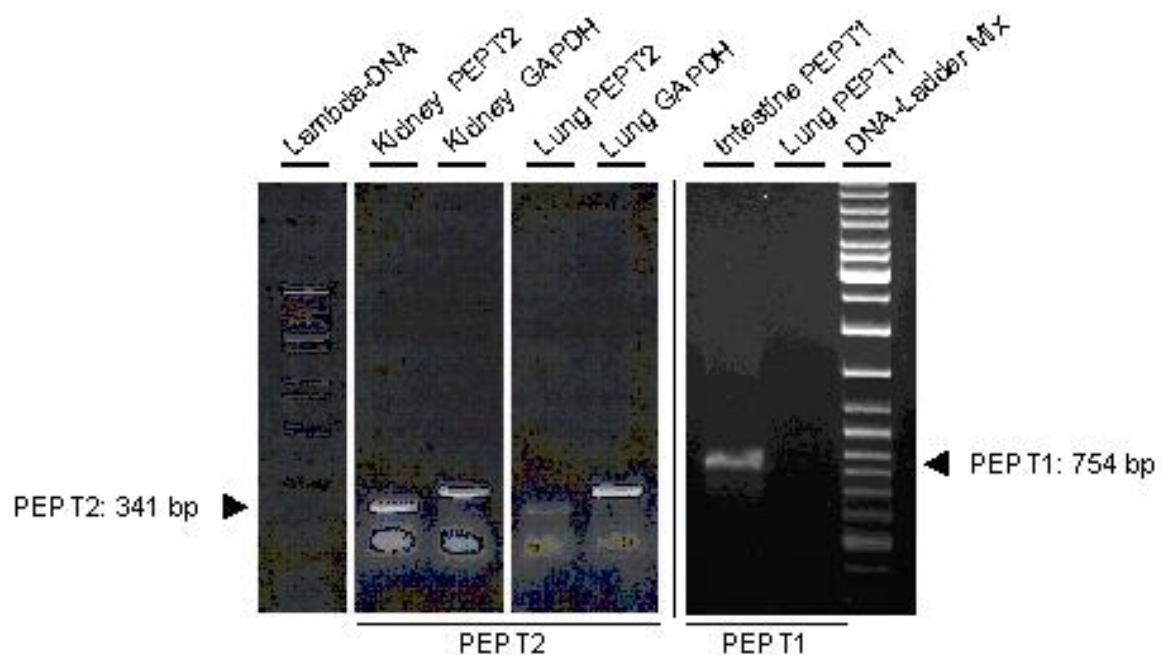


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 RT-PCR

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

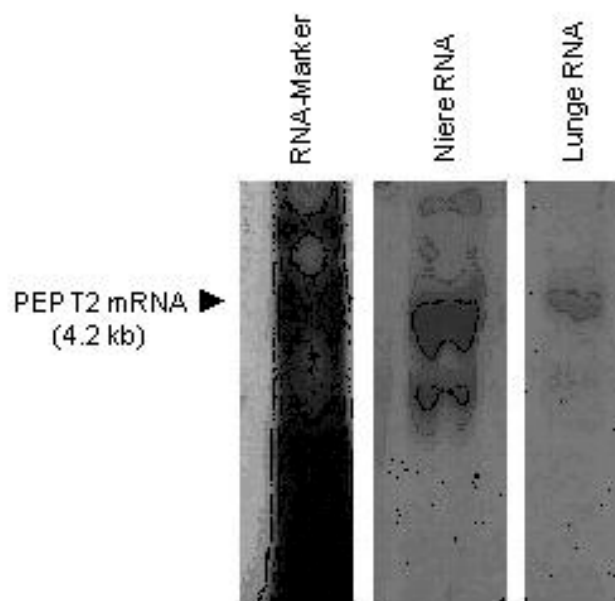
In den untersuchten Geweben zeigte sich in den parallelen Kontrollen eine Bande für das Amplifikat des „house keeping genes“ GAPDH, welche mit der Ziellänge des errechneten Produktes übereinstimmte (Abb.8).



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

### 3.2 Northern-Blot

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



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

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

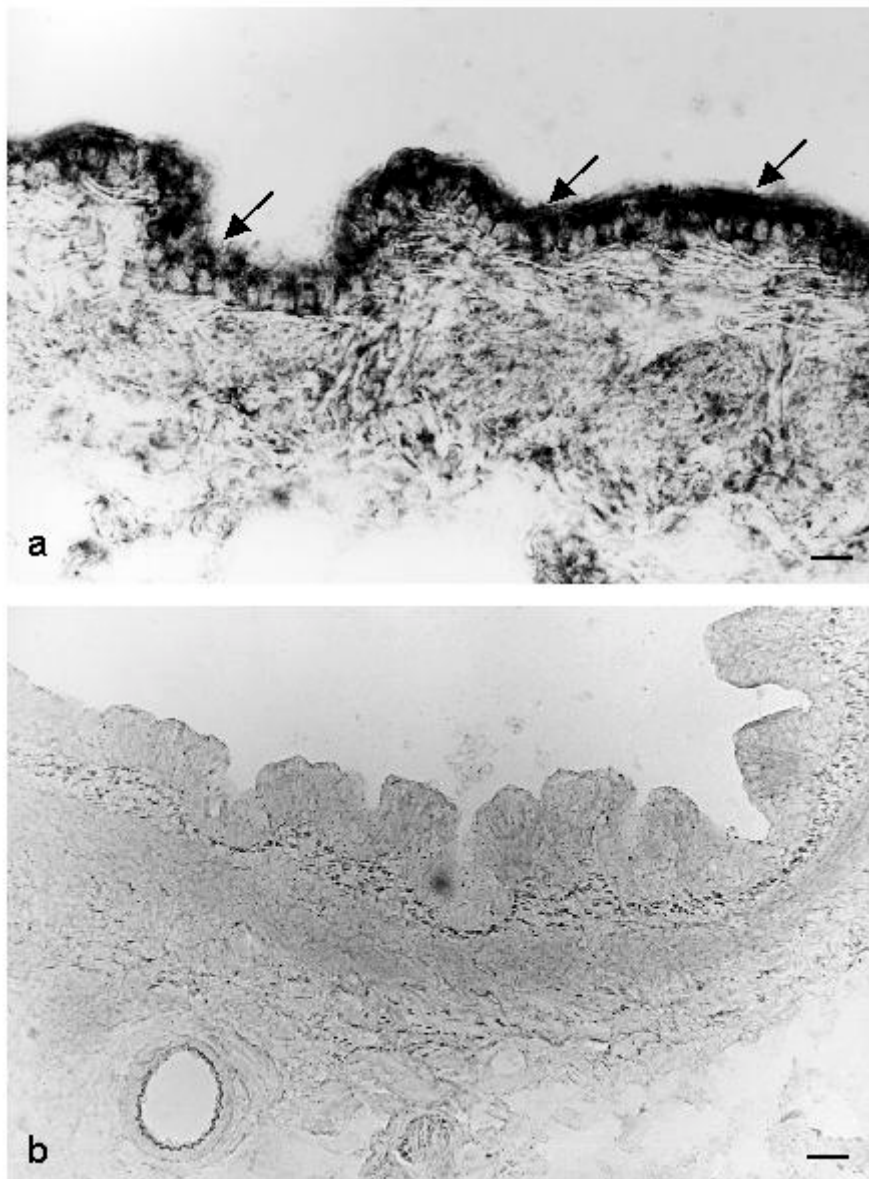
Die zur histologischen Lokalisation von PEPT2-mRNA durchgeführte nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung führte in drei unabhängigen Versuchsreihen bei jeweils  $n = 5$  untersuchten Rattenlungen zu identischen Ergebnissen. Die mit der Antisense-Sonde durchgeführten Inkubationen resultierten in einer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

