

## **4 Diskussion**

### **4.1 Methoden**

In dieser Arbeit wurde die Expression des Oligopeptidtransporters PEPT2 auf transkriptioneller, translationaler und funktioneller Ebene in Lungengeweben von Maus, Ratte und Mensch untersucht.

Die Existenz eines spezifischen Transportsystems für Oligopeptide in der Lunge wurde bisher aufgrund einer Reihe funktioneller Studien vermutet.

So konnte in Typ II-Pneumozyten-Primärkulturen der Ratten die Aufnahme des Dipeptids (L)-Trp-(L)-Tyr beobachtet werden, jedoch ohne Charakterisierung des molekularen Transportvorgangs, da das Dipeptid sehr schnell hydrolysiert wurde (Meredith und Boyd, 1993).

Durch den Nachweis des intakten Transports des hydrolysestabileren Dipeptids (D)-Phe-(L)-Ala in einer luminal-vaskulären Rattenlungenpräparation konnten erstmals Hinweise auf einen spezifischen Dipeptidtransport gesammelt werden (Boyd et al., 1993). Auch boten Studien über die Aufnahme der Dipeptide (L)-Gly-(D)-Phe und (L)-Gly-(L)-Phe in Ratten-Alveolarepithelzell-Primärkulturen (Morimoto et al., 1993) Hinweise für einen geregelten Oligopeptidtransport in der Lunge.

Der einzige Hinweis auf einen Transport von Tripeptiden im Lungengewebe war bis jetzt der Nachweis der Aufnahme des hydrolyseresistenten Tripeptids (L)-Ala-(D)-Phe-(L)-Ala in Bürstensaummembranen von Typ II-Pneumozyten der Ratte (Helliwell et al., 1994).

#### **4.1.1 Nachweis der Transporter-mRNA-Expression**

Auf molekularer Ebene konnten bisher in den Publikationen über die Klonierung der PEPT2-cDNA Hinweise für die Expression von PEPT2-mRNA in Lungenextrakten gesammelt werden. So wurde erstmals durch eine Northern Blot Analyse ein Hybridisierungssignal für PEPT2-mRNA in der Kaninchenlunge gefunden (Boll et al., 1996). Eine später durchgeführte RT-PCR-Studie mit Kaninchengeweben bestätigte diesen Befund (Döring et al., 1998a). In der Rattenlunge wurde ebenfalls durch eine Northern Blot Analyse ein Hybridisierungssignal für PEPT2-mRNA nachgewiesen (Saito et al., 1996).

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit eine Northern Blot Analyse an der Rattenlunge durchgeführt. Mit dieser Methode konnte gleichfalls eine Überprüfung der Spezifität der zur In-situ-Hybridisierung benutzten Sonden durchgeführt werden. Dabei

wurde ein für PEPT2 spezifisches Hybridisierungssignal bei 4,2 kb festgestellt und somit die Spezifität der Sonde nachgewiesen und das Ergebnis von Saito (1996) bestätigt werden.

Zusätzlich zu dieser Technik wurde die Expression PEPT2s in Rattenlungen auf transkriptioneller Ebene durch die Technik der RT-PCR (Saiki et al., 1985) überprüft. Sie ist um den Faktor 1000 bis 10000 (Mullis et al., 1986) sensitiver als die Northern Blot Analyse, so dass auch geringe Mengen an mRNA nachgewiesen werden können. Auch bei dieser Methode wurden für PEPT2-mRNA spezifische Amplifikate mit einer Länge von 341 bp gefunden. Der Nachweis der Spezifität der Methoden erfolgte durch Negativkontrollen.

Frühere Klonierungsstudien zeigten bereits die Abwesenheit der mRNA des Oligopeptidtransporters PEPT1 in Lungengewebe der Ratte (Saito et al., 1995) und des Kaninchens (Fei et al., 1994), so dass auf einen nochmaligen Nachweis der Abwesenheit PEPT1 auf transkriptioneller Ebene verzichtet werden konnte.

