit kubischer Gestalt und der Vorwölbung in das Alveolarlumen konnten sie als Typ II-Pneumozyten charakterisiert werden (Abb. 13 a, b). Es wurde keine Immunreaktion in intraalveolaren Rundzellen festgestellt.

Die Präabsorption des Primärantikörpers mit korrespondierendem Peptid führte zu einem Verlust der spezifischen Markierung (Abb. 13 c). Auch durch die Anwendung verschiedener Sekundärantikörper konnten unspezifische Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden.

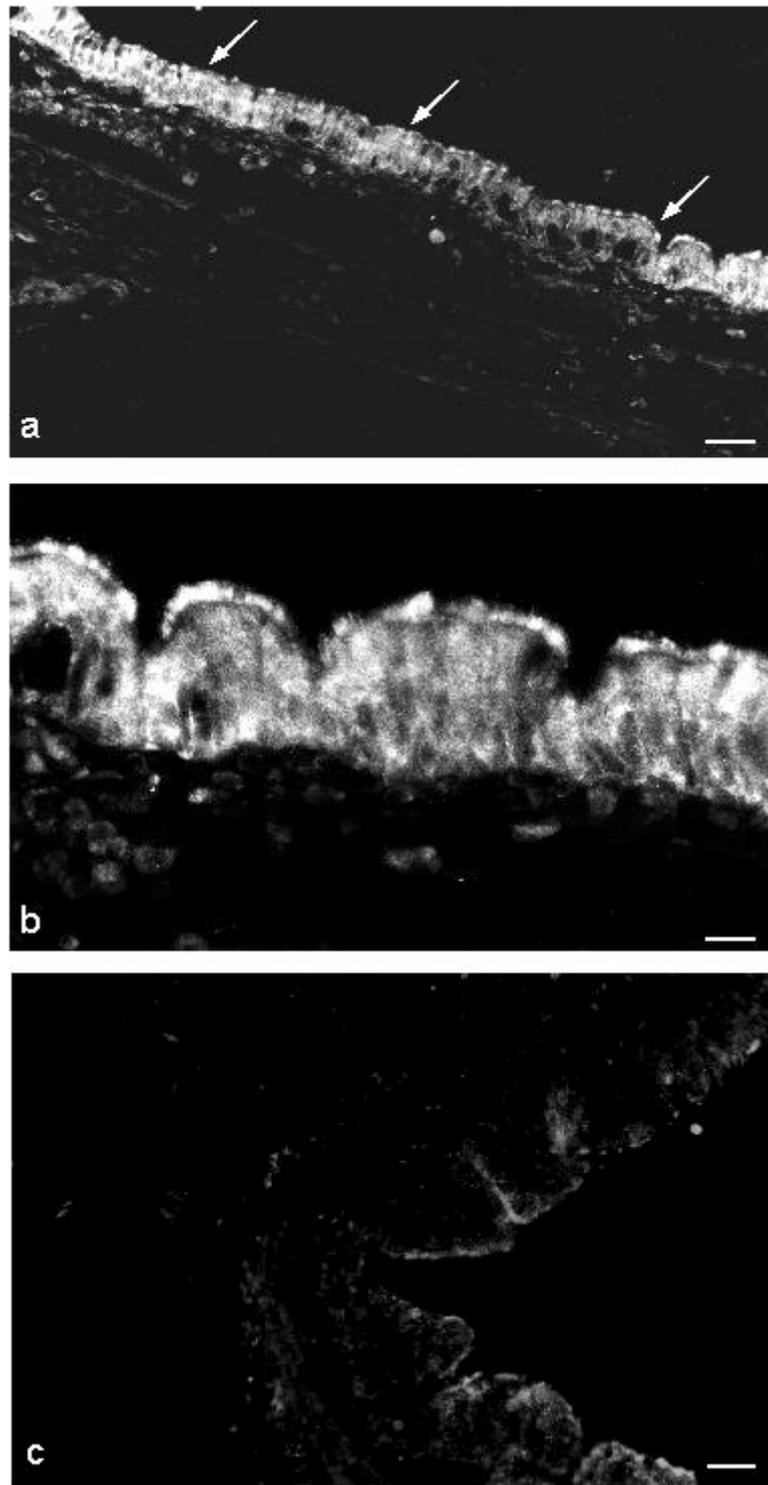


Abbildung 12: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität im Rattenbronchus. Signale finden sich in den hochprismatischen Zellen des respiratorischen Epithels (Pfeile in A, B). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (C). Balken = 40 μm (B), = 80 μm (A, C).

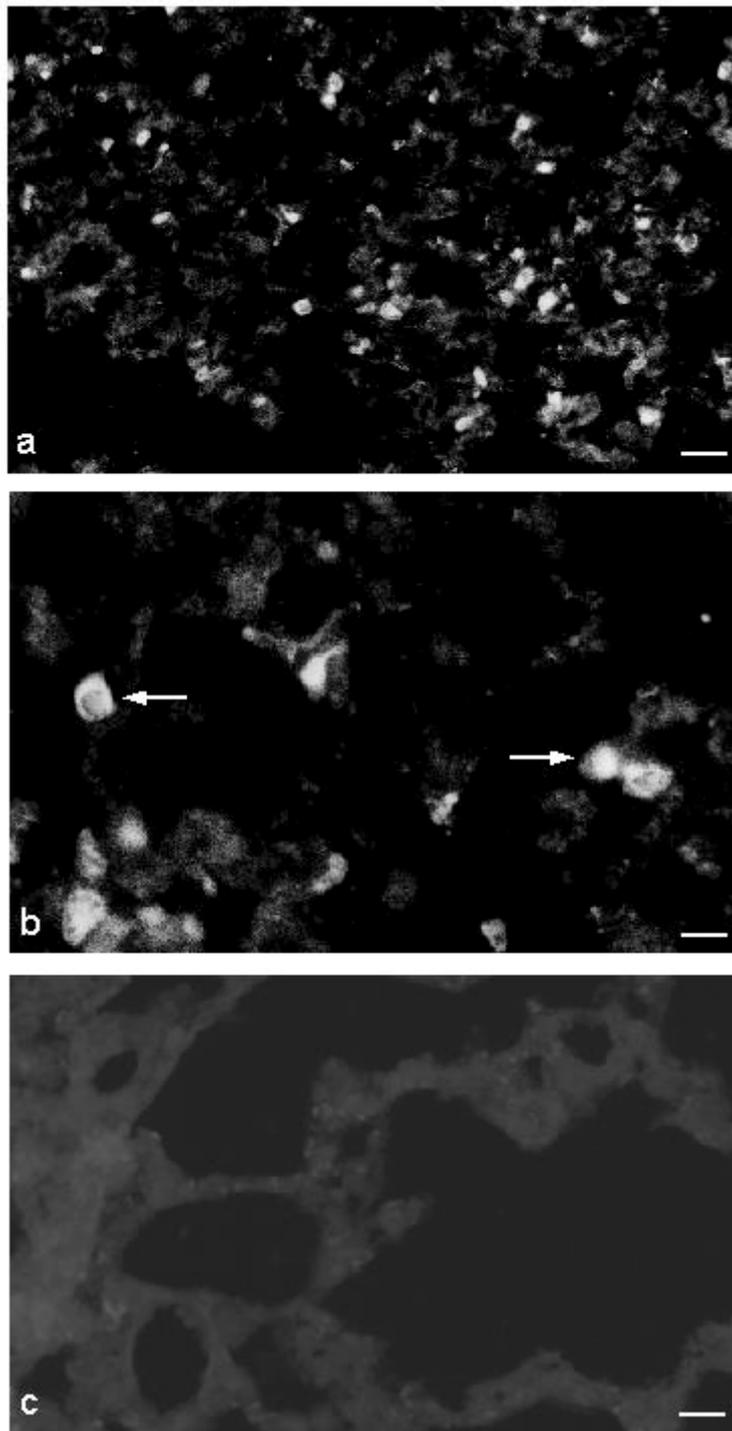


Abbildung 13: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren Rattenlunge. PEPT2-Signale sind in Typ II-Pneumozyten lokalisiert (A, Pfeile in B). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (C). Balken = 40 μm (A), = 80 μm (B, C).

3.4.2 Maus

3.4.2.1 Atemwege

Die Anwendung der Immunhistochemie bei murinen Tacheal- und Bronchialschnitten führte zu einer gleichmäßigen Anfärbung des respiratorischen Epithels. Es konnte ein deutliches PEPT2-Immunsignal in den hochprismatischen, kinozilientragenden Epithelzellen von Trachea, großen und kleinen Bronchien sowie Bronchiolen gefunden werden (Abb. 14 a, b).

Das Fluoreszenzmuster in diesen Zellen war nicht-granulär und ohne erkennbare subzelluläre Verteilung. Auch konnte vereinzelt in den submukösen Endothelzellen kleinerer Gefäße ein Signal beobachtet werden.

Nach Präabsorption mit dem korrespondierenden Antigen kam es zu einer vollständigen Abschwächung des Fluoreszenzsignals (Abb. 14 c).

3.6.4.2 Alveolarbereich

In peripheren Lungenabschnitten zeigten nischenförmig zwischen den flachen Typ I-Pneumozytenzellausläufern gelegene Zellen PEPT2-Immunreaktivität (Abb. 15 a, b). Durch ihre charakteristische kubische Gestalt ohne Ausläufer wurden sie als Typ II-Pneumozyten identifiziert.

Auch in peripheren Lungenschnitten führte die Präabsorption zu einer Aufhebung des Signals (Abb. 15 c).

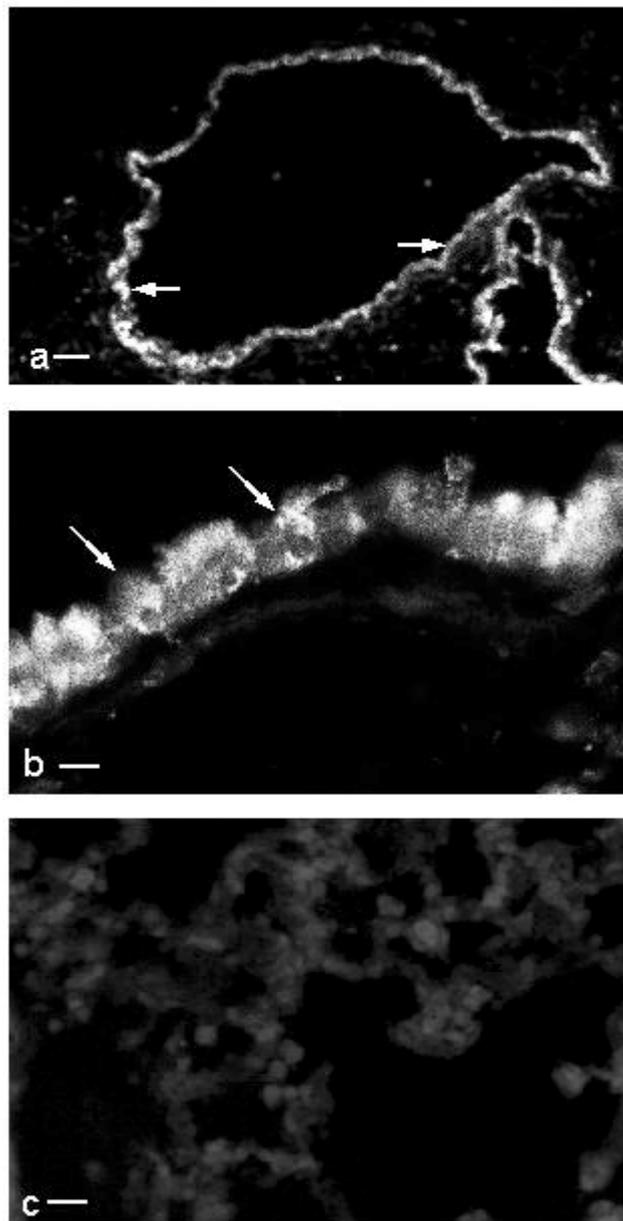


Abbildung 14: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität im Mäusebronchiolus. Signale in Bronchialepithelzellen (Pfeile in A, B). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (C). Balken = 10 μm (B), = 60 (C), = 80 μm (A).

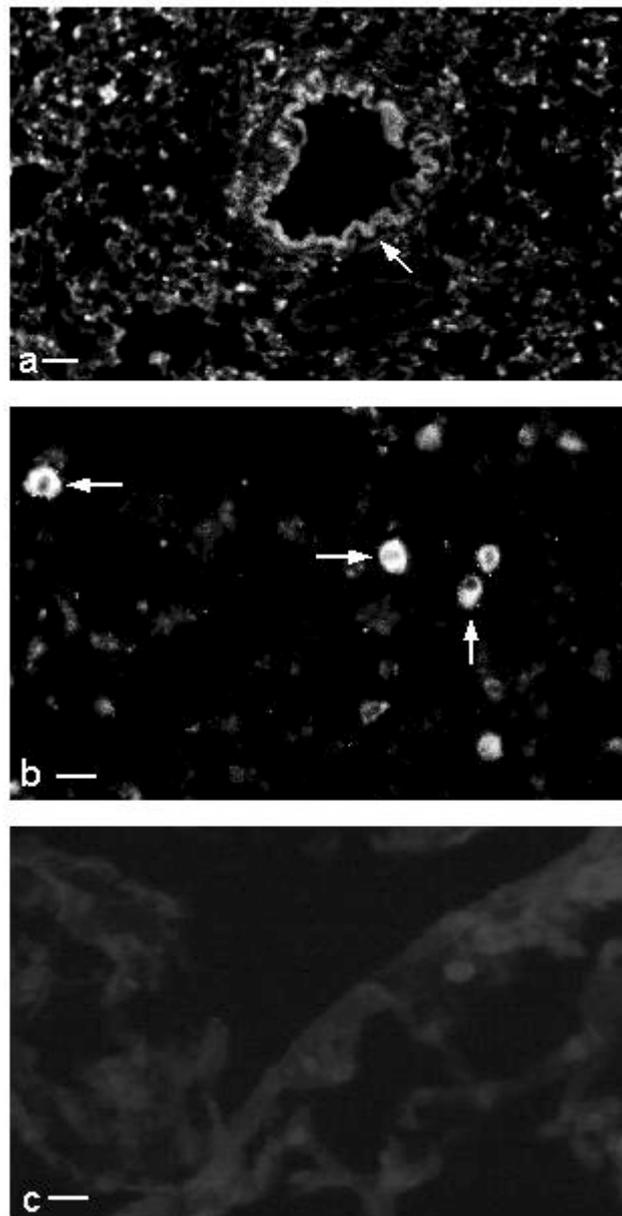


Abbildung 15: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren Mäuselunge. PEPT2-Signale im Bronchiolusepithel (Pfeil in A) und Typ II-Pneumozyten (A, Pfeile in B). Präabsorption (C). Balken = 20 μm (B, C), = 100 μm (A).

3.4.3 PEPT1-Immunhistochemie in Mäusegeweben

3.4.3.1 Lungengewebe

Die Inkubation zentraler Tacheal- und Bronchialbezirke sowie peripherer Lungenbereiche mit PEPT1-Antiserum führte zu keiner spezifischen Antikörperreaktion (Abb. 16 a).

3.4.3.2 Jejunum

Immunhistochemie mit PEPT1-Antiserum im jejunalen Dünndarmabschnitt der Maus als Positivkontrolle führte zu einer intensiven Reaktion im Bereich des Darmepithels. Das nicht-granuläre Fluoreszenzsignal war in den absorptiven Enterozyten lokalisiert (Abb. 16 b). Schleimsezernierende Zellen des Epithels blieben ausgespart. Genauso zeigten Tela submucosa, Lamina muscularis propria sowie Subserosa und Serosa keine Strukturen mit spezifischer PEPT1-Immunreaktivität.

Die Präabsorption mit dem korrespondierenden Antigen und die Kontrollinkubationen ohne Primärantikörper führten zu einer vollständigen Minderung des Fluoreszenzsignals.

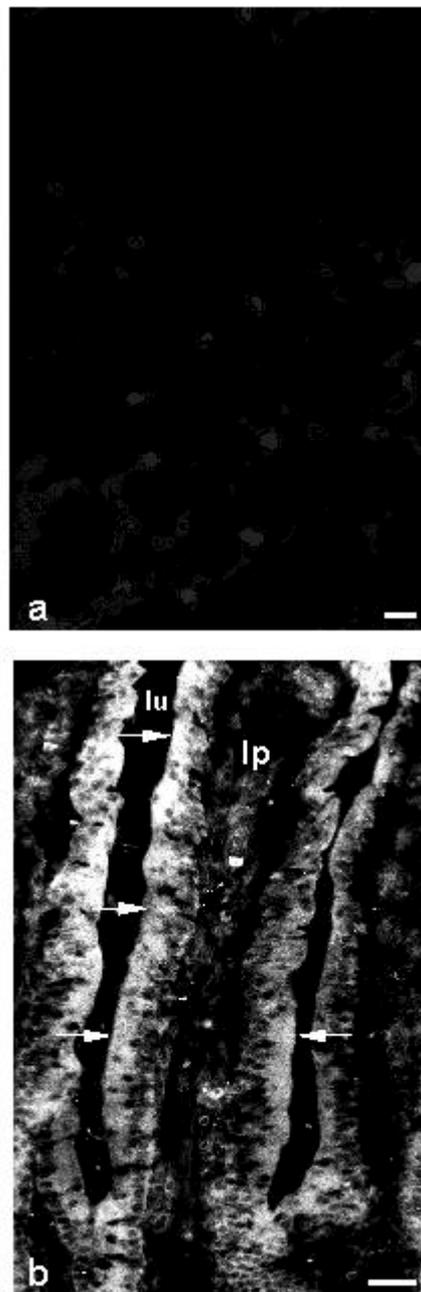


Abbildung 16: PEPT1-Immunhistochemie in Mäusegeweben. Es finden sich keine PEPT1-Signale in der Lunge (A). Die Inkubation des Jejunums führt zu einem intensiven Signal in den absorptiven Enterozyten (B). Balken = 20 μm (A), = 42 μm (B).

3.4.4 Humanes Gewebe

3.4.4.1 Normale Lunge

3.4.4.1.1 Atemwege

In Gewebeschnitten von normalen humanen Atemwegen zeigte das respiratorische Epithel der Trachea, großer und kleiner Bronchien sowie Bronchioli eine Immunreaktivität für PEPT2. Es färbten sich die hochprismatischen Epithelzellen mit erkennbaren Kinozilien an (Abb. 17 a). Die Immunreaktivität zeichnete sich durch einen intensiven nicht-granulären Typ aus. In kleineren venösen Gefäßen der Submukosa zeigte sich ein PEPT2-Immunsignal in den Endothelzellen (Abb. 17 b).

Keine Reaktion zeigte der M. trachealis, die glatte Muskulatur der großen und kleinen Bronchien, sowie das Bindegewebe, Drüsen und Knorpelgewebe.

Das Fluoreszenzsignal wurde durch Präabsorption mit der immunogenen Peptidsequenz komplett aufgehoben (Abb. 17 c).

3.6.4.1.2 Alveolarbereich

Im Alveolarbereich waren immunreaktive Typ II-Pneumozyten erkennbar, die durch ihren prominenten Zellkörper im Alveolarlumen identifiziert wurden (Abb. 18 a). Keine Reaktion zeigten intraalveolär gelegene Rundzellen und flache Typ I-Pneumozyten.

Das Fluoreszenzsignal wurde durch Präabsorption mit dem korrespondierenden Antigen komplett aufgehoben (Abb. 18 b).

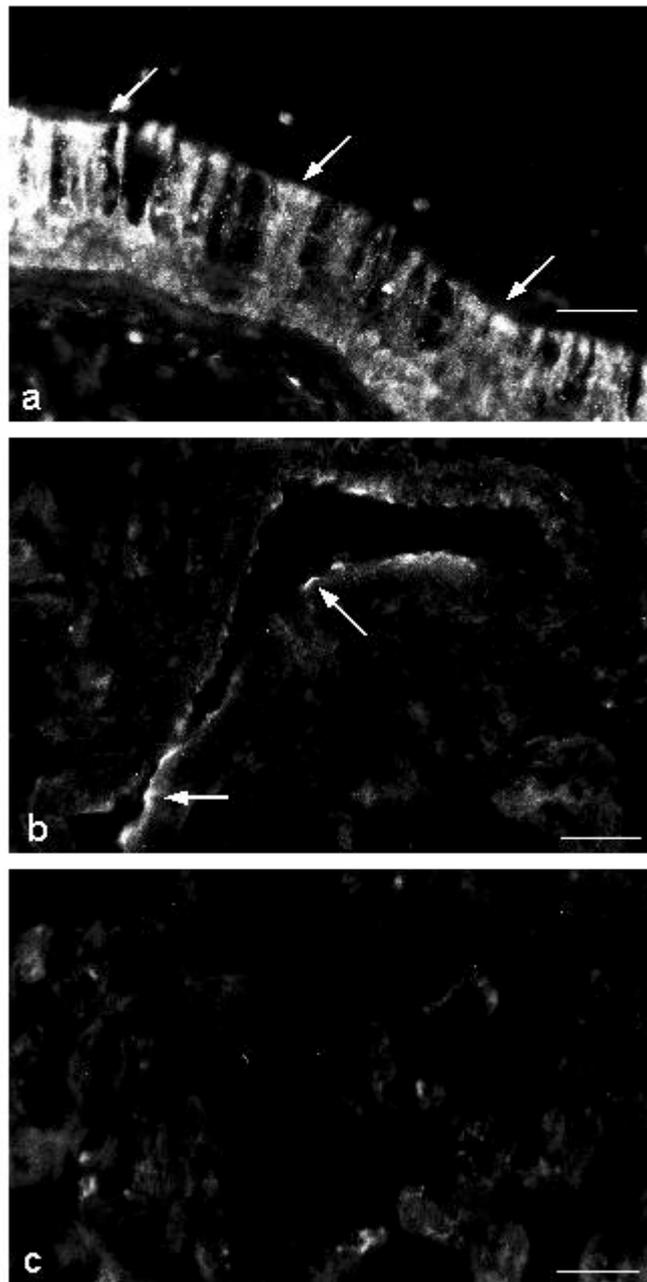


Abbildung 17: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der humanen Trachea. PEPT2-Signale im Trachealepithel (Pfeile in A) und Endothelzellen submuköser Venolen (Pfeile in B). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (C). Balken = 40 μm (A), = 80 μm (B, C).

