

Aus der Klinik für Pädiatrie  
mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Morphologische Charakterisierung des pulmonalen  
Phänotyps Peptidtransportergen-depletierter Mäuse

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hanna Beke Paul  
aus Berlin

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. D. Groneberg

2.: Prof. Dr. Th. Penzel

3.: Priv.-Doz. Dr. B. Kütting

Datum der Promotion: 20.11.2009

Für meine Eltern

## **Inhaltsübersicht**

<b><u>Inhaltsübersicht</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	<b><u>2</u></b>
<b><u>Abbildungsverzeichnis</u></b>	<b><u>4</u></b>
<b><u>Tabellenverzeichnis</u></b>	<b><u>6</u></b>
<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b><u>2. Material und Methoden</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>3. Ergebnisse</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>4. Diskussion</u></b>	<b><u>58</u></b>
<b><u>5. Zusammenfassung</u></b>	<b><u>70</u></b>
<b><u>6. Summary</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b><u>7. Literaturverzeichnis</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b><u>8. Veröffentlichungen</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b><u>9. Danksagung</u></b>	<b><u>84</u></b>

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsübersicht .....	1
Inhaltsverzeichnis .....	2
Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis .....	6
1 Einleitung .....	7
1.1 Grundlagen .....	7
1.2 Transportsysteme des Atemwegsepithels .....	8
1.3 Der pulmonale Peptidtransporter PEPT2 .....	11
1.3.1 Transporterstruktur .....	11
1.3.2 Funktionelle Eigenschaften von PEPT2 .....	12
1.3.3 Substrate .....	14
1.4 Ziele der Arbeit .....	16
2 Material und Methoden .....	17
2.1 Material .....	17
2.1.1 Versuchstiere .....	17
2.1.2 Gewebe für Genotypisierung und Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	17
2.1.3 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung für Morphologie .....	17
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Genotypisierung der Pept-2-Knockout Mäuse .....	19
2.2.2 Kryostattechnik .....	21
2.2.3 $\beta$ -Galaktosidase-Expression .....	21
2.2.4 Immunhistochemie .....	22
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	23
2.2.4 Masson-Goldner-Färbung .....	23
2.2.5 PAS-Färbung .....	24
2.2.6 Ultrastrukturelle Techniken .....	24
3 Ergebnisse .....	26
3.1 Genotypisierung .....	26
3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Expression .....	26
3.3 Immunhistochemie .....	27
3.3.1 Wildtyp-Tiere .....	27
3.4 Histomorphologische Untersuchungen .....	28
3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	28
3.4.2 Masson-Goldner-Färbung .....	34
3.4.3 PAS-Färbung .....	38
3.5 Ultrastrukturelle Untersuchungen .....	42
3.5.1 Semidünnschnitte .....	42
3.6 Elektronenmikroskopische Morphologie .....	50
3.6.1 Wildtyp-Mäuse .....	50
3.6.2 Gen-depletierte-Mäuse .....	54
4 Diskussion .....	58
4.1 Einleitung .....	58
4.1.1 Pulmonaler Peptidmetabolismus .....	59
4.2 Diskussion der Methodik .....	60
4.3 Biologische Bedeutung der Befunde .....	63
4.3.1 Endogene Substrate für PEPT2 .....	65
4.3.2 Exogene Substrate .....	67
4.4 Ausblick .....	69
5. Zusammenfassung .....	70

## Inhaltsverzeichnis

---

6. Summary .....	71
7. Literaturverzeichnis.....	72
8. Veröffentlichungen.....	83
9. Danksagung.....	84

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Transportvorgänge im Atemwegsepithel
- Abbildung 2:** Struktur des PEPT2- Proteins
- Abbildung 3:** Funktion des Peptidtransporters als tertiär aktiver Transporter
- Abbildung 4:** Oligopeptide als Substrate des Peptidtransporters
- Abbildung 5:** Transport von exogenen Substraten durch PEPT2
- Abbildung 6:** Exemplarische Gelelektrophorese zu PEPT<sup>-/-</sup> und PEPT<sup>+/+</sup>
- Abbildung 7:**  $\beta$ -Galaktosidaseexpression bei den Gen-depletierten Tieren
- Abbildung 8:** Bronchioli der Kontrolltiere (HE-Färbung)
- Abbildung 9:** Alveolarepithel der Kontrolltiere (HE-Färbung)
- Abbildung 10:** HE-Färbung von Gen-depletierten murinen Lungenpräparaten
- Abbildung 11:** HE-Färbung des Alveolarepithels muriner Gen-depletierter Lungenpräparate
- Abbildung 12:** Masson-Goldner-Färbung der Kontrolltier-Lungenpräparate
- Abbildung 13:** Masson-Goldner-Färbung der Gen-depletierten Tierlungen
- Abbildung 14:** PAS-Färbung der Lungenpräparate der Kontrolltiere
- Abbildung 15:** PAS-Färbung der Gen-depletierten Tierlungen
- Abbildung 16:** Semidünn-Schnitte der Lungenpräparate der Kontrolltiere
- Abbildung 17:** Semidünn-Schnitte der murinen Lungenpräparate der Kontrolltiere
- Abbildung 18:** Semidünn-Schnitte der Gen-depletierten- Mäuselungen
- Abbildung 19:** Semidünn-Schnitte der Gen-depletierten- Mäuselungen
- Abbildung 20:** Semidünn-Schnitte der Gen-depletierten- Mäuselungen
- Abbildung 21:** Elektronenmikroskopische Abbildung der Lungenpräparate der Kontrolltiere. Bronchioli
- Abbildung 22:** Elektronenmikroskopische Abbildung der Lungenpräparate der Kontrolltiere. Regelrechtes Alveolarepithel
- Abbildung 23:** Elektronenmikroskopische Abbildung eines Kontrolltierpräparates  
Darstellung eines pulmonalen peripheren Nervens

- Abbildung 24:** Elektronenmikroskopische Abbildungen von Gen-depletierten Lungenpräparaten. Bronchialepithel
- Abbildung 25:** Elektronenmikroskopische Abbildungen von Gen-depletierten Lungenpräparaten. Ablagerungen mit zellmembranähnlicher Struktur
- Abbildung 26:** Elektronenmikroskopische Abbildungen von Gen-depletierten Lungenpräparaten
- Abbildung 27:** Elektronenmikroskopische Abbildungen von Gen-depletierten Lungenpräparaten. Kinozilien im Querschnitt. „9+2“  
Strukturanordnung der Mikrotubuli

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Verteilung der H<sup>+</sup>- abhängigen Peptidtransporter in Organen, Zellen und subzellulären Kompartimenten
- Tabelle 2:** Primer zur Amplifikation einer lacZ- Kasette
- Tabelle 3:** Primer zur Amplifikation eines Fragments des PEPT2- Gens
- Tabelle 4:** Sekundärantikörper

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen

Die Atmungsorgane lassen sich in obere (Nase, Pharynx) und untere luftleitende Abschnitte (Larynx, Trachea, Bronchialbaum) untergliedern, wobei der Gasaustausch in den respiratorischen Abschnitten, den Bronchioli respiratorii und terminales und dem Alveolarbereich stattfindet.

Histologisch lassen sich die Atemwege in 3 Schichten gliedern:

- Tunica mucosa, bestehend aus Lamina epithelialis und Lamina propria,
- Tunica fibromusculocartilaginea,
- Tunica adventitia.

Die Lamina epithelialis der Tunica mucosa wird vom so genannten respiratorischen Epithel gebildet, das ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel mit oraler Schlagrichtung der Kinozilien ist. In den verschiedenen Abschnitten bestehen charakteristische Unterschiede im Aufbau des Epithels, z.B. nimmt seine Reihigkeit entlang des Bronchialbaumes ab und auch der Anteil der verschiedenen Zelltypen ist unterschiedlich. Ab den Bronchioli terminales kommen anstelle der Becherzellen Clara-Zellen vor, die möglicherweise Vorläuferzellen für andere Bronchiolarzellen sind.

Den letzten Abschnitt des Bronchialbaumes stellen der Ductus alveolaris und der Sacculus alveolaris dar, die mit ihren Alveolen aus dem Bronchiolus respiratorii hervorgehen. Ihr mittlerer Durchmesser beträgt 250-280  $\mu\text{m}$ . Bei einer Anzahl von rund 300 Mio. Alveolen errechnet sich eine für den Gasaustausch zur Verfügung stehende Oberfläche von ca. 70 bis 140  $\text{m}^2$  beim erwachsenen Menschen (Duncker, 1994). Das Alveolarepithel besteht aus zwei Zelltypen, den Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ I und Typ II. Die Pneumozyten Typ I, deren Zytoplasma zu flächig ausgebreiteten, dünnen Platten ausgezogen ist, bekleiden den größten Teil der inneren Oberfläche der Lunge (~95%), wobei sie beim Menschen nur einen geringen Anteil von ca. 8% aller Zellen der Interalveolarepten ausmachen. Die Typ I Pneumozyten werden auch Deckzellen genannt und fungieren als dünne Trennfläche zwischen Gefäßsystem und Alveolarraum, als Teil der Blut-Luft-Schranke. Weitere Bestandteile der Blut-Luft-Schranke sind die Endothelzellen der Alveolenkapillaren und die Basallaminae von Alveolardeckzellen und Endothelien.

Ungefähr 7 % der Alveolaroberfläche wird von den Pneumozyten Typ II, auch Nischenzellen genannt, bedeckt. Sie weisen die typischen Kennzeichen von sezernierenden Zellen auf, denn sie enthalten dicht gepackte Membranstapel, die zur Bezeichnung multilamelläre Körperchen

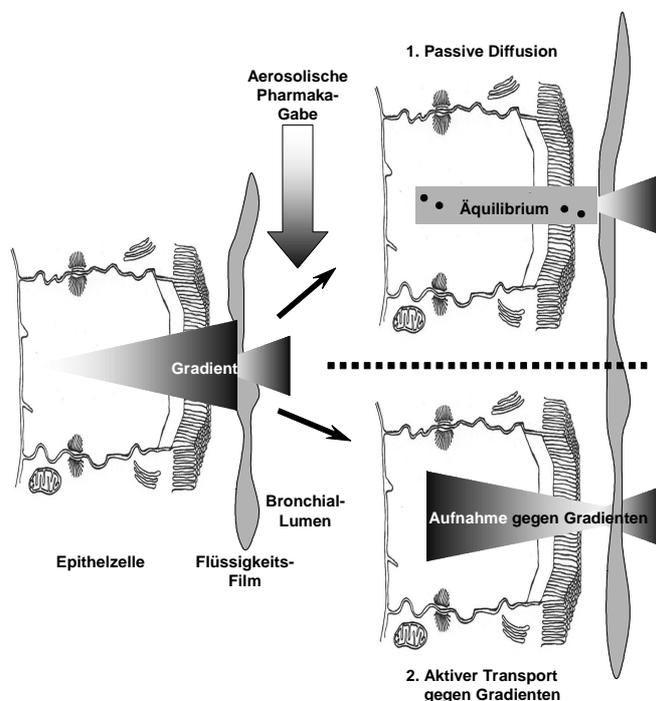
geführt haben (Wagner et al., 2003) Für die Integrität des Alveolarraums besitzen die Nischenzellen eine unentbehrliche Funktion, die in der Weiterdifferenzierung zu Typ I-Pneumozyten (Adamson et al., 1974) und in der Synthese und Sekretion von oberflächenaktivem Surfactant liegt.

Ferner befinden sich im Alveolarraum Bürstenzellen und Alveolarmakrophagen. Die Alveolarmakrophagen gehen aus Blutmonozyten hervor und tragen durch ihren Phagozytoseapparat wesentlich zur Selbstreinigung der Lunge bei.

## 1.2 Transportsysteme des Atemwegsepithels

Für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist die ständige Aufnahme kleiner organischer Moleküle aus dem Extrazellulärraum über Transportsysteme in der Plasmamembran der Zelle notwendig.

Denn neben Transportvorgängen wie der passiven Diffusion, Endo- sowie Exozytose, bei denen sich Substrate im Sinne eines Konzentrations- Equilibriums verteilen, bedarf es außerdem noch Membrantransportproteine, die im Unterschied zur passiven Diffusion eine unterschiedliche Zusammensetzung von Extrazellulärraum und Zytosol ermöglichen (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Transportvorgänge im Atemwegsepithel.

Verschiedene Transportsysteme konnten in den vergangenen Jahren in der Lunge funktionell nachgewiesen werden. Glukosetransporter (Kemp et al., 1992), Ionentransporter (Ballard et al., 1991), (Bland et al., 1986), (Kemp et al., 1994) Natrium-Aminosäure-Kotransporter (Brown et al., 1985) sowie auch Oligopepid-Transporter (Groneberg et al., 2001b) konnten dabei charakterisiert werden. Peptidtransporter sind in der Natur ubiquitär und scheinen eine früh in der Evolution entstandene Gruppe von Transmembransystemen darzustellen. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts vermutete Emil Abderhalden, dass die Abbauprodukte der luminalen Proteinverdauung nicht nur als Aminosäuren, sondern auch als Di- und Tripeptide am Darmepithel absorbiert werden (Abderhalden, 1905). So war es auch der Protonengekoppelte Oligopeptidtransporter PEPT1, der als erster identifizierter Säugetiertransporter im Dünndarm entdeckt wurde (Boll et al., 1994; Fei et al., 1994). 1996 konnte erstmals in den Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere ein weiterer Peptidtransporter (PEPT2) molekular identifiziert werden (Boll et al., 1996). In der Niere dient PEPT2 der Konservierung von Stickstoffgruppen durch die Rückresorption aus dem Primärharn (Daniel et al., 1997). Nachdem PEPT1 im Dünndarm und PEPT2 in den Nieren entdeckt wurde, versuchte man Zusammenhänge zwischen bereits dargestellten Aufnahmekapazitäten in den Atemwegen (Yamashita et al., 1997, 1998) und den Transporterproteinen zu entschlüsseln (Groneberg, 2003). Daraus resultierte die Identifizierung von PEPT2 in Lungengewebe von Ratten, Kaninchen und Mäusen sowie auch in der humanen Lunge (Boll et al., 1996; Liu et al., 1995; Rubio-Aliaga et al., 2000) (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Verteilung der H<sup>+</sup>-abhängigen Peptidtransporter in Organen, Zellen und subzellulären Kompartimenten.

<b>Peptidtransporter</b>	<b>Organ</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Referenz</b>
<u>PEPT1</u>	Dünndarm	Apikale Membran der Enterozyten	(Ogihara et al., 1996)
	Niere	Apikale Membran der epithelialen Zellen des S1-Segments des proximalen Tubulus; Membran von Lysosomen	(Shen et al., 1999), (Zhou et al., 2000) (Groneberg et al., 2002a)

## Einleitung

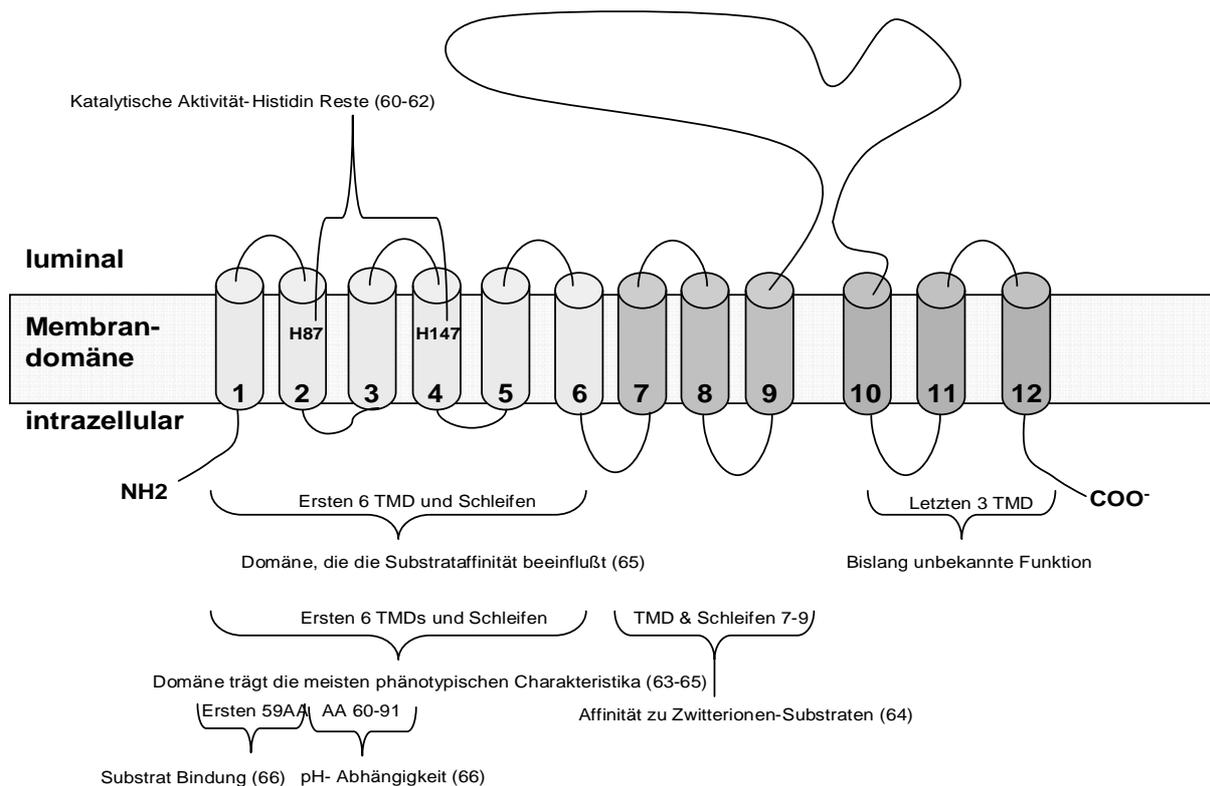
	Pankreas	Kernmembran von vaskulären, glatten Muskelzellen, Schwannschen Zellen und Lysosomen der askinaren Zellen	(Bockman et al., 1997)
	Gallengang	Apikale Membran der Cholangiozyten	(Knutter et al., 2002)
	Pancreas	Lysosomen	(Bockman et al., 1997)
<u>PEPT2</u>	Niere	Apikale Membran der epithelialen Zellen des proximalen Tubulus (S2 und S3 Segment)	(Shen et al., 1999) (Groneberg et al., 2002a)
	ZNS	Membran und Zytoplasma von Gliazellen; Astrozyten; epitheliale Zellen des Choroid-Plexus der ependymalen Zellen und der Astrozyten; Astroglia	(Groneberg et al., 2004b) (Dieck et al., 1999) (Berger et al., 1999) (Novotny et al., 2000) (Dringen et al., 1998)
	PNS	Membran und Zytoplasma von Gliazellen	(Groneberg et al., 2001a)
	Lunge	Apikale Membran von bronchialen und trachealen epithelialen Zellen, Membran und Zytoplasma von Pneumozyten Typ II	(Groneberg et al., 2002c)
	Brustdrüse	Epitheliale Zellen der Drüsen und Gänge	(Groneberg et al., 2002b)

Die Organexpression wurde nachgewiesen mittels RT-PCR, Northern Blot, *In-situ* Hybridisierung und Immunohistochemie.

### 1.3 Der pulmonale Peptidtransporter PEPT2

#### 1.3.1 Transporterstruktur

PEPT2 gehört zur Familie der protonen-abhängigen Oligopeptid-Transporter (POT), die zurzeit ~70 klonierte Transporter in einer Vielzahl von Organismen umfasst. Alle Proteine der POT- Familie zeichnen sich durch eine große Anzahl identischer und ähnlicher Sequenzmotive aus (Graul et al., 1997). Peptidtransporter sind in der Natur ubiquitär und scheinen eine früh in der Evolution entstandene Gruppe von Transmembransystemen darzustellen. Der humane PEPT2 (hPEPT2) Transporter wurde auf dem Chromosom 3q13.3 – q21 (Ramamoorthy et al., 1995) lokalisiert. Die Transporter variieren in ihrer Größe von 450 bis über 700 Aminosäuren und sind in Prokaryonten wesentlich kleiner als in Eukaryonten. Die cDNA besteht aus einem ca. 2,190-bp-langen offenen Leserahmen mit einem Protein aus ~ 729 Aminosäuren. Die Analyse der Aminosäuresequenz lässt auf 12 transmembranäre Domänen schließen mit ähnlicher Struktur wie bei PEPT1 (Abb. 2).

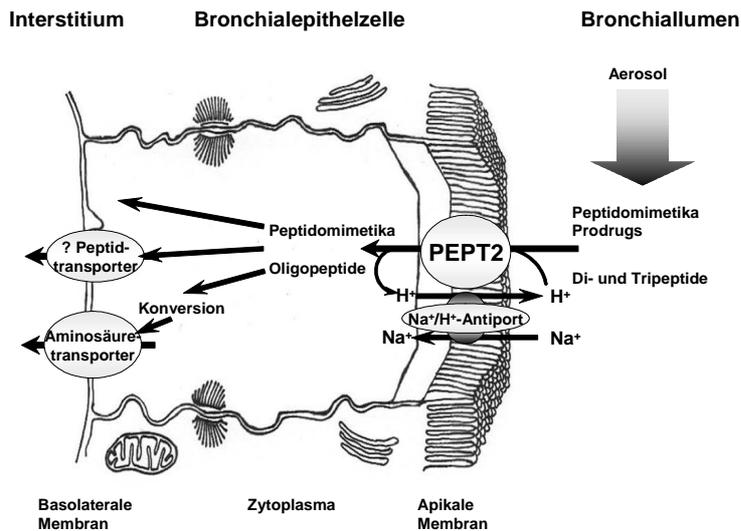


**Abbildung 2:** Struktur des PEPT2- Proteins.

Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende liegen im Zytosol. Die Primärstruktur von PEPT2 weist eine 50% Identität zum humanen intestinalen  $H^+$ / Peptid-Kotransporter PEPT1 auf (Liu et al., 1995). Die größten Unterschiede zwischen den beiden Transporterproteinen wurden in der großen extrazellulären Schleife gefunden, die die transmembranären Domänen (TMDs) 9 und 10 miteinander verbindet. Um herauszufinden welche genaue Rolle die Proteindomänen für die funktionellen Eigenschaften von PEPT2 spielen, wurden Mutagenese-Studien durchgeführt und chimäre Peptidtransporter bestehend aus bestimmten PEPT2 Regionen analysiert. Diese Studien zeigten, dass erhaltene Histidin-Reste in der zweiten und vierten TMD von PEPT2 für die Transportaktivität notwendig sind (Brandsch et al., 1997; Fei et al., 1997; Terada et al., 1996). Weitere Studien mit chimären Peptidtransportern zeigten außerdem, dass es insgesamt die ersten 6 TMDs und Schleifen des PEPT2 Proteins sind, die den Phänotyp hauptsächlich determinieren (Doring et al., 1996; Fei et al., 1998) und dass die TMD 7 bis 9 für die Affinität zu Zwitterionen eine Rolle spielen. Die ersten 6 TMDs stellen somit insgesamt die Basis für die Substratbindungsstelle dar, (Terada et al., 2000) während die zwei identifizierten Regionen des Amino-Endes die entscheidende Rolle bezüglich der Substrataffinität spielen (Doring et al., 2002).