#### **4.1.2 Lokalisation der Transporter-mRNA**

Es gibt ein begründetes Interesse an einer Aufschlüsselung der Transportvorgänge nach Gewebe- und Zelltypen im Organverband. Zum einen eröffnen sich damit neue Einblicke in Steuerungsvorgänge der Zellen und zum anderen können sich hierdurch Anstöße bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ergeben.

Die Lokalisation von mRNA auf zellulärer Ebene durch die In-Situ-Hybridisierung ist erst seit Mitte der 80er Jahre möglich (Coghlan et al., 1985). Zwar wurde diese Technik schon zu Beginn der siebziger Jahre entwickelt (Pardue und Gall, 1969, John et al., 1969), jedoch konnte erst durch die Einführung von Klonierungstechniken die ursprünglich autoradiographische Technik zur Detektion von Satelliten-DNA auf den Nachweis von mRNA ausgeweitet werden (Harper et al., 1986). So z. B. war die Bildung von Erythropoietin in der Niere schon seit langem bekannt; erst durch die Entwicklung der mRNA-In-situ-Hybridisierung konnte schließlich eine genaue Lokalisierung der Erythropoietinproduktion in peritubulären Fibroblasten erfolgen (Lacombe et al., 1988, Bachmann et al., 1993).

Durch die Anwendung der mRNA-In-situ-Hybridisierung am Tiermodell der Ratte sollte eine exakte zelluläre Lokalisation der PEPT2-mRNA in der Lunge erfolgen. Im Vergleich zu anderen Geweben wie dem ZNS mit einer größeren Homogenität des Gewebes und niedrigeren RNase-Aktivitäten konnten für die Atemwege bis jetzt erst relativ wenige In-

situ-Hybridisierungen erfolgreich durchgeführt und publiziert werden (Baraniuk et al., 1993, Saldise et al., 1996, Martínez et al., 1997). Durch die Lokalisation der PEPT2-mRNA in Typ II-Pneumozyten und in Zellen des Tracheal- und Bronchialepithels wurde erstmals ein Peptidtransporter in der Lunge auf zellulärer Ebene exakt nachgewiesen. Dieser Befund identifiziert das bisher in Typ II-Pneumozyten und Trachealepithelzellen vermutete Oligopeptidtransportsystem als PEPT2.

#### **4.1.3 Nachweis des Transporterproteins**

Um neben der Lokalisation der mRNA auch eine Aussage bezüglich der Expression des Proteins zu machen, wurde die Methode der Immunhistochemie verwendet. Diese Methode gestattet die Detektion der Immunreaktivität auf zellulärer Ebene durch spezifische Antikörper. Der verwendete PEPT2-Antikörper wurde bereits charakterisiert (Döring et al., 1998c) und richtet sich gegen den carboxyterminalen Terminus des Transporterproteins. Die Ergebnisse der Immunhistochemie mit einer Lokalisation der PEPT2-Immunreaktivität in Typ II-Pneumozyten sowie Bronchial- und Trachealepithelzellen stimmen mit den Ergebnissen der In-situ-Hybridisierung überein und lassen darauf schließen, dass die in den Zellen gebildete mRNA auch zum Protein translatiert wird. Neben der Lokalisation im Rattengewebe konnte durch die Lokalisation der Immunreaktivität in Maus- und Menschengewebe diese Aussage zusätzlich auf weitere Spezies erweitert werden. Im Vordergrund des Nachweises beim menschlichen Gewebe stand der Vergleich der Expression PEPT2s in normalen und Mukoviszidosenlungen. Es wurden keine qualitativen Unterschiede in der Expression der Immunreaktivität PEPT2s festgestellt.

Um einen Transport von Oligopeptiden durch den Oligopeptidtransporter PEPT1 auszuschließen, wurden Inkubationen mit einem Antikörper gegen PEPT1 durchgeführt. Es konnte keine Immunreaktivität für PEPT1 in der Lunge nachgewiesen werden. Dieser Befund wird durch die schon früher gezeigte Abwesenheit der PEPT1-mRNA in der Lunge gestützt (Fei et al., 1994, Saito et al., 1995).