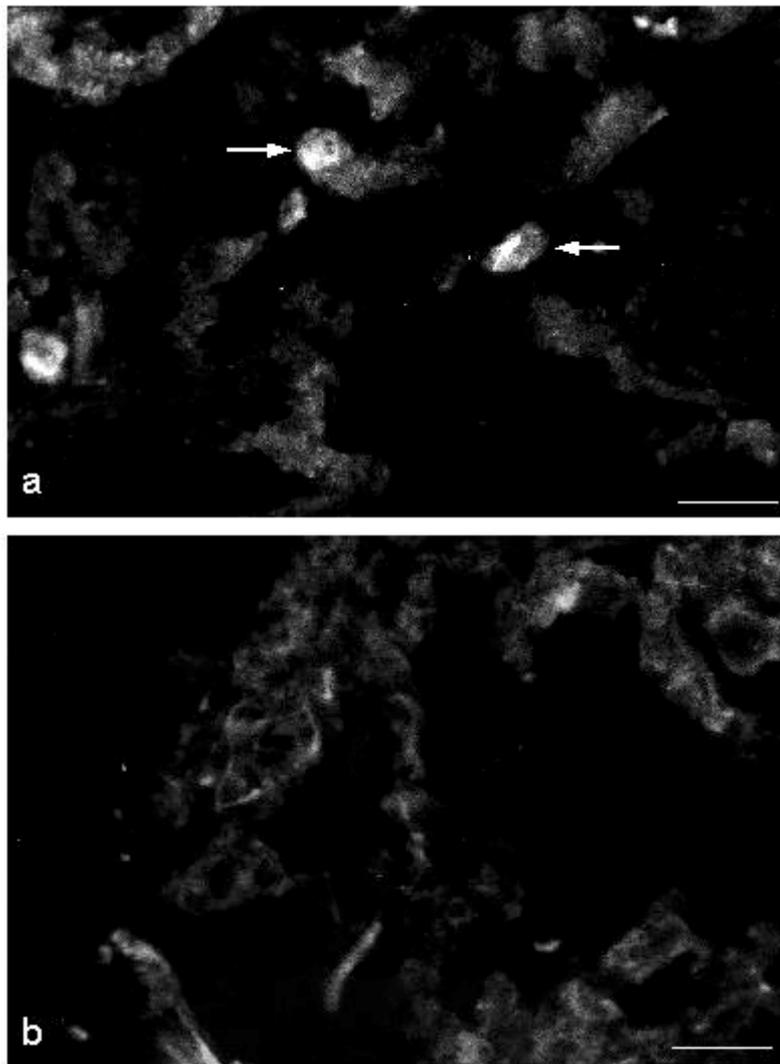


Abbildung 18: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren humanen Lunge. PEPT2-Signale in den Typ II-Pneumozyten (Pfeile in A). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (B). Balken = 80 μm (A, B).

3.6.3.2 Mukoviszidose

In Gewebeschnitten aus Empfängerlungen, die bei Lungentransplantationen von Mukoviszidosepatienten entnommen wurden, zeigte die immunhistochemische Darstellung PEPT2s im Vergleich zu Geweben normaler humaner Lungen keine qualitativen Veränderungen des Verteilungsmusters.

3.6.3.2.1 Atemwege

In den Atemwegen wurde das gleiche Immunreaktivitätsmuster wie unter normalen Bedingungen festgestellt: Es fanden sich Signale für PEPT2-Immunreaktivität in den hochprismatischen Zellen des respiratorischen Epithels von Trachea, Bronchien und Bronchiolen (Abb. 19 a). Auch das Gefäßendothel zeigte PEPT2-Immunreaktivität (Abb. 19 b). Bei der Präabsorption kam es zu einer Aufhebung des Fluoreszenzsignals (Abb. 19 c).

3.6.3.2.1 Alveolarbereich

Im Alveolarbereich zeigten die als Typ II-Zellen identifizierten kubischen Nischenzellen eine nicht-granuläre PEPT2-Immunreaktivität (Abb. 20 a). Diese Reaktion wurde durch eine Präabsorption aufgehoben (Abb. 20 b).

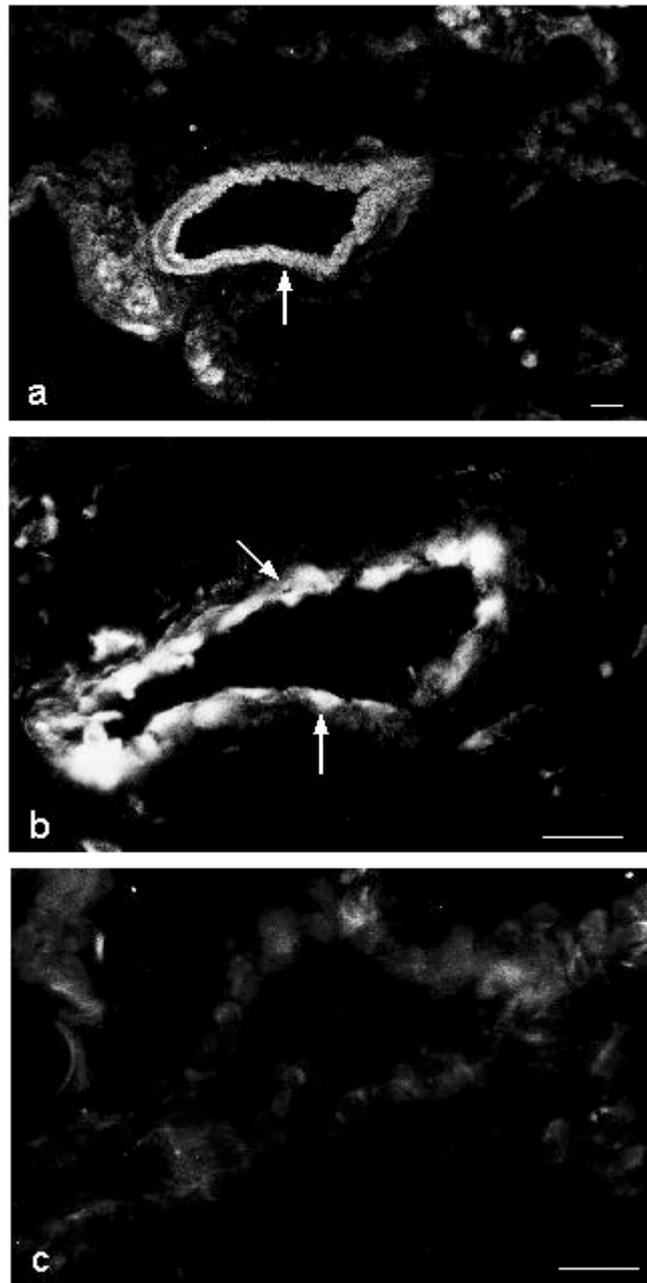


Abbildung 19: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten. PEPT2-Signale im Bronchiolusepithel (Pfeil in A) und Endothelzellen submuköser bronchialer Venolen der Bronchi (Pfeile in B). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (C). Balken = 60 μ m (B, C), = 80 μ m (A).

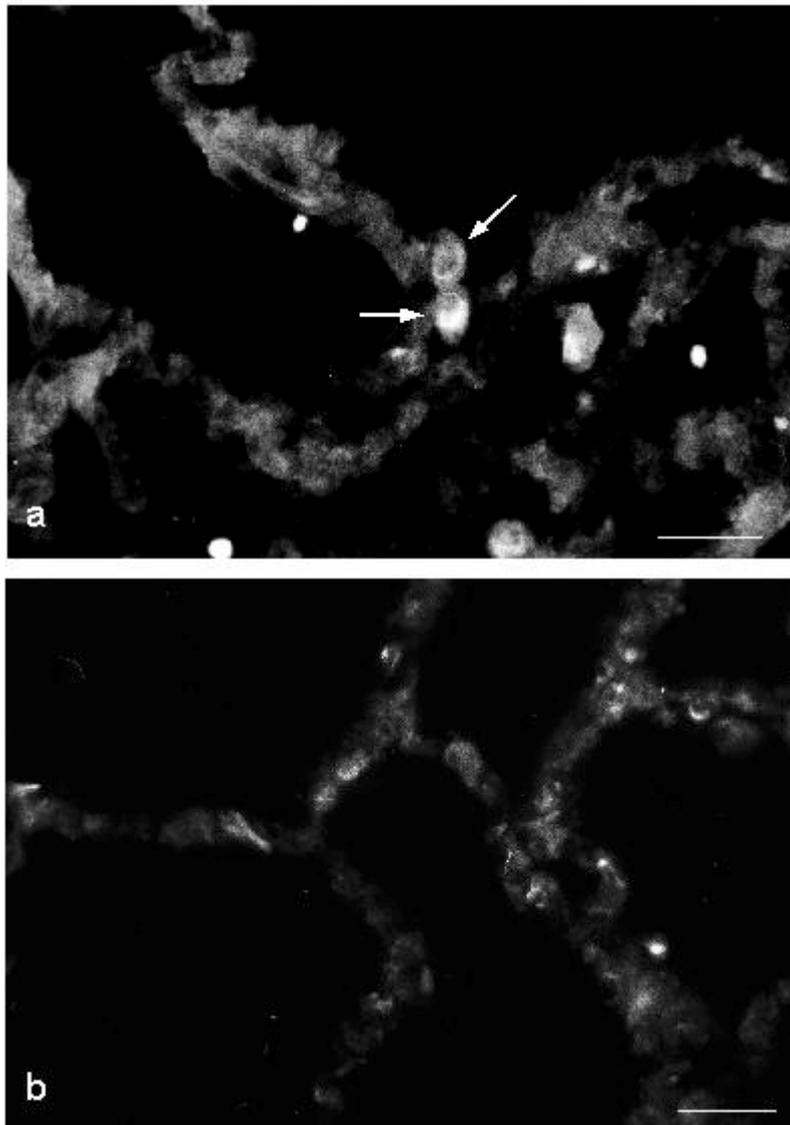


Abbildung 20: Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren Lunge von Mukoviszidosepatienten. PEPT2-Signale in den Typ II-Pneumozyten (Pfeile in A). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (B). Balken = 80 μ m (A, B).

3.5 Ex-vivo-Aufnahmestudien an murinen Präparationen

3.5.1 Atemwege

Die Inkubation von murinen Lungenpräparationen mit 25 μM (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA resultierte in der Aufnahme des Farbstoff-Dipeptidkonjugats in hochprismatischen Zellen des respiratorischen Epithels von Trachea, Bronchien und Bronchiolen (Abb. 21 a, b).

Es ließ sich keine Fluoreszenzakkumulation in Endothelien, glatter Muskulatur, Knorpelgewebe und Bindegewebe erkennen.

Im Verdrängungsexperiment mit dem Zusatz von 1 mM Cefadroxil zeigte sich eine starke Reduzierung des Fluoreszenzsignals im Bereich des respiratorischen Epithels (Abb. 21 c).

Bei der Verdrängung durch 1 mM Glycylglutamin zeigte sich ebenfalls eine Aufhebung des Signals im Epithel (Abb. 21 d).

Kontrollexperimente mit Auslassen des Reportermoleküls sowie Inkubationen bei einer Temperatur von 4°C zeigten eine völlige Aufhebung des Fluoreszenzsignals.

Als weitere Kontrolle wurde DEPC in einer Konzentration von 1mM der Inkubationslösung zugefügt. Auch hierbei kam es zu keiner Aufnahme des fluoreszierenden Substrates.

3.5.2 Alveolarbereich

In peripheren Abschnitten konnte eine Akkumulation des markierten Dipeptids in kubischen Nischenzellen festgestellt werden, die durch ihre charakteristische Morphologie als Typ II-Pneumozyten identifiziert wurden (Abb. 22 a, b). Das Fluoreszenzsignal lag intrazellulär ohne Akzentuierung einzelner subzellulärer Strukturen. Die Verdrängungsstudien mit 25 μM (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA plus 1 mM unmarkiertem Cefadroxil zeigten eine komplette Verdrängung des Signals (Abb. 22 c). Bei der Verdrängung von 25 μM mit 1 mM unmarkiertem Glycyl-glutamin waren die Signale ebenfalls auf ein Minimum reduziert (Abb. 22 d).

Kontrollinkubationen bei abgestuften Temperaturen zeigten quantitativ eine Minderaufnahme des Reportermoleküls. Bei einer Temperatur von 4°C sowie bei Auslassen des markierten Dipeptids zeigte sich keine intrazelluläre Akkumulation von Fluoreszenz.

Bei der Kontrollinkubation mit dem Zusatz von DEPC in einer Konzentration von 1 mM kam es ebenfalls zu keiner feststellbaren Aufnahme des Fluoreszenzsubstrates.

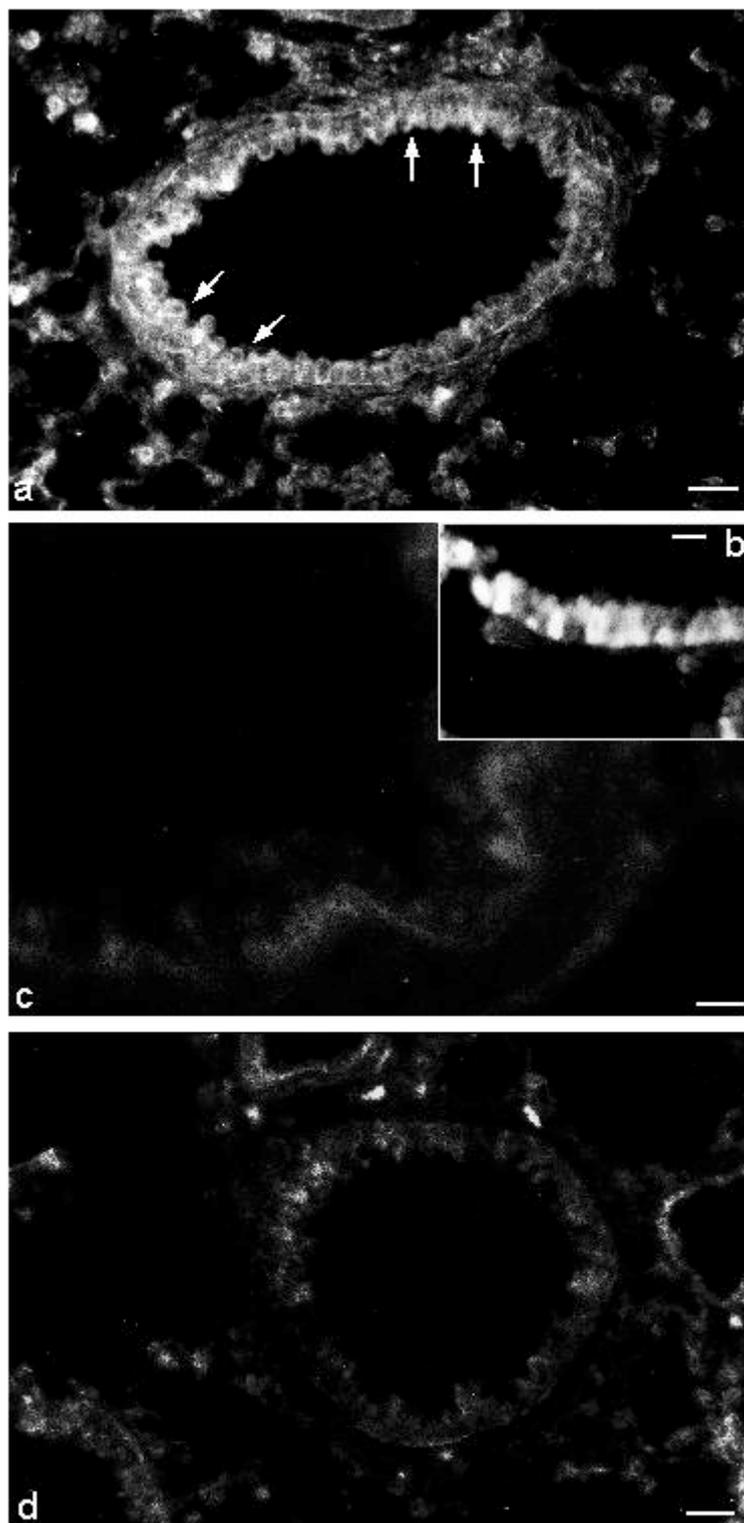


Abbildung 21: Funktionelle Ex-vivo-Aufnahmestudien in murinen Lungenpräparationen: Bronchiolus. Bei der Inkubation mit 25 μM (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA findet sich intrazelluläre Fluoreszenz im respiratorischen Epithel (A, B). Deutlich reduzierte Aufnahme des fluoreszierenden Moleküls in das Epithel bei Verdrängung mit 1mM Cefadroxil (C) und Glycylglutamin (D). Balken = 12 μm (B), = 22 μm (C), = 80 μm (A, D).

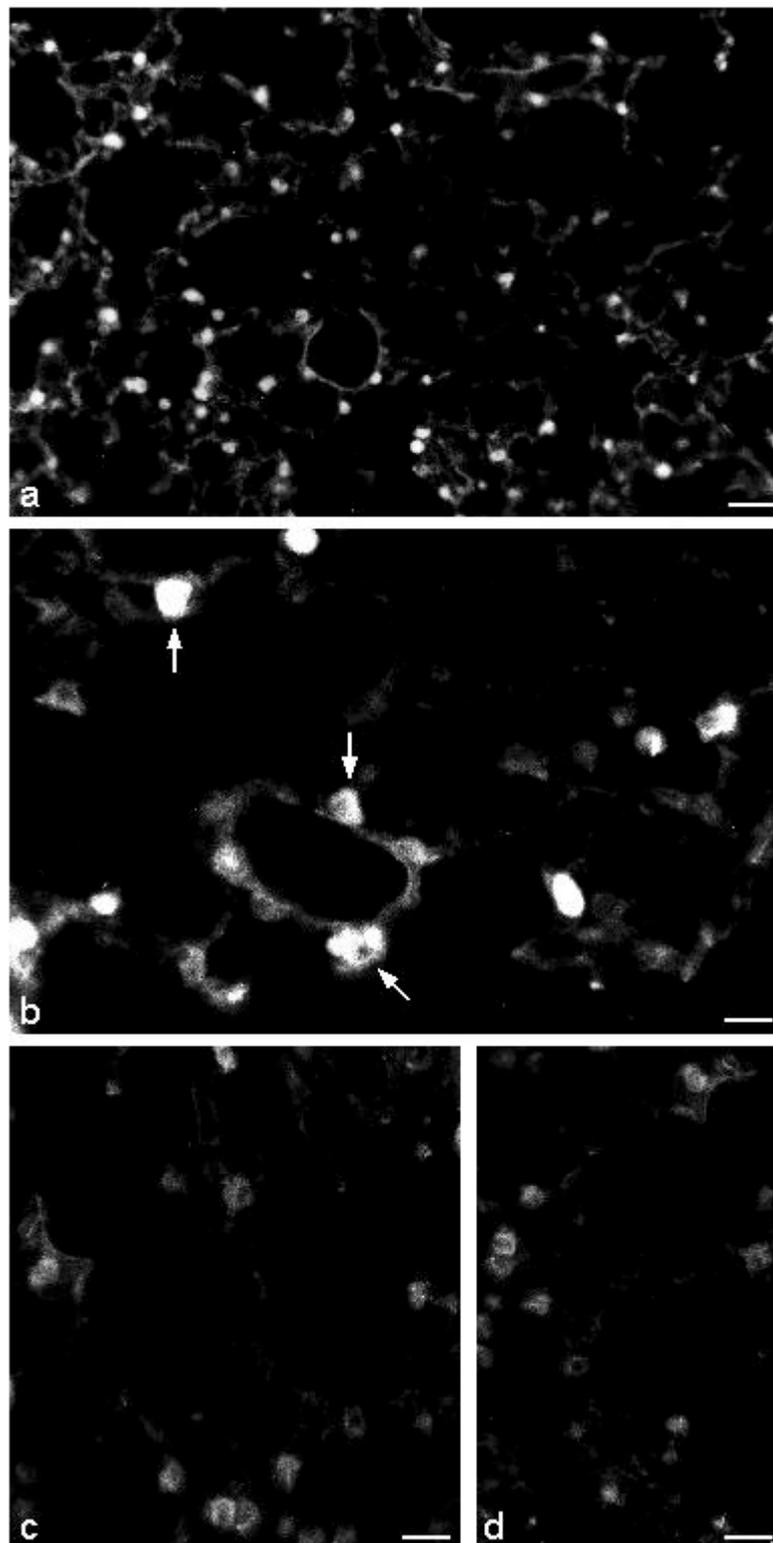


Abbildung 22: Funktionelle Ex-vivo-Aufnahmestudien in murinen Lungenpräparationen: Periphere Lunge. Bei der Inkubation mit 25 μ M (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA findet sich intrazelluläre Fluoreszenz in den Typ II-Pneumozyten (A, Pfeile in B). Deutliche Verminderung der Fluoreszenz bei Verdrängungsstudien mit 1mM Cefadroxil (C) und Glycylglutamin (D). Balken = 20 μ m (B), = 40 μ m (C, D), = 100 μ m (A).