#### **3.3.1 Atemwege**

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

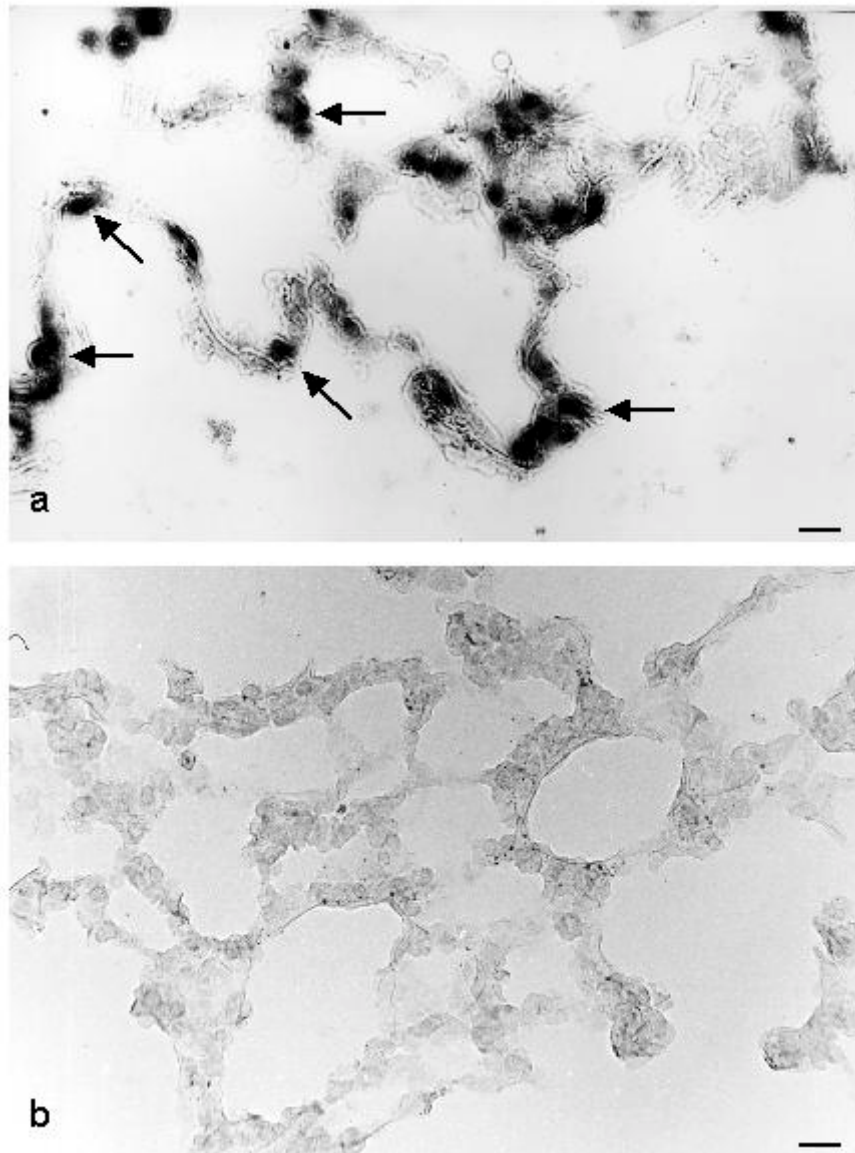
#### **3.3.2 Alveolarbereich**

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



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





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

### **3.4 Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität**

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

#### **3.4.1 Ratte**

##### **3.4.1.1 Atemwege**

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

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

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

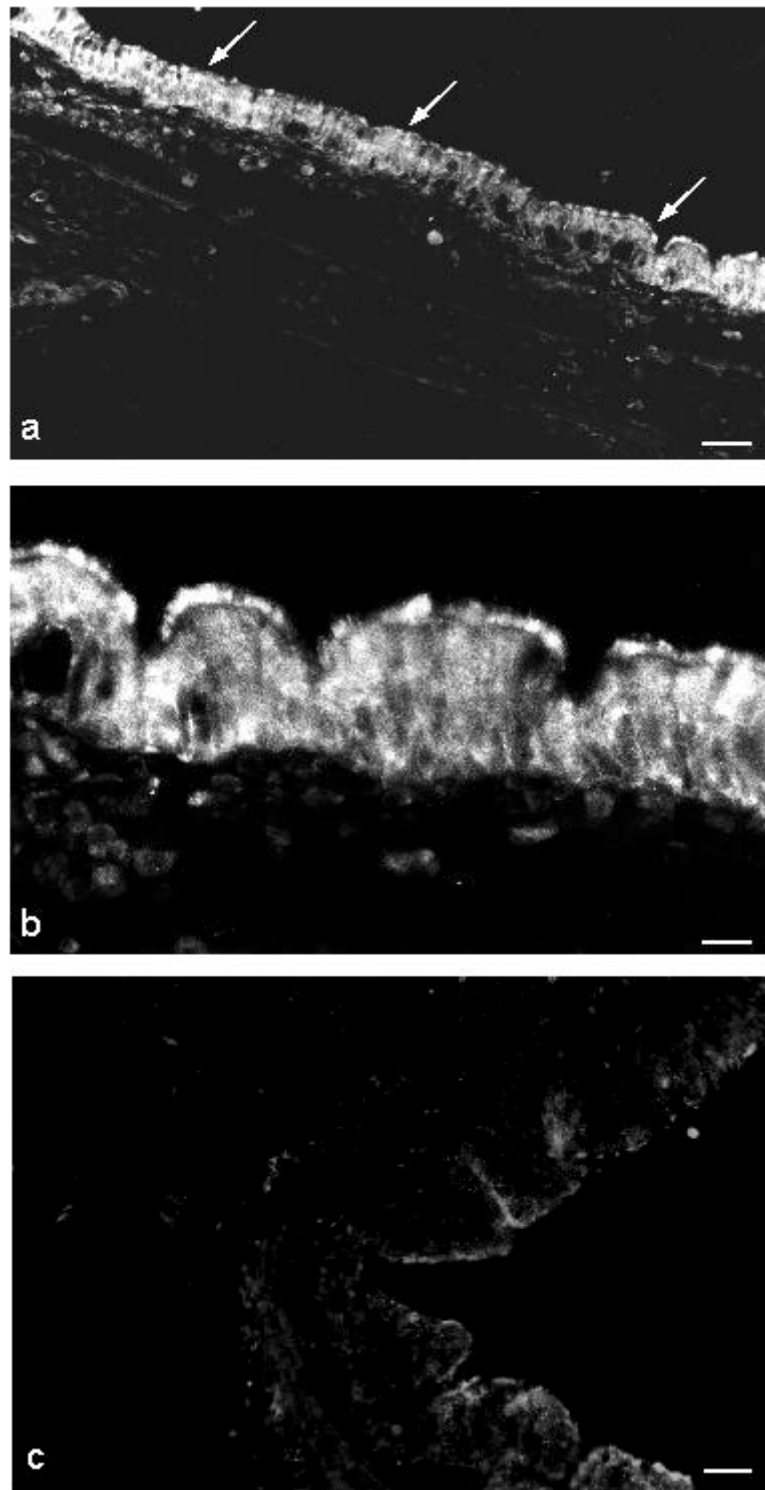
Es stellte sich keine Reaktion in glatter Muskulatur, subepithelialem Bindegewebe oder hyalinem Knorpel dar.

