

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

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

2.1.2 RT-PCR und Northern-Blot

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

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

2.1.3.1 Tierische Gewebe

Vor der transkardialen Perfusion wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von Ketamin-HCl (50 mg/kg [Parke Davis, Freiburg]) und Xylazin (20 mg/kg [Bayer, Leverkusen]) vorbehandelt. Der Thorax wurde eröffnet, die A. thoracica interna durch das transversale Einbringen einer Klemme in den Interkostalraum abgeklemmt und das Mediastinum freigelegt. Nach Eröffnung des Herzbeutels und Injektion von 0,5 ml Heparin (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) in den linken Ventrikel wurde nachfolgend das rechte Herzohr zum Druckausgleich geöffnet. Über einen Einschnitt in den linken Ventrikel wurde ein mit dem Perfusionssystem verbundener Polyethylenschlauch unter Sichtkontrolle in den aufsteigenden Teil der Aorta eingebracht und dort fixiert. Bei einem konstanten Perfusionsdruck von 1,50 m Wassersäule wurden zuerst 200 ml einer Vorspüllösung (2,5 % Polyvinylpyrrolidon [Roth, Karlsruhe], 0,9 % NaCl, 0,5 % Procainhydrochlorid [Merck, Darmstadt], 2 ml Heparin [Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen], pH 7,4 [Forssmann et al. 1977]) perfundiert. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 500 ml Paraformaldehyd-Fixierlösung (4 % Paraformaldehyd [T. J. Baker, Deveneter, Niederlande], 1x Phosphat-puffer (PBS [136 mM NaCl, 3 mM KCl, 9 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4], pH 7,4) für die In-Situ-Hybridisierung oder Zamboni-Fixierlösung (2% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure, 0,1 M PBS, pH 7,4 [Zamboni, 1972]) für die Immunhistochemie. Das Paraformaldehyd (T. J. Baker, Deveneter, 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 15 min mit 0,1 M PBS perfundiert, die Lungen entnommen und zum Schutz vor Gefrierartefakten über Nacht bei 4°C in einer Saccharose-PBS Lösung (800 mOsm/kg H₂O, pH 7,4) immersiert. Anschließend wurden die Lungen mit dem Gefrierschutzeinbettungsmedium Tissue Tek (Vogel, Gießen) aufgebläht, auf Filterpapier aufgebracht und in Stickstoff-gekühltem Isopentan (Riedel-de Haen, Seelze) schockgefroren und danach bei -80°C aufbewahrt.