### **1.3.2 Funktionelle Eigenschaften von PEPT2**

Auf molekularer Ebene geschieht der Oligopeptidtransport durch Kopplung an einen zelleinwärts gerichteten elektrochemischen Protonengradienten (Daniel & Herget, 1997). Dieser Protonengradient wird durch die Aktivität des  $Na^+ / H^+$  -Antiporters aufrechterhalten (Temple et al., 1995) (Abb. 3), wobei der  $Na^+ / H^+$  - Antiporter mit Hilfe eines  $Na^+$  - Gradienten einen  $H^+$  -Gradienten aufbaut. Der  $Na^+$ -Gradient wiederum wird primär aktiv durch die sich an der basolateralen Membran befindliche  $Na^+ / K^+$  - ATPase erzeugt. PEPT2 ist also ein tertiär aktiver Transporter.



**Abbildung 3:** Funktion des Peptidtransporters als tertiär aktiver Transporter.

Die Mechanismen der Substraterkennung, Aufnahme und Transfer durch PEPT2 sind stark abhängig vom Membranpotential und dem extrazellulären pH. Das pH – Optimum für den PEPT2- abhängigen Transport liegt bei pH 4.5-6.5 in Abhängigkeit von der Nettoladung des jeweiligen Substrats (Daniel et al., 2003). Da die Umgebung des respiratorischen Epithels unter normalen Bedingungen einen relativ stabilen, leicht sauren pH von ~ 6.5 besitzt, findet physiologisch ein optimaler Transport von Peptiden statt, die bei einem pH von 6.5 ungeladen vorliegen.

Die Transportrate kann erhöht werden, wenn das Membranpotential hyperpolarisiert ist und ein niedrigerer pH mit einem extrazellulärem Überschuss an Protonen vorliegt, wie es beispielsweise der Fall bei Asthma bronchiale ist.

Durch die Kopplung des Substrattransports an einen elektrochemischen Gradienten kann das PEPT2-System ebenfalls als ein zellulärer Säure-Lieferant im Lungenepithel angesehen werden. Aufgrund der Abhängigkeit von einem Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> -Antiport wird auf der anderen Seite die Na<sup>+</sup> - Aufnahme in die Zelle erhöht, um die intrazelluläre Homöostase zu gewährleisten. Im Verdauungstrakt konnte nachgewiesen werden, dass der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> -Austauscher NHE3 als sekundär aktiver Transport in die Prozesse eingebunden ist (Thwaites et al., 2002). Da NHE3 in der Lunge nicht nachgewiesen wurde, könnten es andere Transporter wie z.B. NHE1 (Al-Bazzaz et al., 2001) sein, die die Aufgabe des Na<sup>+</sup> – Austausches in den Atemwegs-epithelzellen übernehmen.

Nach Aufnahme von Di- und Tripeptiden in die Epithelzellen der Atemwege werden diese schnell durch zelluläre zytosolische Peptidasen hydrolysiert. Die so entstehenden Aminosäuren können dann von den Zellen für die Synthese spezifischer Mediatoren oder

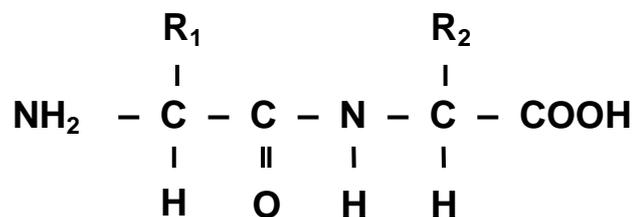
auch für den zellulären Stoffwechsel genutzt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Abtransport durch basolaterale Aminosäuretransporter.

### 1.3.3 Substrate

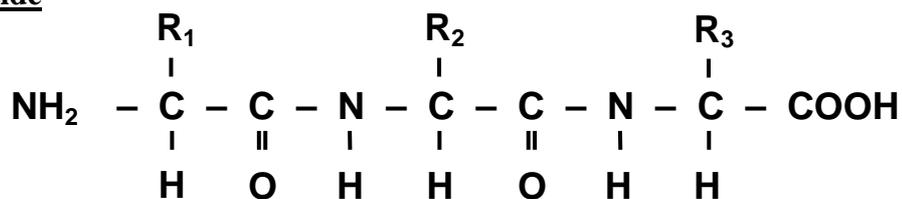
#### 1.3.3.1 Endogene Substrate

Die beiden Peptidtransporter zählen zu den multispezifischen Transportern, da sie ein sehr breites Substratspektrum aufweisen. Sie transportieren Di- (Daniel, 1993) und Tripeptide (Tirupathi et al., 1990a, 1990b, 1991; Tirupathi et al., 1990c), aber keine Aminosäuren oder Tetrapeptide. Theoretisch können alle Di- und Tripeptide als Substrate von PEPT1 und PEPT2 erkannt werden (Abb. 4). 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. Ein weiteres endogenes Substrat stellt die Delta-Aminolävulinsäure dar (Abb. 4).

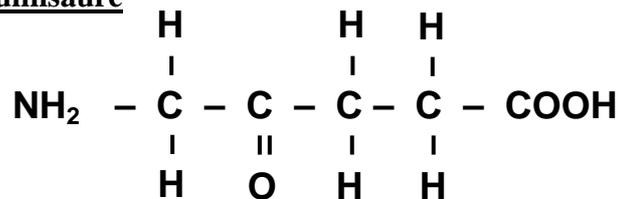
#### Dipeptide



#### Tripeptide



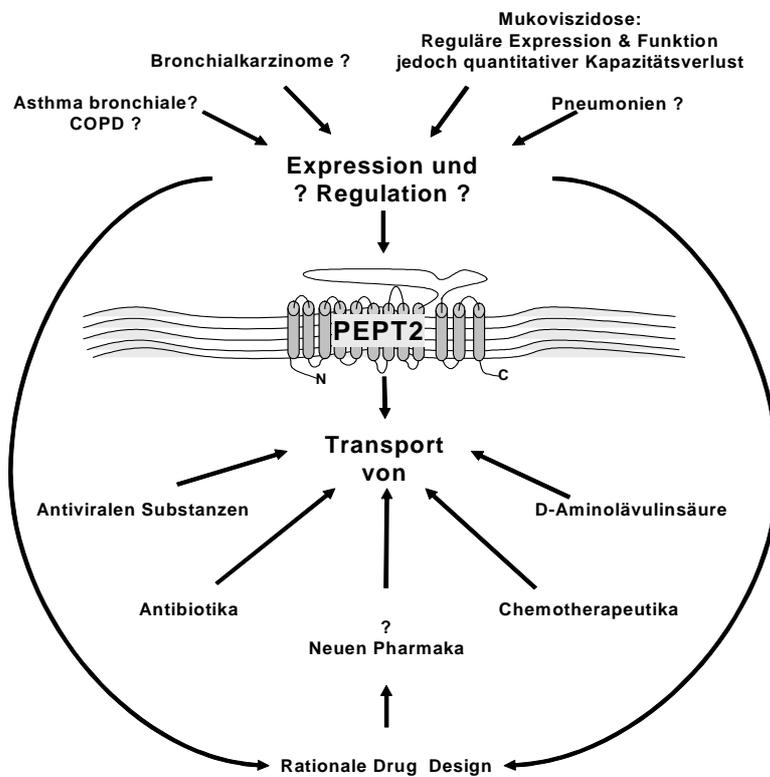
#### Delta-Aminolävulinsäure



**Abbildung 4:** Oligopeptide und Delta-Aminolävulinsäure als Substrate des Peptidtransporters. R=Reste

1.3.3.2 Exogene Substrate

Neben dem Transport von Oligopeptiden können PEPT1 und PEPT2 auch zahlreiche pharmakologisch aktive Substrate transportieren und sind dadurch in das Blickfeld therapeutischer Überlegungen gerückt (Abb. 5). Innerhalb der großen Gruppe der Antibiotika gehören vor allem die Betalaktame mit Penicillinen und Cephalosporinen zu den von PEPT2 transportierten Substraten, da sie eine tripeptidähnliche Struktur besitzen (Quay, 1972) Ebenso zählen Zytostatika (Nakanishi et al., 2000; Nielsen et al., 2003) und antivirale Verbindungen wie Valacyclovir zu Substraten des Peptidtransporters.



**Abbildung 5:** Transport von exogenen Substraten durch PEPT2.

### ***1.4 Ziele der Arbeit***

Der Wissensstand über die Expression, Lokalisation und Funktion von Peptidtransportern in zahlreichen Organen wie z.B. Darm, Niere und ZNS ist mittlerweile sehr detailliert. Demgegenüber ist es erst in der jüngeren Vergangenheit gelungen das Transportsystem, PEPT2 in der Lunge zu identifizieren (Groneberg, 2001).

Für ein Verständnis der genauen Transportvorgänge ist die Kenntnis über die Histomorphologie unerlässlich. Ein zentrales Anliegen dieser Arbeit ist es daher, einen Beitrag zur Aufschlüsselung der Transportvorgänge in der Lunge zu leisten. Es eröffnen sich damit nicht nur Einblicke in die Steuerungsvorgänge der Zellen, es können hierdurch auch Anstöße bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze gegeben werden.

Aus den oben genannten Gründen ergibt sich folgende Zielsetzung:

#### **Morphologische Charakterisierung des pulmonalen Phänotyps Peptidtransportergen-depletierter Mäuse.**

Dabei sollte insbesondere folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Führt die gezielte Ausschaltung eines elektrogenen Nährstofftransportproteins der Zellmembran zu einer morphologischen Veränderung des Lungengewebes?
2. Kann es sich bei Veränderungen wie Entzündung, Fibrose, Epithelhyperplasie bzw. bislang unbekanntem Erscheinungen, um Befunde handeln, die mit der Funktion des Peptidtransporters in Verbindung stehen?

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Material***

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden insgesamt 15 Balb/c Mäuse verwendet (vom Land Berlin genehmigter Tierversuch). Die Tiere wurden unter Standardlaborrichtlinien gehalten. Die zu untersuchenden und bezüglich renaler Veränderungen bereits beschriebenen PEPT2<sup>-/-</sup> Mäuse stammen von dem Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie der TU München (Leiterin: Fr. Prof. Dr. H. Daniel) (Rubio-Aliaga et al., 2003). Sie basieren auf einem C57BL/6- und 129/Sv-Hintergrund und sind auf 7-10 Generationen rückgekreuzt (Abb.6). Die 6 Monate alten Tiere wurden in einer temperatur-kontrollierten Umgebung und einem 12 Stunden Tages- und 12 Stunden Nachtzyklus gehalten.

#### **2.1.2 Gewebe für Genotypisierung und Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Für die Genotypisierung und die PCR wurden Organe von sechs Mäusen frisch entnommen und entweder sofort weiterprozessiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### **2.1.3 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung für Morphologie**

##### **2.1.3.1 Fixierung für lichtmikroskopische Morphologie**

Vor der transkardialen Perfusion wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von Ketamin-HCL (50mg/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 0,3 ml Heparin (Hoffmann-La Roche, Grenach-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 wurde zuerst eine Vorspüllösung (2,5% Polyvinylpyrrolidon (Roth, Karlsruhe), 0,9% NaCl, 0,5% Procainhydrochlorid (Merck, Darmstadt), 1ml Heparin (Hoffmann-La Roche, Grenzach, Wyhlen), pH 7,4 (Forssmann et al. 1977)) perfundiert. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehyd-Fixierlösung (4% Paraformaldehyd (T.J. Baker, Deventer, Niederlande), 1x Phosphat-puffer (PBS (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)). Das Paraformaldehyd (T.J.Baker, Deventer, Niederlande) wurde vor jeder Perfusionsreihe als 4%ige Lösung in 1x PBS frisch angesetzt und auf pH 7,4 eingestellt (Kummer et al., 1990) Nach der Fixierung wurde 1mal t = 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 H<sub>2</sub>O, pH 7,4) immersiirt. Anschließend wurden die Lungen mit dem Gefrierschutzeinbettungsmedium Tissue Tek (Leica, Wetzlar) aufgebläht, auf Rundfilter (Schleicher und Schnell) aufgebracht und in Stickstoff-gekühltem Isopentan (Rieder-de haen, Seelze) schockgefroren und danach bei -80°C aufbewahrt.

### 2.1.3.2 Fixierung für ultrastrukturelle Morphologie

Die Fixierung erfolgte wie bereits unter 2.1.3.1 beschrieben. Anstelle von Paraformaldehyd wurde gepuffertes Glutaraldehyd (2,5% Glutaraldehyd und 0.1 molarem Phosphatpuffer) verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Genotypisierung der Pept-2-Knockout Mäuse

#### 2.2.1.1 Methode nach Chikara Kokubu, GSF

Mit 500µl Tail buffer und 0,5 mg/ml Proteinase K wurden 5 mm Mäuseschwanz (frisch oder bei -20°C aufbewahrt) über Nacht bei 65°C unter kontinuierlichem Schütteln verdaut. Zur Inaktivierung der Proteinase K muss das Gemisch anschließend für t = 10 min bei 95°C erhitzt werden. Die Haare wurden abzentrifugiert und jeweils 1 µl Überstand für die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Für den Tail buffer wurden verwendet:

- 50 mM KCL
- 10 mM Tris-HCL (pH 8.3)
- 0,1 mg/ml Gelatine
- 0,45% Nonidet NP-40
- 0,45% Tween 20

#### 2.2.1.2 PCR zur Amplifizierung eines Fragments der lacZ-Kassette

Zur Amplifizierung der lacZ-Kassette wurden maus-spezifische Primerpaare eingesetzt (Tab.2). Mit diesen Primern erhielt man ein Fragment von 400 bp, falls das lacZ-Gen auf mindestens einem Allel enthalten war.

**Tabelle 2:** Primer zur Amplifikation einer lacZ-Kassette.

Name	Sequenz
lacZ 1 F	5'-cag gat atg tgg cgg at gag-3'
lacZ 1 R	5'-ggt caa cca ccg cac gat ag-3'

2.2.1.3 PCR zur Amplifizierung eines Fragments des Pept2-Gens, das deletiert sein sollte

Zur Amplifizierung eines Fragmentes des PEPT2-Gens wurden maus-PEPT2-spezifische Primerpaare eingesetzt (Tab.3). Mit diesen Primern wurde bei intaktem PEPT2-Gen ein 600 bp Fragment amplifiziert.

**Tabelle 3:** Primer zur Amplifikation eines Fragments des PEPT2-Gens.

Name	Sequenz
m2F – 147	5'-cca ctg aaa ctg aca ccc ac-3'
M 2 g 1 l B 383	5'-gct ctg cac aca agg gaa ac-3'

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1µl DNA (100 – 200 ng/µl)
- 2,5 µl buffer (Red Taq)
- 0,5 µl dNTP (Red Taq)
- 1 µl forward primer
- 1 µl reverse primer
- 1,25 µl Red Taq (Sigma)
- H<sub>2</sub>O ad 25µl = 17,75 µl.

Folgende Temperaturprofile wurden je Zyklus (insgesamt 35 Zyklen) verwendet:

1. 94° C für t = 4 min
2. 94° C für t = 1 min  
55° C für t = 1 min  
72° C für t = 1 min
3. 72° C für t = 10min

Ein Aliquot des Transkriptionsansatzes wurde mit Puffer, Primer, und Taq-Polymerase versetzt und mit autoklaviertem Aqua bidest auf ein Volumen von 100µl aufgefüllt. Nach

einem ersten Denaturierungsschritt bei 95° C folgten 35 Zyklen dreier Reaktionsschritte in einem Thermocycler (Perkin Elmer). Ein Zyklus besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem „annealing“ genannten Anlagerungszeitraum für die Primer und einem Amplifikationsschritt, der zur Verlängerung der Primer dient („amplification“). 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%).

### **2.2.2 Kryostattechnik**

Für die verschiedenen Färbungen wurden in horizontaler Schnittführung geschnittene Gefrierschnitte aus Mäuselungen (n = 6) zwischen 8-12 µm Schnittdicke verwendet. Die Gewebe wurden vor dem Schneiden ca. 10 min auf eine ihrem Fettgehalt entsprechende Temperatur äquilibriert, mit Tissue Tek (Leica) auf dem Gefrierblock fixiert und dann mit einem Kryostat (Leica Cm 1900) geschnitten. Die Schnitte wurden auf beschichteten Objektträgern (Super Frost Plus Langenbrinck, Emmendingen) aufgenommen. Nach den verschiedenen histologischen Färbungen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes und einer Imaging Einheit (Leica, Wetzlar) Fotos angefertigt.

### **2.2.3 β-Galaktosidase-Expression**

Der β-Galaktosidase-Nachweis wurde auf Gefrierschnitten (s. Kap. 2.2.2) angewendet. Die Kryotomschnitte wurden in 0,2% Glutaraldehyd für t = 10 min auf Eis postfixiert, dreimal mit PBS/2mM MgCl<sub>2</sub> behandelt und dann in Detergenzlösung (0,1M Phosphat-Puffer pH 7,3, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Natriumdesoxycholat, 0,02% Nonidet P-40) für t = 10 min inkubiert. Danach schloss sich die Färbung für 2-3 Stunden bei 37° C an (Detergenz-Lösung mit 1 mg/ml X-Gal, 5mM Kaliumferricyanid, 5mM Kaliumferrocyanid). Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen, kurz in dH<sub>2</sub>O gespült und eingedeckelt.

### **2.2.4 Immunhistochemie**

Zur *in-situ* Lokalisation des Oligopeptidtransporterproteins wurde die Methode der Immunhistochemie verwendet (Coons, 1958; Coons et al., 1955). Es wurden die pulmonalen Gewebeschnitte der Wildtypmäuse und Gen-depletierten Mäuse (n = 6 Mäuse) untersucht.

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 (Doring et al., 1998). Der Antikörper wurde gegen das C-terminale Ende des PEPT2-Transporters generiert. Das synthetisierte Polypeptid (Sequenz: H<sub>2</sub>N-CQGNMIKLETKKTKL-COOH) wurde in Kombination mit Freuds Adjuvant Kaninchen subkutan injiziert. Nach Verdünnungsreihen mit den Antiseren konnte eine optimale Verdünnung des PEPT2-Antikörpers von 1:1000 festgestellt werden.

Als Sekundärantikörper dienten wahlweise Indocarbocyanin (Cy3)-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG Serum oder Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG Serum (Tab. 4)

**Tabelle 4:** Sekundärantikörper.

Antigen	Konjugat	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen-IgG	Indocarbocyanin	Ziege	1 : 250	Dianova, Hamburg
Kaninchen-IgG	Fluoreszein- Isothiocyanat	Ziege	1 : 250	Organon Teknika Corporation, Eppelheim

#### Antikörperinkubation und Antikörperdetektion:

Die Gefrierschnitte wurden t = 1-2 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen mit Blockingmedium für t = 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, in ausgetesteter Verdünnung von 1: 1000 in PBS/NaCl (PBS mit doppelter Salzkonzentration zur Verringerung der Hintergrundreaktion) (Grube, 1980) verdünnt, überschichtet und für  $t = 1 - 2$  Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei  $4^{\circ} \text{C}$  gelagert. Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Schnitte sorgfältig gespült (3mal  $t = 8\text{min}$  in PBS) und mit den Sekundärantikörpern beschichtet. Als Sekundärantikörper dienten wahlweise Cy3-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG Serum (Dianova, Hamburg) und FITC-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG Serum (Dianova, Hamburg) (Tab 4) Nachdem die ungebundenen Antikörper nach  $t = 1$  Stunde Inkubation durch 3mal  $t = 5\text{min}$  Waschen in PBS entfernt worden waren, wurden die Schnitte mit PBS/Glycerin (pH 8,6) eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert und fotografiert.

### Kontrollen:

Kontrollen auf unspezifischen Bindungen wurden durch eine Präabsorption des polyklonalen PEPT2-Antiserums über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit korrespondierenden PEPT2-Protein (Konzentration:  $20\mu\text{g}$  Antigen/ml Antiserum) durchgeführt. Danach erfolgte die weitere immunhistochemische Bearbeitung wie oben beschrieben. Eine Positivkontrolle ohne Antigenzugabe wurde mitgeführt. Als weitere Kontrolle wurde der Primärantikörper unter Beibehaltung aller anderen Schritte ausgelassen, um somit unspezifische Bindungen durch die Sekundärantikörper nachzuweisen.

### **2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Gefrierschnitte wurden kurze Zeit in 70% Ethanol geschwenkt und danach mit Aqua bidest abgespült.  $T = 10\text{min}$  wurden sie in Hämalaun getaucht, anschließend kurz in Aqua bidest gewaschen und in HCl-Ethanol differenziert. Nach  $t = 5\text{min}$  in Aqua bidest wurden die Schnitte  $t = 3\text{min}$  mit Eosin gefärbt und danach wieder mit Aqua bidest gewaschen. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%,96%,100%) und in Xylol wurden die Schnitte mit Eukitt konserviert.

### **2.2.4 Masson-Goldner-Färbung**

Die Gefrierschnitte wurden nach kurzem Eintauchen in 70% Ethanol eine Minute in Hämatoxylin getaucht, danach  $t = 5\text{min}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen.  $T = 15\text{min}$  wurden sie mit

Ponceau-Fuchsin gefärbt und vor der  $t = 8\text{min}$  Färbung mit Molybdätoposphorsäure kurz mit 1% Essigsäure abgespült. Für  $t = 3\text{min}$  wurden sie in Lichtgrün getaucht, darauf wieder in 1% Essigsäure und nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol wurden die Schnitte mit Eukitt konserviert.

### **2.2.5 PAS-Färbung**

Nach kurzem Schwenken in 70% Ethanol wurden die Schnitte  $t = 20\text{min}$  in Perjodsäure getaucht und danach mit Aqua dest abgespült.  $T = 10\text{min}$  wurden sie sowohl in Schiff's-Reagenz sowie, nach kurzer Spülung mit Wasser, auch in Hämalan getaucht. Danach folgte die Anwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe, von Xylol und Eukitt zur Konservierung.

### **2.2.6 Ultrastrukturelle Techniken**

#### **2.2.6.1 Fixierung und Einbettung**

Organstückchen wurden sofort nach Entnahme des Lungengewebes in gepuffertem Glutaraldehyd (2,5% Glutaraldehyd und 0.1 molarem Phosphatpuffer) überführt. Sie wurden nach der Fixierung für 3mal  $t = 10\text{min}$  mit Phosphatpuffer gespült. Die Blockkontrastierung (Postfixierung) erfolgte in 2 % Osmiumtetroxid über  $t = 2$  Stunden bei Raumtemperatur und wenig Licht. Anschließend folgte nochmals eine Spülung in Phosphatpuffer und zwar 3mal  $t = 10\text{min}$ .

#### **2.2.6.2 Entwässerung und Einbettung**

In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe entwässert (50%  $t = 10\text{min}$ , 2x70%  $t = 10\text{min}$ , 2x90%  $t = 12\text{min}$ , 3x100%  $t = 10\text{min}$  Ethanol). Um die Präparate in einen Kunststoff einbetten zu können, der nicht mit Alkohol mischbar ist, wurde ein Zwischenmedium (Propylenoxid) gewählt, in dem die Präparate für 2mal  $t = 15\text{min}$  verblieben sind. Danach wurden die Präparate in Gemische aus 2:1, 1:1, 1:2 Volumenanteilen Propylenoxid und Epon (Epoxyharz) je  $t = 1$  Stunde und zuletzt in reines Epon (über Nacht) gebracht. In speziellen Kapseln, die mit Epon gefüllt sind, wurde das Gewebe bei  $60^\circ\text{C}$  48 Stunden polymerisiert.