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

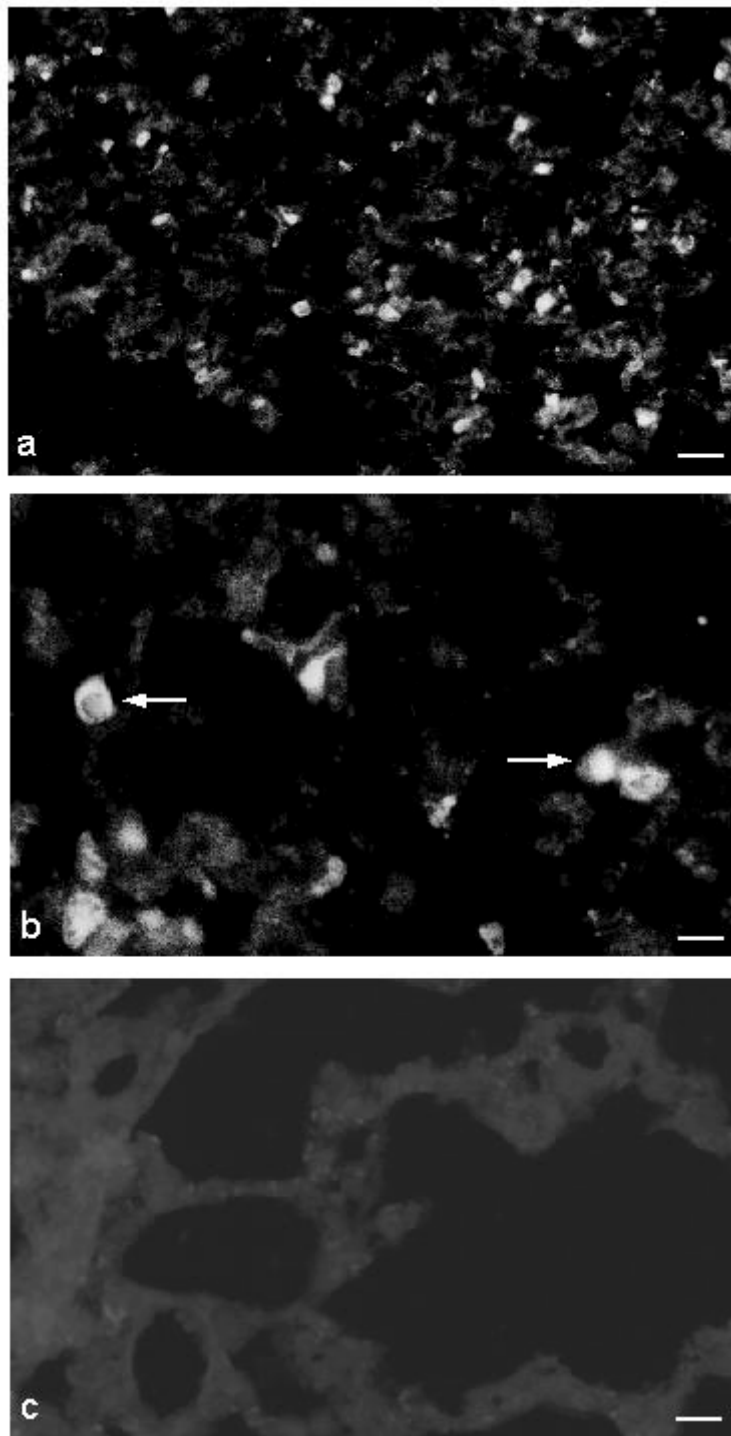
##### **3.6.1.2 Alveolarbereich**

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

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



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



**Abbildung 13:** Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren Rattenlunge. PEPT2-Signale sind in Typ II-Pneumozyten lokalisiert (A, Pfeile in B). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (C). Balken = 40  $\mu\text{m}$  (A), = 80  $\mu\text{m}$  (B, C).