3.6 Kombinierte Ex-vivo-Aufnahmestudien und Histochemie

Die Kombination aus Aufnahmestudien für (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA und Lektin-Histochemie in murinen Lungengeweben führte wie bei den isolierten Aufnahmestudien zu einer primären Akkumulation des markierten Reportermoleküls (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA in Typ II-Pneumozyten (Abb. 23 b). Die im Anschluss sekundär durchgeführte Lektin-Histochemie resultierte in einer Anfärbung von Typ I-Pneumozytenmembranen (Abb. 23 a). Durch die Wahl verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe konnte eine unterschiedliche Verteilung von PEPT2-Immunreaktivität und LEA in den gleichen Schnitten aufgezeigt werden. Typ I-Pneumozyten wurden nicht durch die Inkubation mit dem PEPT2-Antiserum angefärbt (Pfeilköpfe in a).

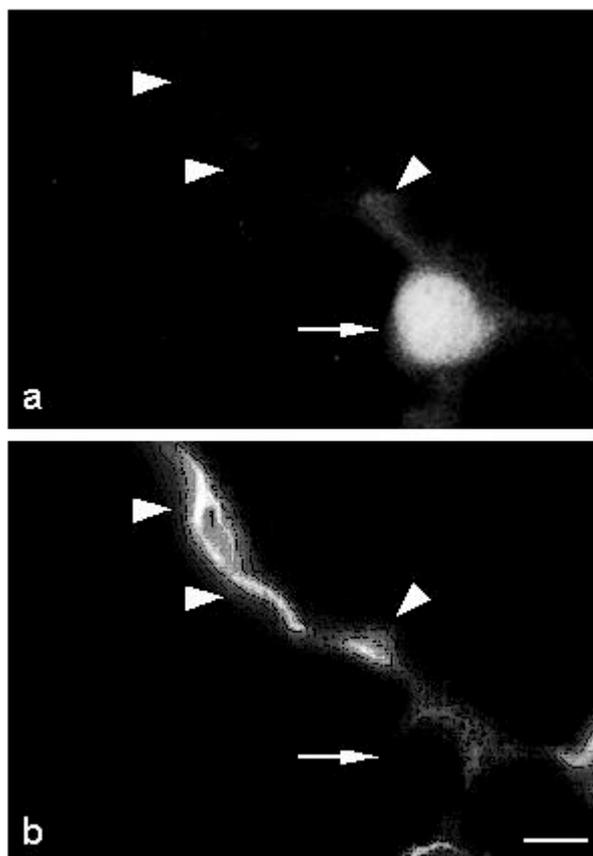


Abbildung 23: Kombinierte Ex-vivo-Aufnahmestudien und Histochemie in murinen Lungenpräparationen. Typ II-Pneumozyten zeigen ein intensives AMCA-Fluoreszenzsignal (Pfeil in A). Daneben finden sich LEA markierte Typ I-Pneumozytenmembranen (Pfeilköpfe in B), die sich in der Inkubation mit PEPT2-Antiserum nicht anfärben (Pfeilköpfe in A). Balken = 18 µm.

3.7 Ex-vivo-Aufnahmestudien in humanen Lungengeweben

3.7.1 Normale Lunge

Die Inkubation von normalen humanen Lungen mit 25 μ M (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA in MEM 21011 führte zu einer Akkumulation des Reportermoleküls in Zellen des respiratorischen Epithels subsegmentaler Bronchien und Bronchiolen (Abb. 24 a).

Im Alveolarbereich wurde eine Akkumulation von (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA in den kubischen Typ II-Pneumozyten gefunden (Abb. 24 b).

Die Verdrängungsexperimente mit 1 mM Glycylglutamin (Abb. 24 c) und 1 mM Cefadroxil (Abb. 24 d) zeigten eine kompetitive Verdrängung des (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA Transports im Flimmerepithel und den Typ II-Pneumozyten. Inkubationen mit einem Zusatz von DEPC (Abb. 24 e) sowie bei einer Temperatur von 4 °C (Abb. 24 f) zeigten ebenfalls keine Aufnahme des Reportermoleküls.

3.7.2 Mukoviszidose

In den Resektaten von Mukoviszidosepatienten wurde ein qualitativ gleiches Aufnahmepattern wie in normalen Lungengeweben vorgefunden: (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA akkumulierte in den Flimmerepithelzellen (Abb. 24 g) und Typ II-Pneumozyten (Abb. 24 h, i).

Quantitativ stellte sich jedoch aufgrund der schlechten Zugänglichkeit in den Bereichen des Resektats, die durch Schleimretention verlegt waren, eine Minderaufnahme des Dipeptidkonjugats dar.

Die Aufnahme konnte in den Verdrängungsexperimenten durch Cefadroxil (Abb. 24 k) und Glycylglutamin (Abb. 24 j) gehemmt werden.

Die Kontrollexperimente die entweder unter Auslassen des Reportermoleküls, einer Temperatur von 4°C (Abb. 24 l) oder Zusatz des Inhibitors DEPC (Abb. 24 m) durchgeführt wurden, zeigten keine intrazelluläre Fluoreszenzakkumulation.

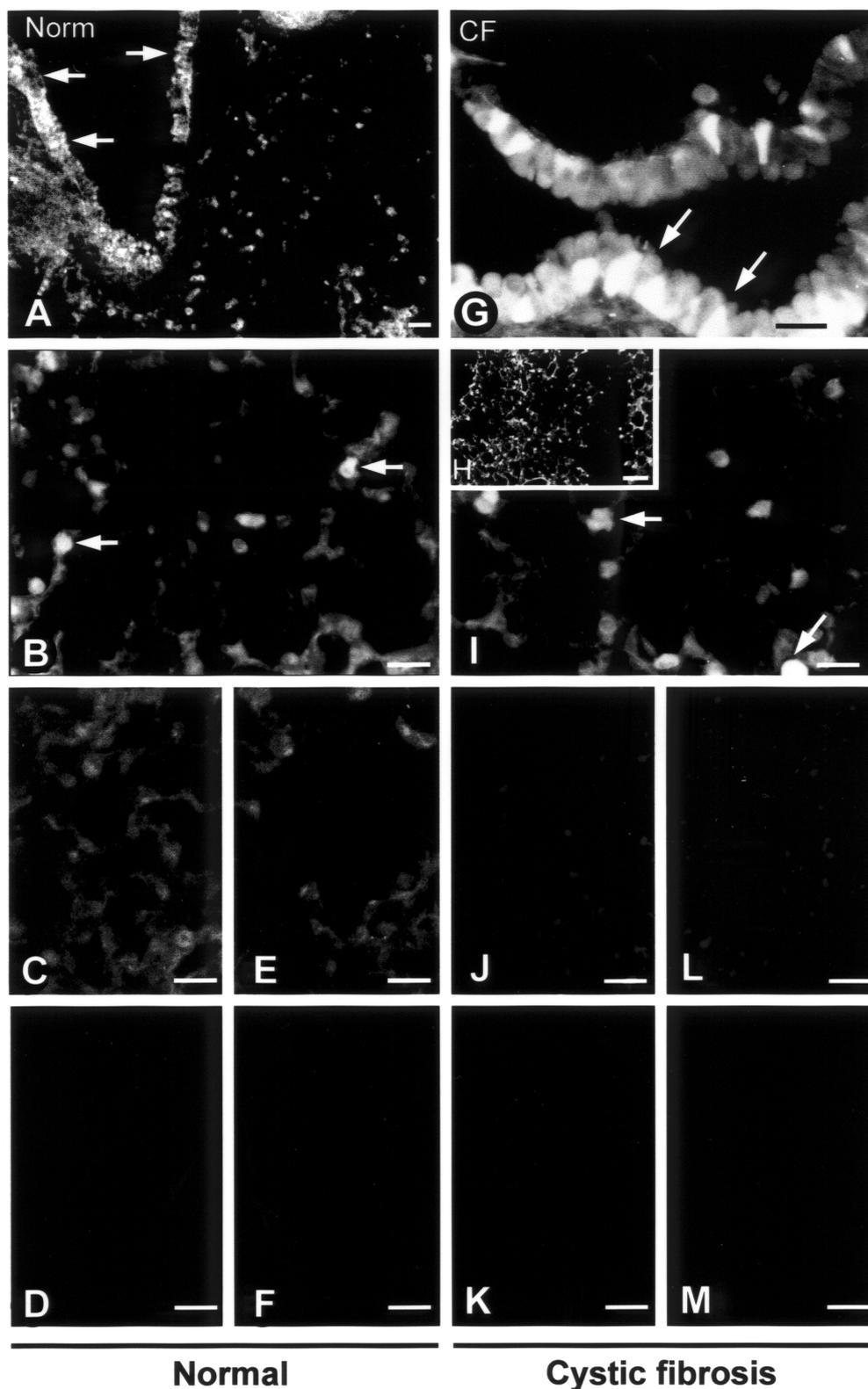


Abbildung 24: Funktionelle Ex-vivo-Aufnahmestudien in der humanen normalen und CF-Lunge. Fluoreszenzsignale im respiratorischen Epithel der Bronchi und Bronchiolen (normal A, Mukoviszidose G), sowie in Typ II-Pneumozyten (normal B, Mukoviszidose H, D). Reduktion des Signals bei Inkubation mit Glycylglutamin (normal C, Mukoviszidose J) und Cefadroxil (normal E, Mukoviszidose L). Keine Aufnahme bei DEPC- (normal D, Mukoviszidose K) und 4 °C - Inkubationen (normal F, Mukoviszidose M) Balken = 22 μm (A, D), = 42 μm (B-G, I-M), = 300 μm (H).

4 Diskussion

4.1 Methoden

In dieser Arbeit wurde die Expression des Oligopeptidtransporters PEPT2 auf transkriptioneller, translationaler und funktioneller Ebene in Lungengeweben von Maus, Ratte und Mensch untersucht.

Die Existenz eines spezifischen Transportsystems für Oligopeptide in der Lunge wurde bisher aufgrund einer Reihe funktioneller Studien vermutet.

So konnte in Typ II-Pneumozyten-Primärkulturen der Ratten die Aufnahme des Dipeptids (L)-Trp-(L)-Tyr beobachtet werden, jedoch ohne Charakterisierung des molekularen Transportvorgangs, da das Dipeptid sehr schnell hydrolysiert wurde (Meredith und Boyd, 1993).

Durch den Nachweis des intakten Transports des hydrolysestabileren Dipeptids (D)-Phe-(L)-Ala in einer luminal-vaskulären Rattenlungenpräparation konnten erstmals Hinweise auf einen spezifischen Dipeptidtransport gesammelt werden (Boyd et al., 1993). Auch boten Studien über die Aufnahme der Dipeptide (L)-Gly-(D)-Phe und (L)-Gly-(L)-Phe in Ratten-Alveolarepithelzell-Primärkulturen (Morimoto et al., 1993) Hinweise für einen geregelten Oligopeptidtransport in der Lunge.

Der einzige Hinweis auf einen Transport von Tripeptiden im Lungengewebe war bis jetzt der Nachweis der Aufnahme des hydrolyseresistenten Tripeptids (L)-Ala-(D)-Phe-(L)-Ala in Bürstensaummembranen von Typ II-Pneumozyten der Ratte (Helliwell et al., 1994).

4.1.1 Nachweis der Transporter-mRNA-Expression

Auf molekularer Ebene konnten bisher in den Publikationen über die Klonierung der PEPT2-cDNA Hinweise für die Expression von PEPT2-mRNA in Lungenextrakten gesammelt werden. So wurde erstmals durch eine Northern Blot Analyse ein Hybridisierungssignal für PEPT2-mRNA in der Kaninchenlunge gefunden (Boll et al., 1996). Eine später durchgeführte RT-PCR-Studie mit Kaninchengeweben bestätigte diesen Befund (Döring et al., 1998a). In der Rattenlunge wurde ebenfalls durch eine Northern Blot Analyse ein Hybridisierungssignal für PEPT2-mRNA nachgewiesen (Saito et al., 1996).

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit eine Northern Blot Analyse an der Rattenlunge durchgeführt. Mit dieser Methode konnte gleichfalls eine Überprüfung der Spezifität der zur In-situ-Hybridisierung benutzten Sonden durchgeführt werden. Dabei

wurde ein für PEPT2 spezifisches Hybridisierungssignal bei 4,2 kb festgestellt und somit die Spezifität der Sonde nachgewiesen und das Ergebnis von Saito (1996) bestätigt werden.

Zusätzlich zu dieser Technik wurde die Expression PEPT2s in Rattenlungen auf transkriptioneller Ebene durch die Technik der RT-PCR (Saiki et al., 1985) überprüft. Sie ist um den Faktor 1000 bis 10000 (Mullis et al., 1986) sensitiver als die Northern Blot Analyse, so dass auch geringe Mengen an mRNA nachgewiesen werden können. Auch bei dieser Methode wurden für PEPT2-mRNA spezifische Amplifikate mit einer Länge von 341 bp gefunden. Der Nachweis der Spezifität der Methoden erfolgte durch Negativkontrollen.

Frühere Klonierungsstudien zeigten bereits die Abwesenheit der mRNA des Oligopeptidtransporters PEPT1 in Lungengewebe der Ratte (Saito et al., 1995) und des Kaninchens (Fei et al., 1994), so dass auf einen nochmaligen Nachweis der Abwesenheit PEPT1 auf transkriptioneller Ebene verzichtet werden konnte.

4.1.2 Lokalisation der Transporter-mRNA

Es gibt ein begründetes Interesse an einer Aufschlüsselung der Transportvorgänge nach Gewebe- und Zelltypen im Organverband. Zum einen eröffnen sich damit neue Einblicke in Steuerungsvorgänge der Zellen und zum anderen können sich hierdurch Anstöße bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ergeben.

Die Lokalisation von mRNA auf zellulärer Ebene durch die In-Situ-Hybridisierung ist erst seit Mitte der 80er Jahre möglich (Coghlan et al., 1985). Zwar wurde diese Technik schon zu Beginn der siebziger Jahre entwickelt (Pardue und Gall, 1969, John et al., 1969), jedoch konnte erst durch die Einführung von Klonierungstechniken die ursprünglich autoradiographische Technik zur Detektion von Satelliten-DNA auf den Nachweis von mRNA ausgeweitet werden (Harper et al., 1986). So z. B. war die Bildung von Erythropoietin in der Niere schon seit langem bekannt; erst durch die Entwicklung der mRNA-In-situ-Hybridisierung konnte schließlich eine genaue Lokalisierung der Erythropoietinproduktion in peritubulären Fibroblasten erfolgen (Lacombe et al., 1988, Bachmann et al., 1993).

Durch die Anwendung der mRNA-In-situ-Hybridisierung am Tiermodell der Ratte sollte eine exakte zelluläre Lokalisation der PEPT2-mRNA in der Lunge erfolgen. Im Vergleich zu anderen Geweben wie dem ZNS mit einer größeren Homogenität des Gewebes und niedrigeren RNase-Aktivitäten konnten für die Atemwege bis jetzt erst relativ wenige In-

situ-Hybridisierungen erfolgreich durchgeführt und publiziert werden (Baraniuk et al., 1993, Saldise et al., 1996, Martínez et al., 1997). Durch die Lokalisation der PEPT2-mRNA in Typ II-Pneumozyten und in Zellen des Tracheal- und Bronchialepithels wurde erstmals ein Peptidtransporter in der Lunge auf zellulärer Ebene exakt nachgewiesen. Dieser Befund identifiziert das bisher in Typ II-Pneumozyten und Trachealepithelzellen vermutete Oligopeptidtransportsystem als PEPT2.

4.1.3 Nachweis des Transporterproteins

Um neben der Lokalisation der mRNA auch eine Aussage bezüglich der Expression des Proteins zu machen, wurde die Methode der Immunhistochemie verwendet. Diese Methode gestattet die Detektion der Immunreaktivität auf zellulärer Ebene durch spezifische Antikörper. Der verwendete PEPT2-Antikörper wurde bereits charakterisiert (Döring et al., 1998c) und richtet sich gegen den carboxyterminalen Terminus des Transporterproteins. Die Ergebnisse der Immunhistochemie mit einer Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in Typ II-Pneumozyten sowie Bronchial- und Trachealepithelzellen stimmen mit den Ergebnissen der In-situ-Hybridisierung überein und lassen darauf schließen, dass die in den Zellen gebildete mRNA auch zum Protein translatiert wird. Neben der Lokalisation im Rattengewebe konnte durch die Lokalisation der Immunreaktivität in Maus- und Menschengewebe diese Aussage zusätzlich auf weitere Spezies erweitert werden. Im Vordergrund des Nachweises beim menschlichen Gewebe stand der Vergleich der Expression PEPT2s in normalen und Mukoviszidosenlungen. Es wurden keine qualitativen Unterschiede in der Expression der Immunreaktivität PEPT2s festgestellt.

Um einen Transport von Oligopeptiden durch den Oligopeptidtransporter PEPT1 auszuschließen, wurden Inkubationen mit einem Antikörper gegen PEPT1 durchgeführt. Es konnte keine Immunreaktivität für PEPT1 in der Lunge nachgewiesen werden. Dieser Befund wird durch die schon früher gezeigte Abwesenheit der PEPT1-mRNA in der Lunge gestützt (Fei et al., 1994, Saito et al., 1995).

4.1.4 Nachweis des Oligopeptidtransports auf funktioneller Ebene

Die bis jetzt erhobenen funktionellen Daten zum Oligopeptidtransport basieren auf Befunden an Zellkulturen und Homogenisaten. Eine präzise Aussage bezüglich des Oligopeptidtransports im intakten Lungengewebe war daher nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde eine Technik entwickelt, die es erlaubt, den Transport eines spezifischen Reportermoleküls in-situ zu bestimmen. Über die Akkumulation der Fluoreszenz in einzelnen Zellen lässt sich eine genaue zelluläre Lokalisation der Transportvorgänge im intakten Gewebsverband durchführen.

Bei der Wahl des Reportermoleküls stand an vorderster Stelle die Spezifität des Substrats. In dieser Hinsicht wurden bis jetzt zwei mögliche fluoreszenzgekoppelte Dipeptidderivate in der Literatur veröffentlicht (Otto und Bauer, 1996, Abe et al., 1999). Dabei konnte das Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Molekül (D)-Ala-(L)-Lys-N-epsilon-7-amino-4-Methyl-Kumarin-3-Azetat (AMCA) als Oligopeptidtransport-spezifisches Dipeptidderivat in Primärkulturen von follikulostellatalen Zellen (Otto et al., 1996), Testikularmakrophagen (Otto und Bauer, 1996), PEPT2 exprimierenden Hefezellen (Döring et al., 1998), Astroglia (Tom Dieck et al., 1999) und LLC-PK1 Zellen (Wenzel et al., 1999) charakterisiert werden. Aufgrund dieser Nachweise in verschiedenen Zellkulturen erschien (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA als günstigste Ausgangsbasis für eine Ex-vivo-Studie im Lungenpräparat.

Insbesondere spielt die Frage nach der Hydrolysestabilität bei der Interpretation der Befunde eine wesentliche Rolle. Die Aufnahme größerer Mengen hydrolysierter Peptidfragmente über singuläre Aminosäuretransporter könnte einen Oligopeptidtransport simulieren. Um die Hydrolysestabilität zu erhöhen, wurde (D)-Ala benutzt (Tom Dieck et al., 1999). Darüber hinaus wurde als Inkubationsmedium Minimum Essential Medium (MEM-21011 [Eagle und Levine, 1967]) mit einem Zusatz verschiedener Aminosäuren gewählt. Neben Lysin in einer Konzentration von 72,5 mg/l enthält dieses Medium die Aminosäuren Arginin, Cystin, Glutamin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin, jedoch keine Di- oder Tripeptide. Diese singulären Aminosäuren erschweren durch ihre Eigenschaft als kompetitive Substrate eine ungezielte Aufnahme von Hydrolysefragmenten des Reportermoleküls durch Aminosäuretransporter.

Auch die Temperatur der Organpräparationen spielt eine wesentliche Rolle bei den Transportvorgängen. Die Spezifität des Dipeptidtransports wurde in Temperaturstufen untersucht, wobei bei einer Temperatur von 4°C kein Transport mehr festgestellt werden konnte. Dadurch wurde gezeigt, dass die passive Diffusion keine erhebliche Rolle bei der Aufnahme des Reportermoleküls spielen konnte.

Als Kontrolle der Spezifität der Aufnahmereaktion erfolgte eine Blockade des Transportvorgangs mit DEPC. Dieser Stoff reagiert mit den Histidin-Resten und führt somit über eine Modifikation der Peptidstruktur zu einer Veränderung der Transportereigenschaften.