### 2.2.6.3 Herstellung von Semi-und Ultradünnschnitten

Die in Epon eingebetteten Blöcke wurden zunächst getrimmt, um dann an einem Mikrotom (RM 2065 Leica, Bensheim) mit Hilfe eines Glasschleifers 0,5µm dicke Semidünnschnitte anfertigen zu können. Diese wurden im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgetragen. Auf einer Heizplatte wurden die Präparate gestreckt und getrocknet, bevor sie mit RICHARDSON-Farbe gefärbt wurden. Die Semidünnschnitte geben eine lichtmikroskopische Vororientierung, um geeignete Areale für die ultrastrukturelle Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop auswählen zu können. Die 50 bis 80 nm dicken Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser am Ultramikrotom Ultracut S (Leica, Bensheim) angefertigt und anschließend auf Grids aufgezogen, die mit einer dünnen Kunststoffmembran (Pioloform) beschichtet sind. Die Schnittkontrastierung erfolgte mit 5% Uranylacetat  $t = 12\text{min}$  und Bleicitrat nach Reynolds  $t = 5\text{min}$ . Die Ultradünnschnitte wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop vom Typ EM 906 (Zeiss, Oberkochen) untersucht und die Befunde fotografisch dokumentiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Genotypisierung

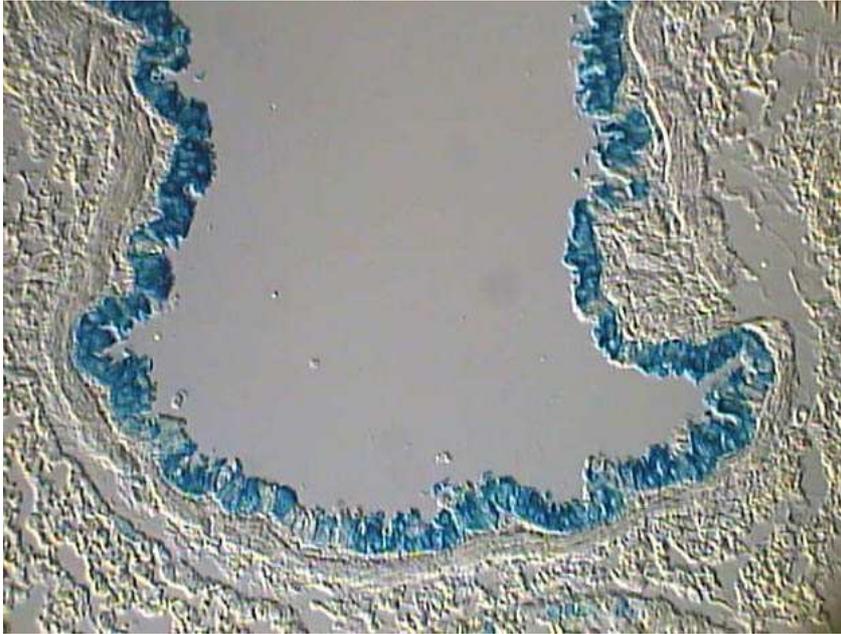
Die Genotypisierung führte zu reproduzierbaren Ergebnissen, welche sich in der Gelelektrophorese als Banden darstellte. Sie ergab bei  $n = 3$  Tieren den Genotyp PEPT2  $-/-$  und bei  $n = 3$  Tieren den Genotyp PEPT2  $+/+$  (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Exemplarische Gelelektrophorese zu PEPT2  $-/-$  und PEPT2  $+/+$ .

#### 3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Expression

Mit Hilfe des Genproduktes  $\beta$ -Galaktosidase des Reportergens (LacZ) konnte die farblose Substanz X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-inolyl- $\beta$ -D-Galaktose) hydrolysiert werden, was zu einem blauen Indigofarbstoff Produkt (5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole) führte. Die phänotypische Veränderung (blaue Färbung) belegte das erfolgreiche Einschleusen des lacZ-Gens anstelle des PEPT2-Gens und damit die Gen-deletion bei allen untersuchten Tieren mit dem Genotyp PEPT2  $-/-$  (Abb. 7). Bei den Wildtyptieren mit dem Genotyp PEPT2  $+/+$  war keine Färbereaktion zu erkennen.



**Abbildung 7:**  $\beta$ - Galaktosidaseexpression bei den Gen-depletierten Tieren im Bronchial-epithel.

### ***3.3 Immunhistochemie***

#### **3.3.1 Wildtyp-Tiere**

Die Anwendung der Immunhistochemie in Tracheal- und Bronchialschnitten führte zu einer gleichmäßigen Anfärbung des respiratorischen Epithels. Es konnte ein deutliches PEPT2-Immunsignal in den hochprismatischen, kinozilientragenden Epithelzellen der großen und kleinen Bronchien sowie Bronchiolen gefunden werden. Auch in Typ II-Pneumozyten zeigte sich eine PEPT2-Immunreaktivität. Bei den Mäusen mit PEPT2- Gen-deletion zeigte sich kein Signal.

### ***3.4 Histomorphologische Untersuchungen***

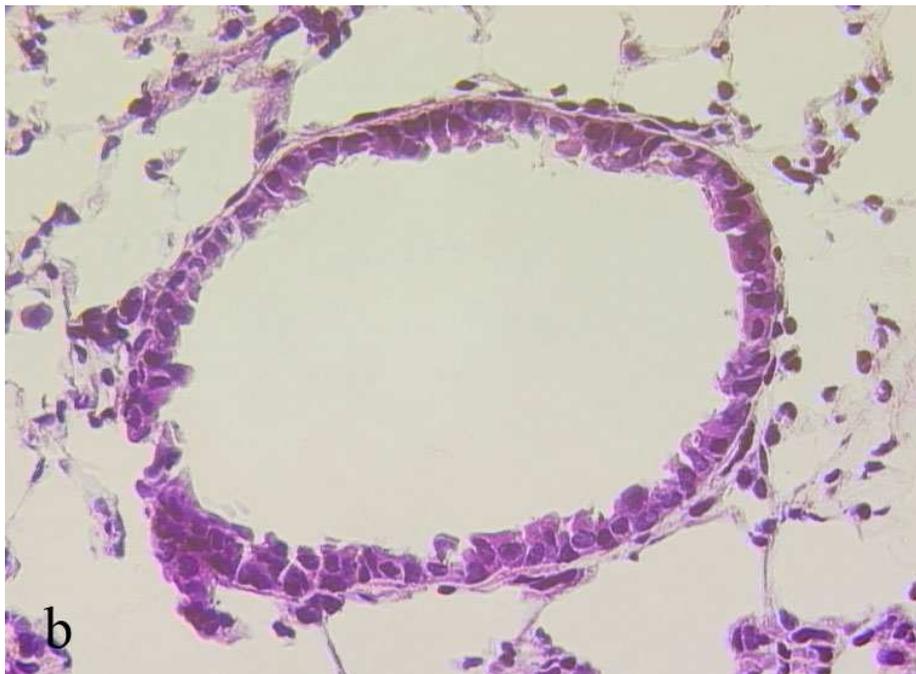
#### **3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

##### 3.4.1.1 Wildtyp-Mäuse

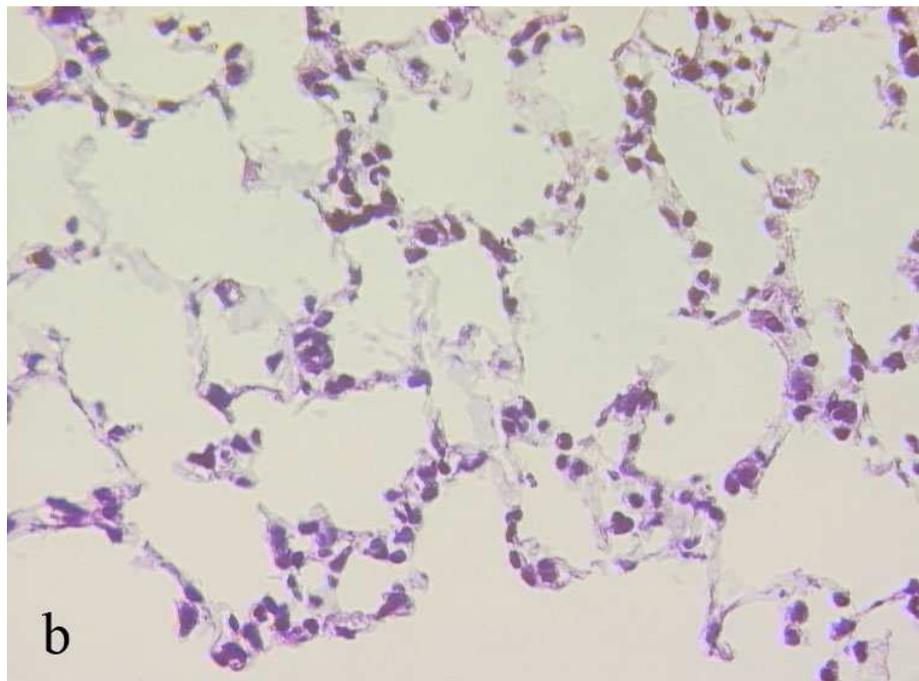
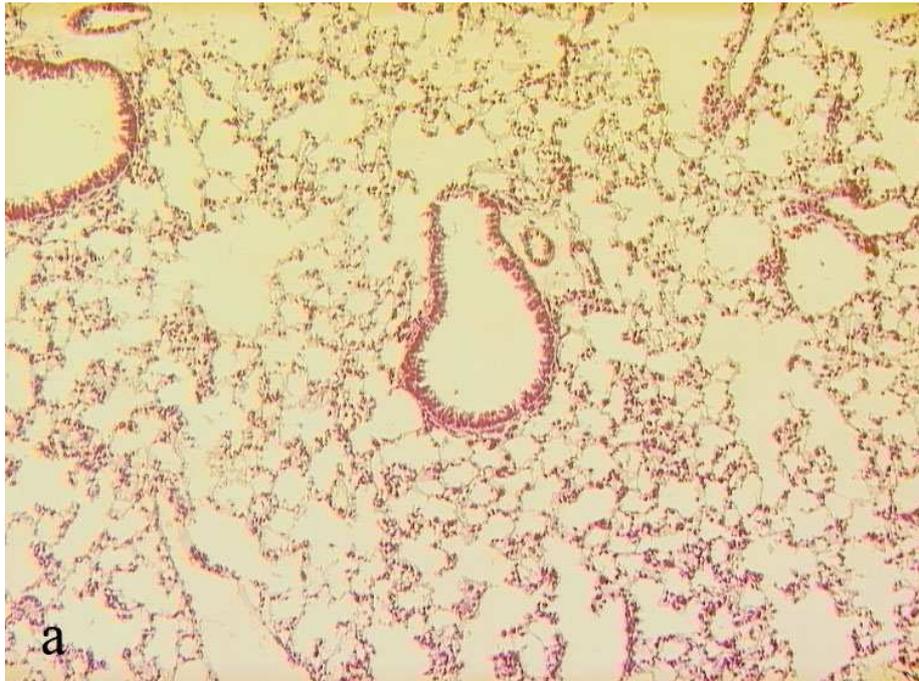
Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die einzelnen Lungenabschnitte einer jeden Wildtyp- und Gen-depletierten Maus getrennt nach spezifischen Kriterien in den verschiedenen morphologischen Einheiten der Lunge untersucht. Dabei wurden Aufnahmen mit 10facher und 40facher Objektiv-Vergrößerung angefertigt.

Im Bereich der Atemwege der Kontrolltiere zeigte sich eine fortlaufende dichotome Aufzweigung der Bronchien in Bronchioli. In einigen Aufnahmen zeigten sich noch Anschnitte von hyalinem Knorpel, die im Verlauf der Verzweigung der Bronchiolen zu Bronchioli terminalis und Bronchioli respiratorii nicht mehr darstellbar waren. Aus den Bronchioli respiratorii gingen die aus Alveolen bestehenden Ductus alveolares hervor. Die Wand der Bronchioli zeichnete sich durch ein regelrechtes hochprismatisches Epithel aus, in denen keine Drüsen mehr erkennbar waren. Neben den zilientragenden Flimmerepithelzellen ließen sich zilienfreie Zellen, die so genannten Clara- Zellen erkennen. Sie konnten darüber hinaus aufgrund ihrer sich apikal befindlichen sekretorischen Granula identifiziert werden. Bei den Kontrolltieren ließen sich keine Unregelmäßigkeiten im Aufbau des Bronchialbaumes erkennen.

Bei den Ductuli alveolares und den Alveolen konnten einige Auffälligkeiten gefunden werden. Bei den Alveolarepithelzellen Typ 1 (AZ I) waren die abgeflachten Zellkerne und Zelleiber, mit denen sie die Lufträume in den Alveolen vom kapillarhaltigen Bindegewebe abtrennen, regelrecht erkennbar. Die Alveolarepithelzellen Typ 2 (AZ II), auch Nischenzellen genannt, ließen eine typische kubische Gestalt erkennen. Distal der terminalen Bronchiolen zeigte sich eine Zerstörung der Alveolarsepten mit Verlust der Alveolenstruktur. Es ließen sich Emphysemblasen mit kleinen bis mittelgroßen unregelmäßig verteilten Bullae darstellen.



**Abbildungen 8a + b:** Bronchioli der Kontrolltiere (HE-Färbung). a) 10fache Vergrößerung, b) 40fache Vergrößerung. Regelrechter Aufbau des Bronchialbaums, Anzeichen von Emphysembildung.

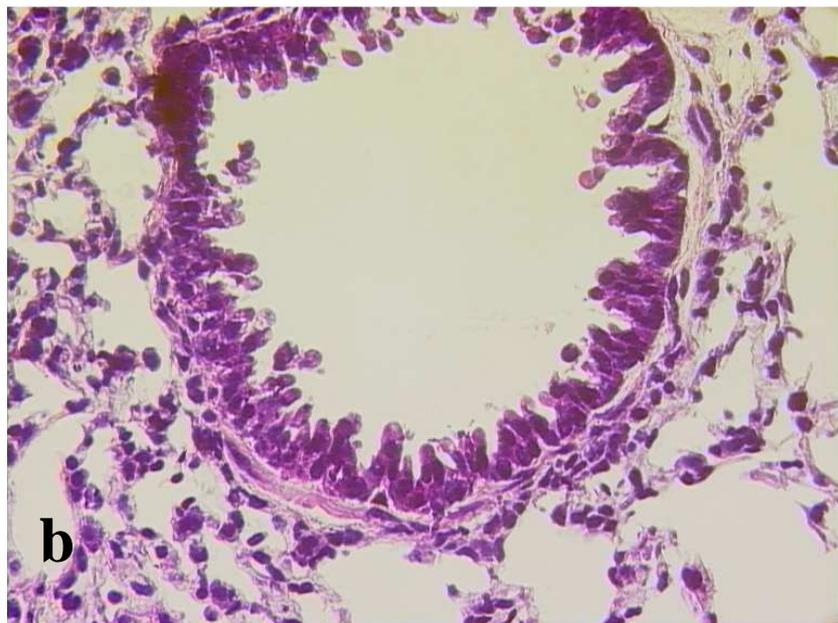
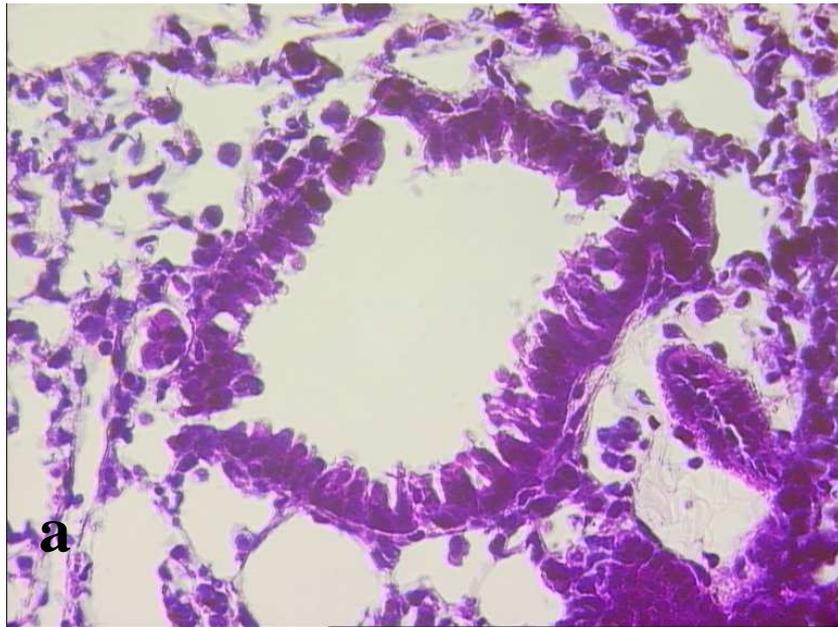


**Abbildungen 9a + b:** Alveolarepithel der Kontrolltiere (HE-Färbung). a) 10fache Vergrößerung, b) 40fache Vergrößerung. Regelrechtes Epithel, zum Teil mit mittelgradig großen Bullae.

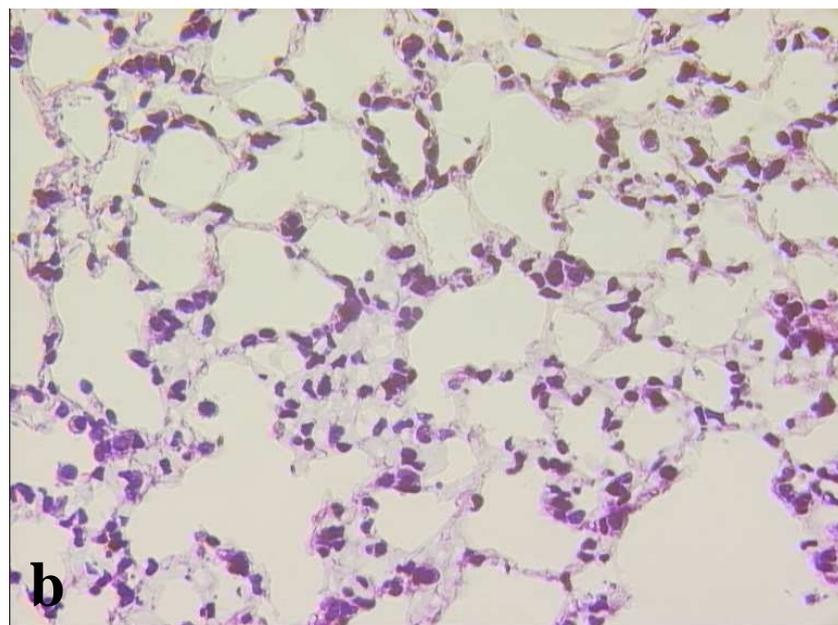
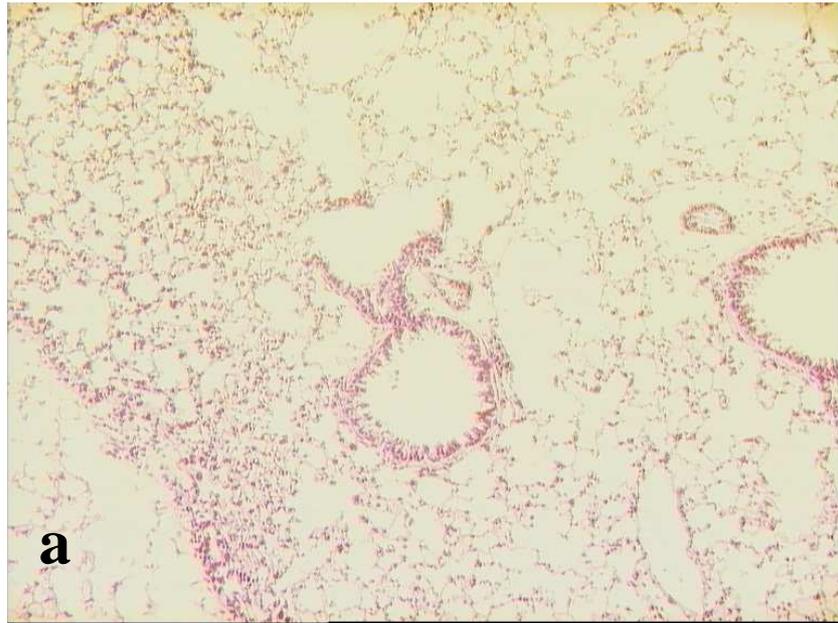
### 3.4.1.2 Gen-depletierte Mäuse

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der HE gefärbten Lungenpräparate der Gen-depletierten Mäuse zeigten keine grundsätzlichen Unterschiede zu denen der Kontrolltiere. Eine regelrechte Gliederung der Atemwege war erkennbar. In Abbildung 10a ist ein quergeschnittener Bronchiolus mit mehrreihigem zilientragendem Zylinderepithel dargestellt. Die Zellkerne färbten sich stark blauviolett, das Zytoplasma rosa bis rot und die elastischen Fasern zart rosa bis gar nicht. Eine Schicht zirkulär angeordneter glatter Muskulatur wurde deutlich sichtbar. Insgesamt erschien die Bronchiolus-Schleimhaut der Knock-out Mäuse in den HE-Färbungen etwas verdickt und nicht so geordnet wie bei den Kontrolltieren (Abb. 8-10b).

Die Morphologie der Alveolen ließ ebenfalls Emphyseblasen erkennen. Sie erschienen noch prominenter in ihrer Ausprägung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ablagerungen, wie unter 3.5.1. beschrieben, konnten in den Routinefärbungen aufgrund der Prozessierung und Gewebeherstellung nicht dargestellt werden (Abb. 11).



**Abbildungen 10a +b:** HE-Färbung von Gen-depletierten murinen Lungenpräparaten. a) und b) Bronchioli im Querschnitt in 40facher Vergrößerung.

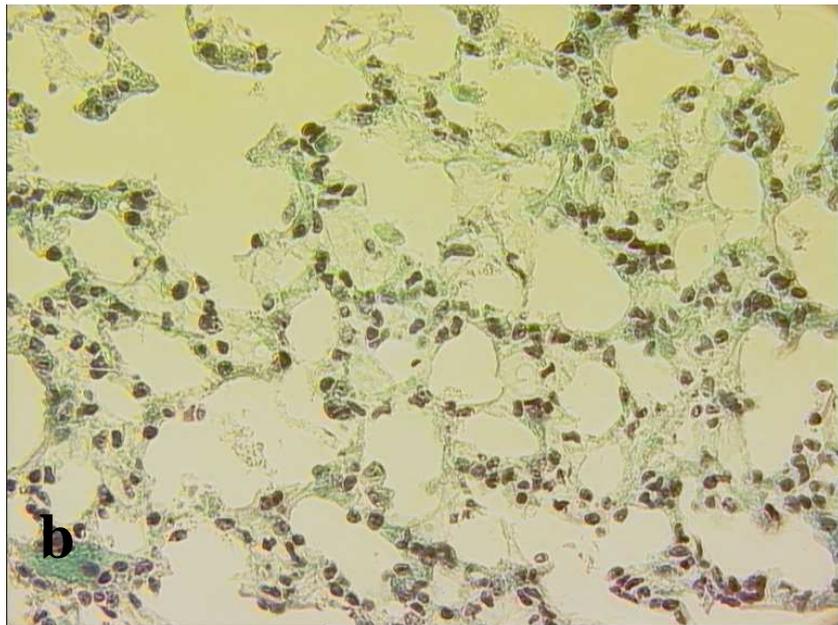
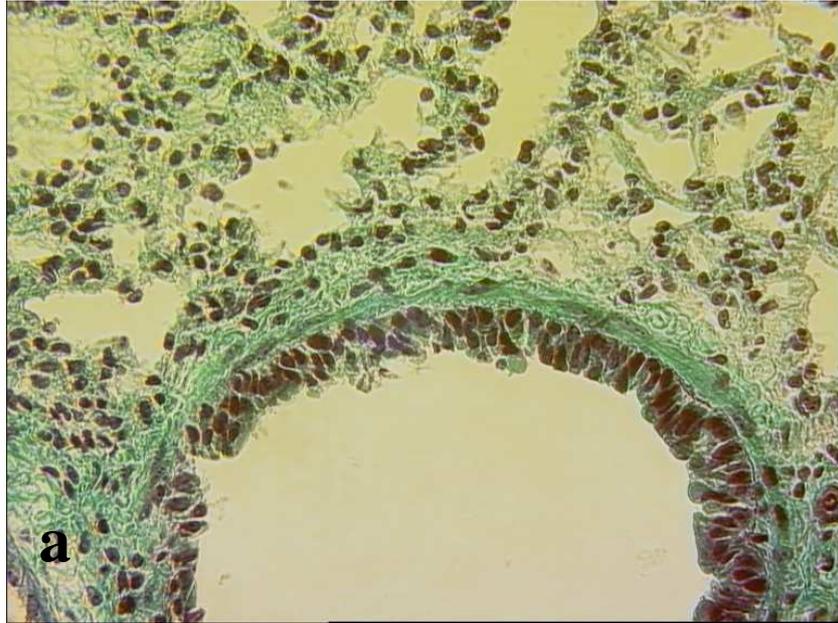


**Abbildungen 11a+ b :** HE-Färbung des Alveolarepithels muriner Gen-depletierter Lungenpräparate. a) 10fache Vergrößerung b) 40fache Vergrößerung.