### **3.4.2 Maus**

#### **3.4.2.1 Atemwege**

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

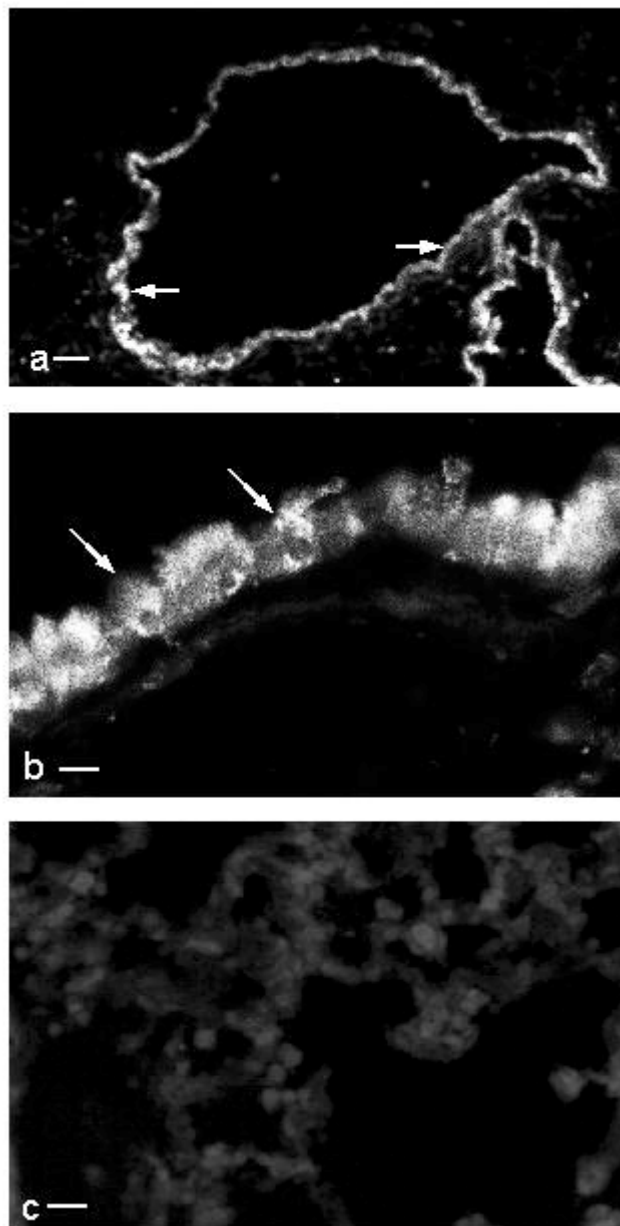
Das Fluoreszenzmuster in diesen Zellen war nicht-granulär und ohne erkennbare subzelluläre Verteilung. Auch konnte vereinzelt in den submukösen Endothelzellen kleinerer Gefäße ein Signal beobachtet werden.

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

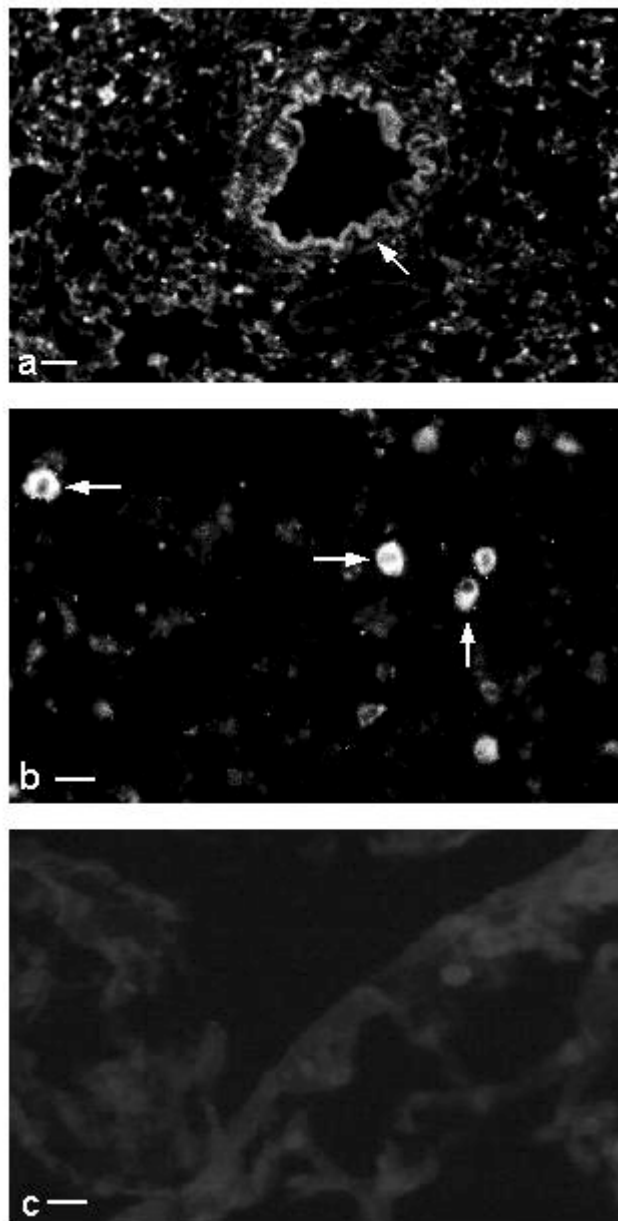
#### **3.6.4.2 Alveolarbereich**

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

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



**Abbildung 14:** Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität im Mäusebronchiolus. Signale in Bronchialepithelzellen (Pfeile in A, B). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (C). Balken = 10  $\mu\text{m}$  (B), = 60 (C), = 80  $\mu\text{m}$  (A).



**Abbildung 15:** Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren Mäuselunge. PEPT2-Signale im Bronchiolusepithel (Pfeil in A) und Typ II-Pneumozyten (A, Pfeile in B). Präabsorption (C). Balken = 20  $\mu\text{m}$  (B, C), = 100  $\mu\text{m}$  (A).