Schon in früheren Studien wurde eine Inhibition der Oligopeptidtransporter durch DEPC demonstriert (Kramer, 1988, Meredith und Laynes, 1996, Terada et al., 1998). DEPC kann aufgrund der Tatsache, dass es alle Histidin-Reste modifiziert, nur als unspezifischer Hemmstoff gelten. Ein spezifischer Inhibitor der Oligopeptidtransporter PEPT2 und PEPT1 wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Da Typ I-Pneumozyten gegenüber histochemischen Methoden sehr vulnerabel sind und dadurch dieser Zelltyp artefaktspezifisch im histologischen Befund unterrepräsentiert sein kann, wurden lektinhistochemische Studien mit *Lycopersicon esculentum* Lektin (LEA) zum Nachweis der Integrität der Typ I-Zellen durchgeführt.

Die Kombination mit den Ex-vivo-Aufnahmestudien an murinen Lungenpräparationen ermöglichte eine parallele Darstellung der PEPT2-Aktivität und der Typ I-Pneumozyten. Das Typ I-Pneumozyten-spezifische LEA (Fehrenbach et al., 1999, Kasper et al., 1993) führte zu einer Anfärbung von Typ I-Zellmembranen ohne Markierung der (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA markierten Typ II-Pneumozyten. Damit konnte sowohl die Intaktheit der Typ I-Zellen nachgewiesen, als auch ein Transport von Oligopeptiden in diese Zellen ausgeschlossen werden.

4.2 Biologische Bedeutung der Befunde

Der Nachweis des Oligopeptidtransporters PEPT2 auf molekularer und funktioneller Ebene in Zellen des respiratorischen Epithels ist sowohl für den pulmonalen als auch systemischen Peptidmetabolismus von Bedeutung.

4.2.1 Pulmonaler Peptidmetabolismus

Traditionell werden die Lungen in erster Linie als gasaustauschendes Organ betrachtet. Zur Gewährleistung einer regelrechten Gasaustauschoberfläche bedarf es eines wirkungsvollen Syntheseparameters, insbesondere in den Surfactant-produzierenden Zellen (Mason und Crystall, 1998). Darüber hinaus wurde in jüngerer Zeit auch eine wichtige Rolle der pulmonaler Zellen bezüglich des Immunsystems postuliert (Barnes, 1994, Barnes et al., 1998).

Der hohe Bedarf an Grundsubstanzen wird über ein ausgeprägtes Netz an Transportsystemen gedeckt. Betrachtet man hierbei die Systeme für den Transport von Stickstoffgruppen wie singuläre Aminosäuren, Oligopeptide und Proteine, so ist der Nachweis PEPT2s in den extrem stoffwechselaktiven Typ II-Pneumozyten ein neuer Anhalt für die Diversifizierung der Stickstoffversorgungswege dieser Zellen.

Neben den Systemen für Cystein (Knickelbein et al., 1997), Glutamin (Hautamaki et al., 1992) und dem Natrium-Aminosäure-Kotransporter (Brown et al., 1985), deren Transportkinetiken in Lungenzelllinien und Membranpräparationen charakterisiert wurden, konnte die Expression mehrerer anderer Aminosäuretransporter cDNAs in der Lunge gezeigt werden. Hierzu gehören der Taurin Transporter TAUT (Liu et al., 1992), ein Glyzin Transporter (Borowsky et al., 1993), sowie mehrere unspezifische kationische Aminosäuretransporter (CAT-4 [Palacín et al., 1998]), anionische Aminosäuretransporter (EAAT1 [Arriza et al., 1994], EAAT3 [Kanai und Hediger, 1992]) neutrale Aminosäuretransporter (rBAT, D2 [Bertran et al., 1992]) und zwitterionische Aminosäuretransporter (ASCT1 [Arriza et al., 1993], ATB^o [Kekuda et al., 1996]).

Bei der Hydrolyse von Proteinen im Alveolarraum entstehen nicht nur singuläre Aminosäuren, sondern auch Oligo- und Polypeptide. Eine Vielzahl von Peptidasen wurde in der Lunge bereits charakterisiert (Juillat-Jeanneret et al., 1997, Abb. 25). Obwohl die Tendenz bestand, diese Enzyme nach einzelnen Substraten zu benennen, z. B. Angiotensin Converting Enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) oder Enkephalinase (Neutrale Endopeptidase 24.11 [NEP], EC 3.4.24.1), sind sie nicht spezifisch für ein einzelnes Substrat, sondern erkennen die Aminosäuren in der Umgebung der potentiellen Hydrolysestelle. Die

Peptidasen können generell in zwei Gruppen getrennt werden: Endopeptidasen und Ektopeptidasen. Endopeptidasen hydrolysieren eine innerhalb eines Peptids liegende Peptidbindung, während Ektopeptidasen Fragmente von ein bis zwei Aminosäuren vom N- oder C-Terminus des Peptids entfernen (Funkhouser et al., 1991). Als Resultat dieser Reaktionen entstehen freie Polypeptide, Oligopeptide und singuläre Aminosäuren.

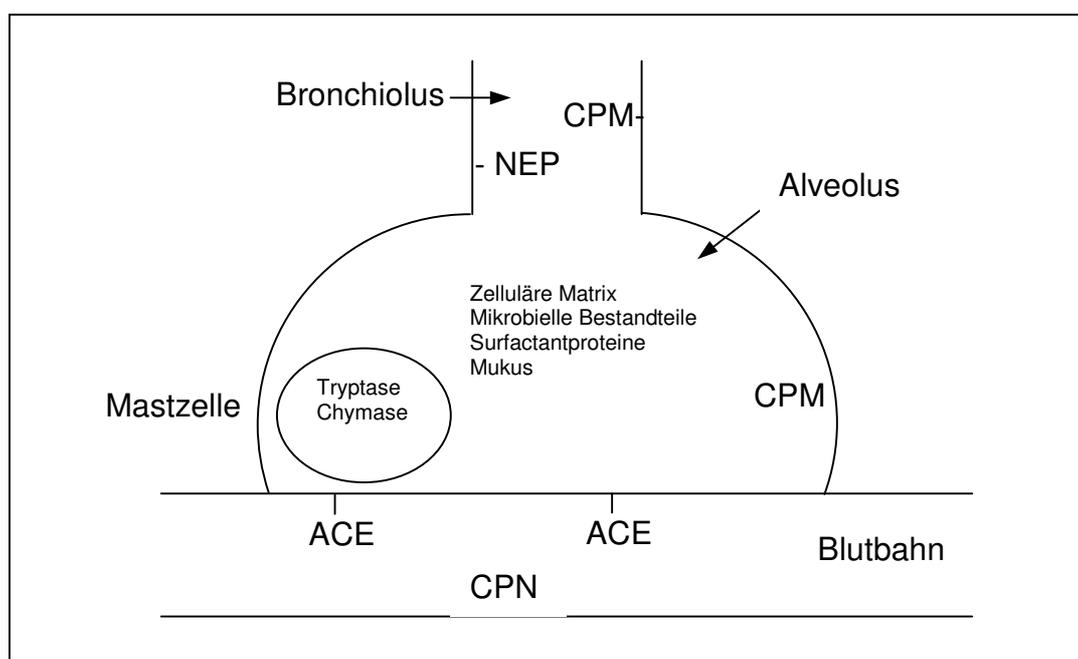


Abbildung 25: Pulmonale Lokalisation von Peptidasen, deren Hydrolyseprodukte potentielle PEPT2-Substrate sind. Abk.: ACE, Angiotensin Converting Enzym; CPM, Carboxypeptidase M; CPN, Carboxypeptidase N; NEP, Neutrale Endopeptidase.

Zu den wichtigsten in der Lunge vorkommenden Peptidasen gehören die Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11 [Goetzl et al., 1989, Baraniuk et al., 1995]), Mastzellen Tryptase (Caughey et al., 1988, Tam und Caughey, 1990), Mastzellen Chymase (Franconi et al., 1989), Aminopeptidase P (EC 3.4.11.9 [Sidorowicz et al., 1984]), Aminopeptidase N (Funkhouser et al., 1991), Carboxypeptidase N (CPN, EC 3.4.17.3 [Erdös, 1979]) und Dipeptidylpeptidase II (EC 3.4.15.1 [Erdös, 1979]). Die Bedeutung dieser Peptidasen liegt unter anderem in der Hydrolyse und Deaktivierung von biologisch aktiven Neuropeptiden wie Tachykininen (Martins et al., 1990, Dragovic et al., 1993) oder Vasoaktivem Intestinalen Polypeptid (VIP [Thompson et al., 1990, Hachisu et al., 1991, Lilly et al., 1993, 1994]). Die aus der Hydrolyse entstehenden Fragmente sind teilweise Di- und Tripeptide und somit potentielle PEPT2-Substrate.

Als Beispiel für die Fragmentierung eines Polypeptids in mehrere Dipeptidfragmente kann die Hydrolyse des Neurotransmitters Substanz P genommen werden (Abb. 26). Hierbei entstehen sechs mögliche Dipeptide und drei mögliche Tripeptide, die durch einen PEPT2 vermittelten Transport in die Zelle zurückgeführt werden können.

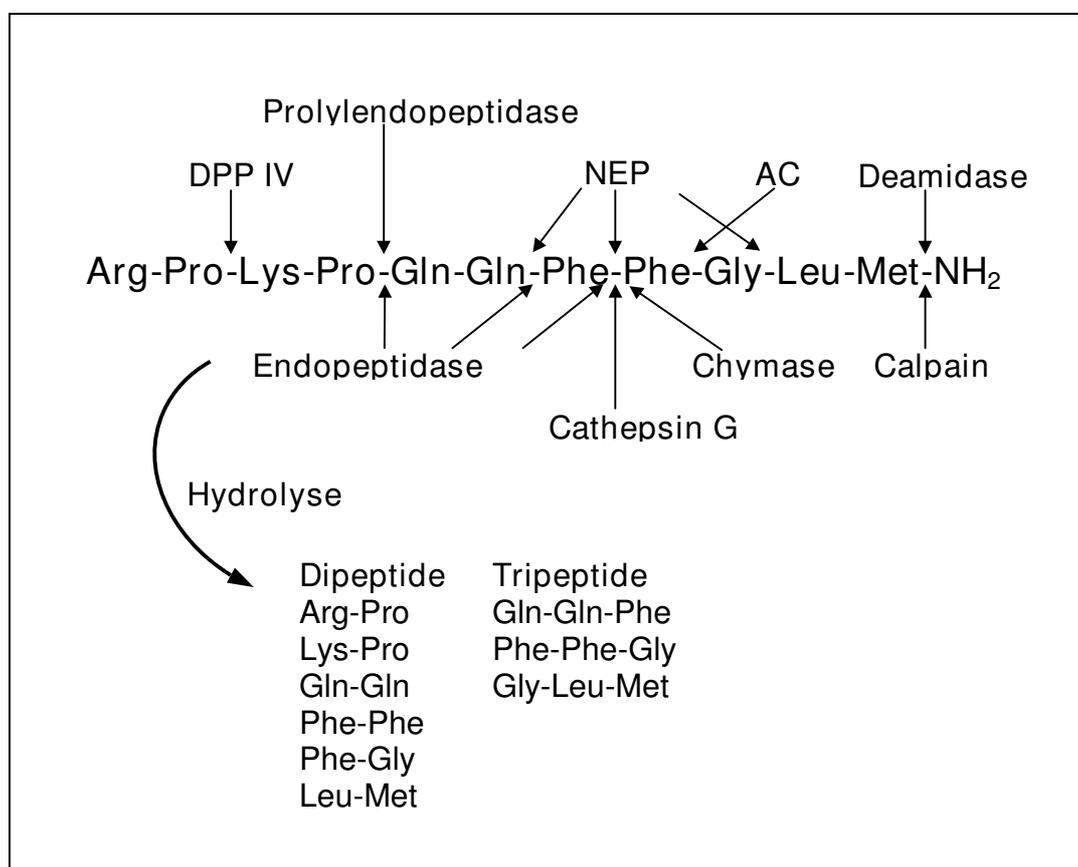


Abbildung 26: Hydrolyse zu möglichen Oligopeptidfragmenten durch Lungenpeptidasen am Beispiel von Substanz P. NEP, Neutrale Endopeptidase; ACE, Angiotensin Converting Enzyme; DPP IV, Dipeptidyl Peptidase IV.

In gleicher Weise wie Substanz P werden die verschiedensten Proteine, z. B. Bestandteile der zellulären Matrix, Surfactantproteine, Mukusproteine oder mikrobielle Proteine im Alveolarraum gespalten. Dadurch ist anzunehmen, dass eine große Anzahl an Oligopeptiden entsteht, welche durch PEPT2-vermittelten Transport in das respiratorische Epithel aufgenommen und in den intrazellulären Stickstoffpool zurückgeführt werden können. Eine genaue Quantifizierung des Anteils von Oligopeptiden und des Anteils von singulären Aminosäuren und Polypeptiden als Produkte des pulmonalen Stickstoffmetabolismus könnte zu einer besseren Einschätzung des Anteils des Oligopeptidtransports am Gesamttransport von Stickstoffgruppen im Lungenepithel führen. Bis jetzt

wurden derartige Studien noch nicht durchgeführt. Ein erster Anhalt für die Dimension des Oligopeptidanteils kann ein Vergleich mit der Situation im Systemkreislauf bieten: Versuche an verschiedenen Tiermodellen zeigten, dass ca. 50 % der zirkulierenden Plasmaamino­säuren als Peptide vorliegen, die Mehrzahl davon als Di- und Tripeptide (Schlagheck und Webb, 1984, Seal und Parker, 1991, Rérat et al., 1992).

Ein weiterer Aspekt des Abtransports von Oligopeptiden in der Lunge ist die Bedeutung hinsichtlich der alveolären Flüssigkeitsbilanz. Eine Erhöhung des alveolären Proteingehalts aufgrund einer Akkumulation von Peptiden kann den osmotischen Gradienten erhöhen und somit über eine Verdickung des alveolären Flüssigkeitsfilms zu einer erschwerten Gasdiffusion führen.

Die genaue Rolle des Peptidtransporters PEPT2 muss diesbezüglich noch untersucht werden. Ansätze hierfür wären die Entwicklung eines Knockout-Modells.

4.2.2 Endogene Substrate für PEPT2 mit Bedeutung für die lungeneigene Homöostase

Mit Bezug auf die Barrierewirkung gegen schädliche Umwelteinflüsse und den erhöhten Sauerstoffkontakt des respiratorischen Epithels ist eine Bedeutung PEPT2s beim Transport membranstabilisierender Substanzen möglich. Der Nachweis des Dipeptid-Transports von β -Ala-(L)-His (Synonym: Carnosin) im Trachealepithel durch Yamashita et al. (1998) stützt diese Hypothese. In der peripheren Lunge beeinflusst Carnosin den intrazellulären pH (Tikhomirova et al., 1993) und übt regenerative Effekte bei Verletzungen der Lungenintegrität aus (Perel'man et al., 1989a, b). Dies könnte unter anderem an seiner membranstabilisierenden und antioxidativen Wirkung liegen (Boldyrev et al., 1993). Auch wurde beschrieben, dass Carnosin den Alterungsprozess von fetalen Lungenzellen verzögert (McFarland und Holliday, 1994). Die Expression des Carnosin-transportierenden Proteins PEPT2 in Typ II-Pneumozyten und Bronchialepithelzellen gibt diesen Zellen die Fähigkeit, Carnosin nicht nur durch Synthese herstellen zu können, sondern auch direkt aus dem extrazellulären Raum aufnehmen zu können. Dieser zusätzliche Versorgungsweg für das membranstabilisierende und antioxidative Carnosin könnte einen weiteren Faktor der guten Regenerations- und Proliferationsfähigkeit der Typ II-Pneumozyten darstellen.

Weitere PEPT2-Substrate mit Bedeutung für die Lungenhomöostase sind Di- und Tripeptide, die Cystein oder Cystin enthalten. Cystein ist ein limitierender Faktor für die Synthese von Glutathion, das als wichtiges Antioxidans in der Lunge gilt (Brown et al., 1992, Deneke et al., 1989). Neben der Aufnahme durch Cystin und Cystein Transportsysteme (Knickelbein et al., 1997) kann eine Aufnahme dieser wichtigen Aminosäure auch

als oligopeptidgebundene Form über PEPT2 erfolgen.

4.2.3 Systemischer Peptidmetabolismus

Neben der hohen Wertigkeit von Oligopeptiden und singulären Aminosäuren für die lungeneigene Proteinsynthese (Frissell, 1982), wurde in jüngerer Zeit auch eine wichtige Rolle der Lungen im Aminosäurehaushalt des Gesamtorganismus postuliert (Plumley et al., 1990a).

Es werden beispielsweise große Mengen an Stickstoffdonatoren in die systemische Zirkulation während Systemerkrankungen wie dem septischen Schock freigesetzt (Plumley et al., 1990b, Austgen et al., 1991).

Die genaue Ursache hierfür ist noch nicht bekannt, jedoch scheint insbesondere pulmonales Glutamin eine wichtige Rolle im Zustand der Sepsis zu spielen (Souba et al., 1990). Glutamin als nichtessentielle Aminosäure ist die am häufigsten vorkommende Aminosäure im Blutkreislauf und im freien Aminosäurepool des Körpers (Bergström et al., 1974). Der Nachweis der Inhibition des Transports von (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA durch Glycylglutamin in Zellen des respiratorischen Epithels und die Identifikation von PEPT2 in diesen Zellen sind Hinweis dafür, dass innerhalb des Lungen-Glutamin-Metabolismus neben dem Transport durch ein Glutamin-spezifisches Transportsystem (Hautamaki et al., 1992) auch noch ein Transport durch den Oligopeptidtransporter PEPT2 erfolgen kann.

4.2.4 Die Expression des Transporters in normalen und pathologischen humanen Geweben

Als Antibiotika-transportierendes Protein spielt PEPT2 eine wesentliche Rolle bei der renalen Reabsorption verschiedener Betalaktame (Daniel und Adibi, 1993). Darüber hinaus wird die intestinale Isoform PEPT1 für die gute Aufnahme von Betalaktamantibiotika im Magen-Darm-Trakt verantwortlich gemacht (Wenzel et al., 1995). Die Expression von PEPT2 in der Lunge rückt den Transporter in das Blickfeld therapeutischer Überlegungen bezüglich bakterieller Infektionen der Lunge, die als weit verbreitete Erkrankungen schwerwiegende sozioökonomische Folgen haben. Insbesondere bei Patienten mit zugrunde liegenden chronischen Lungen- und Systemerkrankungen können diese Infektionen schwere Destruktionen der Lunge bzw. eine respiratorische Insuffizienz bewirken und somit wesentlich zur Progression der Erkrankung beitragen. Pneumonien sind eine unausweichbare Komplikation der Systemerkrankung Mukoviszidose bei Patienten, die die Neugeborenenperiode überleben (Falbel und Smaczny, 1993). Die

Lungen der Mukoviszidosepatienten sind nach der Geburt histologisch noch vollkommen unauffällig (MacLusky und Levison, 1990). Schon bald jedoch erfolgt eine Verlegung der Luftwege durch Mukus aufgrund der gestörten mukoziliären Clearance, mit der Folge einer bakteriellen Besiedlung (Armstrong et al., 1995, Kahn et al., 1995, Smith et al., 1996). Pneumonien gelten als Hauptmortalitätsursache der Erkrankung - ca. 95 % aller Mukoviszidosepatienten sterben an einer pulmonalen Komplikation (Elborn et al., 1991).

Mit Hinsicht auf diese zentrale Rolle der bakteriellen Infektionen bei der Progression der Erkrankung steht die Antibiotikatherapie an vorderster Stelle. Seit der Einführung der gezielten Antibiotikatherapie konnte dementsprechend auch eine wesentliche Verbesserung der Überlebenszeit erreicht werden (FitzSimmons, 1994, Rosenstein und Zeitlin, 1994).

Traditionell wird die Serumkonzentration eines Antibiotikums mit der minimalen inhibitorischen Konzentration (minimal inhibitory concentration, MIC) verglichen, derer es bedarf, um 90 % der Bakterienstämme zu inhibieren (MIC 90). Obwohl die MIC ein wichtiges Kriterium im Falle einer Bakteriämie darstellt, spielt die Konzentration des antimikrobiellen Agens am Ort der Infektion in der Lunge die wesentliche Rolle bei der Eradikation der Erreger.

Mehrere Faktoren, welche sich auf die Eigenschaften systemisch applizierter Antibiotika gründen, limitieren ihre klinische Effektivität in der Therapie von Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose. Die schlechte Anreicherung der systemischen Präparate in Bronchialsekreten aufgrund des pathologisch veränderten Lungenepithels und der hohen Viskosität des Schleims resultiert in minimalen Sputumkonzentrationen. Aus diesem Grund bedarf es hoher Dosen systemisch applizierter Präparate um adäquate Dosen zu erhalten, mit der Folge, dass die Rate an unerwünschten Wirkungen zunimmt. Darüber hinaus erfordern akute Exazerbationen oft eine Kombination verschiedener intravenöser Antibiotika, wodurch eine Hospitalisierung notwendig wird (Honeybourne, 1997).