### **3.4.2 Masson-Goldner-Färbung**

#### **3.4.2.1 Wildtyp-Mäuse**

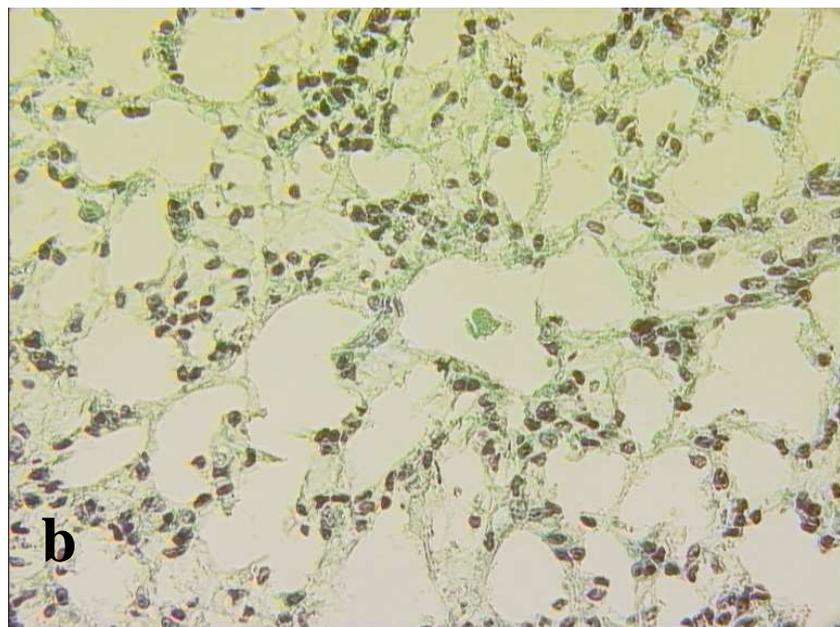
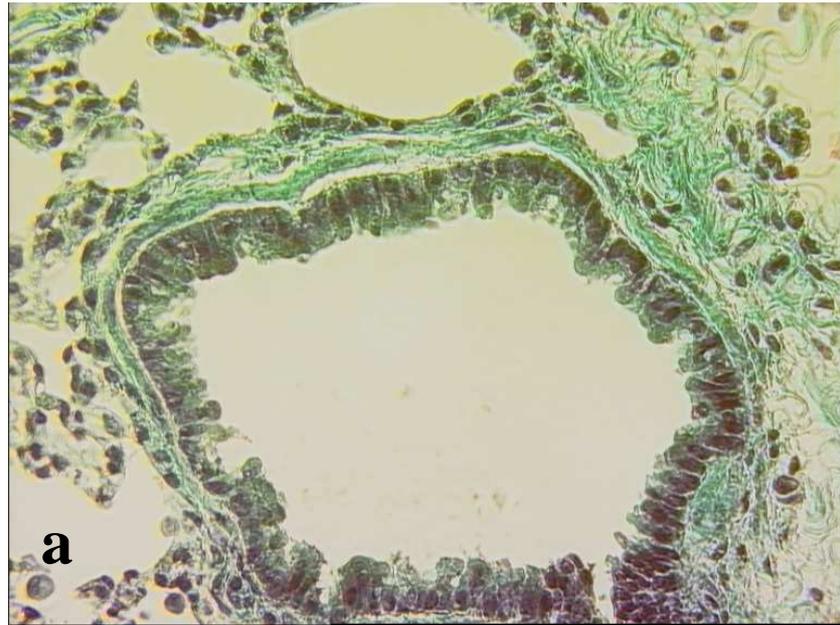
Mit Hilfe der Masson-Goldner Trichrom-Färbung wurde geprüft, ob sich Auffälligkeiten in der Gruppe der Kollagen- bzw. retikulären Fasern darstellen lassen. Bei den Kontrolltieren konnte eine braunschwarze Färbung der Zellkerne, eine Rotfärbung des Zytoplasmas und eine Grünfärbung von Kollagenfasern und Retikulärfasern beobachtet werden. Kollagen war hauptsächlich in den Alveolarsepten und im peribronchialen Bindegewebe erkennbar. Insgesamt erschien der Anteil nicht mehr als die 10-15% des Interstitiums, die es üblicherweise ausmacht, zu sein (Abb. 12).



**Abbildungen 12 a + b:** Masson-Goldner-Färbung der Kontrolltier-Lungenpräparate. a) Bronchiolus 10fache Vergrößerung b) Alveolen 40fache Vergrößerung. Es konnten keine weiteren Besonderheiten dargestellt werden.

### 3.4.2.2 Gen-depletierte Mäuse

Eine interstitielle Faservermehrung, wie sie z.B. im Rahmen einer chronischen interstitiellen Pneumonie vorkommt, konnte mit Hilfe der Masson-Goldner-Färbung nicht nachgewiesen werden. Ebenso wie bei den Kontrolltieren zeigte sich eine Grünfärbung im peribronchialen Bindegewebe. Größtenteils war originäres alveoläres Parenchym erkennbar. Im Vergleich zu den Kontrolltieren ließen sich keine besonderen Auffälligkeiten erkennen (Abb. 13).

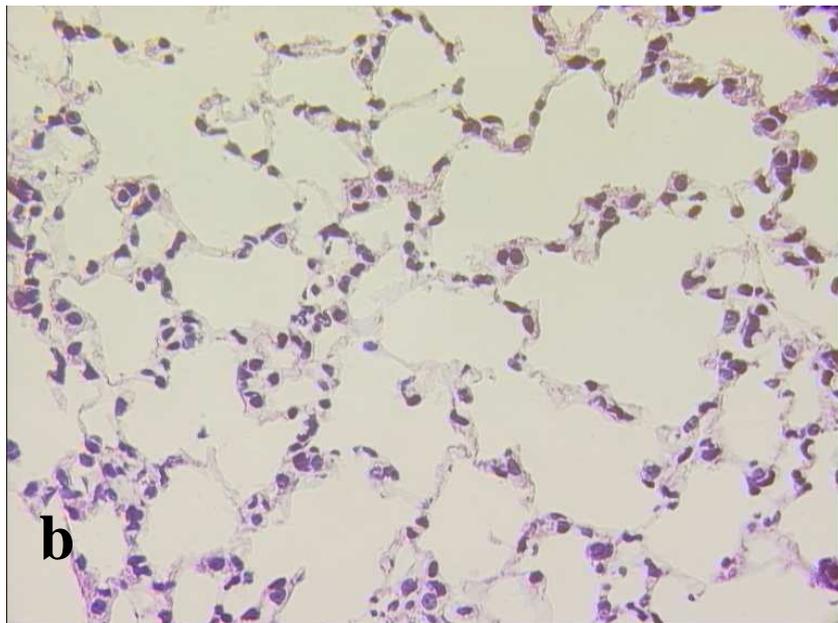
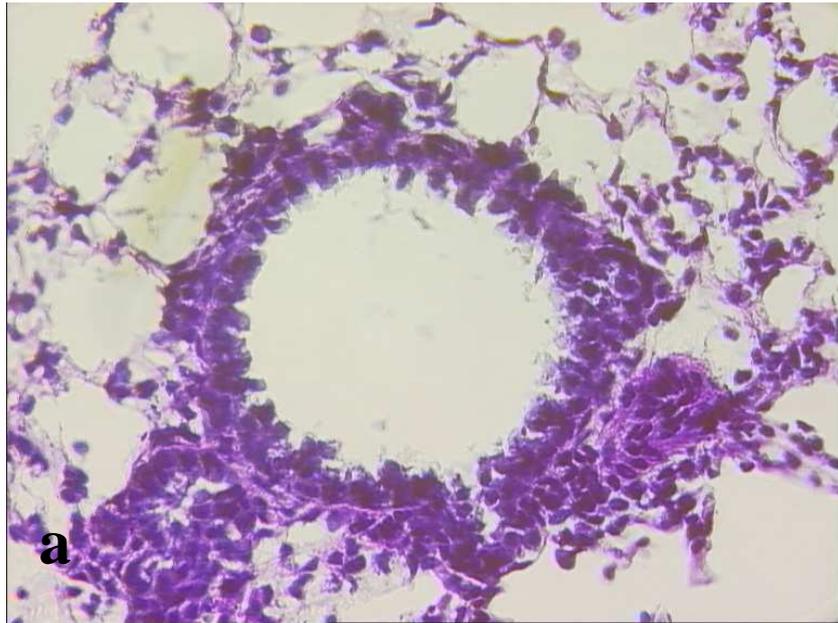


**Abbildungen 13 a + b:** Masson-Goldner-Färbung der Gen-depletierten Tierlungen a) Bronchiolus 10fache Vergrößerung b) Alveolen 40fache Vergrößerung. Es zeigte sich originäres alveoläres Parenchym. Zwischen den Alveolen sieht man ein dünnes Bindegewebsseptum, mit einem Netzwerk aus kollagenen und elastischen Fasern, die sich leicht grün darstellen.

### **3.4.3 PAS-Färbung**

#### **3.4.3.1 Wildtyp-Mäuse**

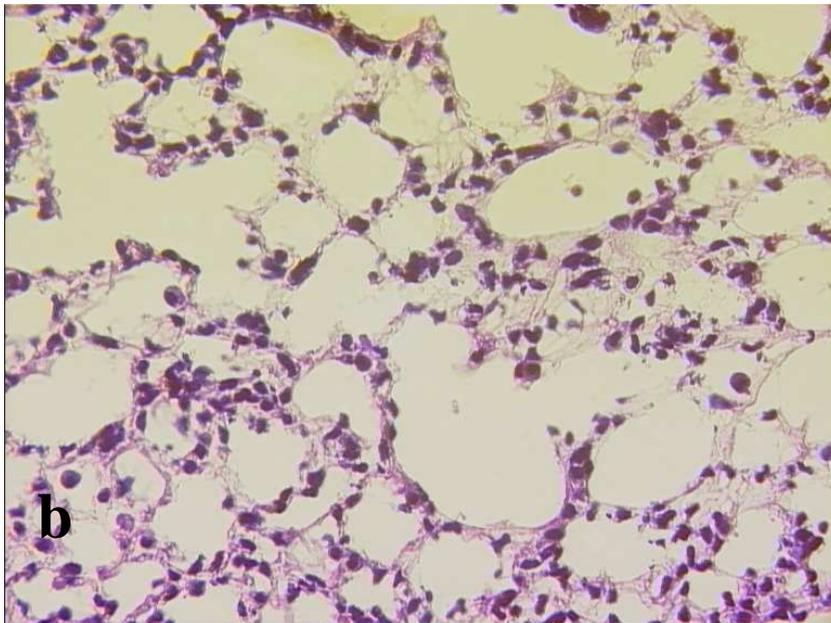
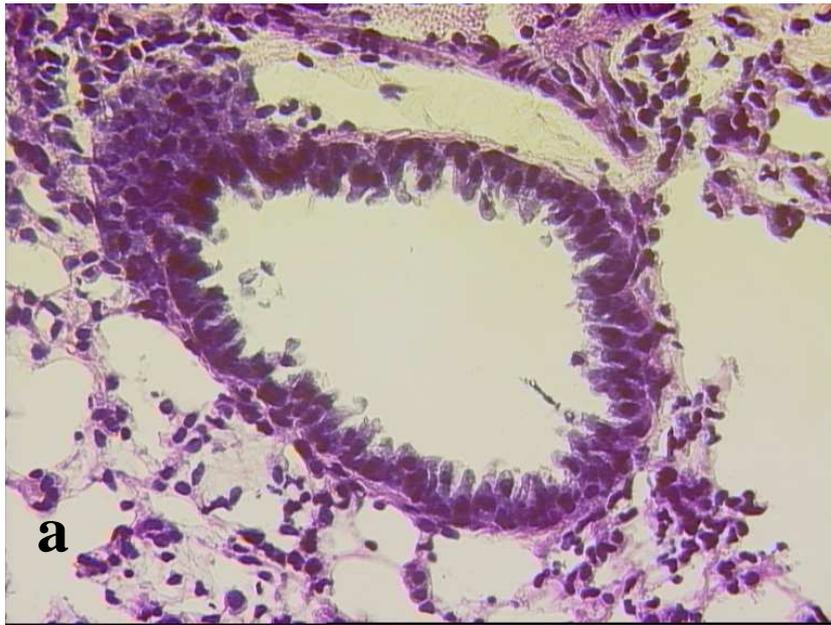
Um einen Einblick in das dynamische Zellgeschehen zu erhalten, wurde die Perjodsäure-Schiff-Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der histochemischen Färbung können kohlenhydrathaltige Komponente wie etwa neutrale Glykoproteine, Schleim und Glykogen rotviolett dargestellt und sichtbar gemacht werden. Hierdurch hätten sich auch hyaline Membranen erkennbar machen lassen, die als Vorläufer der Lungenfibrose gelten, da sich die feinen Proteinmäntel PAS-positiv zeigen. Diese ließen sich jedoch nicht erkennen (Abb. 14 a und b). Ebenso wenig konnte eine Vermehrung der Becherzellen, die in den ersten Abschnitten der Bronchioli noch vereinzelt auftraten, beobachtet werden. Distal fehlten sie vollständig, was einem regelrechten Aufbau des Bronchialbaumes entspricht. Eine vermehrte Schleimproduktion war somit nicht erkennbar. Die Alveolarwände und die verschiedenen Abschnitte der Bronchiolen stellten sich unauffällig dar.



**Abbildungen 14 a + b:** PAS-Färbung der Lungenpräparate der Kontrolltiere. a) Bronchiolus in 10facher Vergrößerung b) Alveolen in 40facher Vergrößerung. Es zeigte sich keine vermehrte Schleim- bzw. Glykoprotein-Vermehrung.

### 3.4.3.2 Gen-depletierte- Mäuse

Die Aufnahmen der murinen Lungenpräparate der Gen-depletierten Mäuse ließen keine Unterschiede zu denen der Kontrolltiere erkennen. In Abbildung 16 a und b zeigte sich ein Bronchiolus mit einem hochprismatischen Flimmerepithel ohne besondere Auffälligkeiten. Die Abbildung der Endabschnitte des Bronchialbaums, die Auskunft über den Aufbau der Alveolarwände geben sollte, stellte sich ebenfalls unauffällig dar. Im Vergleich zu den Aufnahmen der Kontrolltiere zeigen sich somit in der PAS-Färbung keine Unterschiede.



**Abbildungen 15 a + b:** PAS-Färbung der Gen-depletierten murinen Lungenpräparate, a) Bronchiolus in 10facher Vergrößerung und b) peripherer Lungenabschnitt mit Darstellung der Alveolen einer Gen-depletierten Maus in 40facher Vergrößerung. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und Gen-depletierten Tieren dargestellt werden.

### ***3.5 Ultrastrukturelle Untersuchungen***

#### **3.5.1 Semidünnschnitte**

Die Auswertung der Semidünnschnitte ergab einen Überblick über feinstrukturelle Veränderungen. Auf der Grundlage der begutachteten Semidünnschnitte wurden in einem nachfolgenden Schritt Ultradünnschnitte für die elektronenmikroskopische Analyse angefertigt.

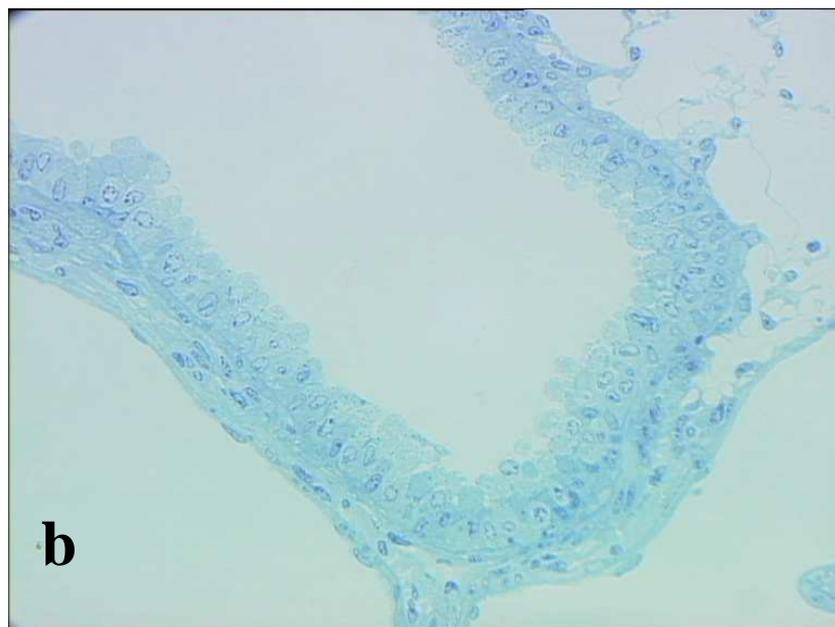
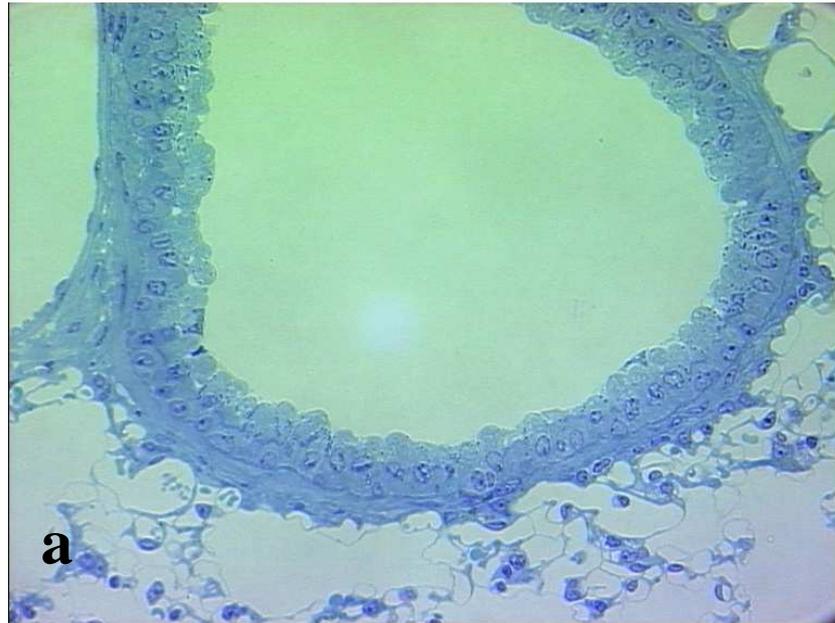
##### **3.5.1.1 Wildtyp-Tiere**

Die Bronchioli der Kontrolltiere ließen in der Regel ein mehrreihiges, hochprismatisches Epithel mit zilientragenden und zilienfreien Epithelzellen erkennen. Die Bronchioli terminales wiesen ein einschichtiges iso- bis hochprismatisches Epithel auf. Dagegen zeichneten sich die Bronchioli respiratorii durch ein einschichtiges kubisches Epithel aus (Abb. 16 a und b).

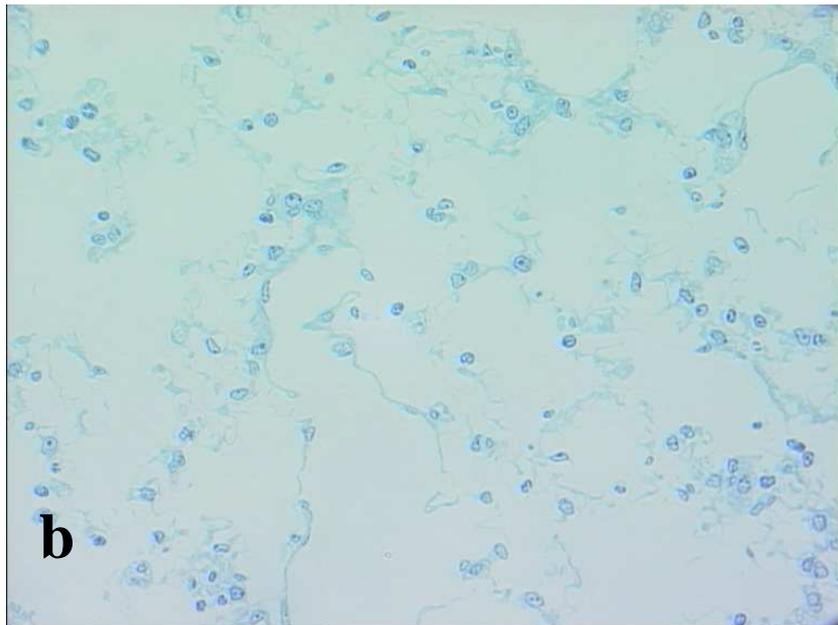
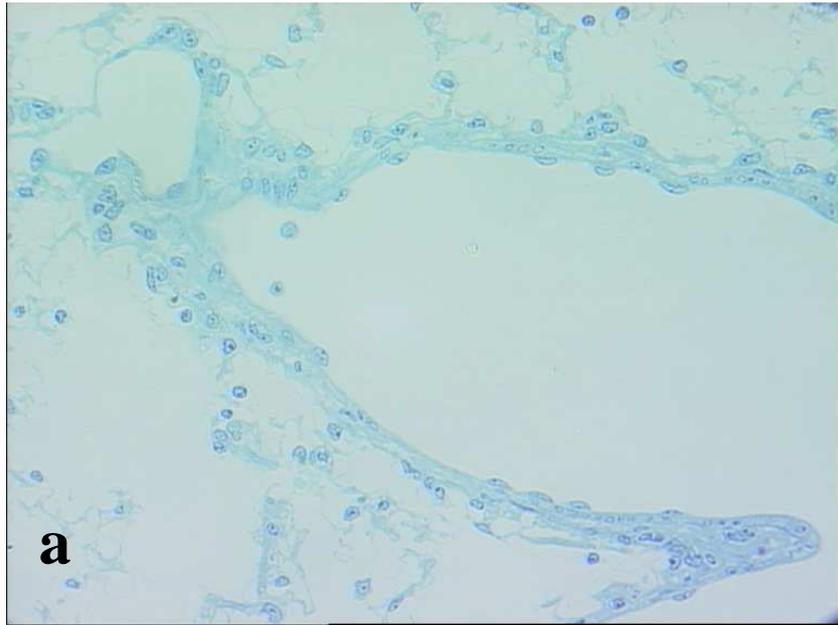
Die zilientragenden Zellen enthielten einen basal liegenden runden bis kuboiden Zellkern mit dunkelblau gefärbtem Rand und hellblauem Nukleoplasma. Die Clara-Zellen, die nicht mit Zilien besetzt waren, zeigten eine mehr längliche Zellform mit luminal keulenförmig aufgetriebenem Ende. Zahlreiche Granula ließen sich im apikalen Drittel erkennen. Die Epithelhöhe sowie die Dicke der Tunica muscularis erschienen regelrecht.