2.1.3.2 Humane Gewebe

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

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

2.1.4 Ex-vivo-Aufnahmestudien

2.1.4.1 Tierische Gewebe

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

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

2.1.4.2 Humane Gewebe

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

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

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

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolation

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

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

2.2.3.1 Reverse-Transkription

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

2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

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

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

2.2.3.3 PCR-Bedingungen und Primerdesign

2.2.3.3.1 PCR zum Nachweis der PEPT2-mRNA

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

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

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

2.2.3.3.2 PCR zum Nachweis der PEPT1-mRNA

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

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

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

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

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

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

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

2.2.3.4 Kontrollen

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

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

2.2.4.1 Präparation der cDNA-Matrizen

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

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

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

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

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

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

Tabelle 7: Hybridisierungssonden

2.2.5 Northern-Blot

2.2.5.1 Hybridisierung

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

2.2.5.2 Detektion der hybridisierten Riboproben

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

2.2.6 In-Situ-Hybridisierung

2.2.6.1 Durchführung

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

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

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

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

2.2.6.2 Detektion der hybridisierten Riboproben

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

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

2.2.7 Immunhistochemie

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

2.2.7.1 Primärantikörper

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

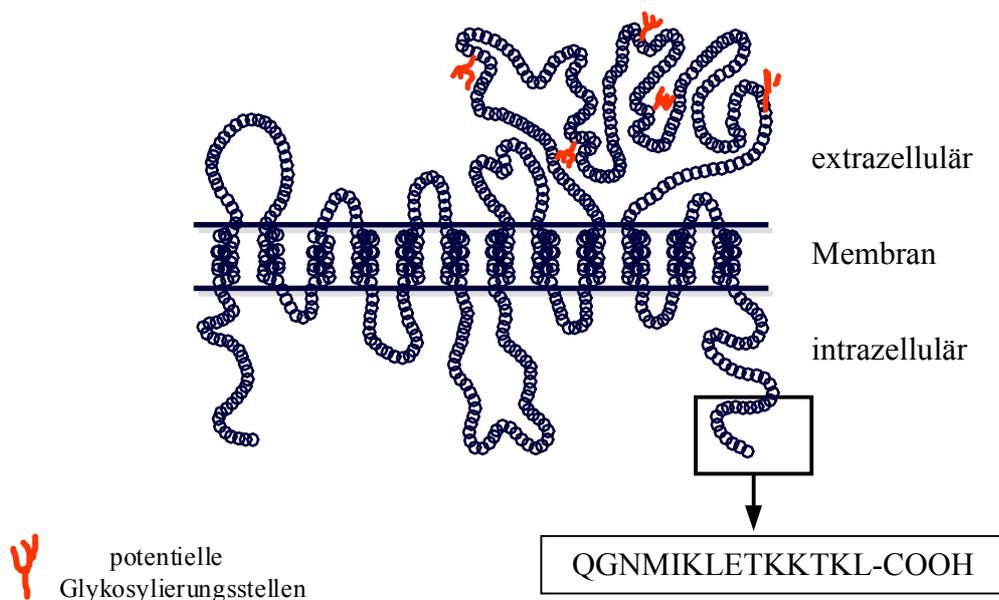


Abbildung 6: Struktur des PEPT2-Proteins und Sequenz des Antikörpers.

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

2.2.7.2 Sekundärantikörper

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

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

Tabelle 8: Sekundärantikörper

2.2.7.3 Tertiärreagenz

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

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

Tabelle 9: Tertiär-Reagenz

2.2.7.4 Antikörperinkubation und Antikörperdetektion

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

2.2.7.5 Kontrollen

2.2.7.5.1 Präabsorption

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

2.2.7.5.2 Weitere Kontrollen

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

2.2.8 Ex-vivo-Aufnahmestudien

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

2.2.8.1 Inkubation

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

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

2.2.8.2 Verdrängungsstudien

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

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

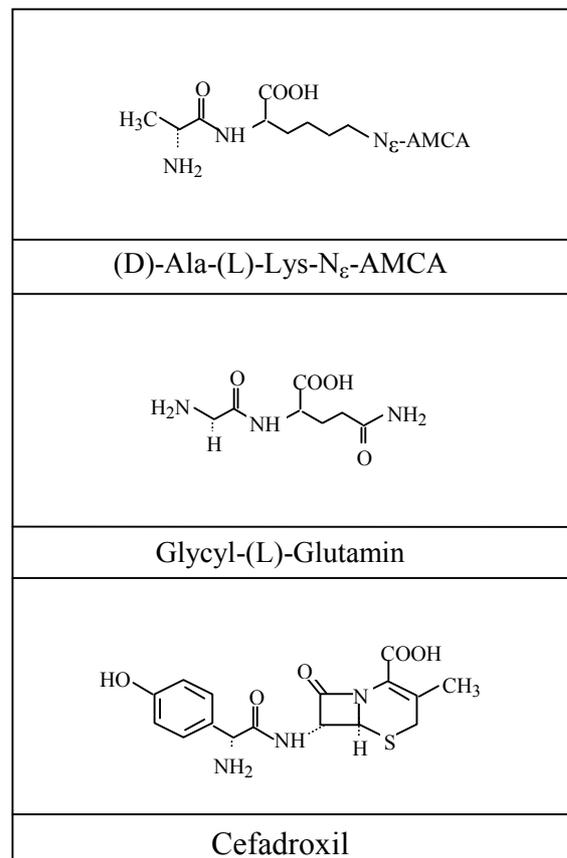


Abbildung 7: Substrate der Ex-vivo-Aufnahmestudien

2.2.8.3 Kontrollen

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

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

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

2.2.8.4 Gewebeprozessierung

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

2.2.9 Kombinierte Ex-vivo- und Histochemiestudien

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

2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

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

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

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

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

Tabelle 10: Fluoreszenzfilter

2.2.11 Dokumentation

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