Demgegenüber stellt die aerosolische Antibiotikatherapie mit Vernebelung des Agens eine attraktive Alternative dar, die wesentliche theoretische Vorteile beherbergt (Niven et al., 1990, Hoover et al., 1992, Patton und Platz, 1992). Durch aerosolische Administration kann das Agens in hohen Konzentrationen direkt an den Ort seiner Wirkung gelangen. Dadurch werden „First-pass“-Metabolismus in der Leber und schnelle Inaktivierung durch renale Elimination ausgeschaltet und systemische unerwünschte Wirkungen reduziert (Eisenberg, 1996). Trotzdem ist die Effektivität der aerosolischen Antibiotikatherapie sehr kontrovers (Itokazu und Weinstein, 1998).

Eine Reihe an Publikationen berichtete über aerosolische Behandlungen von Lungeninfektionen hauptsächlich mit Aminoglykosiden (Kun et al., 1984, Steinkamp et al., 1989, Ramsey et al., 1993) aber auch Betalaktamen (Hodson et al., 1981, Nolan et al., 1982, Stead et al., 1987, Bressolle et al., 1992, Sustronck et al., 1995). Trotz der Vielzahl an Therapiestudien ist bis jetzt nur relativ wenig über den Metabolismus der Aerosole bekannt. Einige Studien konnten Ergebnisse über die quantitative Verteilung (Mukhopadhyay et al., 1994), Bioverfügbarkeit (Cooney et al., 1994) und zellulären Effekte (Palmer et al., 1998) erzielen. Über die genauen Transportvorgänge wurden bis jetzt noch keine Daten veröffentlicht.

Der Nachweis des Peptidtransporters PEPT2 im respiratorischen Epithel ist ein erster Hinweis auf den pulmonalen Transportmetabolismus einiger Betalaktame nach einer aerosolischer Applikation.

Die Anwendung aerosolischer Betalaktame konnte sich bis jetzt nicht durchsetzen. In einer Plazebo-kontrollierten Studie konnte die Effektivität von aerosolischem Carbenicillin und Gentamicin nachgewiesen werden (Hodson et al., 1981). Auch Stead et al. konnten in einer randomisierten Plazebo-kontrollierten Studie eine Verbesserung der Lungenfunktion durch Therapie mit aerosolischen Ceftazidime bzw. Carbenicillin in Kombination mit Gentamicin nachweisen (Stead et al., 1987). Demgegenüber wurde in einer Studie von Nolan et al. keine Effektivität von Cephaloridin nachgewiesen, was jedoch wahrscheinlich auf einer primären Resistenz der Bakterien beruhte (Nolan et al., 1982). In einer unkontrollierten Studie wurde aerosolisches Ticarcillin in Kombination mit Gentamicin getestet und ein Rückgang von Krankenhaustagen aufgrund akuter Exazerbationen festgestellt (Wall et al., 1983).

Mit der in den Ex-vivo-Studien nachgewiesenen Verdrängung (D)-Ala-(L)-Lys-AMCAs durch Cefadroxil in normalen humanen Lungengewebe sowie Mukoviszidoseresektaten wurde indirekt der Transport des Betalaktams durch einen Oligopeptidtransporter nachgewiesen. Cefadroxil, ein semi-synthetisches Cephalosporin, das effektiv gegen Gram-positive und -negative Infektionen der Lunge eingesetzt werden kann (Chisholm et al., 1986), wurde bereits in früheren Arbeiten als ein durch PEPT2-transportiertes Substrat in renalen Bürstensaummembranen (Ries et al., 1994) und *Xenopus laevis* Oozyten (Boll et al., 1996) charakterisiert. Neben der antibiotischen Potenz Cefadroxils in der Lunge ist ein zusätzlicher Aspekt seine Wirksamkeit in der Reduzierung Antigen-induzierter bronchialer Hyperreaktivität (Boichot et al., 1993). Dieser Effekt ist nicht mit der Reduktion von Eosinophilen verbunden.

Der Nachweis der Expression PEPT2s in Typ II-Pneumozyten ist Hinweis auf eine Akkumulation pulmonal applizierter Betalaktame in diesem Zelltyp.

Demgegenüber wurde bezüglich einer erfolgreichen Eradikation von Bakterien insbesondere eine hohe Konzentration des antimikrobiotischen Agens im epithelialen Flüssigkeitsfilm und in Alveolarmakrophagen für wichtig erachtet (Retsema et al., 1990), wobei der Ort der Infektion in erster Linie neben dem infektiösen Sputum in der Mukosa gesehen wurde.

Anhand von Pneumokokken-Pneumonie-Tiermodellen konnte eine positive Relation zwischen Gewebekonzentration und therapeutischem Erfolg gezeigt werden (Vallee et al., 1991, Azoulay-Depuis, et al., 1991). Die Konzentration des Antibiotikums innerhalb der Makrophagen und Neutrophilen spielt vor allem im Rahmen von Infektionen durch intrazelluläre Erreger eine Rolle (Edelstein et al., 1996). Gegenüber Makroliden und Quinolonen, die sehr gute Eigenschaften bezüglich der Anreicherung in diesen Zellen aufweisen, werden Betalaktame nur als weniger gut anreichernd eingestuft (Honeybourne, 1994, Cook et al., 1996). Diese Beobachtungen werden jetzt durch den Befund unterstützt, dass im Gegensatz zu Bronchialepithelzellen und Typ II-Pneumozyten in Makrophagen und Neutrophilen keine Expression PEPT2s oder ein funktioneller Oligopeptidtransport nachgewiesen werden konnte.

Bis jetzt liegen noch keine Daten bezüglich der Wirksamkeit PEPT2-transportierter Betalaktame gegenüber nicht-PEPT2-transportierter Betalaktame vor. Ein Vergleich der Wirksamkeit beider Gruppen in Pneumonie-Tiermodellen könnte die Frage klären, in wieweit die Deposition und Akkumulation PEPT2-transportierter Betalaktame in Typ II-Pneumozyten und Bronchialepithel bezüglich der Effektivität eines pulmonal applizierten Betalaktams eine Rolle spielt.

Eine weitere Frage hinsichtlich der biologischen Bedeutung der pulmonalen Deposition PEPT2-transportierter Substrate besteht im Rahmen der Beobachtungen über selektive Hemmstoffe der pulmonalen Humanen Leukozyten Elastase (HLE, EC 3.4.21.37). Die hohe Aktivität dieser Serin-Protease wird kausal mit Erkrankungen wie der Mukoviszidose (Jackson et al., 1984), der chronischen Bronchitis (Stockley et al., 1991), dem Lungenemphysem (Janoff, 1985) und dem Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS [Merritt et al., 1983]) in Verbindung gebracht. Die Präsenz HLEs im interzellulären Raum resultiert in einer unkontrollierten Proteolyse und Zerstörung von zellulären Strukturen (Snider, 1987).

Bei der Entwicklung von HLE-Inhibitoren (Trainor, 1987, Travis und Fritz, 1991) wurde auch die inhibitorische Wirkung von Cephalosporinen auf HLE erkannt (Doherty et al., 1986, Hagman et al., 1989, Doherty et al., 1990, Shah et al., 1990). In der Folgezeit konnte festgestellt werden, dass unter HLE-inhibierenden Cephalosporinen, insbesondere nonpolare, hydrophobe Formen (Finke et al. 1990) geeignet sind, HLE zu blockieren. Finke et al. konnten 1992 die Synthese eines aerosolischen Cephalosporins mit HLE-inhibitorischer Wirkung berichten. Hier stellt sich die Frage, ob der Wirkungsgrad einzelner HLE-inhibierender Cephalosporine nicht nur von deren Affinität zur HLE abhängig ist, sondern auch durch den PEPT2-vermittelten Abtransport aus dem interzellulären Raum gemindert wird.

In Bezug auf die Expression PEPT2s in pathologischen Geweben wurde durch die Lokalisation des Transporters in Mukoviszidosegeweben auf immunhistologischer Ebene kein Unterschied zu normalen Geweben gefunden. Das Verteilungsmuster des Transporters ist also in Mukoviszidosegeweben, die als Substrat der Hauptindikation für aerosolische Antibiotikatherapie gelten, qualitativ identisch mit der normalen Gewebsverteilung. Die Untersuchung der Effektivität von PEPT2-transportierten gegenüber nicht-transportierten Antibiotika würde somit nicht durch eine erkennbare Störung der Verteilung des Transportsystem im pathologisch veränderten Lungengewebe in Frage gestellt. Die limitierte Aussagekraft immunhistochemischer Befunde in Bezug auf quantitative Veränderungen der Expression PEPT2s in pathologischen Geweben könnte durch künftige Studien mit quantifizierenden Methoden (Fink et al., 1998) erweitert werden.

In den Ex-vivo-Aufnahmestudien wurde parallel zu den Ergebnissen der Immunhistochemie kein Unterschied im Aufnahmemuster zwischen den Resektaten der Mukoviszidosepatienten und den normalen Lungengeweben gefunden. (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA akkumulierte in den Flimmerepithelzellen und Typ II-Pneumozyten.

Quantitativ stellte sich jedoch aufgrund der schlechten Zugänglichkeit in den Bereichen des Resektats, die durch Schleimretention verlegt waren, eine Minderaufnahme des Dipeptidkonjugats dar.

4.2.5 Delta-Aminolävulinsäure als PEPT2-Substrat in der Lunge

Der kürzlich erfolgte Nachweis des Transports von Delta-Aminolävulinsäure (δ -ALA) durch PEPT2 (Döring et al., 1998a, Novotny et al., 2000) ist ein Befund mit mehreren physiologischen und pharmakologischen Bedeutungen im Atemtrakt.

Auf der Basis eines Substrats für die Hämsynthese besitzt δ -ALA eine Rolle bei der pulmonalen Produktion von Kohlenmonoxid (CO). Neben Stickstoffmonoxid (Hamid et al., 1993) wird CO eine mögliche Bedeutung bei der Reaktion auf oxidativen Stress eingeräumt (Zayasu et al., 1997, Horvath et al., 1998). CO wird durch das Stress-induzierbare Hitzeschockprotein Hämoxxygenase I (Lee et al., 1996) und seine konstitutive Isoform Hämoxxygenase II generiert (Maines, 1988). In der humanen Lunge wurde eine Expression dieser Proteine unter anderem in Bronchialepithelzellen gefunden (Lim et al., im Druck), in denen jetzt ebenfalls PEPT2 nachgewiesen werden konnte.

Neben der Bedeutung von CO als Marker von oxidativem Stress liegt die therapeutische Relevanz der pulmonalen Aufnahme von δ -ALA in der Photodynamischen Therapie (PDT, Rowe, 1998, Dougherty et al. 1998).

Es besteht ein wachsendes Interesse bezüglich der Biokinetik und des Metabolismus von δ -ALA seit der erstmaligen Anwendung in der PDT (Peng et al., 1992, 1997, Fromm et al., 1996, Bown und Rogowska, 1999). Bei systemischer, topischer oder oraler Gabe (Loh et al., 1993, Webber et al., 1997) δ -ALAs kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation dieser Substanz und zur Bildung von Porphyrinen. Über eine Photoaktivierung der Porphyrine wird die Zellapoptose eingeleitet (Steinbach et al., 1995, Gibson et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb kurzer Zeit nach oraler Gabe von δ -ALA ein relativ hoher Plasmaspiegel erreicht wird (Fromm et al., 1996). Auch erfolgte der Nachweis einer Akkumulation und Wirkung δ -ALAs in verschiedenen Epithelzellen (Loh et al., 1992, Bedwell et al., 1992, Goff et al., 1992, Wyss-Desserich et al., 1996). Der Transport im Gastrointestinaltrakt wurde auf den intestinalen Oligopeptidtransporter PEPT1 zurückgeführt (Döring et al., 1998a).

Darüber hinaus wird die Plasmakonzentration δ -ALAs durch die Rückresorption aus dem proximalen Tubulus (O'Flaherty et al., 1981, Cheeks und Weden, 1986) sowohl durch PEPT2 als auch PEPT1 beeinflusst (Döring et al., 1998a).

Auch in der Lunge wird δ -ALA sowohl in der Diagnose (Baumgartner et al., 1996) als auch in der Therapie (Sutedja und Postmus, 1996) von Neoplasien eingesetzt. Der Nachweis von PEPT2 im respiratorischen Epithel ist der erste Hinweis bezüglich des Aufnahmemechanismus δ -ALAs in der Lunge. Weitere Studien müssen die Expression von PEPT2 in Tumorzelllinien untersuchen, um eine mögliche Rolle des Transporters in Lungenkarzinomen zu definieren.

5 Zusammenfassung

Fragestellung und Methodik

Peptide sind wichtige Mediatoren physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in der Lunge. Ihre biologische Aktivität wird durch pulmonale Peptidasen terminiert. Da der enzymatische Abbau von Proteinen und mikrobiellen Bestandteilen über einen Anstieg des osmotischen Gradienten zu einem erschwerten Gasaustausch führen kann, besitzt der Abtransport von Peptidfragmenten für die Aminosäurebilanz der Lunge eine zentrale Bedeutung. Neben der Bedeutung als gasaustauschendes Organ spielt das respiratorische Epithel eine wichtige Rolle als Grenzbarriere zwischen dem Organismus und seiner Umwelt. Die große Oberfläche von 70 bis 140 m² kann dabei effizient zur Administration verschiedener Pharmaka benutzt werden. In dieser Hinsicht konnte bereits eine Vielzahl von Transporterproteinen im respiratorischen Epithel funktionell charakterisiert werden.

Die cDNAs zweier Familien Protonen-gekoppelter Oligopeptidtransporter wurden in den vergangenen Jahren aus Epithelzellen von Darm (PEPT1) und Niere (PEPT2) kloniert. Während die Expression von PEPT1-mRNA ausschließlich in Darm und Niere festgestellt wurde, konnte man PEPT2-mRNA in der Niere sowie in einer Reihe weiterer Organen wie dem ZNS und der Lunge nachweisen.

Beide Isoformen besitzen 12 transmembranäre Domänen und teilen eine ca. 47 %ige Identität auf der Proteinebene. Die Transporter katalysieren eine zelleinwärts gerichtete Substrattranslokation, die an einen elektrochemischen Protongradienten gekoppelt ist. Neben des Transports endo- und exogener Di- und Tripeptide transportieren PEPT1 und PEPT2 Peptidpharmaka wie z. B. Cephalosporine, Aminopenizilline, Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren sowie Antimetabolite wie Valaciclovir und das Zytostatikum Bestatin.

Die Fähigkeit PEPT2s zum Transport von Antibiotika rückt den Transporters in das Blickfeld therapeutischer Überlegungen bei der aerosolischen Antibiotikatherapie rezurrenter Atemwegsinfektionen.

In dieser Arbeit wurde die Expression von PEPT2 in Lungengewebe von Ratte, Maus und Mensch untersucht. Auf transkriptioneller Ebene wurden RT-PCR und Northern-Blotting an Rattengewebe zum Nachweis der PEPT2-mRNA durchgeführt. Zur exakten Lokalisation der Ratten PEPT2-mRNA auf zellulärer Ebene diente die Methode der nonradioaktiven In-situ-Hybridisierung. Immunhistochemische Studien ermöglichten eine Darstellung PEPT2s in Lungengewebe von Ratte und Maus auf der translationalen Ebene.

Es wurde zusätzlich ein Modell zur Ex-vivo-Aufnahme von Oligopeptiden in murinen Lungenpräparaten entwickelt, um den Peptidtransport auch funktionell nachzuweisen. Eine Kombination der Aufnahmestudien mit der Lektin histochemie diente zum Ausschluss eines Transportvorganges in Typ I-Pneumozyten.

Darüber hinaus wurden immunhistochemische und funktionelle Ex-vivo-Studien an Geweben von normalen humanen Lungen sowie Mukoviszidose-Lungenresektaten vorgenommen.

Ergebnisse

Durch RT-PCR konnte PEPT2-mRNA in Lungen- und Nierenextrakten der Ratte nachgewiesen werden. Dieser Befund korreliert mit Daten der Kaninchenlunge. PEPT2-mRNA wurde in der Rattenlunge zusätzlich durch das Northern-Blot Verfahren nachgewiesen.

Um die exakte mRNA-Lokalisation auf zellulärer Ebene zu bestimmen, wurden non-radioaktive In-situ-Hybridisierungen durchgeführt und eine Expression von PEPT2-mRNA in Typ II-Pneumozyten, Bronchialepithelzellen und Endothelzellen kleinerer Bronchusvenolen der Rattenlunge nachgewiesen.

Immunhistochemische Studien konnten PEPT2-Immunreaktivität in Bronchialepithelzellen, Typ II-Pneumozyten und Endothelzellen von Ratten- und Mäuselungen identifizieren.

Funktionelle Ex-vivo-Aufnahmestudien mit dem fluoreszierenden Dipeptidderivat (D)-Alanin-(L)-Lysin-AMCA an isolierten Mäusethoraces führten zu einer Aufnahme in das Bronchialepithel und Typ II-Pneumozyten. Die zytoplasmatische Akkumulation des fluoreszierenden Substrats wurde im Verdrängungsexperiment durch das Dipeptid Glycylglutamin und das Cephalosporin Cefadroxil fast vollständig inhibiert. Über kombinierte Ex-vivo-Aufnahme- und histochemische Studien mit LEA konnte ein Transport des Dipeptid-konjugats in Typ I-Pneumozyten ausgeschlossen werden.

Immunhistochemische Versuche an Geweben von normalen humanen Lungen konnten eine PEPT2-spezifische Immunreaktivität ebenfalls in Bronchialepithelzellen, Typ II-Pneumozyten und Endothelzellen von Bronchialvenolen nachweisen. Studien an Lungenresektaten von lungentransplantierten Mukoviszidosepatienten führten zu dem gleichen Immunreaktivitätsmuster, so dass eine qualitative Differenz im Muster der PEPT2 Immunreaktivität zwischen normaler Lunge sowie pathologisch verändertem Mukoviszidosegewebe ausgeschlossen werden konnte.

Zusätzlich wurden die Ex-vivo-Aufnahmestudien vom Tiermodell auf humane Gewebe übertragen. Mit dem Transport von (D)-Alanin-(L)-Lysin-AMCA in das respiratorische

Flimmerepithel und in Typ II-Pneumozyten stellte sich im normalen und im Mukoviszidosegewebe ein identisches Aufnahmemuster dar. Quantitativ wurde die Aufnahme des Dipeptidderivats in Mukoviszidosegeweben jedoch durch den starken Sekretverhalt gemindert.

Schlussfolgerung

Es konnten erstmals die Expression, Lokalisation und funktionelle Aspekte eines definierten Oligopeptidtransportsystems im Atemtrakt nachgewiesen werden und somit eine molekularbiologische und morphologische Grundlage zu früheren Hypothesen über einen Oligopeptidtransport in der Lunge geschaffen werden.

Die Expression des Transporters in Tracheal- sowie Bronchialepithelzellen, Typ II-Pneumozyten und Endothelzellen submuköser Venen, sowie die Fähigkeit PEPT2s, Betalaktamantibiotika wie beispielsweise Cefadroxil, ein gegen Gram-negative und Gram-positive Erreger wirksames Cephalosporin zu transportieren, rückt den Transporter in das Blickfeld therapeutischer Überlegungen bezüglich der aerosolischen Antibiotikatherapie rekurrenter Atemwegsinfektionen.

7 Literaturverzeichnis

- ABE, H., SATOH, M., MIYAUCHI, S., SHUTO, S., MATSUDA, A., KAMO, N.
Conjugation of dipeptide to fluorescent dyes enhances its affinity for a dipeptide transporter (PEPT1) in human intestinal Caco-2 cells.
Bioconjug. Chem. 10:24-31 (1999).
- ADAMSON, I. Y. R., BOWDEN, D. H.
The type II cells as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen.
Lab. Invest. 30:35-42 (1974).
- AKARAWUT, W., LIN, C. J., SMITH, D. E.
Noncompetitive inhibition of glycylsarcosine transport by quinapril in rabbit renal brush border membrane vesicles: effect on high-affinity peptide transporter.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 287:684-690 (1998).
- AMASHEH, S., WENZEL, U., WEBER, W. M., CLAUSS, W., DANIEL, H.
Electrophysiological analysis of the function of the mammalian renal peptide transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes.
J. Physiol. 504:169-174 (1997).
- AMASHEH, S., WENZEL, U., BOLL, M., DORN, D., WEBER, W. M., CLAUSS, W., DANIEL, H.
Transport of charged dipeptides by the intestinal H⁺/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes.
J. Membr. Biol. 155:247-256 (1997).
- AMIDON, G. L., WALGREEN, C. R. JR.
5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter.
Pharm. Res. 16:175-179 (1999).
- ANDERSON, G. W., ZIMERMANN, J. E., CALLAHAN, F. M.
The use of N-hydroxysuccinimide esters in peptide synthesis.
J. Am. Chem. Soc. 86:1839-1842 (1964).
- ARMSTRONG, D. S., GRIMWOOD, K., CARZINO, R., CARLIN, J. B., OLINSKY, A., PHELAN, P. D.
Lower respiratory infection and inflammation in children with newly diagnosed cystic fibrosis.
Brit. J. Med. 310:1571-1572 (1995).
- ARRIZA, J. L., KAVANAUGH, M. P., FAIRMAN, W. A., WU, Y.-N., MURDOCH, G. H., NORTH, R. A., AMARA, S. G.

Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family.

J. Biol. Chem. 268:15329-15332 (1993).

AUSTGEN, T. A., CHEN, M. K., SALLOUM, R. M., SOUBA, W. W.

Glutamine metabolism by the endotoxin-injured lung.

J. Trauma. 31:1068-1075 (1991).

AZOULAY-DEPUIS, E., VALLEE, E., BEDOS, J. P., MUFFAT-JOLY, M., POCIDALO, J. J.

Prophylactic and therapeutic activities of azithromycin in a mouse model of pneumococcal pneumonia.

J. Antimicrob. Chemother. 35:1024-1028 (1991).

BACHMANN, S., LE HIR, M., ECKARDT, K. U.

Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin.

J. Histochem. Cytochem. 41:335-341 (1993).

BAI C, BROWN LAS, JONES DP.

Gluthathione transport by type II cells in perfused rat lung.

Am. J. Physiol. 267:L447-L455 (1994).

BALIMANE, P. V., TAMAI, I., GUO, A., NAKANISHI, T., KITADA, H., LEIBACH, F. H., TSUJI, A., SINKO, P. J.

Direct evidence for peptide transporter (PepT1)-mediated uptake of a nonpeptide prodrug, valacyclovir.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 250:246-251 (1998).

BALLARD S. T., GATZKY J. T.

Alveolar transepithelial potential difference and ion transport in adult rat lung.

J. Appl. Physiol. 70:63-69 (1991).

BARANIUK, J. N., OHKUBO, K., KWON, O. J., MAK, J., ROHDE, J., KALINER, M. A., DURHAM, S. R., BARNES, P. J.

Identification of neutral endopeptidase mRNA in human nasal mucosa.

J. Appl. Physiol. 74:272-279 (1993).

BARANIUK, J. N., OHKUBO, O., KWON, O. J., MAK, J. W. C., DAVIES, R., TWORT, C., KALINER, M., LETARTE, M., BARNES, P. J.

Localisation of neutral endopeptidase (NEP) mRNA in human bronchi.

Eur. Resp. J. 8:1458-1464 (1995).

BARNES, P. J.

Cytokines as mediators of chronic asthma.

Am. J. Resp. Crit. Care Med. 150:42-49 (1994).

BARNES, P. J., CHUNG, K. F., PAGE, C. P.
Inflammatory mediators of asthma: an update.
Pharmacol Rev. 50:515-596 (1998).

BAUMGARTNER, R., HUBER, R. M., SCHULZ, H., STEPP, H., RICK, K., GAMARRA, F.,
LEBERIG, A., ROTH, C.
Inhalation of 4-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early
stage lung cancer.
J. Photochem. Photobiol. B. 36:169-174 (1996).

BEDWELL, J., MACROBERT, A. J., PHILIPS, D., BOWN, S. G.
Fluorescence distribution and photodynamic effect of ALA induced PP IX in the DMH rat
colonic tumour model.
Br. J. Cancer. 65:818-824 (1992).

BERGER, U. V., HEDIGER, M. A.
Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system.
Anat. Embryol. 199:439-449 (1999).

BERGSTRÖM, J., FURST, P., NOREE, L., VINNARS, E.
Intracellular free amino acid concentration in human skeletal muscle.
J. Appl. Physiol. 36:393-397 (1974).

BERTRAN, J., WERNER, A., MOORE, M. L., STANGE, G., MARKOVICH, D., BIBER, J.,
TESTAR, X., ZORZANO, A., PALACÍN M., MURER, H.
Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport
system for cystine and dibasic and neutral amino acids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:5601-5605 (1992).

BLAND, R. D., BOYD, C. A. R.
Cation transport in lung epithelial cells derived from fetal, newborn, and adult rabbits.
J. Appl. Physiol. 61:507-517 (1986).

BLEYAVSKY, A., VINOGRADOVA, T., RAJEWSKY, K.
PCR-based cDNA library construction: General cDNA libraries at the level of a few cells.
Nucleic Acids Res. 17:2919-2932 (1989).

BOICHOT, E., RICHARD, M.-P., PAUBERT-BRAQUET, M.
Effect of cefadroxil on antigen-induced bronchial hyperresponsiveness and eosinophil
accumulation in lung from sensitized guinea pig.
Int. Arch. Allergy Immunol. 102:87-93 (1993).

- BOLDYREV, A.A., KOLDOBSKI, A., KURELLA, E., MALTSEVA, V., STVOLINSKI, S.
Natural histidine-containing dipeptide carnosine as a potent hydrophilic antioxidant with membrane stabilizing function. A biomedical aspect.
Mol. Chem. Neurophathol. 19:185-192 (1993).
- BOLL, M., MARKOVICH D., WEBER W. M., KORTE H., DANIEL H., MURER H.
Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton coupled transport of peptides, β -lactam antibiotics, and ACE-inhibitors.
Pfluegers Arch. 429:146-149 (1994).
- BOLL, M., HERGET, M., WAGENER, M., WEBER, W. M., MARKOVICH, D., BIBER, J., CLAUSS, W., MURER, H., DANIEL, H.
Expression cloning and functional characterisation of the kidney cortex high affinity proton coupled peptide transporter.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:284-289 (1996).
- BONNARD, C., PAPERMASTER, D. S., KRAEHENBUHL, J. P.
The streptavidin-biotin bridge technique: Application in light and electron microscope immunocytochemistry.
In: Polak, J. M., Varndell, I. M. (Hrsg.). Immunolabelling for electron microscopy.
Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam. 95-112 (1984).
- BOROWSKY, B., MEZEY, E., HOFFMAN, B. J.
Two glycine transporter variants with distinct localisation in the CNS and peripheral tissues are encoded by a common gene.
Neuron. 10:851-863 (1993).
- BOWN, S. G., ROGOWSKA, A. Z.
New photosensitizers for photodynamic therapy in gastroenterology.
Can. J. Gastroenterol. 13:389-392 (1999).
- BOYD, C. A. R., BRONK, J. R., HELLIWELL, P. A.
Stereospecificity of dipeptide transport in rat lung in situ (Abstract).
J. Physiol. 467:187 (1993).
- BRANDSCH, M., BRANDSCH, C., PRASAD, P. D., GANAPATHY, V., HOPFER, U., LEIBACH, F. H.
Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H^+ /peptide cotransporter.
FASEB J. 9:1489-1496 (1995).
- BRESSOLLE, F., DE LA COUSSAYE, J. E., AYOUB, R., FABRE, D., GOMENI, R., SAISSI, G., ELEDJAM, J. J., GALTIER, M.

Endotracheal and aerosol administrations of ceftazidime in patients with nosocomial pneumonia: pharmacokinetics and absolute bioavailability.

Antimicrob. Agents Chemother. 36:1404-1411 (1992).

BRETSCHNEIDER, B., BRANDSCH, M., NEUBERT, R.

Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. Pharm. Res. 16:55-61 (1999).

BROWN, S. E. S., KIM, K. J., GODDMAN, B. E., CRANDALL, E. D.

Sodium-amino acid cotransport by type II alveolar epithelial cells.

J. Appl. Physiol. 59:1616-1622 (1985).

BROWN, L. A., BAI, C., JONES, D. P.

Glutathione protection in alveolar type II cells from fetal and neonatal rabbits.

Am. J. Physiol. 262:L305-L312 (1992).

BUKOWSKI, D. M., DENEKE, S. M., LAWRENCE, R. A., JENKINSON, S. G.

A noninducible cystine transport system in rat alveolar type II cells.

Am. J. Physiol. 268:L21-L26 (1995).

CASTRANOVA, V., WRIGHT, J. R., COLBY, H. D., MILES, P. R.

Ascorbate uptake by isolated rat alveolar macrophages and type II cells.

J. Appl. Physiol. 54:208-214 (1983).

CAUGHEY, G. H., LEIDIG, F., VIRO, N. F., NADEL, J. A.

Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 244:133-137 (1988).

CHEEKS, C., WEDEN, R. P.

Renal tubular transport of delta-aminolevulinic acid in the rat.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 181:596-601 (1986).

CHISHOLM, D. R., DE REGIS, R. G., BEHR, D. A.

Therapeutic efficacy of cefadroxil and cephalexin for pneumonia in a rat test model.

Antimicrob. Agents Chemother. 30:105-109 (1986).

COGLAN, J. P., ALDRED, P., HARALAMBRIDIS, J., NIALL, H. D., PENSCHOW, J. D., TREGGAR, G. W.

Hybridisation histochemistry.

Anal. Biochem. 149:1-28 (1985).

COOK, P. J., ANDREWS, J. M., WISE, R. HONEYBOURNE, D.

Distribution of cefdinir, a third generation cephalosporin antibiotic, in serum and pulmonary compartments.

J. Antimicrob. Chemother. 37:331-339 (1996).

COONEY, G. F., LUM, B. L., TOMASELLI, M., FIEL, S. B.

Absolute bioavailability and absorption characteristics of aerosolized tobramycin in adults with cystic fibrosis.

J. Clin. Pharmacol. 34:250-254 (1994).

COONS, A. H., LEDUC, E. H., CONOLLY, J. M.

Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit.

J. Exp. Med. 102:49-63 (1955).

COONS, A. H.

Fluorescent antibody methods.

In: Danielli, J. F. (Hrsg.). General cytochemical methods.

Academical Press, New York. 399-422 (1958).

CREUWELS, L. A. J. M., VAN GOLDE, L. M. G., HAAGSMAN H. P.

The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects.

Lung. 175:1-39 (1997).

DANIEL, H.

Transport von Oligopeptiden an Bürstensaummembranen von Dünndarm und Nierentubulus.

Z. Gastroenterol. 33:50-53 (1993).

DANIEL, H.

Function and molecular structure of brush border membrane peptide/H⁺ symporters.

J. Membr. Biol. 154:197-203 (1996).

DANIEL, H.

First insights into the operational mode of epithelial peptide transporters.

J. Physiol. 498:561(1997).

DANIEL, H., ADIBI S.A.

Transport of β -lactam antibiotics in kidney brush border membrane: determinants of the 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, E. L., ADIBI, S.A.

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., MORSE E. L., ADIBI S.A.

Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane.

J. Biol. Chem. 267:9565-9573 (1992).

DENEKE, S. M., FANBURG, B. L.

Regulation of cellular glutathione.

Am. J. Physiol. 257:L163-L173 (1989).

DIPAK, K. D., STEINBERG, H.

Adenosine transport by the lung.

J. Appl. Physiol. 65:297-305 (1988).

DOHERTY, J. B., ASHE, B. M., ARGENBRIGHT, L. W., BARKER, P. L., BONNEY, R. J., CHANDLER, G. O., DAHLGREN, M. E., DORN, C. P. JR., FINKE, P. E., FIRESTONE, R. A., FLETCHER, D., HAGMAN, W. K., MUMFORD, R., O'GRADY, L., MAYCOCK, A. L., PISANO, J. K., SHAH, S. K., THOMPSON, K. R., ZIMMERMAN, M.

Cephalosporin antibiotics can be modified to inhibit human leukocyte elastase.

Nature. 322:192-194 (1986).

DOHERTY, J. B., ASHE, B. M., BARKER, P. L., BLACKLOCK, T. J., BUTCHER, J. W., CHANDLER, G. O., DAHLGREN, M. E., DAVIES, P., DORN, C. P. JR., FINKE, P. E., FIRESTONE, R. A., HAGMAN, W. K., HALGREN, T., KNIGHT, W. B., MAYCOCK, A. L., NAVIA, M. A., O'GRADY, L., PISANO, J. K., SHAH, S. K., THOMPSON, K. R., WESTON, H., ZIMMERMAN, H.

Inhibition of human leukocyte elastase. 1. Inhibition by C-7 substituted cephalosporin tert-butyl esters.

J. Med. Chem. 33:2513-2521 (1990).

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. 497:777-779 (1996).

DÖRING, F., THEIS, S., DANIEL, H.

Expression and functional characterisation of the mammalian intestinal peptide transporter PEPT1 in the myelotrophic yeast *P. pastoris*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 232:656-662 (1997).

DÖRING, F., WALTER, J., WILL, 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 (1998a).

DÖRING, F., WILL, J., AMASHEH, S., CLAUSS, W., AHLBRECHT, H., DANIEL, H.

Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter.

J. Biol. Chem. 273:23211-23218 (1998b).

DÖRING, F., MICHEL, T., RÖSEL, A., NICKOLAUS, M., DANIEL, H.

Expression of the mammalian renal peptide transporter PEPT2 in the yeast *Pichia pastoris* and applications of the yeast system for functional analysis.

Mol. Membr. Biol. 15:79-88 (1998c).

DOUGHERTY, T. J., GOMER, C. J., HENDERSON, B. W., JORI, G., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J., PENG, Q.

Photodynamic Therapy.

J. Natl. Cancer Inst. 90:889-905 (1998).

DRAGOVIC, T., IGIC, R., ERDÖS, E. G., RABITO, S. F.

Metabolism of bradykinin by peptidases in the lung.

Am. Rev. Respir. Dis. 147:1491-1496 (1993).

DRINGEN, R., HAMPRECHT, B., BRÖER, S.

The peptide transporter PEPT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures.

J. Neurochem. 71:388-393 (1998).

DRISCOLL, K. E., HOWARD, B. W., CARTER, J. M., ASQUITH, T., JOHNSTON, C., DETILLEUX, P., KUNKEL, S. L., ISFORT, R.J.

α -Quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells.

Am. J. Pathol. 149:1627-1637 (1996).

DUNCKER, H.-R.

Respirationstrakt.

In: Hinrichsen, K. V. (Hrsg.). Humanembryologie. Lehrbuch und Atlas der vorgeburtlichen Entwicklung des Menschen.

Springer, Berlin-Heidelberg-New York. 571-606 (1990).

DUNCKER, H.-R.

Atemapparat.

In: Drenckhahn, D., Zenker, W. (Hrsg.). Benninghoff: Anatomie.
Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore. 529 - 587 (1994).

EAGLE, H., LEVINE, E. M.

Growth regulatory effects of cellular interaction.
Nature. 213:1102-1106 (1967).

EDELSTEIN, P. H., EDELSTEIN, M. A. C., LEHR, K. H., REN, J.

In-vitro activity of levofloxacin against clinical isolates of Legionella spp, its pharmacokinetics in guinea pigs, and use in experimental Legionella pneumophila pneumonia.

J. Antimicrob. Chemother. 37:117-126 (1996).

EISENBERG, J. D.

Antibiotic use in cystic fibrosis.
Curr. Opin. Pulm. Med. 2:439-446 (1996).

ELBORN, J. S., SHALE, D. J., BRITTON, J. R.

Cystic fibrosis: Current survival and population estimates to the year 2000.
Thorax. 46:881-885 (1991).

ERDÖS, E. G.

Kininases.

In: Erdös, E. G. (Hrsg.). Bradykinin, Kallidin, Kallikrein, Handbook of Experimental Pharmacology.

Springer, Berlin-Heidelberg-New York. 25:438-468 (1979).

FALBEL, H., SMACZNY, C.

Pulmonaler Verlauf der Mukoviszidose beim Erwachsenen.
Atemw.-Lungenkrh. 19:510-515 (1993).

FEHRENBACH, H., KASPER, M., TSCHERNIG, T., PAN, T., SCHUH, D., SHANNON, J. M., MULLER, M., MASON, R. J.

Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis.

Eur. Respir. J. 14:534-544 (1999).

FEI, Y. J., KANAI, Y., NUSSBERGER, S., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H., ROMERO, M. F., SINGH, S. K., BORON, W. F., HEDIGER, M. A.

Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter.

Nature. 368:563-566 (1994).

FEI, Y. J., LIU, J.C., FUJITA, T., LIANG, R., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H.

Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporters PepT1 and PepT2 using PepT1-PepT2 and PepT2-PepT1 chimeras.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 246:39-44 (1998).

FINK, L., SEEGER, W., ERMERT, L., HANZE, J., STAHL, U., GRIMMINGER, F., KUMMER, W., BOHLE, R. M.

Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking.

Nat. Med. 4:1329-1333 (1998).

FINKE, P. E., SHAH, S. K., ASHE, B. M., BALL, R. G., BLACKLOCK, T. J., BONNEY, R. J., BRAUSE, K. A., CHANDLER, G., O., COTTON, M., DAVIES, P., DELLEA, P. S., DORN, C. P. JR., FLETCHER, D., S., O'GRADY, L. A., HAGMAN, W. K., HAND, K. M., KNIGHT, W. B., MAYCOCK, A. L., MUMFORD, R. A., OSINGA, D. G., SOHAR, P., THOMPSON, K. R., WESTON, H., DOHERTY, J. B.

Inhibition of human leukocyte elastase. 4. Selection of a substituted cephalosporin (L-658,758) as a topical aerosol.

J. Med. Chem. 35:3731-3744 (1992).

FISHE, A. B., DODIA, C., CHANDER, A., KLEINZELLER, A.

Transport of choline by plasma membrane vesicles from lung-derived epithelial cells.

Am. J. Physiol. 263:L1250-L1257 (1992).

FITZSIMMONS, S. C.

The changing epidemiology of cystic fibrosis.

Curr. Probl. Pediatr. 24:171-179 (1994).

FOLKESSON, H. G., MATTHAY, M. A., HASEGAWA, H., KHERADMAND, F., VERKMAN, A. S.
Transcellular water transport in lung alveolar epithelium through mercury-sensitive water channels.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:4970-4974 (1994).

FORSSMANN, W. G., ITOH, S., WEIHE E., AOKI, A., DYM, D. M., FAWCETT, D. W.

An improved perfusion fixation method for the testis.

Anat. Rec. 188:307-318 (1977).

FRANCONI, G. M., GRAF, P. D., LAZARUS, S. C., NADEL, J. A., CAUGHEY, G. H.

Mast cell tryptase and chymase reverse airway smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the ferret.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 248:947-951 (1989).

FREEMAN, T.C., BENTSEN, B.S., THWAITES, D.T., SIMMONS, N.L.

H⁺/di-tripeptide transporter (Pept1) expression in the rabbit intestine.

Pfluegers Arch. 430:394-400 (1995).

FRISSELL, W. R.

Synthesis and catabolism of nucleotides.

In: Frisell, W. R. (Hrsg.). Human biochemistry.

Macmillan, New York. 292-304 (1982).

FROMM, D., KESSEL, D., WEBBER J.

Feasibility of photodynamic therapy using endogenous photosensitization for colon cancer.

Arch. Surch. 131:667-669 (1996).

FUNKHOUSER, J. D., TANGADA, S. D., JONES, S. J. O., PETERSON, R. D. A.

Typ II alveolar epithelial cell antigen is identical to aminopeptidase N.

Am. J. Physiol. 260:L274-L279 (1991).

FUNKHOUSER, J. D., TANGADA, S. D., PETERSON, R. D. A.

Ecto-peptidases of alveolar epithelium: candidates for roles in alveolar regulatory mechanisms.

Am. J. Physiol. 260:L381-L385 (1993).

GANAPATHY, M. E., HUANG, W., WANG, H., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H.

Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PepT1 and Pept2.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 246:470-475 (1998).

GIBSON, S. L., HAVENS, J. J., FOSTER, T. H., HILF, R.

Time-dependent intracellular accumulation of delta-aminolevulinic acid, induction of porphyrin synthesis and subsequent phototoxicity.

Photochem. Photobiol. 65:416-421 (1997).

GOETZL, E. J., SREEDHARAN, S. P., TURCK, C. W., BRIDENBAUGH, R., MALFROY, B.

Preferential cleavage of amino- and carboxyl-terminal oligopeptides from vasoactive intestinal polypeptide by human recombinant enkephalinase (neutral endopeptidase EC 3.4.24.11.).

Biochem. Biophys. Res. Commun. 158:850-854 (1989).

GOFF, B. A., BACHOR, R., KOLLIAS, N., HASAN, T.

Effects of photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless guinea pigs.

J. Photochem. Photobiol. B. 15:239-251 (1992).

GRUBE, D.

Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. II. Non-specific binding of immunoglobulins to G-cells by ionic interactions.

Histochemistry. 66:149-167 (1980).

GUMBINER, B.

Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions.

Am. J. Physiol. 253:L749-L758 (1987).

GUO, A., HU, P., BALIMANE, P. V., LEIBACH, F. H., SINKO, P. J.

Interactions of a nonpeptidic drug, valacyclovir, with the human intestinal peptide transporter (hPEPT1) expressed in a mammalian cell line.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 289:448-454 (1999).

HACHISU, M., HIRANUMA, T., TANI, S., IIZUKI, T.

Enzymatic degradation of helodermin and vasoactive intestinal polypeptide.

J. Pharmacobiodyn. 14:126-131 (1991).

HAGMAN, W. K., O'GRADY, L. A., ASHE, B. M., DAHLGREN, M. E., WESTON, H., MAYCOCK, A. L., KNIGHT, W. B., DOHERTY, J. B.

Inhibition of human leukocyte elastase by C-2 substituted cephalosporin sulfones.

Eur. J. Med. Chem. 24:599-604 (1989).

HAMID, Q., SPRINGALL, D. R., RIVEROS-MORENO, V., CHANEZ, P., HOWARTH, P., REDNINGTON, A., BOUSQUET, J., GODARD, P., HOLGATE, S., POLAK, J. M.

Induction of nitric oxide synthase in asthma.

Lancet. 342:1510-1514 (1993).