Das Alveolarepithel ließ zwei Zelltypen mit regelrechter Morphologie erkennen: Alveolarzellen Typ I (AZ I) und Alveolarzellen Typ II (AZ II), die untereinander mit Zonulae occludentes verbunden waren und einer Basallamina auflagen (Abb. 17 a und b). Eine genauere Darstellung erfolgte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie.

Die Gefäßwände wiesen ebenfalls keine pathologisch abweichenden Befunde auf. Zwischen dem Gefäßendothel und dem Bronchialepithel ließ sich das bindegewebige Interstitium als ein schmaler Saum darstellen. Es konnte keine Vermehrung oder Veränderung des Interstitiums beobachtet werden.



**Abbildungen 16 a + b:** Semidünn-Schnitte der Lungenpräparate der Kontrolltiere. a) und b) 40fache Vergrößerung: Bronchioli mit regelrechter Epithelstruktur.



**Abbildungen 17 a + b:** Semidünn- Schnitte der murinen Lungenpräparate der Kontrolltiere. a) und b) 40fache Vergrößerung: Darstellung von regelrechtem Alveolarepithel.

### 3.5.1.2 Gen-depletierte- Mäuse

Wesentliche morphologische Veränderungen des Lungenparenchyms konnten in den Semidünn-Schnitten der Gen-depletierten Mäuse beobachtet werden.

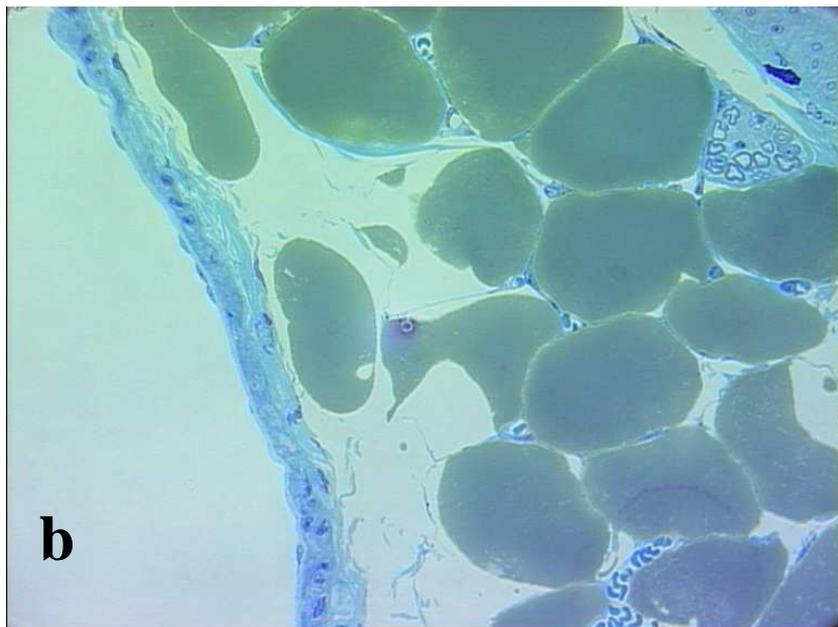
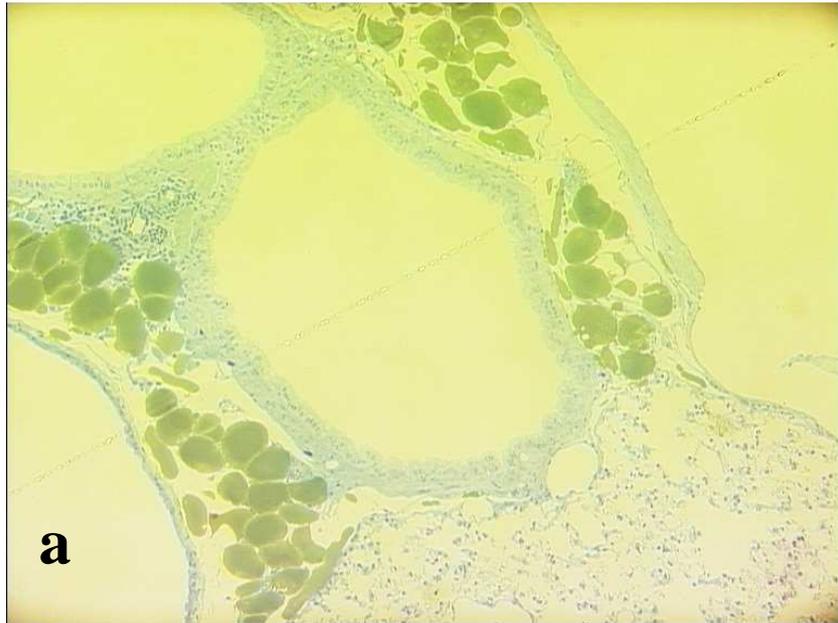
In den Atemwegen fielen dabei extrem große Plaques auf, die im periarteriellen und peribronchialen Raum lokalisiert waren.

Zunächst wurde überprüft, ob sich histomorphologisch klären lässt, woher die fettähnlichen Strukturen kommen. Deswegen wurden Übersichtsaufnahmen und dann kleinere Abschnitte in höherer Vergrößerung fotografiert (Abb. 19a+b und 20a+b).

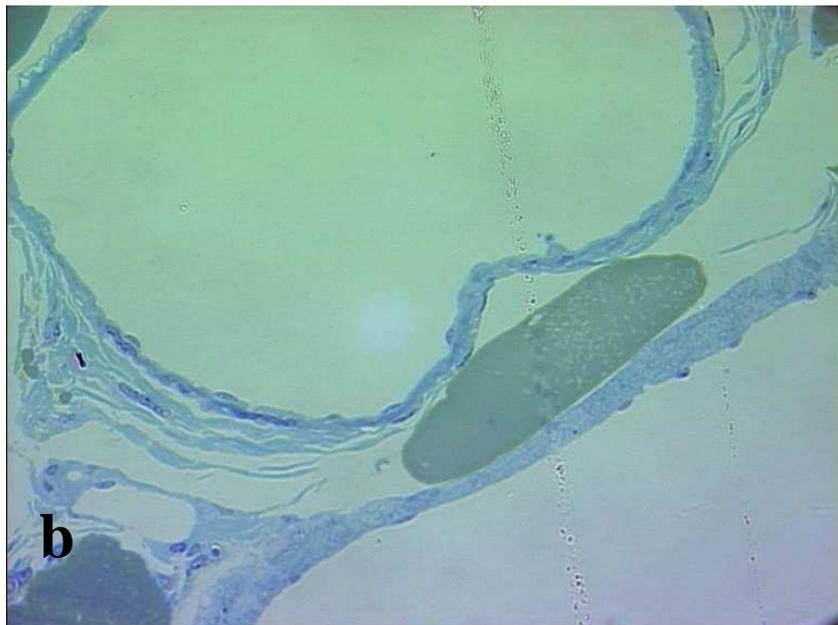
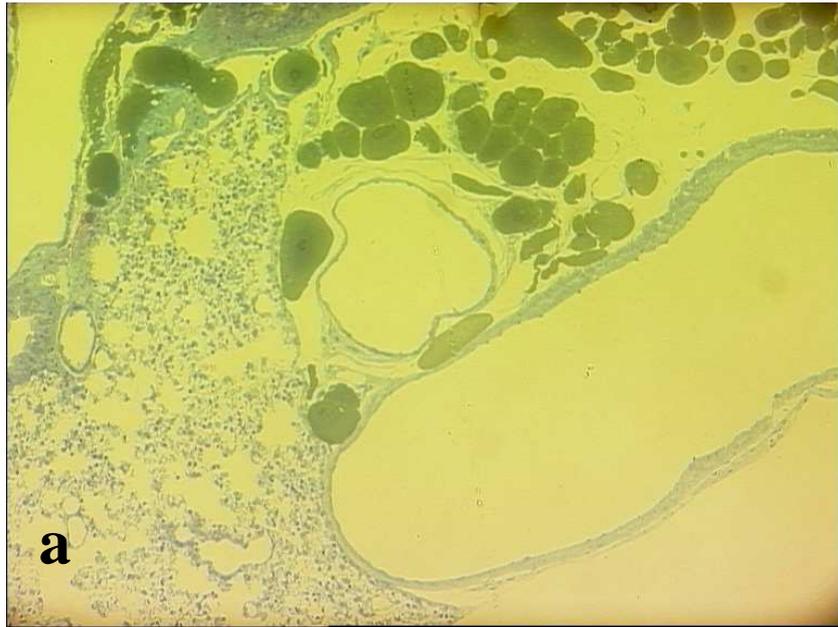
Zum Teil konnte eine Verteilung der Ablagerungen bis hin zu den Bronchiolen festgestellt werden, dabei kam es aber nicht zu einem Durchdringen des Bronchialepithels. Des Weiteren war auch keine Beschädigung der Basalmembran der Gefäße erkennbar. Es konnten dünne Membranen beobachtet werden, die die Plaques umschlossen. Dies vermittelte den Eindruck, dass es sich um gut abgrenzbare, vakuolenähnliche Strukturen handelte. In den Aufnahmen der Kontrolltiere wurde sichtbar, dass der Raum zwischen Gefäß und Bronchiolus normalerweise aus einem schmalen bindegewebigen Saum besteht (Abb.16b). Betrachtete man den Aufbau des Lungengewebes von den Gefäßen bis zu den Atemwegen schichtweise, beginnend auf der luminalen Seite des Gefäßes, folgte daraufhin regulär die Tunica intima, dann die Tunica media und darauf die Tunica adventitia. Letztere bestand überwiegend aus längs verlaufenden Kollagenfibrillen, zahlreichen elastischen Fasern sowie Fibroblasten und ging ohne scharfe Grenze in das benachbarte lockere Bindegewebe über. Dem Bindegewebe folgte weiterhin die Tunica muscularis und dann die Tunica mucosa des Bronchiolus. Folgerichtig zeigte sich also eine Verdrängung oben genannter Strukturen durch das fettähnliche Material, da es sich zwischen dem Gefäßlumen und dem Bronchialepithel erstreckte (Abb.18 und 19). Ebenso ließ sich eine leichte Komprimierung der Alveolen erkennen. Die Gefäße erschienen dilatiert (Abb. 18a und 19a).

An manchen Stellen erschien das Epithel hyperplastisch und weiterhin konnte eine peribronchioläre Bindegewebsvermehrung beobachtet werden (Abb. 20). Es bestand der Verdacht auf eine Fibrosierung, die ursächlich für die Verbreiterung des peribronchiolären Bereichs gewesen sein dürfte. Um dies genauer überprüfen zu können, wurden weitere transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

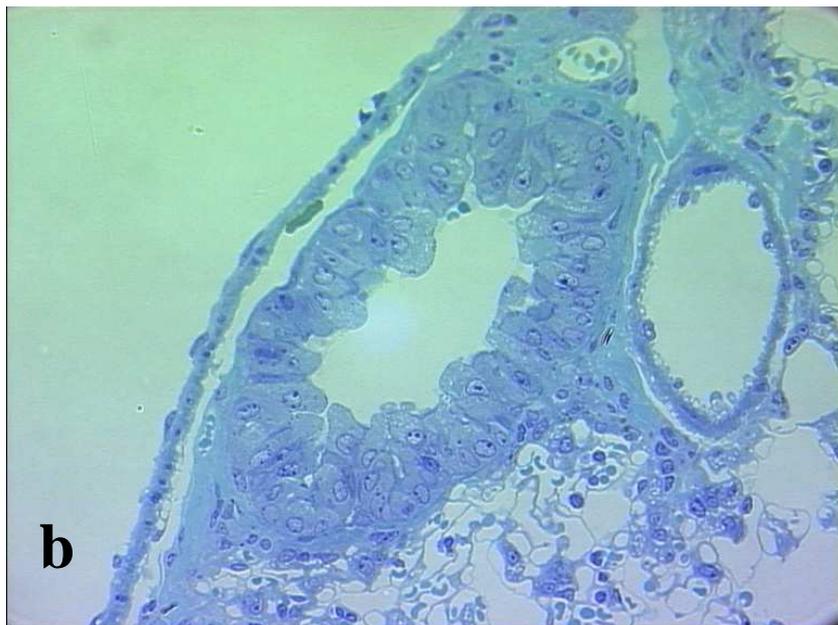
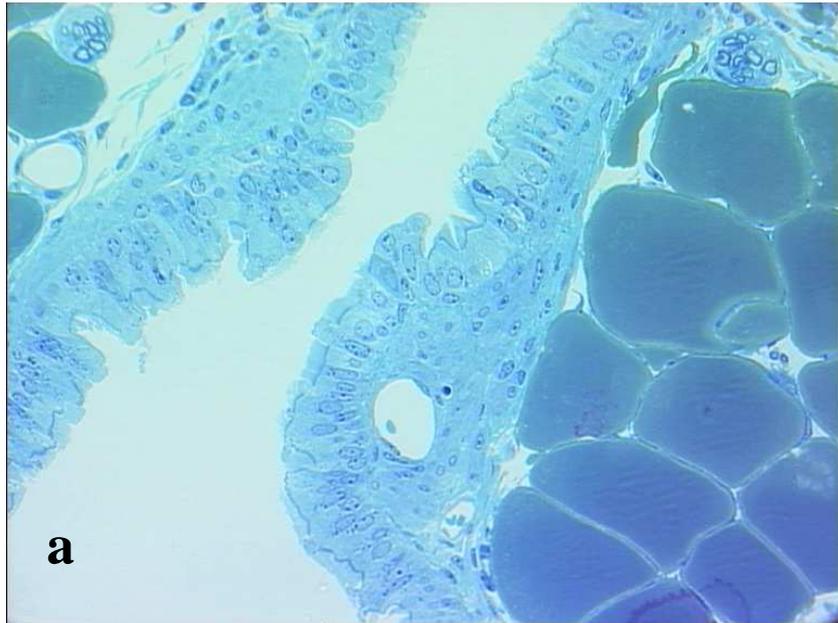
Das Alveolarepithel zeigte wie schon in den lichtmikroskopischen Aufnahmen Emphyseblasen bei einem ansonsten regelrechten Aufbau.



**Abbildungen 18 a + b:** Semidünn-Schnitte der Gen-depletierten- Mäuselungen, a) 10fache Vergrößerung: Bronchiolus mit peribronchialen Ablagerungen, b) 40fache Vergrößerung: Ablagerungen in stärkerer Vergrößerung mit Anschnitten von peripheren Nerven.



**Abbildungen 19 a + b:** Semidünn-Schnitte der Gen-depletierten- Mäuselungen, a) 10fache Vergrößerung: perivaskuläre Ablagerungen b) 40fache Vergrößerung: Ablagerungen in stärkerer Vergrößerung.



**Abbildungen 20 a + b:** Semidünn-Schnitte der Gen-depletierten- Mäuselungen, a) 40fache Vergrößerung: hyperplastisches Epithel mit peribronchialen Ablagerungen, b) 40fache Vergrößerung: peribronchioläre Bindegewebsvermehrung.

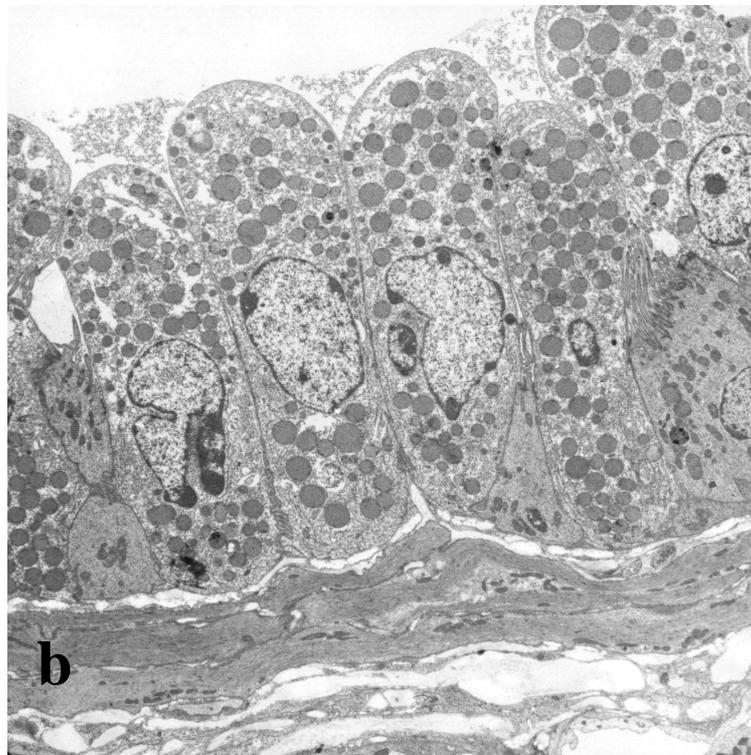
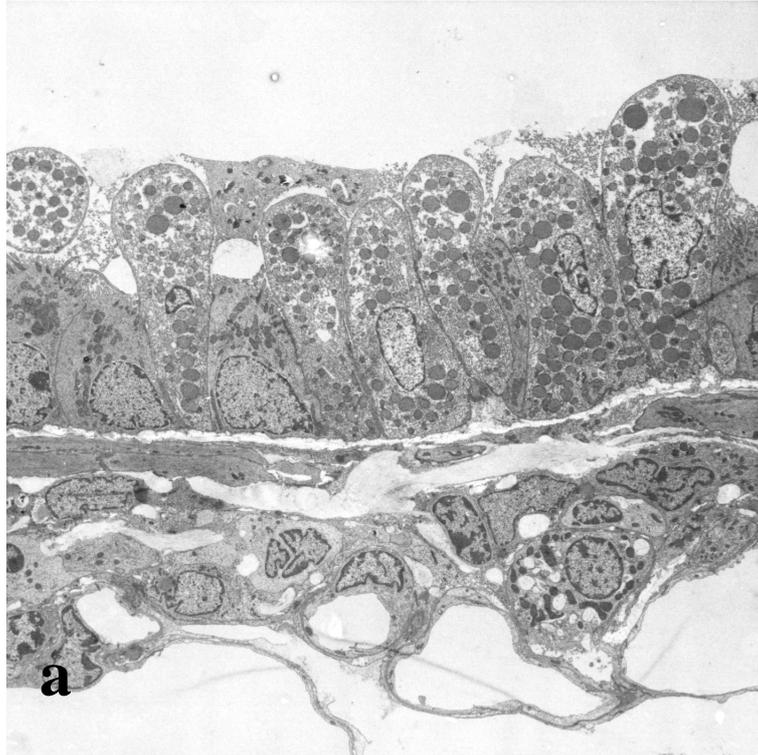
### ***3.6 Elektronenmikroskopische Morphologie***

#### **3.6.1 Wildtyp-Mäuse**

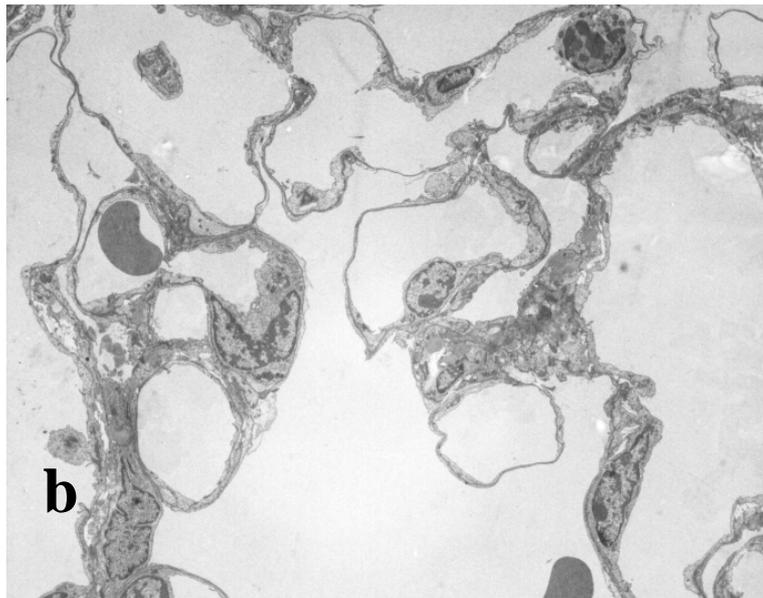
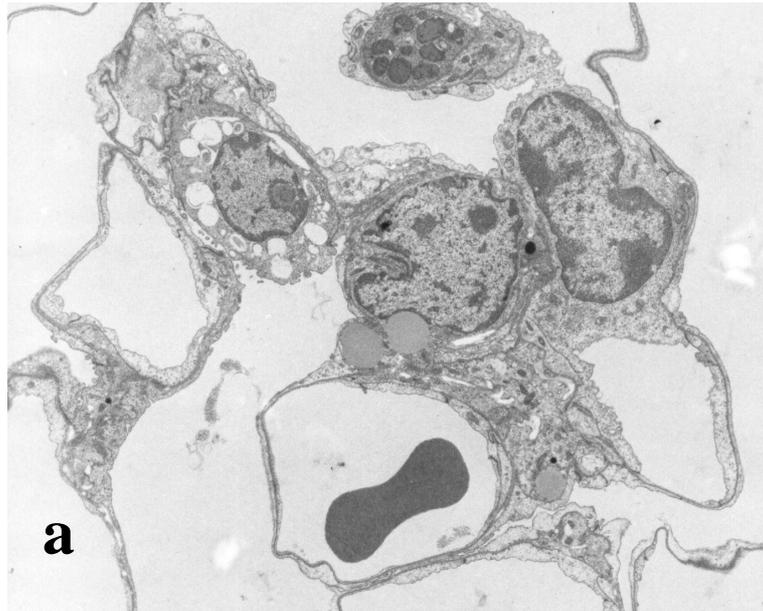
Das Lungenparenchym der Kontrolltiere wies transmissionselektronenmikroskopisch keine Besonderheiten auf. Im Bereich der Bronchioli waren keine pathologischen Veränderungen erkennbar (Abb. 21).

Das in der Regel sehr dünne Interstitium als Grundlage der Alveolarsepten wies nur wenige elastische und retikuläre Fasern sowie schmale Bündel von Kollagenfibrillen auf. Vereinzelt waren Fibroblasten anzutreffen, daneben kamen Makrophagen, Fibrozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Mastzellen im Interstitium vor.

In Abb. 22 b konnte ein Querschnitt einer mäßig kontrahierten Arteriole dargestellt werden. Der Aufbau des Gefäßes ließ keine Unregelmäßigkeiten erkennen. Es waren ebenso unauffällige pulmonale Nerven sichtbar (Abb. 23). Es ließ sich dabei erkennen, dass die Nervenfasern infolge ihres gewellten Verlaufs in verschiedenen Richtungen angeschnitten wurden. Ein schmaler Schrumpfraum war erkennbar, der sich zwischen dem faserreichen Bindegewebe und der Perineuralscheide der Nerven befand.



**Abbildungen 21 a + b:** Elektronenmikroskopische Abbildung der Lungenpräparate der Kontrolltiere. a) 1413fache Vergrößerung und b) 2156fache Vergrößerung: Bronchioli.



**Abbildungen 22 a + b** : Elektronenmikroskopische Abbildung der Lungenpräparate der Kontrolltiere. a) 2784fache und b) 1293fache Vergrößerung: regelrechtes Alveolarepithel.



**Abbildungen 23:** Elektronenmikroskopische Abbildung eines Kontrolltierpräparates. Darstellung eines pulmonalen peripheren Nervens, 2784fache Vergrößerung.