### **3.4.3 PEPT1-Immunhistochemie in Mäusegeweben**

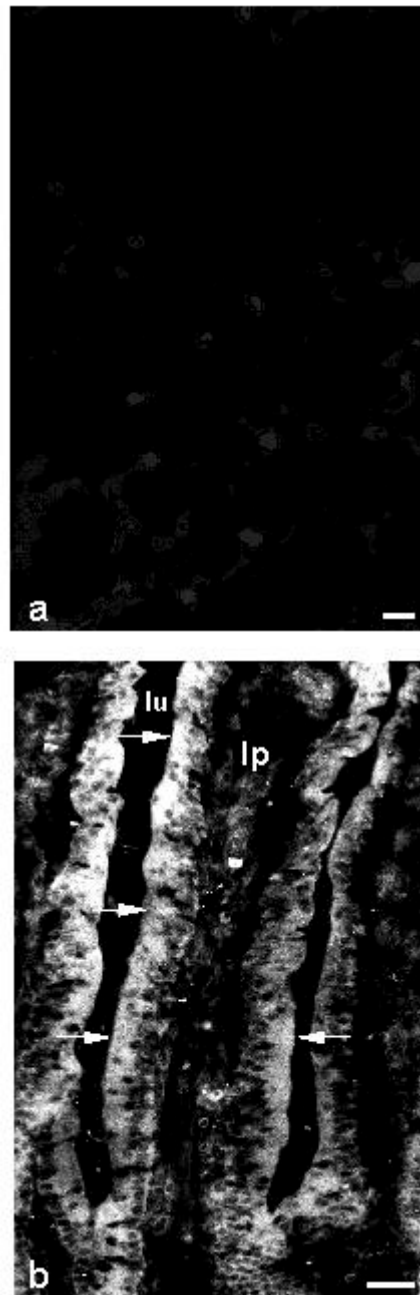
#### **3.4.3.1 Lungengewebe**

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

#### **3.4.3.2 Jejunum**

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

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



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

### **3.4.4 Humanes Gewebe**

#### **3.4.4.1 Normale Lunge**

##### **3.4.4.1.1 Atemwege**

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

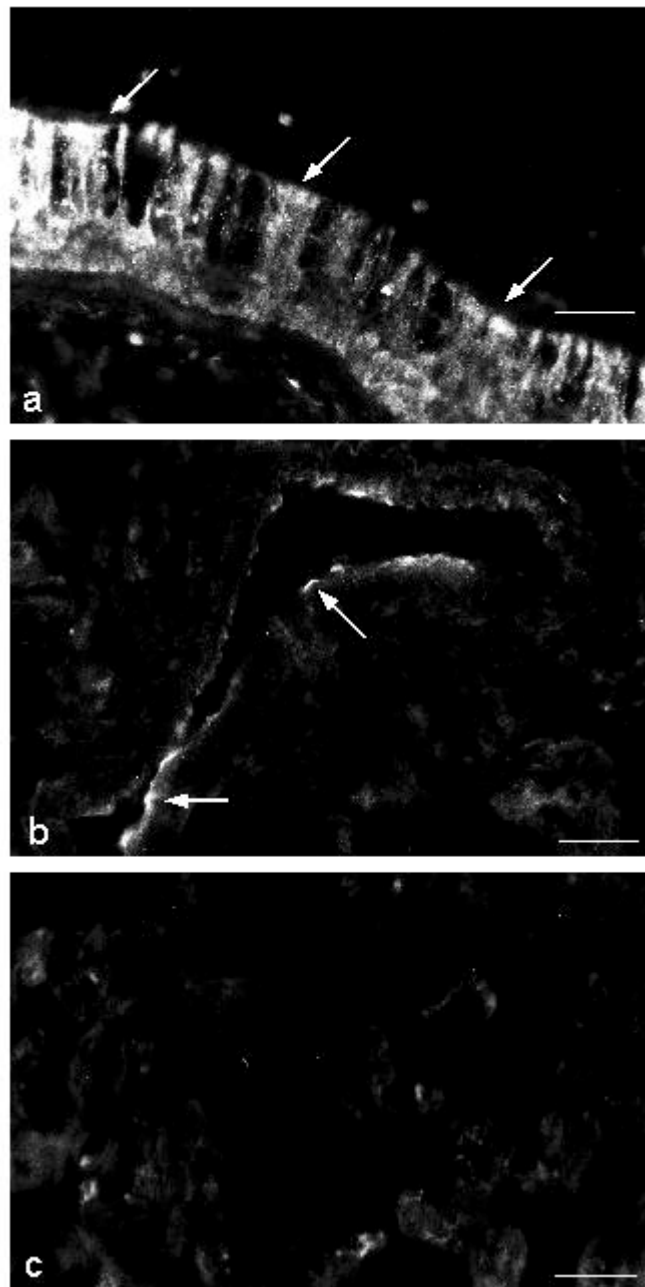
Keine Reaktion zeigte der M. trachealis, die glatte Muskulatur der großen und kleinen Bronchien, sowie das Bindegewebe, Drüsen und Knorpelgewebe.

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

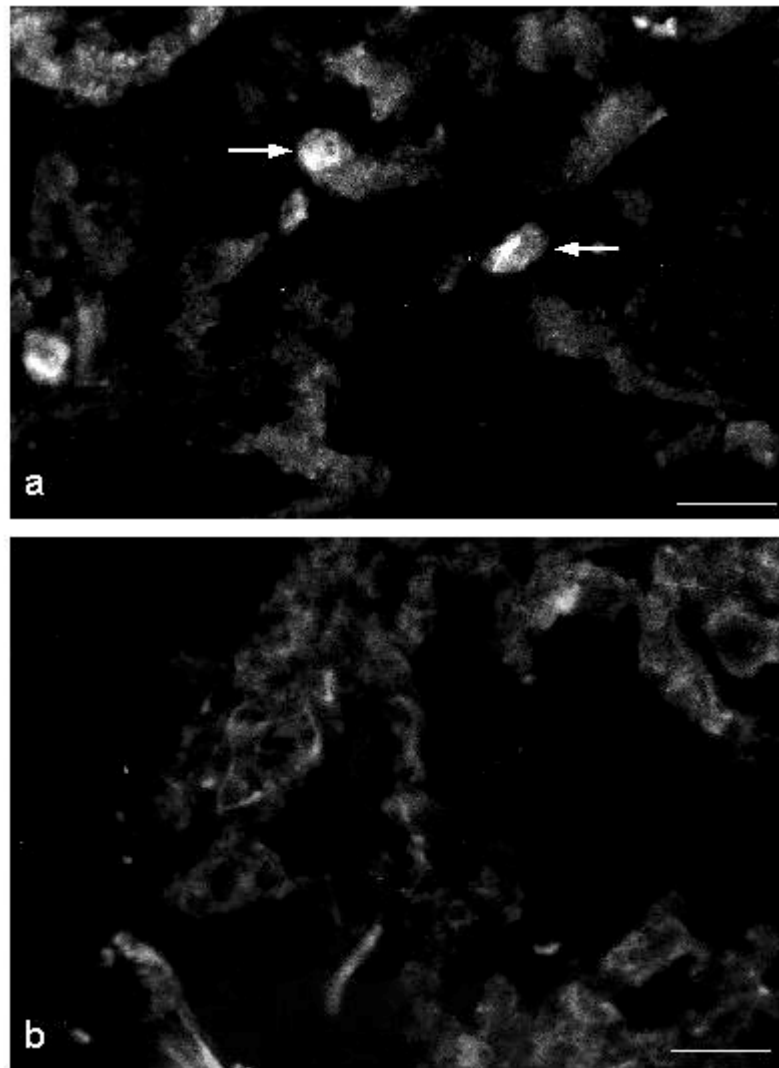
##### **3.6.4.1.2 Alveolarbereich**

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

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



**Abbildung 17:** Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der humanen Trachea. PEPT2-Signale im Trachealepithel (Pfeile in A) und Endothelzellen submuköser Venolen (Pfeile in B). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (C). Balken = 40  $\mu\text{m}$  (A), = 80  $\mu\text{m}$  (B, C).



**Abbildung 18:** Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in der peripheren humanen Lunge. PEPT2-Signale in den Typ II-Pneumozyten (Pfeile in A). Die Präabsorption zeigt keine spezifischen Signale (B). Balken = 80  $\mu\text{m}$  (A, B).