HAN, H. K., RHIE, J. K., OH, D. M., SAITO, G., HSU, C. P., STEWART, B. H., AMIDON, G. L. CHO/hPEPT1 cells overexpressing the human peptide transporter (hPEPT1) as an alternative in vitro model for peptidomimetic drugs.

J. Pharm. Sci. 88:347-350 (1999).

HARPER, M. E., MARSELLE, L. M., GALLO, R. C., WONG-STAHN, F.

Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotrophic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridisation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:772-776 (1986).

HAURI, H. P., BUCHER, K.

Immunoblotting with monoclonal antibodies: Importance of the blocking solution.

Anal. Biochem. 159:386-389 (1986).

HAUTAMAKI, R. D., GREENE, B., SOUBA, W. W.

Characterization of L-gutamine transport by type II alveolar cells.

Am. J. Physiol. 262:L459-L465 (1992).

HELLIWELL, P. A., MEREDITH, D., BOYD, C. A. R., BRONK, J. R., LISTER, N., BAILEY, P. D. Tripeptide transport in rat lung.

Biochim. Biophys. Acta. 1190:430-434 (1994).

HODSON, M. E., PENKETH, A. R. L., BATTEN, J. C.

Aerosol carbenicillin and gentamicin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis.

Lancet. 2:1137-1139 (1981).

HONEYBOURNE, D.

Antibiotic penetration into lung tissues.

Thorax 49:104-106 (1994).

HONEYBOURNE, D.

Antibiotic penetration in the respiratory tract and implications for the selection of antimicrobial therapy.

Curr. Opin. Pulm. Med. 3:170-174 (1997).

HOOVER, J. L., RUSH, B. D., WILKINSON, K. F., DAY, J. S., BURTON, T. J., VIDMAR, T. J., RUWART, M. J.

Peptides are better absorbed from the lung than the gut in the rat.

Pharm. Res. 9:1103-1106 (1992).

HORVATH, I., DONNELLY, L. E., KISS, A., PAREDI, P., KHARITONOV, S. A., BARNES, P.J.

Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress.

Thorax. 53:668-672 (1998).

INUI, K., OKANO, T., TAKANO, M., SAITO, H., HORI, R.

Carrier-mediated transport of cephalixin via the dipeptide transport system in rat renal brush border membrane vesicles.

Biochim. Biophys. Acta. 679:449-454 (1984).

INUI, K., OKANO, T., MAEGAWA, H., KATO, M., TAKANO, M., HORI, R.

H⁺ coupled transport of p. o. cephalosporins via dipeptide carriers in rabbit intestinal brush-border membranes: difference of transport characteristics between cefixime and cephradine.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 247:235-241 (1988).

INUI, K., TOMIA 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).

ITOKAZU, G. S., WEINSTEIN, R. A.

Aerosolized antimicrobials: another look.

Crit. Care Med. 26:5-6 (1998).

- JACKSON, A. H., HILL, S. L., AFFORD, S. C., STOCKLEY, R. A.
Sputum soluble phase proteins and elastase activity in patients with cystic fibrosis.
Eur. J. Respir. Dis. 65:114-124 (1984).
- JANOFF, A.
Elastase and Emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis.
Am. Rev. Respir. Dis. 132:417-433 (1985).
- JOHANSSON, J., CURSTEDT, T.
Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components.
Eur. J. Biochem. 244:675-693 (1997).
- JOHN, H., BIRNSTIEL, M., JONES, K.
RNA-DNA hybrids at the cytological level.
Nature. 223:582-587 (1969).
- JUILLERAT-JEANNERET, L., AUBERT, J.-D., LEUENBERGER, P.
Peptidases in human bronchoalveolar fluid, macrophages, and epithelial cells: Dipeptidyl (amino)peptidase IV, aminopeptidase N, and dipeptidyl (carboxy)peptidase (angiotensin-converting enzyme).
J. Lab. Clin. Med. 130:603-614 (1997).
- KAHN, T. Z. WAGNER, J. S., BOST, T., MARTINEZ, J., ACCURSO, F. J., RICHES, D. W.
Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 151:1075-1082 (1995).
- KANAI, Y., HEDIGER, M. A.
Primary structure and functional characterisation of a high affinity glutamate transporter.
Nature. 360:477-471 (1992).
- KASPER, M., RUDOLF, T., HAHN, R., PETERSON, I., MÜLLER, M.
Immuno- and lectin histochemistry of epithelial subtypes and their changes in a radiation-induced lung fibrosis model of the mini pig.
Histochemistry. 100: 367-377 (1993).
- KEKUDA, R., PRASAD, P. D., FEI, Y.-J., TORRES-ZAMORANO, V., SHINA, S., YANG-FENG, T. L., LEIBACH, F. H., GANAPATHY, V.
Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter B⁰ from a human placental choriocarcinoma cell line.
J. Biol. Chem. 271:18657-18661 (1996).
- KEMP, P. J., BOYD, C. A. R.

Pathways for glucose transport in type II pneumocytes freshly isolated from adult guinea pig lung.

Am. J. Physiol. 263:L612-L616 (1992).

KEMP, P. J., ROBERTS, G. C., BOYD, C. A. R.

Identification and properties of pathways for K⁺ transport in guinea pig and rat alveolar epithelial type II cells.

J. Physiol. 476:79-88 (1994).

KESSLER, C., HÖLTKE, H.-J., SEBL, R., BURG, J., MÜHLEGGGER, K.

Nonradioactive labeling and detection of nucleic acids: I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle.

Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 371:917-927 (1990).

KHALIL, N., O'CONNOR, R. N., UNRUH, H. W., WARREN, P. W., FLANDERS, K. C., KEMP, A., BEREZNAVY, O. H., GREENBERG, A. H.

Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor- β in idiopathic pulmonary fibrosis.

Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 5:155-162 (1991).

KNICKELBEIN, R. G., SERES, T., JOHNSTON, R. B. JR., WARSHAW, J. B.

Characterisation of multiple cysteine and cystine transporters in rat alveolar type II cells.

Am. J. Physiol. 273:L1147-L1155 (1997).

KNIGHT, W. B., MAYCOCK, A. L., NAVIA, M. A., SHAH, S. K., THOMPSON, K. R., UNDERWOOD, D. J., WESTON, H., ZIMMERMAN, H., DOHERTY, J. B.

Inhibition of human leukocyte elastase. 2. Inhibition by substituted cephalosporin esters and amides.

J. Med. Chem. 33:2522-2528 (1990).

KRAMER, W.

Inactivation of the intestinal uptake system for beta-lactam antibiotics by diethylpyrocarbonate.

Biochim. Biophys. Acta. 943:288-296 (1988).

KUBESCH, P., DÖRK, T., WULBRAND, U., KÄLIN, N., NEUMANN, T., WULF, B., GEERLINGS, H., WEISSBRODT, H., V. D. HARDT, H., TÜMMLER, B.

Genetic determinants of airways colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis.

Lancet. 341:189-193 (1993).

KUMMER, W., GIBBINS, I. L., STEFAN, P., KAPOOR, V.

Catecholamines and catecholamine-synthesizing enzymes in guinea pig sensory ganglia.

Cell. Tiss. Res. 26:595-606 (1990).

KUN, P., LANDAU, L. I., PHELAN, P. D.

Nebulized gentamicin in children and adolescents with cystic fibrosis.

Austr. Paediatr. J. 20:43-45 (1984).

LACOMBE, C., DA SILVA, J. L., BRUNEVAL, P., FOURNIER, J. G., WENDLING, F., CASADEVALL, N., CAMILLERI, J. P., BARIETY, J., VARET, B., TAMBOURIN, P.

Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney.

J. Clin. Invest. 81:620-623 (1988).

LEE, P. J., ALAM, J., WIEGAND, G. W., CHOI, A. M.

Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:10393-10398 (1996).

LEIBACH, F. H., GANAPATHY, V.

Peptide transporters in the intestine and the kidney.

Annu. Rev. Nutr. 16:99-119 (1996).

LIANG, R., FEI, Y.J., PRASAD, P.D., RAMAMOORTHY, S., HAN, H., YANG-FENG, T. L., HEDIGER, M. A., LEIBACH, F.H.

Human intestinal H⁺/ peptide cotransporter: cloning, functional characterization, and chromosomal localization.

J. Biol. Chem. 270:6456-6463 (1995).

LILLY, C. M., MARTINS, M. A., DRAZEN, J. M.

Peptidase modulation of the effects of vasoactive intestinal peptide in the isolated tracheal perfused guinea pig lung.

J. Clin. Invest. 91:235-243 (1993).

LILLY, C. M., KOBZIK, L., HALL, A. E., DRAZEN, J. M.

Effects of chronic airway inflammation on the activity and enzymatic inactivation of neuropeptides in guinea pig lungs.

J. Clin. Invest. 93:2667-2674 (1994).

LIM, S., GRONEBERG, D. A., FISCHER, A., CARAMORI, G., MATTOS, W., OATES, T., ADCOCK, I., BARNES, P. J., FAN CHUNG, K.

Expression of heme-oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and asthmatic airways: effect of inhaled corticosteroids.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. (in Press).

LIN, C. J., AKARAWUT, W., SMITH, D. E.

Competitive inhibition of glycylsarcosine transport by enalapril in rabbit renal brush border membrane vesicles: interaction of ACE inhibitors with high-affinity H⁺/peptide symporter. *Pharm. Res.* 16:609-615 (1999).

LIU, Q.-R., LÓPEZ-CORCUERA, B., NELSON, H., MANDIYAN, S., NELSON, S.
Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and β-alanine in mouse brain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:12145-12149 (1992).

LIU, W., LIANG, S., RAMAMOORTHY, S., FEI, Y.J., GANAPATHY, M. E., HEDIGER, M. A., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H.
Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney.
Biochim. Biophys. Acta. 1235:461-466 (1995).

LOH, C. S., BEDWELL, J., MACROBERT, A. J., KRASNER, N., PHILLIPS, D., BOWN, S. G.
Photodynamic therapy of the normal rat stomach: a comparative study between di-sulphonated aluminium phthalocyanine and 5-aminolevulinic acid.
Br. J. Cancer. 66:452-462 (1992).

LOH, C. S., MACROBERT, A. J., BEDWELL, J., REGULA, J., KRASNER, N., BOWN, S.
Oral versus intravenous administration of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy.
Br. J. Cancer. 68:41-51 (1993).

MACKENZIE, B., LOO, D. D. F., FEI, Y.-F., LIU, W., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H., WRIGHT, E. M.
Mechanism of the human intestinal H⁺-coupled oligopeptide transporter hPEPT1.
J. Biol. Chem. 271:5430-5437 (1996).

MACLUSKY, I., LEVISON, H.
Cystic fibrosis.
In: Chernick, V. (Hrsg.). *Disorders of the respiratory tract in children.*
Saunders, Philadelphia. 692-730 (1990).

MAINES, M. D.
Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications.
FASEB J. 2:2557-2568 (1988).

MARTÍNEZ, A., MILLER, M. J., CATT, K. J., CUTTITA, F.
Adrenomedullin receptor expression in human lung and in pulmonary tumors.
J. Histochem. Cytochem. 45:159-164 (1997).

MARTINS, M. A., SHORE, S. A., GERARD, N. P., GERARD C., DRAZEN, J. F.

Peptidase modulation of the pulmonary effects of tachykinins in tracheal superfused guinea pig lungs.

J. Clin. Invest. 85:170-176 (1990).

MASON, R. J., CRYSTAL, R. G.

Pulmonary cell biology.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:72-81 (1998).

MCDOWELL, E. M., BEALS, T. F.

Biopsy pathology of the bronchi.

Saunders, Philadelphia. (1987).

McFARLAND, G. A., HOLLIDAY, R.

Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine.

Exp. Cell Res. 212:167-175 (1994).

MCPHERSON, M. S., GOODCHILD, M. C.

The biochemical defect in cystic fibrosis.

Clin. Sci. 74:337-345 (1988).

MEREDITH, D., BOYD, C. A. R.

Peptide transport in type II pneumocytes freshly isolated from rat lung (Abstract).

J Physiol 467:188 (1993).

MEREDITH, D., BOYD, C. A. R.

Dipeptide transport characteristics of the apical membrane of rat lung type II pneumocytes.

Am. J. Physiol. 269:L137-L143 (1995).

MEREDITH, D., LAYNES, R. W.

Dipeptide transport in brush-border membrane vesicles (BBMV) prepared from human full-term placentae.

Placenta. 17:173-179 (1996).

MERRITT, T. A., COCHRANE, C. G., HOLCOMB, K., BOHL, B., HALLMANN, M., STRAYER, D., EDWARDS, D., GLUCK, L.

Elastase and α_1 proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome.

J. Clin. Invest. 72:656-666 (1983).

MIYAMOTO, K. I., SHIRAGA, T., MORITA, K., YAMAMOTO, H., HAGA, H., TAKETANI, Y., TAMAI, I., SAI, Y., 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, V. H., KIM, K. J.
Dipeptide transport across rat alveolar epithelial cell monolayers.
Pharm. Res. 10:1668-1674 (1993).
- MUKHOPADHYAY, S., STADDON, G. E., EASTMANN, C., PALMER, M., RHYS DAVIES, E.,
CARSWELL, F.
The quantitative distribution of nebulized antibiotic in the lung in cystic fibrosis.
Resp. Med. 88:203-211 (1994).
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H.
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51:263-273 (1986).
- NAASANI, I., SUGAWARA M., KOBAYASHI M., ISEKI K., MIYAZAKI K.
Transport mechanism of ceftibuten, a dianionic cephem, in rat renal brush-border
membrane.
Pharm. Res. 12:605-608 (1995).
- NIVEN, R. W., RYPACEK, F., BYRON, P. R.
Solute absorption from the airway of the isolated rat lung. II. Absorption of several
peptidase-resistant, synthetic polypeptides: Poly-(2-hydroxyethyl)-aspartamides.
Pharm. Res. 7:990-994 (1990).
- NOLAN, G., MOIVOR, P., LEVISON, H., FLEMING, P. C., COREY, M., GOLD, R.
Antibiotic prophylaxis in cystic fibrosis: inhaled cefaloridine as an adjunct to oral
cloxacillin.
J. Pediatr. 101:626-630 (1982).
- NOVOTNY, A., XIANG, J., STUMMER, W., TEUSCHER, N. S., SMITH, D. E., KEEP, R. F.
Mechanisms of 5-aminolevulinic acid uptake at the choroid plexus.
J. Neurochem. 75:321-328 (2000).
- O'FLAHERTY, E. J., HAMMOND, P. B., TYLOR, E.
Renal absorption and secretion of delta-aminolevulinic acid in the rat.
Fundam. Appl. Toxicol. 1:278-281 (1981).
- OGIHARA, H., SAITO H., SHIN B. C., TERADA T., TAKENOSHITA S., NAGAMACHI Y., INUI K.,
TAKATA K.
Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 220:848-852 (1996).
- OGIHARA, H., SUZUKI, T., NAGAMACHI, Y., INUI, K., TAKATA, K.

Peptide transporter in the rat small intestine: ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids.

Histochem. J. 31:169-74 (1999).

OTTO, C., BAUER, K.

Dipeptide uptake: a novel marker for testicular and ovarian macrophages.

Anat. Rec. 245:662-667 (1996).

OTTO, C., TOM DIECK, S., BAUER, K.

Dipeptide uptake by adenohipophysial folliculostellate cells.

Am. J. Physiol. 271:C210-C217 (1996).

PAINE, R. III, ROLFE, M. W., STANDIFORD, T. J., BURDICK, M. D., ROLLINS, B. J., STRIETER, R. M.

MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture.

J. Immunol. 150:4561-4570 (1993).

PALACÍN, M., ESTÉVEZ, R., BERTRAN, J., ZORZANO, A.

Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters.

Physiol. Rev. 78:969-1054 (1998).

PALMER, L. B., SMALDONE, G. C., SANFORD, R. S., O'RIORDAN, T. G., CUCCIA, A.

Aerosolized antibiotics in mechanically ventilated patients: Delivery and reponse.

Crit. Care Med. 26:31-39 (1998).

PARDUE, M. L., GALL, J.G.

Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64:600-604 (1969).

PATTON, J. S., PLATZ, R. M.

Routes of delivery: Case study. Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action.

Adv. Drug Deliv. Rev. 8:179-196 (1992).

PAULSEN, I. T., SKURRAY, R. A.

The POT family of transport proteins.

Trends Biochem. Sci. 19:404 (1994).

PAULSSON, M.

Basement membrane proteins: structure, assembly and cellular interactions.

Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 27:93-127 (1992).

PENQ, Q., MOAN, J., WARLOE, T., NESLAND, J. M., RIMINGTON, C.

Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma.

Int. J. Cancer. 52:433-443 (1992).

PENG, Q., WARLOE, T., BERG, K., MOAN, J., KONGSHAUG, M., GIERCKSKY, K. E., NESLAND, J. M.

5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges.

Cancer. 79:2282-2308 (1997).

PEREL'MAN, M. I., KORNILOVA, Z. K., PAUKOV, V. S., BOIKOV, A. K., PRIMAK, A. A.

The effect of carnosine on the healing of a lung wound.

Biull. Eksp. Biol. Med. 108:352-356 (1989a).

PEREL'MAN, M. I., BOIKOV, A. K., KORNILOVA, Z. K., PAUKOV, V. S., PRIMAK, A. A.

Experimental regeneration of the lungs

Biull. Eksp. Biol. Med. 107:612-615 (1989b).

PHALEN, R. F., OLDHAM, M. J.

Airway structures. Tracheobronchial airway structure as revealed by casting techniques.

Am. Rev. Respir. Dis. 128:1-4 (1983).

PLUMLEY, D. A., AUSTGEN, T., SALLOUM R. M., SOUBA, W. W.

Role of the lungs in maintaining amino acid homeostasis.

J. Parenter. Enteral. Nutr. 6:571-573 (1990a).

PLUMLEY, D. A., SOUBA, W. W., HAUTAMAKI, R. D., MARTIN, T. D., FLYNN, T. C., ROUT, R. R., COPELAND, E. M.

Accelerated lung amino acid release in hyperdynamic septic surgical patients.

Arch. Surg. 125:57-61 (1990b).

RAINA, S., PRESTON, G. M., GUGGINO, W. B., AGRE, P.

Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary gland, lacrimal, and respiratory tissues.

J. Biol. Chem. 270:1908-1912 (1995).

RAMSEY, B. W., DORKIN, H. L., EISENBERG, J. D., GIBSON, R. L., HARWOOD, I. R., KRAVITZ, R. M., SCHIDLOW, D. V., WILMOTT, R. W., ASTLEY, S. J., MCBURNIE, M., WENTZ, M., SMITH, A. L.

Efficiency of aerosolized tobramycin in patients with cystic fibrosis.

N. Engl. J. Med. 328:1740-1746 (1993).

RENNARD S. I., BECKMANN, J. D., ROBBINS, R. A.

Biology.

In: Crystal R. G., West, J. B., Barnes, P.J., Cherniack, N. S., Weibel, E. R. (Hrsg.). The lung: scientific foundations.

Raven Press, New York. 157-167 (1991).

RENNARD, S. I., ROMBERGER, D. J., SISSON, J. H., VON ESSEN S. G., RUBINSTEIN, I., ROBBINS, R. A., SPURZEM, J. R.

Airway Epithelial Cells: Functional Roles in Airway Disease.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150:27-30 (1994).

RÉRAT, A., SIMOES-NUNES, C., VAISAADE, M. P., VAUGELADE, P.

Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non anaesthetized pig.

Br. J. Nutr. 68:111-138 (1992).

RETSEMA, J. A., GIRARD, A. E., MILLISEN, W. B.

Relationship of high tissue concentrations of azithromycin to bacterial activity and efficiency in vivo.

J. Antimicro. Chemother. 25:83-89 (1990).

RIES, M., WENZEL, U., DANIEL, H.

Transport of cefadroxil in rat kidney brush-border membranes is mediated by two electrogenic H⁺-coupled systems.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 271:1327-1333 (1994).

RIORDAN, J. R., ROMMENS, J. M., KEREM, B. S., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., ZIELINSKI, J., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J. L., DRUMM, IANNUZZI, M. C., COLLINS, F. S., TSUI, L. C.

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary cDNA.

Science. 245:1066-1073 (1989).

ROSENSTEIN, B. J., ZEITLIN, P. L.

Prognosis in cystic fibrosis.

Curr. Opin. Pulm. Med. 1:444-449 (1995).

ROWE, P.M.

Photodynamic therapy begins to shine.

Lancet. 351:1496 (1998).

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science. 230:1350-1354 (1985).