### **3.6.2 Gen-depletierte-Mäuse**

Bei der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung bestätigten sich die aus den Semidünn-Schnitten gewonnen Ergebnisse bezüglich des Lungenparenchyms. Die Bronchioli zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine leichte Hyperplasie mit einem unruhigen Zellbild (Abb. 24a und b). Noch deutlicher wurde sichtbar, dass die Ablagerungen von einer zellmembranähnlichen Struktur umschlossen wurden und damit an die Bronchialschleimhaut angrenzten, nicht jedoch infiltrativ-tumorös in sie eindringen (Abb. 25a und 26). Einzelne Gefäße stellten sich dilatiert dar.

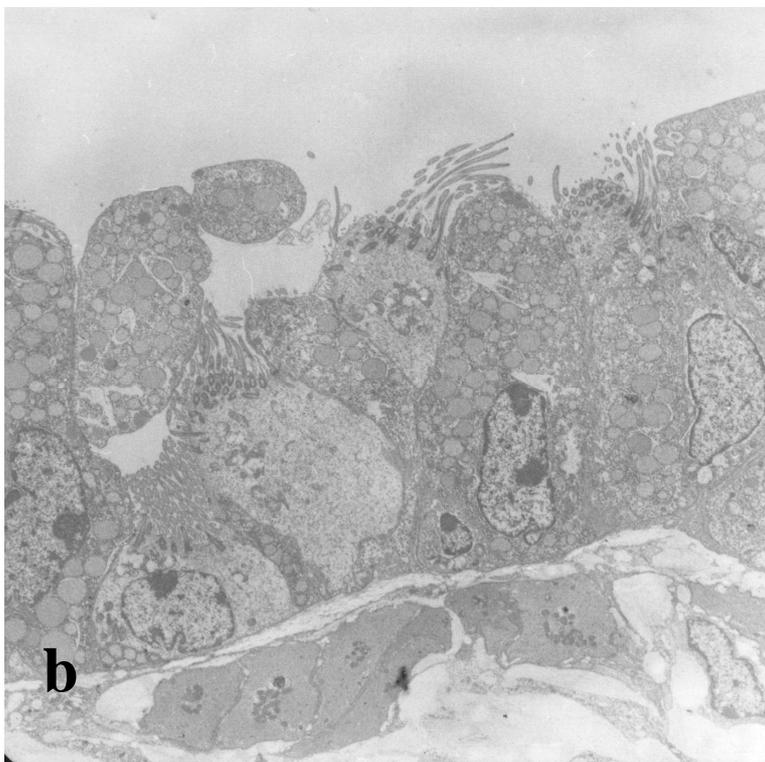
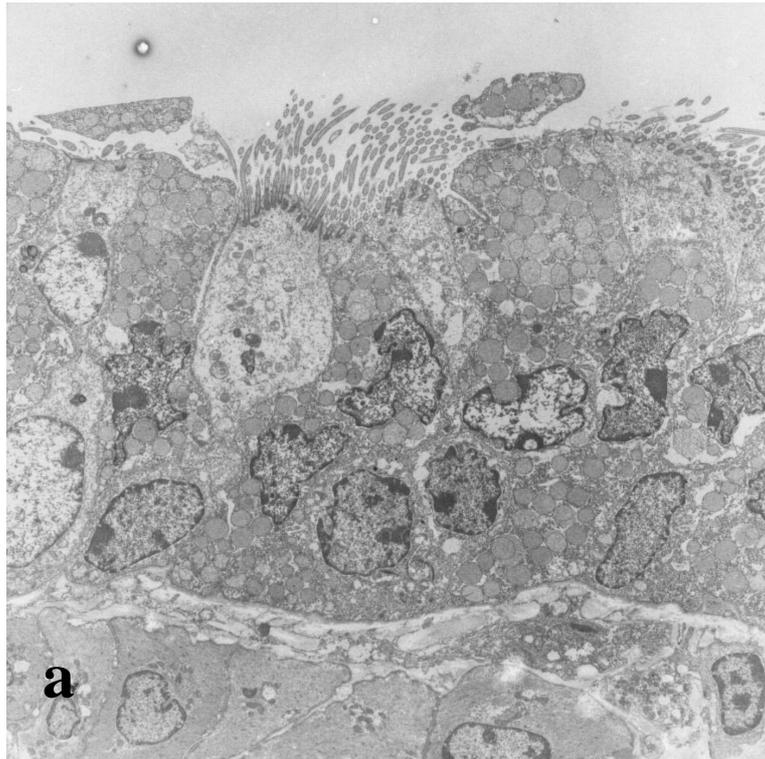
Eine eindeutige Schichtung der Flimmer- und Clarazellen ließ sich nicht erkennen. Insbesondere die Muskulatur erschien hypertrophiert.

Im Bereich der Alveolen zeigten sich neben den Kapillaren, Typ I und Typ II Pneumozyten auch Leukozyten. Es gab jedoch keine eindeutige Vermehrung.

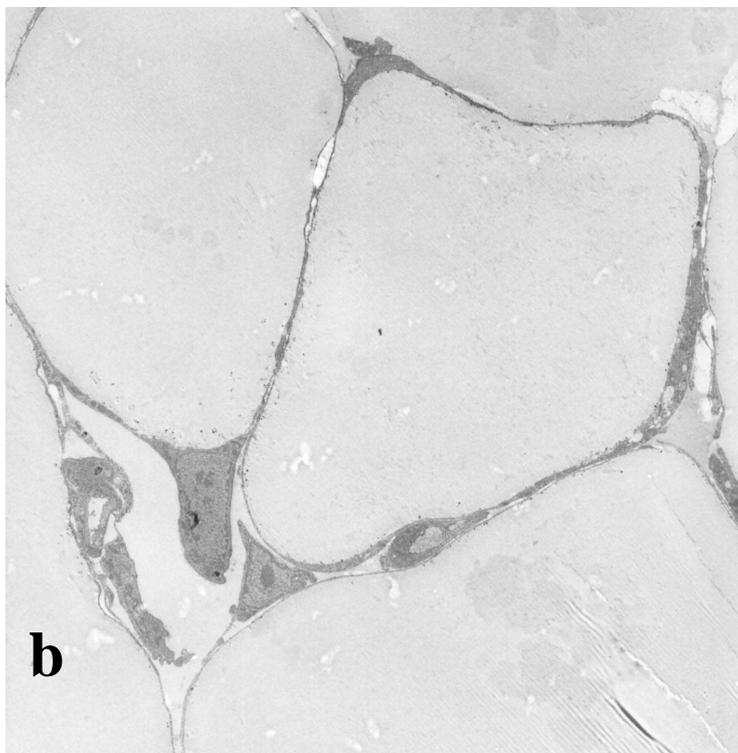
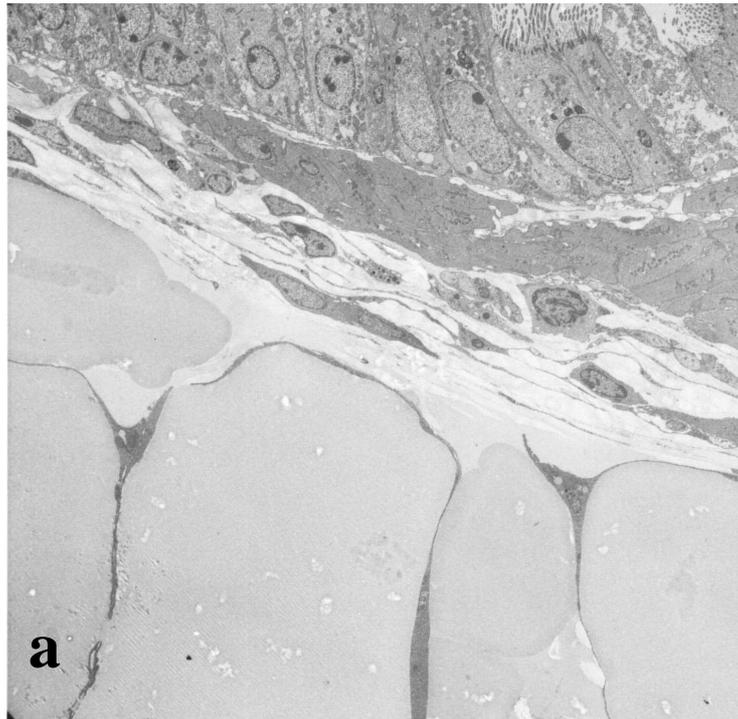
Im Alveolarlumen konnten ultrastrukturell Makrophagen verifiziert werden, deren Zytoplasma zahlreiche Sekundärlysosomen und Vakuolen enthielt und deren Oberfläche durch Pseudopodien unruhig gestaltet war (Abb. 25 b).

Um die Morphologie der vegetativen Nerven vergleichen zu können, wurde auch bei den Gen-depletierten Mäusen Nervenfasern analysiert, die sich in direkter Nachbarschaft eines Bronchiolus befanden. Es konnten keine Unterschiede zu den Kontrolltieren festgestellt werden.

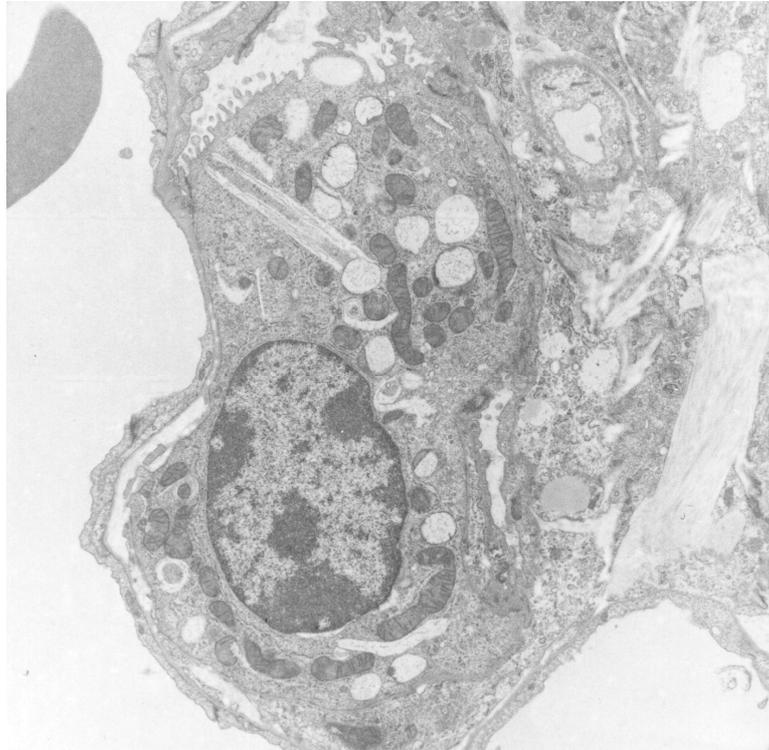
Bei den Gen-depletierten Mäusen gelang es ebenfalls die Binnenstruktur einiger Kinozilien im Querschnitt darzustellen. Es ließen sich zwei getrennte, zentrale Mikrotubuli und neun periphere Mikrotubuluspaare (=Doubletten), die in konstantem Abstand voneinander kreisförmig angeordnet waren, erkennen. Diese „9+2“ genannte Strukturanordnung stellte sich somit ordnungsgemäß dar.



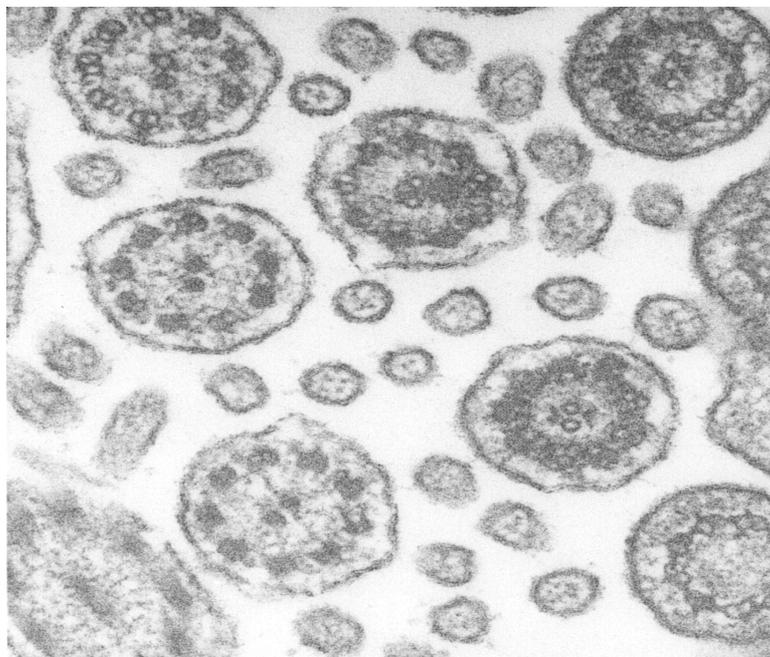
**Abbildungen 24 a+b:** Elektronenmikroskopische Abbildungen von Gen-depletierten Lungenpräparaten. a) und b) 2156fache Vergrößerung: Bronchialepithel mit unruhigem Zellbild.



**Abbildungen 25a + b:** Elektronenmikroskopische Abbildungen von Gen-depletierten Lungenpräparaten. a) 1000fache Vergrößerung: Ablagerungen mit zellmembranähnlicher Struktur an Bronchialepithel anlagernd und b) 1293fache Vergrößerung: Ablagerungen mit zellmembranähnlicher Struktur.



**Abbildung 26:** Elektronenmikroskopische Abbildungen von Gen-depletierten Lungenpräparaten. 4646fache Vergrößerung: Makrophagen mit Vakuolen und Pseudopodien.



**Abbildung 27:** Elektronenmikroskopische Abbildungen von Gen-depletierten Lungenpräparaten. 77500fache Vergrößerung: Kinozilien im Querschnitt. „9+2“ Strukturanordnung der Mikrotubuli.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einleitung

In der Mortalitätsstatistik stehen Lungenerkrankungen mit 10% an dritter Stelle. Sie machen ebenfalls 15% aller berufsbedingten Erkrankungen aus. Darüber hinaus sind 40% aller Todesfälle auf Intensivstationen pulmonaler Genese, und als Todesursache infektiöser Krankheiten führen weltweit Pneumonien (Seeger, 1999).

Darüber hinaus werden nach Angaben der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. pneumologische Volkskrankheiten wie Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Bronchitis in den nächsten 10 Jahren um etwa 25% zunehmen, die bösartigen Erkrankungen der Lunge um etwa 30% (Pneumologie, 2000). Internationalen Berechnungen zufolge wird die chronische obstruktive Bronchitis bis zum Jahr 2020 vom momentan vierten auf den dritten Rang der Todesursachenstatistik vorrücken, der Lungenkrebs vom zehnten auf den fünften.

In Deutschland wird die Zahl der Krankenhaustage aufgrund von pneumologischen Krankheiten ebenfalls bis zum Jahr 2010 um ca. 25% zunehmen, bei den bösartigen Neubildungen der Atmungsorgane um über 30% (Pneumologie, 2000).

Diese Tatsachen unterstreichen die sozioökonomische Bedeutung von Lungenerkrankungen und erklären das Interesse an neuen Optionen bezüglich Diagnostik und Therapie.

Bei der Behandlung von Pneumonien, die beispielsweise auch bei der Mukoviszidose eine der Hauptursachen von Mortalität und Morbidität darstellen (Rosenstein et al., 1995), könnte eine höhere lokale Konzentration von Antibiotika durch aerosolische Gabe eine entscheidende Verbesserung der Eradikation von Erregern bewirken.

Aufnahmestudien konnten bereits zeigen, dass der Pharmakatransporter PEPT2 verschiedene endogene sowie auch exogene Substrate transportiert, darunter auch Peptidomimetika wie z.B.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Ganapathy et al., 1997). Aus Sicht von Pharmakologen sowie Pharmazeuten könnte die Entwicklung von neuen Substanzen, die spezifisch von PEPT2 transportiert werden, Hoffnung für effizientere und nicht-invasive Therapien wecken.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die pulmonale Rolle des hochaffinen Peptidtransporters PEPT2 auf tierexperimenteller Ebene durch PEPT2-Gen-depletierte Mausstämme untersucht werden. Dadurch sollte eine Grundlage zum Verständnis molekularer Peptid- und Pharmakatransportvorgänge unter physiologischen Bedingungen geschaffen

werden, die für die Entwicklung neuer Peptidomimetika im Rational Drug Design von entscheidender Bedeutung sein könnte.

#### **4.1.1 Pulmonaler Peptidmetabolismus**

Der hohe Bedarf an Nährsubstanzen in der Lunge wird über ein ausgeprägtes Netz an Transportsystemen gedeckt. Bereits seit über 20 Jahren wird die Existenz verschiedener Aminosäure-Transporter postuliert. Neben der Expression des Natrium-Aminosäure-Kotransporter (Brown et al., 1985), des Taurin Transporter TAUT (Liu et al., 1992) und des Glyzin-Transporters (Borowsky et al., 1993) konnten unter anderem Systeme für Cystein (Knickelbein et al., 1997) und Glutamin (Hautamaki et al., 1992) in der Lunge gefunden werden. Allerdings entstehen bei dem Abbau von Partikeln der zellulären Matrix oder von Surfactant-, Mukus- oder mikrobiellen Proteinen nicht nur singuläre Aminosäuren, sondern auch Oligo- und Polypeptide. Dies ist auf die unterschiedlichen Peptidbindungs-Schnittstellen der Endo- und Ektopeptidasen zurückzuführen.

Vergegenwärtigt man sich den Transport von Stickstoffgruppen wie singuläre Aminosäuren, Oligopeptide und Proteine, so wurde erst 1968 berichtet, dass Aminosäuren schneller absorbiert werden, wenn sie statt in Form freier Aminosäuren als Peptide vorliegen (Craft et al., 1968). Dies machte man sich unter anderem bei Erkrankungen wie der Hartnup-Krankheit zu Nutze, bei der ein Defekt des Aminosäuretransportsystems vorliegt und die Patienten eine normale Absorption nur dann erreichen, wenn sie die Aminosäuren in Form von Dipeptiden verabreicht bekommen (Tarlow et al., 1970).

1972 konnten Addison et al (Addison et al., 1972) erstmals die Anreicherung eines Dipeptids in den Epithelzellen des Darmes nachweisen. Im Rahmen der Entdeckung des intestinalen Peptidtransporters PEPT1 (Fei et al., 1994) und der renalen Isoform PEPT2 (Boll et al., 1996) gelang im Jahre 1999 erstmals der Nachweis des Oligopeptidtransporters (Maier et al., 2002) auf molekularer und funktioneller Ebene auch in der Lunge, in Pneumozyten Typ II, Endothelzellen kleiner Gefäße sowie in Bronchialepithelzellen (Groneberg et al., 1999). Generell wird eine Bedeutung von PEPT2 in der Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase vermutet (Groneberg et al., 2004a; Meredith et al., 1995). So ist bekannt, dass Aminosäuren und Peptide aus dem ständigen Abbau von Oberflächenproteinen in signifikanten Mengen in der Alveolarflüssigkeit vorkommen und abtransportiert werden müssen. Die Aufnahme von Aminosäuren und Peptiden aus dem Alveolarraum der Lunge ist u. a. wichtig für die Aufrechterhaltung eines osmotischen Gradienten, der bei einer Akkumulation von Peptiden erhöht werden und zu einem erschwerten Gasaustausch führen kann. Ebenso wird die

Viskosität der Flüssigkeit des Alveolarraumes durch das Gleichgewicht der Peptide reguliert und auch das Wachstum von Mikroorganismen ist in entscheidendem Maße von dem Angebot an Peptiden abhängig und würde daher bei fehlendem Abtransport begünstigt werden (Helliwell et al 1994). Mit Hilfe von PEPT2-vermitteltem Transport kann außerdem eine Vielzahl von Stickstoffgruppen in den intrazellulären Stickstoffpool gelangen.

Allerdings ist die Funktion von PEPT2 in der Lunge bisher noch nicht ausreichend erforscht, wobei zuerst seine Rolle bei der Erhaltung der pulmonalen Homöostase geklärt werden sollte. Zur Charakterisierung dieser Rolle wurden in dieser Arbeit PEPT2-Gen-depletierte Mäuse auf Veränderungen im Atemtrakt unter physiologischen Bedingungen untersucht. Dazu wurden lichtmikroskopische strukturelle und elektronenmikroskopische ultrastrukturelle Untersuchungen durchgeführt, die deutliche Veränderungen bei den Gen-depletierten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen zeigten.

### ***4.2 Diskussion der Methodik***

Zur Klärung der offenen Fragen hinsichtlich der physiologischen, aber auch klinisch-therapeutischen Bedeutung des Peptidtransportproteins PEPT2 wurde durch die Kooperationspartnerin Frau Professor Dr. Daniel eine Mauslinie generiert, in der das PEPT2-Gen gezielt inaktiviert wurde (Rubio-Aliaga et al., 2003).

#### β-Galaktosidase-Nachweis

Die Gendeletion wurde über die Reverse Transkription- Polymerase- Kettenreaktion (RT-PCR) überprüft, und es konnte keine mRNA von PEPT2 in allen -/- Tieren nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Validität der Gen-depletion.

Es war damit gelungen, ein elektrogenes Nährstofftransportprotein der Zellmembran gezielt auszuschalten. PEPT2-Gen-depletierte Mäuse wurden diesbezüglich 2003 erstmals beschrieben (Rubio-Aliaga et al., 2003; Shen et al., 2003), aber bislang noch nicht auf die Atemwegsmorphologie und Histopathologie untersucht, so dass die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Charakterisierung des pulmonalen Phänotyps Peptidtransportergen-depletierter Mäuse die erste Analyse dieser Art ist.

Mittels einer lacZ-Darstellung konnte ebenfalls der Nachweis erbracht werden, dass die -/- Mäuse kein PEPT2 Gen mehr enthalten.

Das lacZ-Gen ist ursprünglich ein Gen des Bakteriums *E. coli*, welches für eine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert kodiert. Dieses Enzym spaltet natürlicherweise Laktose, aber auch das synthetische Substrat 5-Brom-4-chlor-4-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal), was zur Entstehung eines blauen Indigofarbstoffs führt. Durch Einfügen des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens in die kodierende Region des ersten Exons wurde das PEPT2 Gen markiert. In der vorliegenden Arbeit konnte somit durch die Hydrolyse von X-Gal bestätigt werden, an welchen Stellen PEPT2 in Wildtyp-Tieren exprimiert wird. Die Validität der Methode und damit die erfolgreiche Gen-depletion wurden durch die Korrelation mit den Immunhistochemie-Ergebnissen und der  $\beta$ -Galaktosidase-Gen-Aktivität demonstriert.

### Immunhistochemie

Seit den 1980er Jahren wird die klassische Histologie durch die Immunhistochemie ergänzt. Durch die Sichtbarmachung einer Antigen-Antikörper-Reaktion mittels einer Chromogenentwicklung am Ort des Antigens konnte somit ein Verfahren etabliert werden, dass das Vorhandensein von spezifischen Proteinen nachweist. Dieses Verfahren konnte in der vorliegenden Arbeit das Fehlen von Peptidtransporter-Antigen in Gen-depletierten Mäusen dokumentieren. Der dabei verwendete Antikörper wurde 1998 von Doring et al. beschrieben und in verschiedenen Arbeiten verwendet (Doring et al., 1998; Groneberg, 2003). Er richtet sich gegen das carboxyterminale Ende des Transporterproteins und lokalisiert PEPT2 in Typ II Pneumozyten, Bronchial- und Trachealepithelzellen der Wildtyp-Tiere. Die fehlende Immunreaktion bei den Gen-depletierten Tieren bestätigte die molekularbiologisch durch Genotypisierung und lacZ-Färbung gewonnenen Aussagen.

### Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Morphologie

Da es in dieser Arbeit um die Charakterisierung der Morphologie des Lungengewebes ging, wurden histomorphologische Untersuchungen durchgeführt.

Schon um 1600 wurde von Hans und Zacharias Janssen aus Holland das erste Mikroskop entwickelt. Um Zellen genauer erfassen zu können, gelang erstmals Anton van Leeuwenhoek die Entwicklung einer Linse mit bis zu 270facher Vergrößerung. Ebenso die Einführung von Fixierungs- und Färbemethoden in die Mikrobiologie Ende des 19. Jahrhunderts verhalfen zu weiteren Einblicken in die Gewebshistologie.

Aus einer großen Anzahl an verschiedenen histologischen Färbemethoden, die im Laufe der letzten 120 Jahre entwickelt wurden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Hämatoxylin-

Eosin (HE)-, die Perjod-Schiff-Säure (PAS) - und die Masson-Goldner-Färbung (MG) ausgewählt.

Mit Hilfe der HE-Färbung, einer routinemäßig durchgeführten Übersichtsfärbung konnten in den Gen-depletierten Tieren Anzeichen von Bronchialhypertrophie, hypertrophierter Muskulatur, Emphyseblasen und Gefäßdilataion dargestellt werden.

Eine Masson-Goldner-Färbung der Mäuselungen wurde durchgeführt, um eine eventuelle Fibrose besser sichtbar machen zu können. Es konnte keine Fibrose nachgewiesen werden.

Die PAS-Färbung sollte weitere Hinweise geben, ob es sich bei Ablagerungen um Mukus- oder glykogenhaltige Substanzen handelt. Hyaline Membranen als Vorläufer von Fibrose hätten ebenfalls dargestellt werden können. Dafür ergaben sich keine Anzeichen.

Jedoch wird auch in der vorliegenden Arbeit deutlich, dass ein noch höherer Vergrößerungsbereich von bis zu 0,3nm Veränderungen zeigen kann, die im Lichtmikroskop unentdeckt bleiben. Dies wurde zum ersten Mal 1931 von M. Knoll und E. Ruska erreicht, die Elektronenstrahlen zur Auflösung von Strukturen verwendeten. Mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) kann eine Auflösung von 0,1nm erreicht werden und auch die plastische Auflösung ist der des Lichtmikroskops überlegen. Die Kontrastierung der biologischen Proben wurde in der vorliegenden Arbeit mit Osmiumsäure durchgeführt. Eine Methode, die 1934 von Ladislaus Marton zum ersten Mal publiziert wurde.

Die Elektronenmikroskopie verhalf in der Vergangenheit zu weitreichenden Erkenntnissen, unter anderem konnte die bereits 1911 postulierte Theorie des Atommodells durch Ernest Rutherford durch die Betrachtung von atomaren Strukturen mit Hilfe des TEM anerkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Semidünnschnitte sowie Ultradünnschnitte ausgewertet, die sich als besonders aussagekräftig erwiesen, da in ihnen zum ersten Mal peribronchial abgelagertes fettähnliches Material identifiziert werden konnte. Diese oder ähnliche Arten von Ablagerungen in der Lunge wurden bislang noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die Nachteile der Elektronenmikroskopie liegen in der aufwändigen Vorbereitung der Proben, welche zu Artefakten führen können. Das Probenmaterial wird von Elektronen durchstrahlt und muss daher eine Dicke von ca. 50-80nm haben (Ultradünnschnitt). Der Elektronenstrahl kann zu einer Schädigung des zu untersuchenden Materials führen, beispielsweise durch Erwärmung oder Wegstoßen ganzer Atome nach Kollision mit den schnellen Elektronen, aber auch durch Einschuss von Fremdatomen aus dem Vakuum in die Probe. In der vorliegenden Arbeit wurden keine wesentlichen Artefakte beobachtet, so dass die Auswertung der Befunde nicht beeinträchtigt war.

### ***4.3 Biologische Bedeutung der Befunde***

Der entscheidende Befund dieser Arbeit liegt in den mittels Semi- und Ultradünnschnitttechnik sichtbar gemachten peribronchialen Ablagerungen. Bislang wurden ähnlich gefärbte Substanzen bei Krankheiten wie Angiomegalie (D'Andrea et al., 1997) oder Neuroblastom (Vuia et al., 1975) beschrieben und als osmiophil benannt, jedoch noch nie in großem Umfang im Lungengewebe von Tieren oder Menschen vorgefunden. Die Ablagerungen, die in den Gen-depletierten Mäusen gefunden wurden, haben eine ähnliche Morphologie, können jedoch nicht als osmiophil beschrieben werden, da ihre Elektronendichte nicht hoch genug ist. Dies spricht nicht gegen die Hypothese, dass es sich um fettähnliches Material handelt, da die Osmium-Reaktion von der Menge an Doppelbindungen, welche die Fettsäure enthält, abhängig ist. Es würde sich in diesem Fall also eher um eine Fettverbindung mit mehr gesättigten Fettsäuren oder eine Mischung mit Proteinen handeln. Weitere massenspektrometrische Studien müssen hier folgen, um die Komposition der Ablagerungen genauer biochemisch charakterisieren zu können. Denn auch bei enzymopathischen Lungenspeicherkrankheiten, die durch intermediäre Zellstoffwechselstörungen und konsekutiver Anhäufung von Metaboliten entstanden sind, finden sich Retentionen im Interstitium (Langer et al., 2004; Letterer, 1956). Beispiele hierfür wären Erkrankungen wie die Glykogenosen oder Sphingolipoidosen. Interessanterweise bleibt die Lungenspeicherung in diesen Fällen oft klinisch unbemerkt oder tritt zumindest in der gesamten Symptomatik nicht in den Vordergrund, was im Einklang steht, mit den bisherigen Charakterisierungen von PEPT2 <sup>-/-</sup> Mäusen, bei denen zumindest phänotypisch keine offensichtlich makroskopisch oder histologisch sichtbaren Pathologien nachgewiesen werden konnten (Shen et al., 2003). Differenzieren kann man diese Gruppe der Enzymopathien nur durch die Bestimmung der gespeicherten Metaboliten.

Aber auch die Art u. Weise der Ablagerungen können Orientierung für die Einordnung der Krankheit geben. Z.B. lagern sich Cerebroside charakteristischerweise tubulär ab, bei der Tay-Sachs-Erkrankung sind es leere Vacuolen, die in den Speicherzellen gefunden werden. Ähnlich der Tay-Sachs-Erkrankung erscheinen die Ablagerungen auch bei den <sup>-/-</sup> Mäusen in der vorliegenden Arbeit tropfen- oder vacuolenartig.

Außerdem muss die Lokalisation im Detail begutachtet werden, da hieraus pathogenetische Schlüsse gezogen werden können.

In einer Arbeit von W. Giese wurde die pathologische Anatomie von Thesauropathien diskutiert. Dabei handelt es sich um Speicherkrankheiten infolge von Retention und Deposition verschiedener Substanzen, infolge derer Schäden an Zellen oder Geweben

eintreten. Seiner Aussage nach gibt es kein anderes Organ, in dem eine „zeitweilige oder dauernde Deposition von Substanzen verschiedenster Art und Herkunft so regelmäßig und in so großer Menge nachgewiesen werden kann“ wie die Lunge. Allgemein kann man die Speicherstoffe einteilen in ihre Deposition a) im Alveolarraum, b) im Interstitium und c) in den Lymphknoten. Die Ablagerungen können frei im Alveolarraum vorliegen (zum Beispiel bei der Alveolarproteinose), in zelluläre Form durch Aufnahme von Alveolarmakrophagen bzw. Speicherzellen (z.B. bei Lipoidpneumonien) oder gebunden an Faserstrukturen im Interstitium (z.B. bei der Calcinose). Die Infiltration in das Interstitium durch zelluläre Depositionen ist typisch für generalisierte Speicherungskrankheiten, wie der Gangliosidose. Hingegen kommt die lymphonoduläre Speicherung fast nur bei Staubkrankheiten, insbesondere der Anthrakose vor.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Ablagerungen peribronchial und perivaskulär gefunden werden. Dies entspricht dem Verlauf von Lymphgefäßen, so dass die Lokalisation für eine Aufnahme des Retentionsmaterials in die Lymphbahnen sprechen würde. Die stark entwickelten Lymphbahnen sorgen für die Drainage des Interstitiums und des besonders für Ödeme anfälligen Alveolarraumes, zudem haben sie eine wichtige Reinigungsfunktion von partikulären und löslichen Schadstoffen. In entzündlichen Atemwegen kommt es zudem zu einer Proliferation von Lymphgefäßen und zu einer Dilatation von Blutgefäßen (Baluk et al., 2005). Die deutlich sichtbaren Membranen und Zellkerne, die durch das Material als flache Scheibe an den Rand gedrückt wurden, lassen annehmen, dass es sich um ein intrazytoplasmatisches Geschehen handelt. Dabei könnte es sich zum Beispiel um Makrophagen handeln, die auch im Interstitium aktiv sind und hier für die Phagozytose organischer und anorganischer Partikel zuständig sind.

Obwohl die Blut- und Lymphgefäße in den Aufnahmen der vorliegenden Arbeit dilatiert erschienen und eine Bronchialmuskelhypertrophie vorlag, welches für eine Entzündung der Atemwege sprechen würde, konnten keine Entzündungszellen in den lichtmikroskopischen Aufnahmen gefunden werden. In diesem Zusammenhang könnte der Transport von n-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP) durch den Peptidtransporter eine Rolle spielen. fMLP ist ein von Bakterien gebildetes Peptid, welches auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkt und zur Bildung von Arachidonsäuremetaboliten sowie zu Sauerstoffradikalen führt. Merlin et al. konnte zeigen, dass PEPT1 fMLP aktiv transportiert und bei Inhibition zu einer 50% Reduktion von transepithelialer Migration neutrophiler Granulozyten führt (Buyse et al., 2002; Merlin et al., 1998). Es könnte also sein, dass die aufgrund PEPT2-Gen-depletion geringere chemotaktische Wirkung und die damit verbundene

geringere Einwanderung von Granulozyten zu einer verringerten entzündlichen Reaktion geführt hat.

Eine Theorie, dass PEPT2 möglicherweise Schutz- und Säuberungsfunktion besitzt, wurde von Shen et al. postuliert (Shen et al., 2003; Teuscher, 2004). Im zentralen Nervensystem wird PEPT2 in Astrozyten, subependymalen und ependymalen sowie epithelialen Zellen des Choroidplexus exprimiert (Groneberg et al., 2004b). Möglicherweise trägt PEPT2 hier zur Reabsorption von Peptiden aus dem Liquor bei. Eine ähnliche Hypothese wurde über die Funktion von PEPT2 in der laktierenden Mama aufgestellt (Groneberg et al., 2002b). PEPT2 soll dabei zur Wiederaufnahme von kleinen Peptiden, die sich durch die Hydrolyse von Milchproteinen angesammelt haben, beitragen. Gleichzeitig könnte dies bedeuten, dass eine spezifische Blockade von PEPT2, eine verbesserte Applikation von Arzneimitteln in das Zentrale Nervensystem zur Folge hätte (Shen et al., 2003). Ebenso kann es aber auch bedeuten, dass eine Anreicherung von Abbauprodukten, die möglicherweise bei den Gen-depletierten Tieren durch Makrophagen abtransportiert wurden, zu den fulminanten Ablagerungen geführt hat, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde.

#### **4.3.1 Endogene Substrate für PEPT2**

PEPT2 wurde ursprünglich als Transportsystem für Oligopeptide (Di- und Tripeptide) identifiziert. In Anbetracht der Tatsache, dass es 20 proteinogene L-alpha-Aminosäuren gibt, ergeben sich 400 verschiedene Di- und bis zu 8000 verschiedene Tripeptide, die ein Molekulargewicht zwischen 96.2 D (Di-Glycine) bis zu 522.6 D (Tri-Tryptophan) besitzen und die durch PEPT2 transportiert werden können (Brandsch et al., 2004). Da außerdem Oligopeptide mit einer D-enantiomeren Aminosäure im N-terminalen Ende eine hohe Affinität und Transportrate aufweisen können, ist die Anzahl möglicher PEPT2-Substrate sogar noch erheblich größer. Es ist also nahe liegend, dass ein fehlender Transport dieser endogenen Substrate zur Akkumulation führen kann und konsekutiv zu Ablagerungen, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Allerdings ist zusätzlich von Interesse, welche Auswirkungen die Inaktivierung von PEPT2 auf die pulmonale Homöostase hat in Bezug auf die intrinsischen Funktionen der zu transportierenden Peptide.

Denn PEPT2 spielt diesbezüglich auch eine Rolle beim Transport membranstabilisierender Substanzen. Der Nachweis des Carnosin-Transports im Trachealepithel durch Yamashita et al. 1998 unterstützt diese Hypothese (Yamashita et al., 1998). Carnosin ist ein Antioxidanz, wirkt proliferationsfördernd auf Lungenfibroblasten und nach Beobachtungen von McFarland

et al. (McFarland et al., 1994) verzögert es den Alterungsprozess von fetalen Lungenzellen. Durch die hohe Sauerstoffexposition des respiratorischen Epithels trägt Carnosin somit zur Regeneration und Stabilisation des Epithels mit bei (Perel'man et al., 1989b; Perel'man et al., 1989a). Bislang konnte die Aufnahme von Carnosin über PEPT2 im Choroidplexus des ZNS nachgewiesen werden. Diese Studie zeigte, dass PEPT2 für ca. 90% des Carnosin-Transportes zuständig ist (Teuscher, 2004). Dadurch dass Typ II-Pneumozyten und Bronchialepithelzellen PEPT2 exprimieren, kann Carnosin auf diesem Wege direkt aus dem extrazellulären Raum aufgenommen werden und bei der Zellregeneration- und Proliferation dieser Zellen mitwirken. Die hier beobachtete Gewebspathologie könnte diesbezüglich auch mit einer fehlenden Regenerationsfähigkeit im Zusammenhang stehen.

Cystein wird ebenfalls von PEPT2 transportiert und ist ein wesentlicher Bestandteil und limitierender Faktor des Glutathionstoffwechsels. Da Glutathion ein hoher Stellenwert im pulmonalen Antioxidationssystem beigemessen wird, kann Cystein als PEPT2-Substrat mit Bedeutung für die Lungenhomöostase gesehen werden (Brown et al., 1992; Deneke et al., 1989).

Die Inaktivierung dieses Transportes und der damit verbundene Eingriff in das zelluläre antioxidative Abwehrsystem könnte zu den emphysematösen Veränderungen in den vorliegenden Abbildungen geführt haben. Ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Erkrankung des Alpha 1-Proteaseinhibitor-Mangels könnte dem zugrunde liegen.

Da PEPT2 auch glutamin- und alaninhaltige Di- und Tripeptide aufnimmt, könnte ihm auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Blutglutamins und Blutalanins zugewiesen werden. Plumely et al. postulierte, dass der Lungen-Glutamin-Metabolismus einen ebenso großen Beitrag zum Glutaminhaushalt liefert, wie die gesamte Skelettmuskelmasse (Plumley et al., 1990a; Plumley et al., 1990b).

### **4.3.2 Exogene Substrate**

Die breite Substratspezifität rückt den Transporter aber auch in das Blickfeld therapeutischer Überlegungen, denn neben den physiologischen Substraten werden auch verschiedene pharmakologisch aktive Peptidomimetika aufgrund deren peptidähnlicher Struktur erkannt.

Bereits vor 4000 Jahren wurden inhalative Pharmaka zur Behandlung respiratorischer Erkrankungen verwendet, z.B. in Form von Atropa belladonna Blättern, die geraucht wurden, um Husten zu unterdrücken. Auch heiße Dämpfe und Meerwasser-Inhalationen waren üblich, um Atemwegobstruktionen zu erleichtern. Während der industriellen Revolution gab es so genannte Asthma-Zigaretten, die Stramoniumextrakte aus der Pflanze *Datura stramonium* (Weißer Stechapfel) enthielten. Bis zur ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts kann die Geschichte der modernen aerosolischen Pharmaka zurückverfolgt werden (Cushing et al., 1965). Durch Miller und Bates (Bates et al., 1966; Miller, 1973) wurden verschiedene topische und systemische Aerosole propagiert, nachdem sich eine sehr gute Perspektive für die aerosolische Administration abzeichnete.

Obwohl die orale und intravenöse Verabreichung von Medikamenten derzeit in der Behandlung von systemischen Erkrankungen den medizinischen Alltag beherrschen, wächst doch das Interesse an neueren inhalativen Anwendungen. Dabei kann der in dieser Arbeit untersuchte Pharmakatransporter PEPT2 eine Bedeutung spielen, wenn man die Substratspezifität berücksichtigt. Bereits eine Vielzahl von Substanzklassen wie Steroide (Cole, 2000; Kelly, 1999) (O'Riordan, 2002),  $\beta$ 2-Sympathomimetika (Fink et al., 2000) und Anticholinergika (Fink & Dhand, 2000; Rau, 1998) wurden klinisch erprobt und sind mittlerweile als Aerosole verfügbar. Diese werden allerdings nicht durch PEPT2 transportiert (Substratspezifität PEPT2s siehe Einleitung) und ein in der vorliegenden Arbeit beschriebener Funktionsverlust des Transporters kann keine direkten Einflüsse auf den pulmonalen Transport dieser Pharmakagruppen haben. Auf der anderen Seite ist jedoch aufgrund der beobachteten Ablagerungen evtl. ein indirekter Einfluss auf Aufnahmeprozesse möglich.

Als aktuellstes innovatives aerosolisches Arzneimittel wurde im Mai 2006 Exubera® auf dem deutschen Markt zugelassen. Dies ist ein inhalatives Insulin, welches in Zukunft die notwendigen häufigen subkutanen Injektionen vermeiden könnte (Cernea et al., 2006). Aufgrund der Eigenschaft als Peptid mit mehr als drei Aminosäuren wird es allerdings nicht durch PEPT2 transportiert. Auf der anderen Seite können Antibiotika bei rekurrenten Atemwegsinfektionen zum Beispiel bei der Mukoviszidose eingesetzt werden (Newhouse et al., 2001; O'Riordan et al., 1999; Smaldone et al., 2000). Dabei gibt es Substanzklassen wie

Cephalosporine, die durch PEPT2 transportiert werden. Hier kann ein wie in der vorliegenden Arbeit beschriebener Transporterfunktionsverlust zu einer reduzierten Aufnahme im Atemwegsepithel führen.

Inhalative Prostaglandinanaloga wie Iloprost haben sich bei der Behandlung der pulmonalen Hypertension ebenfalls als effektiv erwiesen (Langer et al., 2004), werden allerdings aufgrund eines fehlendes Di-/Tripeptidrückgrats ebenfalls nicht durch die Peptidtransporter transportiert.

Insbesondere im Rahmen der Tumorthherapie kommt den Peptidtransportern eine Bedeutung zu: Erste experimentelle Studien lassen vermuten, dass hier zytostatisch wirkende Substanzen wie Bestatin (Ubimex) über die Peptidtransporter gezielt in Zellen eingebracht werden können. Entscheidend hierfür ist der durch Studien bereits erbrachte Nachweis, dass die Expression von Peptidtransportern in epithelialen und nicht epithelialen Tumorzellen außerhalb der Lunge hochreguliert sein kann (Gonzalez et al., 1998; Knutter et al., 2002; Nakanishi et al., 1997). Bei der Charakterisierung der Bedeutung von Peptidtransportsystemen für den tumor-selektiven Pharmakatransport stellte sich heraus, dass die Administration von Bestatin über einen Monat die Lebensfähigkeit der implantierten Tumorzellen signifikant verringern konnte (Nakanishi et al., 2000). Diesbezüglich müsste eine Therapie bei Transportergen-depletierten Mäusen zu keiner Verringerung der Lebensfähigkeit der Tumorzellen führen.

In der Photodynamischen Therapie (PDT) spielt der Transport von Delta-Aminolävulinsäure (d-ALA) durch PEPT2 ebenfalls eine Rolle. Die PDT ist eine relativ neue Technik in der diagnostischen und therapeutischen Onkologie, die die Akkumulation von verschiedenen Photosensibilisatoren durch Tumorzellen nutzt (Rowe, 1998). Durch Lichtexposition einer bestimmten Wellenlänge aktiviert, generiert das sensibilisierende Agens reaktive Sauerstoff-Radikale, die Apoptose und Nekrose in neoplastischen Zellen verursachen (Dougherty et al., 1998). In diesem Zusammenhang würde der Peptidtransporter einen optimalen molekularen therapeutischen Angriffspunkt darstellen, um d-ALA oder andere Photosensitizer zu transportieren. In den hier untersuchten Gen-depletierten Mäusen dürfte sich d-ALA aufgrund mangelnder Transporteraktivitäten nicht in Tumoren anreichern.

#### **4.4 Ausblick**

Nachdem in dieser Arbeit mittels struktureller und ultrastruktureller Techniken weitgehende Veränderungen des pulmonalen Phänotyps bei PEPT2  $-/-$  Tieren nachgewiesen werden konnte, sollten nun weitere Studien folgen.

Dabei sollte die Analyse von pathophysiologischen Bedingungen erfolgen z.B. an einem Asthma-Tiermodell. Hier könnte mit Ovalbumin eine allergische Atemwegsentzündung induziert werden und auf Veränderungen analysiert werden.

In beiden Fällen sollten biochemische/molekularbiologische Untersuchungen bezüglich der Expression von Mukusproteinen folgen. Zelluläre Profile und Zytokinprofile müssten im Rahmen von bronchoalveolären Lavagen erfasst werden.

Nachdem die Bedeutung des Transporters unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht worden ist, sollten zur Charakterisierung eines potentiellen Einsatzes PEPT2s im Rational Drug Design neuer aerosolisch applizierter Pharmaka die genaue Genregulation und Expression des Transporter untersucht werden.

Bislang wurde ebenfalls auch erst eine Studie zum Thema der genetischen Vielfalt der Peptidtransporter- Expression in der humanen Population veröffentlicht (Pinsonneault et al., 2004). Eine Haplotypenanalyse des hPEPT2 kodierenden Gens SLC15A2 erbrachte die Präsenz von zwei verschiedenen häufigen Varianten, die in allen ethnischen Gruppierungen vorhanden waren.

Zum Nachweis der therapeutischen Relevanz von Peptidtransporter-vermitteltem Zytostatika-Transport in Tumoren müssen weitere Studien über die Expression von Transportern in pulmonalen Neoplasien, gefolgt von funktionellen Aufnahmestudien, durchgeführt werden. Diesbezüglich konnte bereits für epitheliale Gallenblasen-tumorzelllinien eine Peptidtransporter-Expression beschrieben werden (Knutter et al., 2002), ebenso für Pankreaskarzinomzelllinien (Gonzalez et al., 1998) und Fibrosarkomzelllinien (Nakanishi et al., 1997).

## 5. Zusammenfassung

Nach der erfolgreichen Herstellung einer Mauslinie, in der das PEPT2-Gen gezielt inaktiviert wurde, konnte in dieser Arbeit ein Beitrag geleistet werden zur pulmonalen Phänotypisierung. Im Vordergrund stand dabei die morphologische Analyse der Rolle des Transporters.

Mit Hilfe von lichtmikroskopischen Aufnahmen, sowie anhand von elektronenmikroskopischen Darstellungen wurden Knock-out Mäuse und Wildtypiere auf morphologische Auffälligkeiten hin untersucht und miteinander verglichen.