### **3.6.3.2 Mukoviszidose**

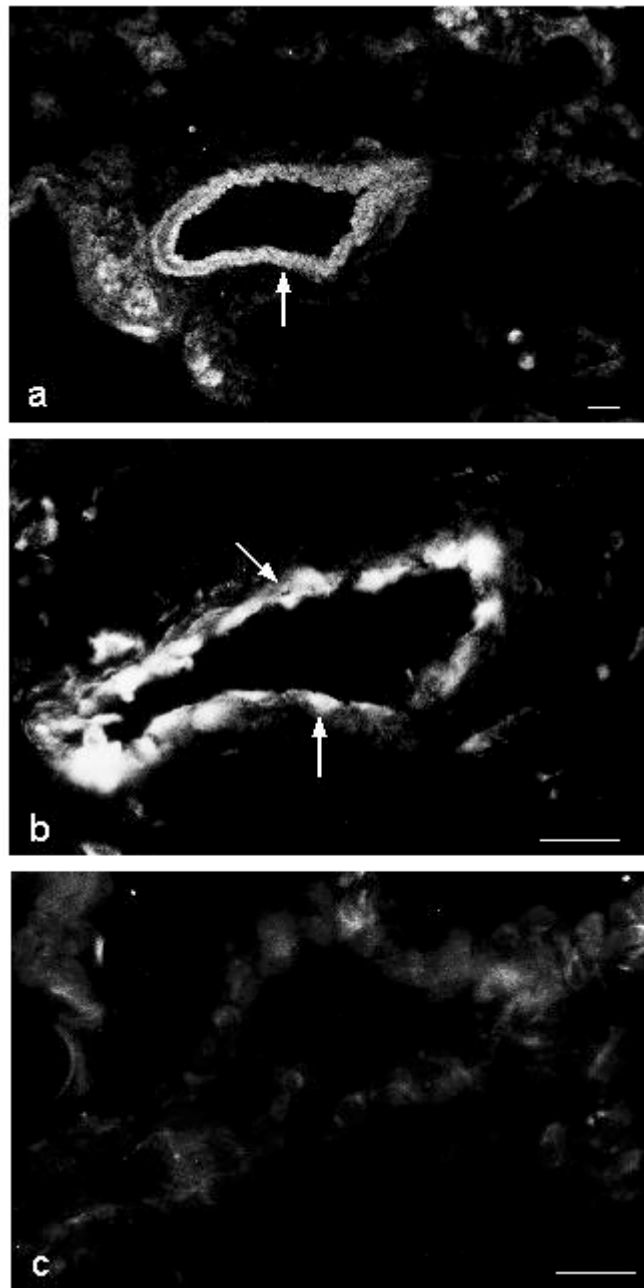
In Gewebeschnitten aus Empfängerlungen, die bei Lungentransplantationen von Mukoviszidosepatienten entnommen wurden, zeigte die immunhistochemische Darstellung PEPT2s im Vergleich zu Geweben normaler humaner Lungen keine qualitativen Veränderungen des Verteilungsmusters.