- 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. Pharmacol. Exp. Ther. 275:1631-1637 (1995).
- SAITO, H. TERADA, T., OKUDA, M., SASAKI, S., INUI, K.
Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2.
Biochim. Biophys. Acta 1280:173-177 (1996).
- SAITO, H., MOTOHASHI, H., MUKAI, M., INUI, K.
Cloning and characterization of a pH-sensing regulatory factor that modulates transport activity of the human H⁺ peptide cotransporter, PepT1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 237:577-582 (1997).
- SALDISE, L., MARTÍNEZ, A., MONTUENGA, L. M., TRESTON, A., SPRINGALL, D. R., POLAK, J. M., VÁZQUEZ, J. J.
Distribution of peptidyl-glycine α amidating mono-oxygenase (PAM) enzymes in normal human lung and in lung epithelila tumors.
J. Histochem. Cytochem. 44:3-12 (1996).
- SCHIEBLER, T., SCHNEIDER, F.
Atmungsorgane.
In: Schiebler, T., Schneider, F. (Hrsg.). Histologie.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York. 438-464 (1991).
- SCHLAGHECK, T. G., WEBB, K. E.
Characterization of peptides from the gastrointestinal tract of calves.
Federation Proc. 43:671-677 (1984).
- SEAL, C. J., PARKER, D. S.
Isolation and characterization of circulating by molecular weight peptides in steer, sheep, and rat portal and peripheral blood.
Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 99:679-685 (1991).
- SHAH, S. K., BRAUSE, K. A., CHANDLER, G. O., FINKE, P. E., ASHE, B. M., WESTON, H., KNIGHT, W. B., MAYCOCK, A. L., DOHERTY, J. B.
Inhibition of human leukocyte elastase. 3. Synthesis and activity of 3'-substituted cephalosporins.
J. Med. Chem. 33:2529-2535 (1990).
- SHEN, H., SMITH, D. E., YANG, T., HUANG, Y. G., SCHNERMANN, J. B., BROSIUS, F. C. 3RD.
Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney.
Am. J. Physiol. 276:F658-F665 (1999).

SMITH D. E., PAVLOVA, A., BERGER, U. V., HEDIGER, M. A., YANG, T., HUANG, Y. G., SCHNERMANN, J. B.

Tubular localization and tissue distribution of peptide transporters in rat kidney. *Pharm. Res.* 15:1244-1249 (1998).

SMITH, J. J., TRAVIS, S. M., GREENBERG, E. P., WELSH, M. J.

Cystic fibrosis airway epithelial fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid.

Cell. 85:229-236 (1996)

SNIDER, G. L.

Protease-antiprotease imbalance in the pathogenesis of emphysema and chronic bronchial injury: a potential target for drug development.

Drug Dev. Res. 10:235-253 (1987).

SÖDERBERG M., S. HELLSTRÖM, T. SANDSTRÖM, R. LUNDGREN, A. BERGH.

Structural characterisation of bronchial mucosal biopsies from healthy volunteers: a light and electron microscopical study.

Eur. Respir. J. 1:883-889 (1988).

SOUBA, W.W., KLIMBERG, V. S., PLUMLEY, D. A., SALLOUM, R. M., FLYNN, T. C., BLAND, K. I., COPELAND, E. M.

The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection.

J. Surg. Res. 48:383-391 (1990).

STAUB, N. C., ALBERTINE, K. H.

The structure of the lungs relative to their principle function.

In: Murray, J. F., Nadel, J. A. (Hrsg.). *Textbook of Respiratory medicine.*

Saunders, Philadelphia. 12-36 (1988).

STEAD, R. J., HODSON, M. E., BATTEN, J. C.

Inhaled ceftazidime compared with gentamicin and carbenicillin in older patients with cystic fibrosis infected with *Pseudomonas aeruginosa*.

Br. J. Dis. Chest. 81:272-279 (1987).

STEINBACH, P., WEINGANDT, H., BAUMGARTNER, R., KRIEMAIR, M., HOFSTADTER, F., KNUCHEL, R.

Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid.

Photochem. Photobiol. 62:887-895 (1995).

STEINER, H.-Y., NAIDER, F., BECKER, J. M.

The PTR-family: a new group of peptide transporters.
Molecular Microbiology 16:825-834 (1995).

STEINKAMP, G., TUMMLER, B., GAPPA, M., ALBUS, A., POTEL, J., WILLIAMS-WARREN, J., WEBER, A., GORE, E. J., REDDING, G. J.
Safety of aerosol tobramycin administration for 3 months to patients with cystic fibrosis.
Pediatr. Pulmonol. 6:91-98 (1989).

STOCKLEY, R. A., HILL, S. L., BURNETT, D.
Proteinases in chronic lung infection.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 624:257-266 (1991).

STRUNK, R. D., EIDLEN, D. M., MASON, R. J.
Pulmonary alveolar type II cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways.
J. Clin. Invest. 81:1419-1426 (1988).

SUSTRONCK, B., DEPREZ, P., MUYLLE, E., VERMEERSCH, H., VANDENBOSSCHE, G., REMON, J. P.
Evaluation of the nebulisation of sodium ceftiofur in the treatment of experimental *Pasteurella haemolytica* bronchopneumonia in calves.
Res. Vet. Sci. 59:267-271 (1995).

SUTEDJA, T. G., POSTMUS, P. E.
Photodynamic therapy in lung cancer. A review.
J. Photochem. Photobiol. B. 36:199-204 (1996).

TAKAHASHI, K., NAKAMURA, N., TERADA, T., OKANO, T., FUTAMI, T., SAITO, H., INUI, K. I.
Interaction of β -lactam antibiotics with H^+ /peptide cotransporters in rat renal brush border membranes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 286:1037-1042 (1998).

TAM, E. K., CAUGHEY, G. H.
Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3:27-32 (1990).

TAMAI, I., NAKANISHI, T., HAYASHI, K., TERAOKA, T., SAI, Y., SHIRAGE, T., MIYAMOTO, K., TAKEDA, E., HIGASHIDA, H., TSUJI, A.
The predominant contribution of oligopeptide transporter PEPT1 to intestinal absorption of beta-lactam antibiotics in the small intestine.
J. Pharm. Pharmacol. 49:796-801 (1997).

TANAKA, H., MEYAMOTO, K.-I., MORITA, H., SEGAWA, H., SHIRAGA, T., FUJIOKA, A., KOUUDA, T., TAKETANI, Y., HISANO, S., FUKUI, Y., KITAGAWA, K., TAKEDA, E.
Regulation of the PepT1 peptide transporter in the rat small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury.
Gastroenterology. 114:714-723 (1998).

TEMPLE, C. S., BOYD, C. A. R.
Proton-coupled oligopeptide transport by rat renal cortical brush border membrane vesicles: a functional analysis using ACE inhibitors to determine the isoform of the transporter.
Biochim. Biophys. Acta. 1373:277-281 (1998).

TEMPLE, C. S., BRONK, J. R., BAILEY, P. D., BOYD, C. A. R.
Substrate-charge dependence of stoichiometry shows membrane potential is the driving force for proton-peptide cotransport in rat renal cortex.
Pfluegers Arch. 430:825-829 (1995).

TEMPLE, C. S., STEWART, A. K., MEREDITH, D., LISTER, N. A., MORGAN, K. M., COLLIER, I. D., VAUGHAN-JONES, R. D., BOYD, C. A. R., BAILEY, P. D., BRONK, J.
Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter.
J. Biol. Chem. 273:20-22 (1998).

TERADA, T., SAITO, H., MUKAI, M., INUI, K.
Recognition of beta-lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, in LLC-PK1 cells.
Am. J. Physiol. 273:F706-F711 (1997).

TERADA, T., SAITO, H., INUI, K.
Interaction of beta-lactam antibiotics with histidine residue of rat H⁺/peptide cotransporters, PEPT1 and PEPT2.
J. Biol. Chem. 273:5582-5585 (1998).

TERADA, T., SAWADA, K., SAITO, H., HASHIMOTO, Y., INUI, K.
Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2.
Am. J. Physiol. 276:G1435-G1441 (1999).

THOMPSON, D. C., DIAMOND, L., ALTIERE, R. J.
Enzymatic modulation of vasoactive intestinal peptide and nonadrenergic noncholinergic inhibitory responses in guinea pig trachea.
Am. Rev. Resp. Dis. 142:1119-1123 (1990).

TIKHOMIROVA, E. V., KORNILOVA, Z.K., OGLOBLINA, T. A., PEREL'MAN, M. I.

The effect of carnosine on the intracellular pH in cultured human embryonic lung fibroblasts. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 16:218-220 (1993).

TIRUPPATHI, C., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H.

Evidence for tripeptide-proton symport in renal brush border membrane vesicles. Studies in a novel rat strain with a genetic absence of dipeptidylpeptidase IV. *J. Biol. Chem.* 265:2048-2053 (1990a).

TIRUPPATHI, C., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H.

Kinetic evidence for a common transporter for glycylsarcosine and phenylalanyl-prolylalanine in renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 265:14870-14874 (1990b).

TIRUPPATHI, C., KULANTHAIVEL, P., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H.

Evidence for tripeptide/H⁺ cotransport in rabbit renal brush border membrane vesicles. *Biochem. J.* 268:27-33 (1990c).

TIRUPPATHI, C., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H.

Transport of peptides in renal brush border membrane vesicles. Suitability of ¹²⁵I-labeled tyrosyl peptides as substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1069:14-20 (1991).

TOM DIECK, S., 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 β -Ala-Lys-N_e-AMCA in Astrocytes. *Glia.* 25:10-20 (1999).

TRAINOR, D. A.

Synthetic inhibitors of human neutrophil elastase. *Trends Pharmacol. Sci.* 8:303-307 (1987).

TRAVIS, J., FRITZ, H.

Potential problems in designing elastase inhibitors for therapy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:1412-1415 (1991).

VALLEE, E., AZOULAY-DEPUIS, E., POCIDALO, J. J., BERGOGNE-BEREZIN, E.

Pharmakokinetics of four fluoroquinolones in an animal model of infected lung. *J. Antimicrob. Chemother.* 28:39-44 (1991).

WALKER, D., THWAITES, D. T., SIMMONS, N. L., GILBERT, H.J., HIRST, B. H.

Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J. Physiol.* 507:697-706 (1998).

WALL, M. A., TERRY, A. B., EISENBERG, J., MCNAMARA M., CEHEN, R.

Inhaled antibiotics in cystic fibrosis.

Lancet. 1:1325 (1983).

WANG, H., FEI, Y. J., GANAPATHY, V., LEIBACH, F. H.

Electrophysiological characteristics of the proton-coupled peptide transporter PEPT2 cloned from rat brain.

Am. J. Physiol. 275:C967-C975 (1998).

WEBBER, J., KESSEL, D., FROMM, D.

Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid.

J. Photochem. Photobiol. 37:151-153 (1997).

WENZEL, U., THWAITES, D. T., DANIEL, H.

Stereoselective uptake of β -lactam antibiotics by the intestinal peptide transporter.

Brit. J. Pharmacol. 116:3021-3027 (1995).

WENZEL, U., GEBERT, I., WEINTRAUT, H., WEBER, W.-M., CLAUSS, W., DANIEL H.

Transport characteristics of differently charged cephalosporin antibiotics in oocytes expressing the cloned intestinal peptide transporter PepT1 and in human intestinal Caco-2 cells.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:831-839 (1996).

WENZEL, U., DIEHL, D., HERGET, M., DANIEL, H.

Endogenous expression of the renal high-affinity H⁺-peptide cotransporter in LLC-PK1 cells.

Am. J. Physiol. 275:C1573-C1579 (1998).

WENZEL, U., DIEHL, D., HERGET, M., KUNTZ, S., DANIEL, H.

Regulation of the high-affinity H⁺/peptide cotransporter in renal LLC-PK₁ cells.

J. Cell. Physiol. 178:341-348 (1999).

WYSS-DESSERICH, M. T., SUN, C. H., WYSS, P., KURLAWALLA, C. S., HALLER, U., BERNIS, M. W., TADIR, Y.

Accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in normal and neoplastic human endometrial epithelial cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 224:819-824 (1996).

YAMASHITA, F., KIM, K. J., LEE, V. H.

Dipeptide uptake and transport characteristics in rabbit trachea epithelial cell layers cultured at an air interface.

Pharm. Res. 15:979-983 (1998).

ZAMBONI, L.

Preparation of percutaneous kidney biopsies for high resolution light microscopy.
Hum. Pathol. 3:127-132 (1972).

ZAYASU, K., SEKIZAWA, K., OKINAGA, S., YAMAYA, M., OHRUI, T., SASAKI, H.
Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156:1140-1143 (1997).

7 Veröffentlichungen

Veröffentlichungen zum Thema der Dissertation:

Originalarbeiten

David A. Groneberg, Monika Nickolaus, Jochen Springer, Frank Döring, Hannelore Daniel, Axel Fischer.

Localisation of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake.

Am. J. Pathol. Im Druck (2000).

David A. Groneberg, Hannelore Daniel, Frank Döring, Q. Thai Dinh, Peter J. Barnes, Kian Fan Chung, Axel Fischer.

Distribution and functional aspects of the oligopeptide transporter PEPT2 in normal and cystic fibrosis human lung.

Am. J. Resp. Crit. Care Med. Eingereicht (2000).

Abstracts

David A. Groneberg, Monika Nickolaus, Jochen Springer, Frank Döring, Hannelore Daniel, Axel Fischer.

Pulmonary uptake of oligopeptides: Expression and functional aspects of PEPT2 in airway tissue.

Am. J. Resp. Crit. Care Med. 159(3): A38 (1999).

David A. Groneberg, Monika Nickolaus, Jochen Springer, Frank Döring, Hannelore Daniel, Axel Fischer.

Oligopeptidaufnahme im Lungenepithel: Expression, Lokalisation und Funktion des Peptidtransporters PEPT2.

Annals of Anatomy 181 (Suppl.): 106 (1999).

David A. Groneberg, Monika Nickolaus, Frank Döring, Hannelore Daniel, Axel Fischer.
Expression, Lokalisation und funktioneller Nachweis des Oligopeptidtransporters PEPT2 im unteren Respirationstrakt.

Stefan Hormuth (Hrsg.) In: 5. Werkstattbericht aus Natur- und Lebenswissenschaften. Justus-Liebig-Universität Gießen. 135-136 (1999).

David A. Groneberg, Monika Nickolaus, Frank Döring, Hannelore Daniel, Axel Fischer.
Nachweis des Peptidtransporters PEPT2 auf transkriptioneller und translationaler Ebene in der Rattenlung mittels RT-PCR, Northern Blot, In-Situ Hybridisierung und Immunhistochemie.

Annals of Anatomy 182 (Suppl.): 170 (2000).

David A. Groneberg, Frank Döring, Hannelore Daniel, Axel Fischer.

Distribution of the oligopeptide transporter PEPT2 in normal human lung.

Am. J. Resp. Crit. Care Med. 161(3): A150 (2000)

David A. Groneberg, Paul Eynott, Frank Döring, Timothy Oates, Peter J. Barnes, Hannelore Daniel, K. Fan Chung, Axel Fischer.

Expression and functional aspects of the high-affinity low capacity oligopeptide transporter in human cystic fibrosis lung.

Am. J. Resp. Crit. Care Med. Eingereicht (2000).

David A. Groneberg, Paul Eynott, Q. Thai Dinh, Frank Döring, Peter J. Barnes, K. Fan Chung, Hannelore Daniel, Axel Fischer
Immunhistochemischer und funktioneller Nachweis des Peptidtransporters PEPT2 in normaler humaner Lunge.
Pneumologie. Im Druck (2000).

Weitere Veröffentlichungen:

Originalarbeiten:

Sam Lim, David A. Groneberg, Axel Fischer, Gaetano Caramori, Waldo Mattos, Timothy Oates, Ian Adcock, Peter J. Barnes, Kian Fan Chung
Expression of heme-oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and asthmatic airways: effect of inhaled corticosteroids.
Am. J. Resp. Crit. Care Med. Im Druck (2000).

David A. Groneberg, Petra Hartmann, Q. Thai Dinh, Sunil P. Sreedharan, Edward J. Goetzl, Axel Fischer
Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC₂ mRNA in human airways.
Lab. Invest. Eingereicht (2000).

David A. Groneberg, Frank Döring, Paul R. Eynott, Axel Fischer, Hannelore Daniel
Intestinal peptide transport: Ex vivo uptake studies and localization of the peptide carrier PEPT1.
Gut. Eingereicht (2000)

Invited Reviews:

David A. Groneberg, Jochen Springer, Axel Fischer
Mediators of Asthma: VIP, CGRP and NPY.
Pulm. Pharmacol. Ther. Im Druck

David A. Groneberg, Axel Fischer
Mediators of Asthma: Opioids.
Pulm. Pharmacol. Ther. Im Druck.

Abstracts:

Jörg Hänze, David A. Groneberg, Axel Fischer, Frank Rose, Ludger Fink, Werner Seeger, Friedrich Grimminger
Expression of an adrenomedullin-receptor subtype in pulmonary epithelial cells.
Am. J. Resp. Crit. Care Med. 161(3): A159 (2000).

Sam Lim, David A. Groneberg, Axel Fischer, Gaetano Caramori, Waldo Mattos, Timothy Oates, Ian Adcock, Peter J. Barnes, Kian Fan Chung
Expression of heme-oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and asthmatic airways: effect of inhaled corticosteroids.
Am. J. Resp. Crit. Care Med. 161(3): A332 (2000).

David A. Groneberg, Jörg Hänze, Axel Fischer
Expression and distribution of human adrenomedullin receptor mRNA in human lung.
Eur. Resp. J. 16(31): 73S (2000).

David A. Groneberg, Petra Hartmann, Axel Fischer
Localisation of VPAC₂ mRNA expression in human trachea and bronchi.
Annals of Anatomy 182 (Suppl.): 93-94 (2000).

David A. Groneberg, Sam Lim, Peter J. Barnes, Kian Fan Chung, Axel Fischer
Heme-oxygenase isoenzyme I and II expression in bronchial biopsies of asthmatics before
and after inhaled glucocorticoid treatment.
Allergy Clin. Immunol. Int. Im Druck (2000).

David A. Groneberg, Petra Hartmann, Q. Thai Dinh, Edward Goetzl, Axel Fischer
Nachweis der VPAC₂-Rezeptor-mRNA in zentralen humanen Atemwegen durch In-situ-
Hybridisierung und Northern Blotting.
Pneumologie. Im Druck (2000).

Kasuistiken:

David A. Groneberg, Werner Adolphs, Gerald Hensel
Traumatic epiphyseolysis capitis femoris in early adolescence.
Eur. J. Orthop. Surg. Trauma. Im Druck (2000).

Yen F. Tai, David A. Groneberg, J. H. Pereira
Cholestatic syndrome caused by extensive diaphragmatic herniation with intrathoracic
pancreatic tumour and twisted common bile duct.
J. Gastroenterol. Hepatol. Eingereicht (2000).

8 Lebenslauf

11.12.1973	geboren in Frankfurt am Main als ältester Sohn von Angela und Michael Groneberg
1980-1984	Grundschule Hadamar
1984-1993	Fürst-Johann-Ludwig-Schule, Abitur
10/1993	Beginn des Medizinstudiums Justus-Liebig-Universität Gießen
8/1995	Ärztliche Vorprüfung
11/1995	Beginn der Promotionsarbeit
8/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999/2000	Praktisches Jahr am St. Vincenz Krankenhaus Limburg, Justus-Liebig-Universität Gießen und am James Paget Hospital, University of Cambridge, Großbritannien
5/2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5-8/2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter am National Heart and Lung Institute, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London, Großbritannien (DAAD-Stipendium)
seit 8/2000	Arzt im Praktikum, Klinische Forschergruppe Allergologie, Charité Campus Virchow, Humboldt-Universität zu Berlin

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. A. Fischer möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas danken. Durch die vielen intensiven Diskussionen und freundschaftlichen Gespräche brachte er mir das Gebiet der Molekular- und Zellbiologie nahe und förderte mich zudem bei der Mitarbeit an weiteren Projekten. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. H. Daniel durch deren Arbeiten auf dem Gebiet des Peptidtransports sowie fachlicher und materieller Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht wurde.

Herrn Prof. Dr. W. Kummer danke ich für die stets freundliche Unterstützung und Möglichkeit der Mitarbeit in dem von ihm geleiteten Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität.

Herrn Prof. Dr. K. F. Chung und Herrn Prof. Dr. P. J. Barnes sowie Frau Dr. H. Patel und Herrn Dr. S. Lim vom National Heart and Lung Institute, Department of Thoracic Medicine, Royal Brompton Hospital, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente mit Mukoviszidosegeweben. Durch den Deutschen Akademischen Auslandsdienst wurde ein Aufenthalt im Rahmen der Arbeiten am National Heart and Lung Institute ermöglicht.

Für die geduldige und freundliche Unterstützung der technischen Durchführung der Arbeit in Gießen möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn M. Bodenbenner, Frau T. Fischbach, Frau A. Goldenberg, Frau P. Hartmann, Frau C. Michael, Frau Claudia Tag und Frau S. Wiegand bedanken.

Das Erlernen molekularbiologischer Techniken wurde mir durch einen Aufenthalt an der Anatomie der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin ermöglicht. Hier sei Herrn Prof. Dr. S. Bachmann sowie Herrn R. Schmitt und Herrn M. Hüning für wertvolle Anleitungen gedankt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. F. Döring, Herrn Dr. R. Haberberger, Frau Dipl. Oec.-troph. M. Nickolaus, Herrn J. Oehler, Herrn Q. T. Dinh und Herrn Dipl. Biol. J. Springer aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie und dem Institut für Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität, sowie dem Institut für Ernährungswissenschaften der Technischen Universität München bin ich für die fachlichen Ratschläge, lebhaften Diskussionen und technischen Hilfestellungen dankbar.

Bei meinen Eltern Angela und Mike, Geschwistern Rafael und Sarah und meiner Paten-tante Frau Dr. P. Velho-Groneberg möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Beatrix Kloft für die liebevolle Zuwendung und Ihr Verständnis in den letzten Jahren danken.