Die Ergebnisse ergaben in den lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahmen deutliche emphysematöse Veränderungen in allen Mäuselungen, jedoch stärker ausgeprägt bei den PEPT2  $-/-$  Tieren. Bei den Gen-depletierten Tieren ließ sich des Weiteren eine Hypertrophie der Bronchialschleimhaut darstellen. Die Masson-Goldner-Färbung und die PAS-Färbung ergaben bei keinem Tier morphologisch erkennbaren Pathologien.

In den Semidünnschnitten und den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in den Gen-depletierten Tieren vacuolenartige Ablagerungen sichtbar, die sich im periarteriellen und peribronchialen Raum verteilten. Weitere Auffälligkeiten wurden im Bereich der Epithel- und Gefäßstruktur erkennbar. Hier wiesen die Gen-depletierten Mäuse eine Dilatation der Gefäße und eine Hypertrophie des Bronchialepithels - sowie der Muskulatur auf. Die Morphologie der Wildtypiere war unauffällig.

Die im Vergleich mit den Kontrollen festgestellten wesentlichen morphologischen Veränderungen von der Lunge legen nahe, dass es sich um Befunde handelt, die mit der Funktion des Peptidtransporters in Verbindung stehen, auch wenn die rein morphologische Betrachtung funktionelle Störungen nur unvollständig erfassen kann.

Diese neuen Ergebnisse sollten in weiteren Studien genutzt werden, um die Rolle von PEPT2 bei der Erhaltung der pulmonalen Homöostase im Detail zu klären. Zudem besitzt der Peptidtransporter pharmakologische Relevanz durch seine Fähigkeit aerosolisch-applizierte Pharmaka zu transportieren, so dass weitere Studien die genauen strukturellen Erfordernisse für PEPT2-Substrate zur Entwicklung aerosolischer Therapeutika klären sollten.

## 6. Summary

After the successful genetic engineering of PEPT-2 knockout mice to assess the role of the PEPT-2 transporter in mammals, the present study focused on the characterization of the pulmonary phenotype of the PEPT-2 knockout mice.

By using light and electro-microscopy morphological changes were screened and compared between wildtype (WT) and PEPT-2-knockout (KO) mice. With light-microscopy significant emphysematous changes in the KO group were detected, in addition to a hypertrophy of the bronchial mucosa. Masson-Goldner-staining and PAS-staining detected no differences in both groups.

In KO-mice the semi-thin-sections and electro-microscopy pictures revealed vacuola-like deposits, which were mostly found in areas around arteries and bronchi. Additional morphological changes were detected in vessels and bronchial system of the lungs. KO-mice showed a dilatation of the studied vessels, hypertrophy of the bronchial epithelium and smooth muscle layer. WT mice showed no changes. Besides the fact, that the histological description of the lungs may not explain any functional features, most likely the documented morphological changes in KO-mice are based on the depletion of the peptide-transporter PEPT-2. Because of its physiological importance in protein absorption, maintenances of the lung homeostasis and possible role as vehicles for drug delivery (aerosolic pharmacotherapy) further *in vivo* and *in vitro* studies need to be performed.

## 7. Literaturverzeichnis

ABDERHALDEN, E.

Abbau und Aufbau der Eiweisskörper im tierischen Organismus.

Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie. 44: 17-52 (1905).

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).

ADDISON, J. M., BURSTON, D., & MATTHEWS, D. M.

Evidence for active transport of the dipeptide glycylsarcosine by hamster jejunum in vitro.

Clin Sci. 43: 907-911 (1972).

AL-BAZZAZ, F. J., HAFEZ, N., TYAGI, S., GAILEY, C. A., TOOFANFARD, M.,

ALREFAI, W. A., NAZIR, T. M., RAMASWAMY, K., & DUDEJA, P. K.

Detection of Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchangers in human airways epithelium.

Jop. 2: 285-290 (2001).

BALLARD, S. T., & GATZKY, J. T.

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

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

BALUK, P., TAMMELA, T., ATOR, E., LYUBYNKA, N., ACHEN, M. G., HICKLIN, D.

J., JELTSCH, M., PETROVA, T. V., PYTOWSKI, B., STACKER, S. A., YLÄ-

HERTTUALA, S., JACKSON, D. G., ALITALO, K., & MCDONALD, D. M.

Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation.

J Clin Invest. 115: 247-257 (2005).

BATES, D. V., KANEKO, K., HENDERSON, J. A., MILIC-EMILI, J., ANTHONISEN, N.

R., DOLLFUSS, R., & DOLOVICH, M.

Recent experimental and clinical experience in studies of regional lung function.

Scand J Respir Dis Suppl. 62: 15-29 (1966).

BERGER, U. V., & HEDIGER, M. A.

Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system.

Anat Embryol (Berl). 199: 439-449. (1999).

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).

BOCKMAN, D. E., GANAPATHY, V., OBLAK, T. G., & LEIBACH, F. H.

Localization of peptide transporter in nuclei and lysosomes of the pancreas.

Int J Pancreatol. 22: 221-225 (1997).

BOLL, M., HERGET, M., WAGENER, M., WEBER, W. M., MARKOVICH, D., BIBER, J., CLAUSS, W., MURER, H., & DANIEL, H.

Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter.

Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 284-289 (1996).

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, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors.

Pflugers Arch. 429: 146-149 (1994).

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).

BRANDSCH, M., BRANDSCH, C., GANAPATHY, M. E., CHEW, C. S., GANAPATHY, V., & LEIBACH, F. H.

Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H<sup>+</sup>/peptide cotransport systems in intestine (PEPT 1) and kidney (PEPT 2).

Biochim Biophys Acta. 1324: 251-262 (1997).

BRANDSCH, M., KNUTTER, I., & LEIBACH, F. H.

The intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships.

Eur J Pharm Sci. 21: 53-60 (2004).

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).

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).

BUYSE, M., TSOCAS, A., WALKER, F., MERLIN, D., & BADO, A.

PepT1-mediated fMLP transport induces intestinal inflammation in vivo.

Am J Physiol Cell Physiol. 283: 1795-1800 (2002).

CERNEA, S., & RAZ, I.

Nininjectable methods of insulin administration.

Drugs Today. 42: 405-424 (2006).

COLE, C. H.

Inhaled glucocorticoid therapy in infants at risk for neonatal chronic lung disease.

J Asthma. 37: 533-543 (2000).

COONS, A. H.

Fluorescent antibody methods. In J. F. Danielli (Ed.), General cytochemical methods (pp. 399-422). New York: Academic Press (1958).

- 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).
- CRAFT, I. L., GEDDES, D., HYDE, C. W., WISE, I. J., & MATTHEWS, D. M.  
Absorption and malabsorption of glycine and glycine peptides in man.  
*Gut.* 9: 425-437 (1968).
- CUSHING, I. E., & MILLER, W. F.  
Nebulization therapy.  
*Clin Anesth.* 1: 169-218 (1965).
- D'ANDREA, V., MALINOVSKY, L., CAVALLOTTI, C., BENEDETTI VALENTINI, F., MALINOVSKA, V., BARTOLO, M., TODINI, A. R., BIANCARI, F., DI MATTEO, F. M., & DE ANTONI, E.  
Angiomegaly.  
*J Cardiovasc Surg (Torino).* 38: 447-455 (1997).
- DANIEL, H.  
Transport von Oligopeptiden an Bürstensaummembranen von Dünndarm und Nierentubulus.  
*Z Gastroenterol.* 33: 50-53 (1993).
- DANIEL, H., & HERGET, M.  
Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport.  
*Am J Physiol.* 273: F1-8 (1997).
- DANIEL, H., & RUBIO-ALIAGA, I.  
An update on renal peptide transporters.  
*Am J Physiol Renal Physiol.* 284: F885-892 (2003).
- DENEKE, S. M., & FANBURG, B. L.  
Regulation of cellular glutathione.  
*Am J Physiol.* 257: L163-L173 (1989).
- DIECK, S. T., HEUER, H., EHRCHEN, J., OTTO, C., & BAUER, K.  
The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-AMCA in astrocytes.  
*Glia.* 25: 10-20 (1999).
- DORING, 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: 773-779 (1996).
- DORING, F., MARTINI, C., WALTER, J., & DANIEL, H.  
Importance of a small N-terminal region in mammalian peptide transporters for substrate affinity and function.  
*J Membr Biol.* 186: 55-62 (2002).

- DORING, F., MICHEL, T., ROSEL, 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. (1998).
- 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).
- DRINGEN, R., HAMPRECHT, B., & BROER, S.  
The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures.  
*J Neurochem.* 71: 388-393 (1998).
- DUNCKER, H.-R.  
Atemapparat. In D. Drenckhahn & W. Zenker (Eds.), Benninghoff: Anatomie (pp. 529-587). München-Wien-Baltimore: Urban und Schwarzenberg (1994).
- 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).
- FEI, Y. J., LIU, W., PRASAD, P. D., KEKUDA, R., OBLAK, T. G., GANAPATHY, V., & LEIBACH, F. H.  
Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H<sup>+</sup>/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2.  
*Biochemistry.* 36: 452-460 (1997).
- FINK, J., & DHAND, R.  
Bronchodilator resuscitation in the emergency department. Part 2 of 2: dosing strategies.  
*Respir Care.* 45: 497-512 (2000).
- GANAPATHY, M. E., PRASAD, P. D., MACKENZIE, B., GANAPATHY, V., & LEIBACH, F. H.  
Interaction of anionic cephalosporins with the intestinal and renal peptide transporters PEPT 1 and PEPT 2.  
*Biochim Biophys Acta.* 1324: 296-308 (1997).
- GONZALEZ, D. E., COVITZ, K. M., SADEE, W., & MRSNY, R. J.  
An oligopeptide transporter is expressed at high levels in the pancreatic carcinoma cell lines AsPc-1 and Capan-2.  
*Cancer Res.* 58: 519-525 (1998).

GRAUL, R. C., & SADEE, W.

Sequence alignments of the H<sup>+</sup>-dependent oligopeptide transporter family PTR: Inferences on structure and function of the intestinal PET1 transporter.

Pharmaceut Res. 14: 388-400 (1997).

GRONEBERG, D. A.

[Expression, localization and functional aspects of the peptide transporter PEPT2 in the normal respiratory tract and in cystic fibrosis].

Pneumologie. 57: 104-105 (2003).

GRONEBERG, D. A., & CHUNG, K. F.

Models of chronic obstructive pulmonary disease.

Respir Res. 5: 18 (2004a).

GRONEBERG, D. A., DORING, F., NICKOLAUS, M., DANIEL, H., & FISCHER, A.

Expression of PEPT2 peptide transporter mRNA and protein in glial cells of rat dorsal root ganglia.

Neurosci Lett. 304: 181-184. (2001a).

GRONEBERG, D. A., DORING, F., NICKOLAUS, M., DANIEL, H., & FISCHER, A.

Renal assimilation of short chain peptides: visualization of tubular peptide uptake.

Pharm Res. 19: 1209-1214 (2002a).

GRONEBERG, D. A., DORING, F., THEIS, S., NICKOLAUS, M., FISCHER, A., & DANIEL, H.

Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 282: E1172-1179. (2002b).

GRONEBERG, D. A., EYNOTT, P. R., DORING, F., THAI DINH, Q., OATES, T.,

BARNES, P. J., CHUNG, K. F., DANIEL, H., & FISCHER, A.

Distribution and function of the peptide transporter PEPT2 in normal and cystic fibrosis human lung.

Thorax. 57: 55-60. (2002c).

GRONEBERG, D. A., NICKOLAUS, M., SPRINGER, J., DORING, F., DANIEL, H., & FISCHER, A.

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

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

GRONEBERG, D. A., NICKOLAUS, M., SPRINGER, J., DORING, F., DANIEL, H., & FISCHER, A.

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

Am J Pathol. 158: 707-714. (2001b).

GRONEBERG, D. A., RUBIO-ALIAGA, I., NICKOLAUS, M., DORING, F., FISCHER, A., & DANIEL, H.

Direct visualization of peptide uptake activity in the central nervous system of the rat.

Neurosci Lett. 364: 32-36 (2004b).

GRONEBERG, J. D. A.

Expression, Lokalisation und funktionelle Aspekte des Peptidtransporters PEPT2 in den Atemwegen von Ratte, Maus und Mensch.  
Justus-Liebig-Universität Giessen. (2001).

GRUBE, D.

Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. II. Non-specific binding of immunoglobulins to G-cells by ionic interactions.  
Histochem J. 66: 149-167 (1980).

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

Characterization of L-glutamine transport by type II alveolar cells.  
Am J Physiol. 262 (1992).

KELLY, H. W.

Comparative potency and clinical efficacy of inhaled corticosteroids.  
Respir Care Clin N Am. 5: 537-553 (1999).

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<sup>+</sup> transport in guinea pig and rat alveolar epithelial type II cells.  
J Physiol. 476: 79-88 (1994).

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

Characterisation of multiple cysteine and cystine transporters in rat alveolar type II cells.  
Am J Physiol. 273: L1147-1155 (1997).

KNUTTER, I., RUBIO-ALIAGA, I., BOLL, M., HAUSE, G., DANIEL, H., NEUBERT, K., & BRANDSCH, M.

H<sup>+</sup>-peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 283: G222-229 (2002).

LANGER, F., WILHELM, W., LAUSBERG, H., & SCHÄFERS, H.-J.

Iloprost und selektive pulmonale Vasodilatation.  
Der Anaesthesist. 53: 753-758 (2004).

LETTERER, E.

[Anatomopathology of injuries caused by therapy].  
Medizinische. 24: 1331-1337 (1956).

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 U S A. 89: 12145-12149 (1992).

LIU, W., LIANG, R., RAMAMOORTHY, S., FEI, Y. J., GANAPATHY, M. E., HEDIGER, M. A., GANAPATHY, V., & LEIBACH, F. H.

Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H<sup>+</sup>/peptide cotransporter family, from human kidney.

Biochim Biophys Acta. 1235: 461-466 (1995).

MAIER, A., TOMASELLI, F., MATZI, V., WOLTSCHKE, M., ANEGG, U., FELL, B., REHAK, P., PINTER, H., & SMOLLE-JUTTNER, F. M.

Comparison of 5-aminolaevulinic acid and porphyrin photosensitization for photodynamic therapy of malignant bronchial stenosis: a clinical pilot study.

Lasers Surg Med. 30: 12-17 (2002).

MCFARLAND, G. A., & HOLLIDAY, R.

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

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

MEREDITH, D., & BOYD, C. A.

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

Am J Physiol. 269: L137-143 (1995).

MERLIN, D., STEEL, A., GEWIRTZ, A. T., SI-TAHAR, M., HEDIGER, M. A., & MADARA, J. L.

hPepT1-mediated Epithelial Transport of Bacteria-derived Chemotactic Peptides Enhances Neutrophil-Epithelial Interaction.

J. Clin. Invest. 102: 2011-2018 (1998).

MILLER, W. F.

Aerosol therapy in acute and chronic respiratory disease.

Arch Intern Med. 131: 148-155 (1973).

NAKANISHI, T., TAMAI, I., SAI, Y., SASAKI, T., & TSUJI, A.

Carrier-mediated transport of oligopeptides in the human fibrosarcoma cell line HT1080.

Cancer Res. 57: 4118-4122. (1997).

NAKANISHI, T., TAMAI, I., TAKAKI, A., & TSUJI, A.

Cancer cell-targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity.

Int J Cancer. 88: 274-280. (2000).

NEWHOUSE, M. T., & CORKERY, K. J.

Aerosols for systemic delivery of macromolecules.

Respir Care Clin N Am. 7: 261-275, vi (2001).

NIELSEN, C. U., & BRODIN, B.

Di/tri-peptide transporters as drug delivery targets: regulation of transport under physiological and patho-physiological conditions.

Curr Drug Targets. 4: 373-388 (2003).

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).

- OGIHARA, H., SAITO, H., SHIN, B. C., TERADO, T., TAKENOSHITA, S., NAGAMACHI, Y., INUI, K., & TAKATA, K.  
Immuno-localization of H<sup>+</sup>/peptide cotransporter in rat digestive tract.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 220: 848-852. (1996).
- O'RIORDAN, T., & FARIS, M.  
Inhaled antimicrobial therapy.  
*Respir Care Clin N Am.* 5: 617-631. (1999).
- O'RIORDAN, T. G.  
Optimizing delivery of inhaled corticosteroids: matching drugs with devices.  
*J Aerosol Med.* 15: 245-250 (2002).
- 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).
- 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).
- PINSONNEAULT, J., NIELSEN, C. U., & SADEE, W.  
Genetic Variants of the Human H<sup>+</sup>/Dipeptide Transporter PEPT2: Analysis of Haplotype Functions.  
*J Pharmacol Exp Ther.* 311: 1088-1096 (2004).
- PLUMLEY, D. A., AUSTGEN, T., SALLOUM, R. M., & SOUBA, W. W.  
Role of the lungs in maintaining aminos 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).
- PNEUMOLOGIE, D. G. F. (2000). Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie an den Sachverständigenrat für die Konzertierte Aktion im Gesundheitswesen Über-, Unter- und Fehlversorgung in der Pneumologie.
- QUAY, J. F.  
Transport interaction of glycine and cephalixin in rat jejunum.  
*The Physiologist.* 15: 241 (1972).
- RAMAMOORTHY, S., LIU, W., MA, Y. Y., YANG-FENG, T. L., GANAPATHY, V., & LEIBACH, F. H.  
Proton/peptide cotransporter (PEPT 2) from human kidney: functional characterization and chromosomal localization.  
*Biochim Biophys Acta.* 1240: 1-4 (1995).

RAU, J. L., JR.

Recent developments in respiratory care pharmacology.  
J Perianesth Nurs. 13: 359-369 (1998).

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).

RUBIO-ALIAGA, I., BOLL, M., & DANIEL, H.

Cloning and characterization of the gene encoding the mouse peptide transporter PEPT2.  
Biochem Biophys Res Commun. 276: 734-741. (2000).

RUBIO-ALIAGA, I., FREY, I., BOLL, M., GRONEBERG, D. A., EICHINGER, H. M.,  
BALLING, R., & DANIEL, H.

Targeted disruption of the peptide transporter Pept2 gene in mice defines its physiological  
role in the kidney.  
Mol Cell Biol. 23: 3247-3252 (2003).

SEEGER, W.

Pneumologie.  
Der Internist. 40: 391- 400 (1999).

SHEN, H., SMITH, D. E., KEEP, R. F., XIANG, J., & BROSIUS, F. C., 3RD.

Targeted disruption of the PEPT2 gene markedly reduces dipeptide uptake in choroid plexus.  
J Biol Chem. 278: 4786-4791 (2003).

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: F658-665. (1999).

SMALDONE, G. C., & PALMER, L. B.

Aerosolized antibiotics: current and future.  
Respir Care. 45: 667-675 (2000).

TARLOW, M. J., SEAKINS, J. W., LLOYED, J. K., MATTHEWS, D. M., CHENG, B., &  
THOMAS, A. J.

Intestinal absorption and biopsy transport of peptides and amino acids in Hartnup disease.  
Clin Sci. 39: 18-19 (1970).

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 protein-peptide cotransport in rat renal cortex.  
Pflugers Arch. 430: 825-829 (1995).

- TERADA, T., SAITO, H., MUKAI, M., & INUI, K. I.  
Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporter, PEPT1.  
FEBS Lett. 394: 196-200 (1996).
- TERADA, T., SAITO, H., SAWADA, K., HASHIMOTO, Y., & INUI, K.  
N-terminal halves of rat H<sup>+</sup>/peptide transporters are responsible for their substrate recognition.  
Pharm Res. 17: 15-20. (2000).
- TEUSCHER, N. S. S., H.; SHU, C.; XIANG, J.; KEEP, R.F.; SMITH, D.E.  
Carnosine uptake in rat choroid plexus primary cell cultures and choroid plexus whole tissue from PEPT2 null mice.  
Journal of Neurochemistry. 89: 375-382 (2004).
- THWAITES, D. T., KENNEDY, D. J., RALDUA, D., ANDERSON, C. M., MENDOZA, M. E., BLADEN, C. L., & SIMMONS, N. L.  
H/dipeptide absorption across the human intestinal epithelium is controlled indirectly via a functional Na/H exchanger.  
Gastroenterology. 122: 1322-1333 (2002).
- 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 dipeptidyl peptidase IV.  
J Biol Chem. 265: 2048-2053 (1990a).
- TIRUPPATHI, C., GANAPATHY, V., & LEIBACH, F. H.  
Kinetic evidence for a common transporter for glycylsarcosine and phenylalanylprolylalanine in renal brush-border membrane vesicles.  
J Biol Chem. 265: 14870-14874 (1990b).
- TIRUPPATHI, C., GANAPATHY, V., & LEIBACH, F. H.  
Transport of peptides in renal brush border membrane vesicles. Suitability of <sup>125</sup>I-labelled tyrosyl peptides as substrates.  
Biochim Biophys Acta. 1069: 14-20 (1991).
- TIRUPPATHI, C., KULANTHAIVEL, P., GANAPATHY, V., & LEIBACH, F. H.  
Evidence for tripeptide/H<sup>+</sup> co-transport in rabbit renal brush-border membrane vesicles.  
Biochem J. 268: 27-33 (1990c).
- VUIA, O., & HAGER, H.  
Central neuroblastic tumour associated with smooth muscle fibers. A study in the optic and electron microscopes.  
Eur Neurol. 13: 258-272 (1975).
- WAGNER, U., STAATS, P., MOLL, R., FEEK, U., VOGELMEIER, C., & GRONEBERG, D. A.  
Imatinib-associated pulmonary alveolar proteinosis.  
Am J Med. 115: 674 (2003).

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

Gly-L-Phe transport and metabolism across primary cultured rabbit tracheal epithelial cell monolayers.

Pharm Res. 14: 238-240 (1997).

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

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

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

ZHOU, X., THAMOTHARAN, M., GANGOPADHYAY, A., SERDIKOFF, C., & ADIBI, S. A.

Characterization of an oligopeptide transporter in renal lysosomes.

Biochim Biophys Acta. 1466: 372-378 (2000).

## 8. Veröffentlichungen

Groneberg, D. A., Paul, H.B., Welte, T.

Novel strategies of aerosolic pharmacotherapy

Exp Toxicol Pathol, 57: 49-53 (2006)

Paul, H.B., Welte, T., Groneberg, D.A.

Pharmakatransport im Atemwegsepithel

Pneumologie 2005, **59**: 461-9 (2005).

## **9. Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. David Groneberg für die außergewöhnliche gute Betreuung.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Axel Fischer und Herrn Prof. Dr. Ulrich Wahn für die stets freundliche Unterstützung und Möglichkeit der Mitarbeit in den von ihnen geleiteten Bereichen- der Klinischen Forschergruppe Allergologie bzw. der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité.

Frau Petra Schrade und Herrn Prof. Dr. Sebastian Bachmann danke ich für ihre hervorragend kompetente Hilfe in der Elektronenmikroskopie und Frau Liliana Cifuentes, Frau Loreen Kirchhoff, Herrn Dr. David Quarcoo und Herrn Dr. Q. Thai Dinh für ihre geduldige und freundliche Unterstützung bei der Einarbeitung in die histologischen Techniken. Darüber hinaus danke ich auch Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel, Frau Dr. Isabel Rubio-Aliaga und Fr. Dr. Isabelle Frey für die materiellen und technischen Unterstützungen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir die Promotion ermöglicht haben.

---

## Erklärung

„Ich, Hanna Beke Paul, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Morphologische Charakterisierung des pulmonalen Phänotyps Peptidtransportergen-depletierter Mäuse selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 06.05.2009  
Datum

H. Paul  
Unterschrift