#### **3.6.3.2.1 Atemwege**

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

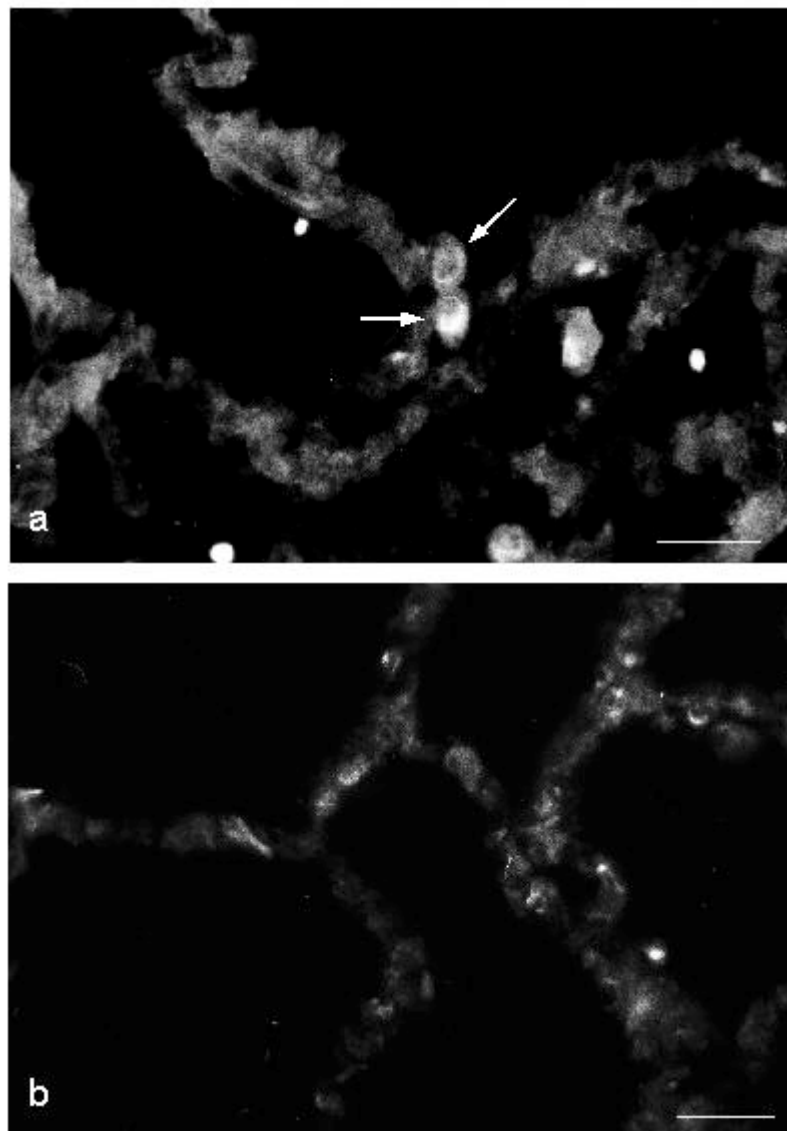
#### **3.6.3.2.1 Alveolarbereich**

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



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





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

### **3.5 Ex-vivo-Aufnahmestudien an murinen Präparationen**

#### **3.5.1 Atemwege**

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

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

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

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

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

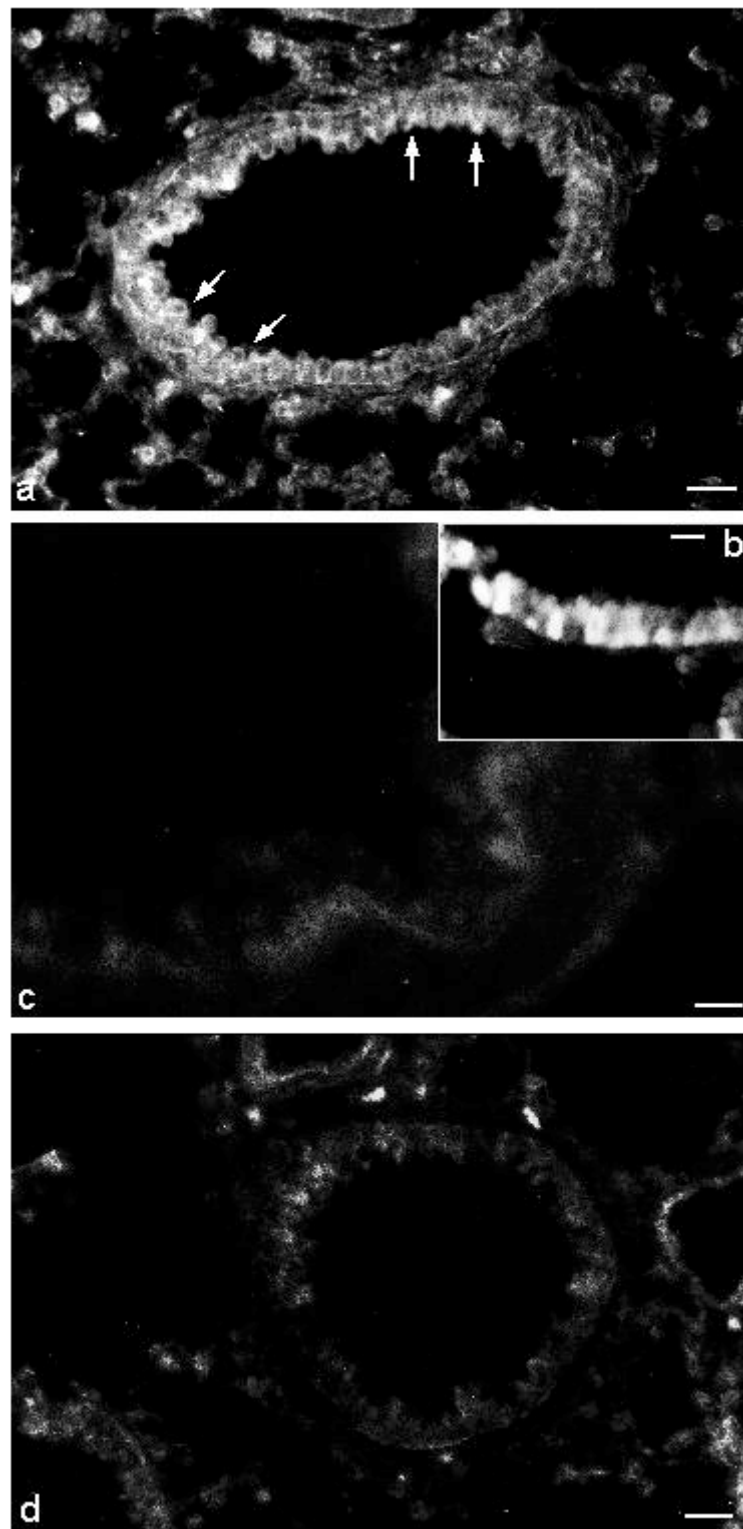
Als weitere Kontrolle wurde DEPC in einer Konzentration von 1mM der Inkubationslösung zugefügt. Auch hierbei kam es zu keiner Aufnahme des fluoreszierenden Substrates.

#### **3.5.2 Alveolarbereich**

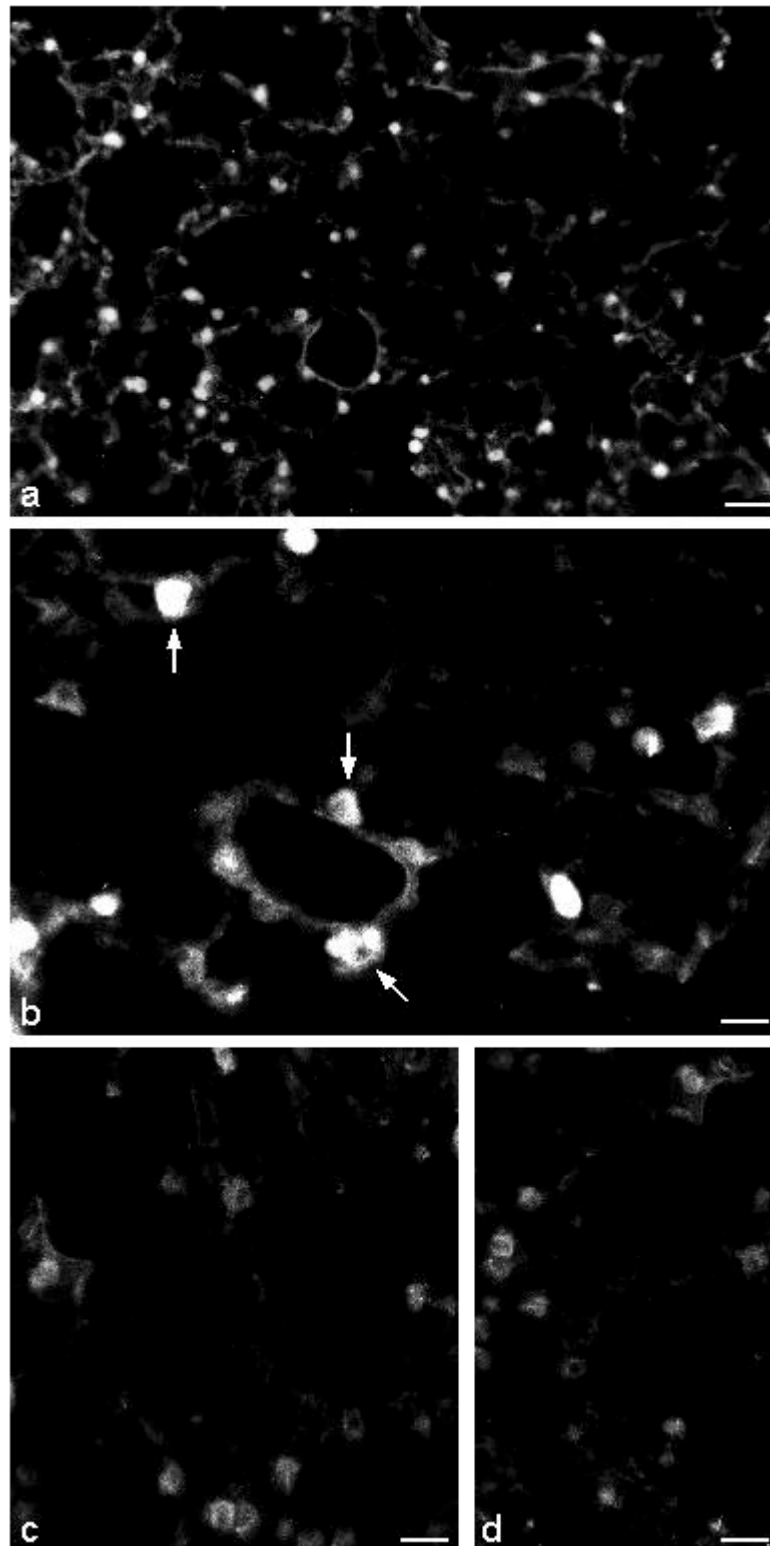
In peripheren Abschnitten konnte eine Akkumulation des markierten Dipeptids in kubischen Nischenzellen festgestellt werden, die durch ihre charakteristische Morphologie als Typ II-Pneumozyten identifiziert wurden (Abb. 22 a, b). Das Fluoreszenzsignal lag intrazellulär ohne Akzentuierung einzelner subzellulärer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