#### **4.1.4 Nachweis des Oligopeptidtransports auf funktioneller Ebene**

Die bis jetzt erhobenen funktionellen Daten zum Oligopeptidtransport basieren auf Befunden an Zellkulturen und Homogenisaten. Eine präzise Aussage bezüglich des Oligopeptidtransports im intakten Lungengewebe war daher nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde eine Technik entwickelt, die es erlaubt, den Transport eines spezifischen Reportermoleküls in-situ zu bestimmen. Über die Akkumulation der Fluoreszenz in einzelnen Zellen lässt sich eine genaue zelluläre Lokalisation der Transportvorgänge im intakten Gewebsverband durchführen.

Bei der Wahl des Reportermoleküls stand an vorderster Stelle die Spezifität des Substrats. In dieser Hinsicht wurden bis jetzt zwei mögliche fluoreszenzgekoppelte Dipeptidderivate in der Literatur veröffentlicht (Otto und Bauer, 1996, Abe et al., 1999). Dabei konnte das Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Molekül (D)-Ala-(L)-Lys-N-epsilon-7-amino-4-Methyl-Kumarin-3-Azetat (AMCA) als Oligopeptidtransport-spezifisches Dipeptidderivat in Primärkulturen von follikulostellatalen Zellen (Otto et al., 1996), Testikularmakrophagen (Otto und Bauer, 1996), PEPT2 exprimierenden Hefezellen (Döring et al., 1998), Astroglia (Tom Dieck et al., 1999) und LLC-PK1 Zellen (Wenzel et al., 1999) charakterisiert werden. Aufgrund dieser Nachweise in verschiedenen Zellkulturen erschien (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA als günstigste Ausgangsbasis für eine Ex-vivo-Studie im Lungenpräparat.

Insbesondere spielt die Frage nach der Hydrolysestabilität bei der Interpretation der Befunde eine wesentliche Rolle. Die Aufnahme größerer Mengen hydrolysierter Peptidfragmente über singuläre Aminosäuretransporter könnte einen Oligopeptidtransport simulieren. Um die Hydrolysestabilität zu erhöhen, wurde (D)-Ala benutzt (Tom Dieck et al., 1999). Darüber hinaus wurde als Inkubationsmedium Minimum Essential Medium (MEM-21011 [Eagle und Levine, 1967]) mit einem Zusatz verschiedener Aminosäuren gewählt. Neben Lysin in einer Konzentration von 72,5 mg/l enthält dieses Medium die Aminosäuren Arginin, Cystin, Glutamin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin, jedoch keine Di- oder Tripeptide. Diese singulären Aminosäuren erschweren durch ihre Eigenschaft als kompetitive Substrate eine ungezielte Aufnahme von Hydrolysefragmenten des Reportermoleküls durch Aminosäuretransporter.

Auch die Temperatur der Organpräparationen spielt eine wesentliche Rolle bei den Transportvorgängen. Die Spezifität des Dipeptidtransports wurde in Temperaturstufen untersucht, wobei bei einer Temperatur von 4°C kein Transport mehr festgestellt werden konnte. Dadurch wurde gezeigt, dass die passive Diffusion keine erhebliche Rolle bei der Aufnahme des Reportermoleküls spielen konnte.

Als Kontrolle der Spezifität der Aufnahmereaktion erfolgte eine Blockade des Transportvorgangs mit DEPC. Dieser Stoff reagiert mit den Histidin-Resten und führt somit über eine Modifikation der Peptidstruktur zu einer Veränderung der Transportereigenschaften.

Schon in früheren Studien wurde eine Inhibition der Oligopeptidtransporter durch DEPC demonstriert (Kramer, 1988, Meredith und Laynes, 1996, Terada et al., 1998). DEPC kann aufgrund der Tatsache, dass es alle Histidin-Reste modifiziert, nur als unspezifischer Hemmstoff gelten. Ein spezifischer Inhibitor der Oligopeptidtransporter PEPT2 und PEPT1 wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Da Typ I-Pneumozyten gegenüber histochemischen Methoden sehr vulnerabel sind und dadurch dieser Zelltyp artefaktspezifisch im histologischen Befund unterrepräsentiert sein kann, wurden lektinhistochemische Studien mit *Lycopersicon esculentum* Lektin (LEA) zum Nachweis der Integrität der Typ I-Zellen durchgeführt.

