

5 Zusammenfassung

Fragestellung und Methodik

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

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

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

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

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

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

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

Ergebnisse

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

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

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

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

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

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

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

Schlussfolgerung

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

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