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

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



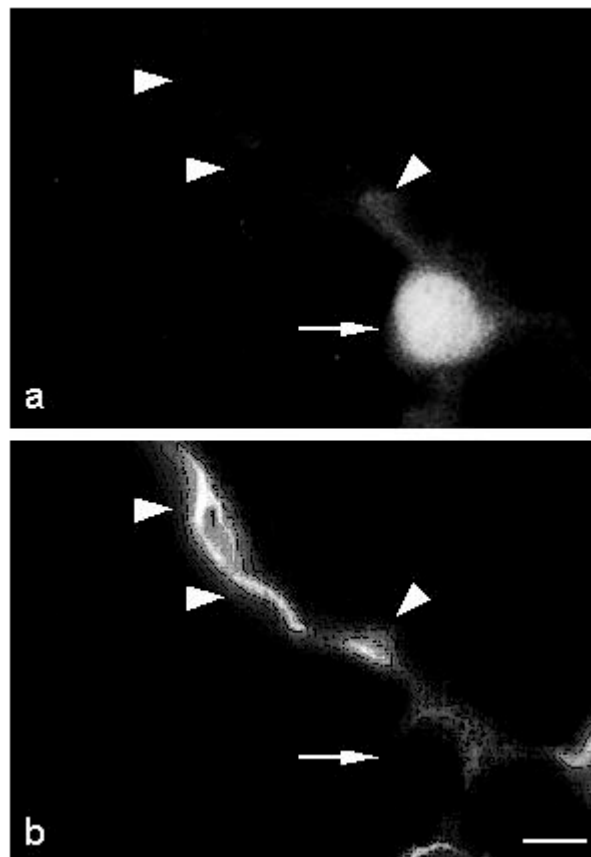
**Abbildung 21:** Funktionelle Ex-vivo-Aufnahmestudien in murinen Lungenpräparationen: Bronchiolus. Bei der Inkubation mit 25  $\mu$ M (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA findet sich intrazelluläre Fluoreszenz im respiratorischen Epithel (A, B). Deutlich reduzierte Aufnahme des fluoreszierenden Moleküls in das Epithel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



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

### 3.6 Kombinierte Ex-vivo-Aufnahmestudien und Histochemie

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



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

### **3.7 Ex-vivo-Aufnahmestudien in humanen Lungengeweben**

#### **3.7.1 Normale Lunge**

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

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

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

#### **3.7.2 Mukoviszidose**

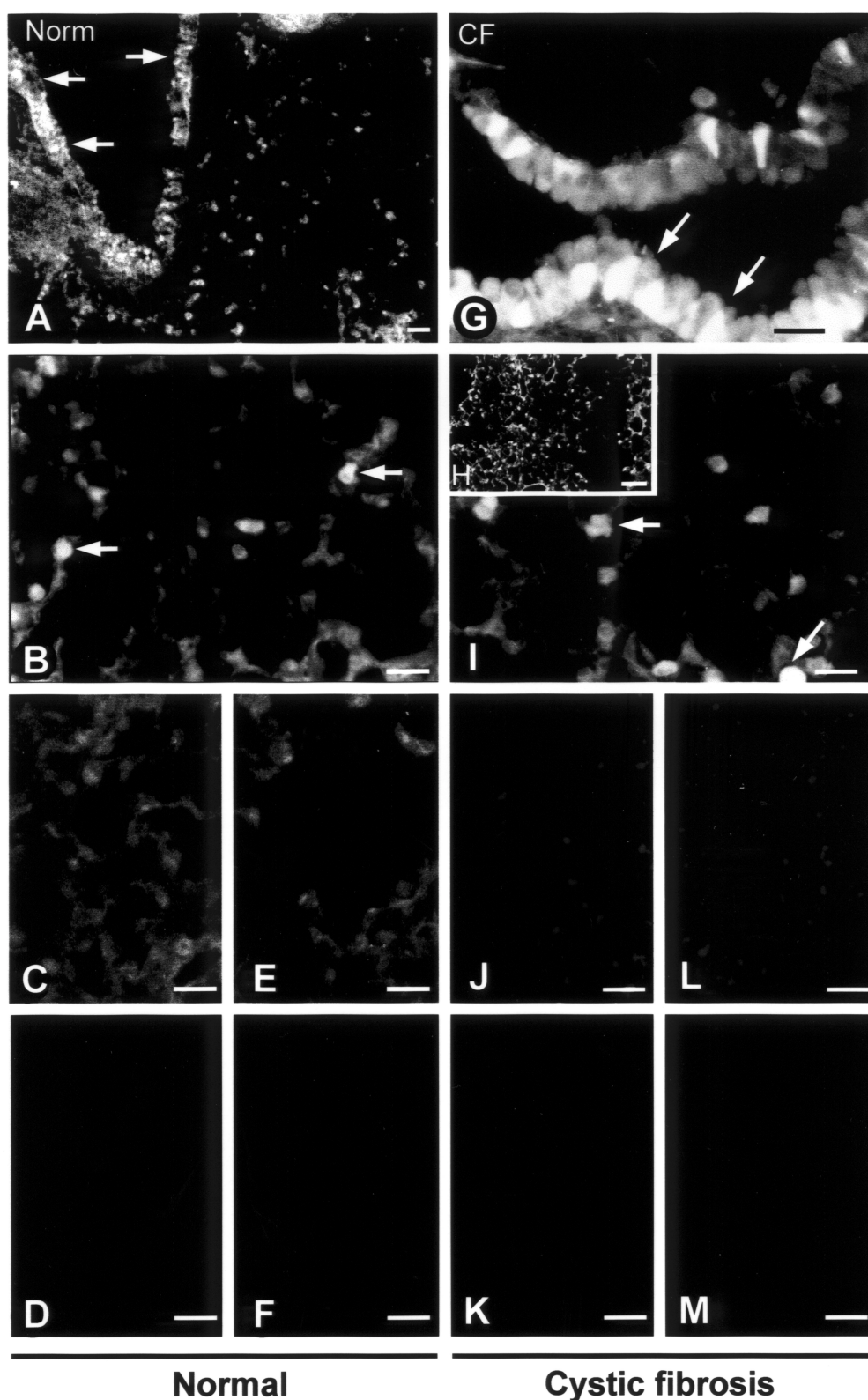
In den Resektaten von Mukoviszidosepatienten wurde ein qualitativ gleiches Aufnahmepattern wie in normalen Lungengeweben vorgefunden: (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA akkumulierte in den Flimmerepithelzellen (Abb. 24 g) und Typ II-Pneumozyten (Abb. 24 h, i).

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

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

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

.



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