

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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