Die Kombination mit den Ex-vivo-Aufnahmestudien an murinen Lungenpräparationen ermöglichte eine parallele Darstellung der PEPT2-Aktivität und der Typ I-Pneumozyten. Das Typ I-Pneumozyten-spezifische LEA (Fehrenbach et al., 1999, Kasper et al., 1993) führte zu einer Anfärbung von Typ I-Zellmembranen ohne Markierung der (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA markierten Typ II-Pneumozyten. Damit konnte sowohl die Intaktheit der Typ I-Zellen nachgewiesen, als auch ein Transport von Oligopeptiden in diese Zellen ausgeschlossen werden.

## 4.2 Biologische Bedeutung der Befunde

Der Nachweis des Oligopeptidtransporters PEPT2 auf molekularer und funktioneller Ebene in Zellen des respiratorischen Epithels ist sowohl für den pulmonalen als auch systemischen Peptidmetabolismus von Bedeutung.

### 4.2.1 Pulmonaler Peptidmetabolismus

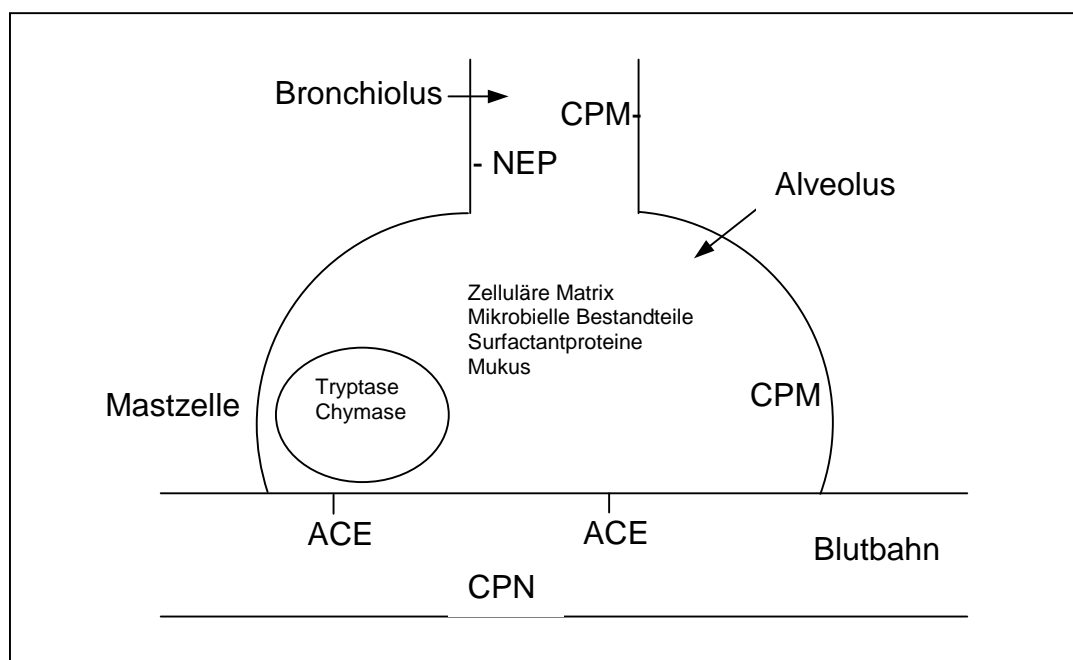
Traditionell werden die Lungen in erster Linie als gasaustauschendes Organ betrachtet. Zur Gewährleistung einer regelrechten Gasaustauschoberfläche bedarf es eines wirkungsvollen Syntheseparameters, insbesondere in den Surfactant-produzierenden Zellen (Mason und Crystall, 1998). Darüber hinaus wurde in jüngerer Zeit auch eine wichtige Rolle der pulmonaler Zellen bezüglich des Immunsystems postuliert (Barnes, 1994, Barnes et al., 1998).

Der hohe Bedarf an Grundsubstanzen wird über ein ausgeprägtes Netz an Transportsystemen gedeckt. Betrachtet man hierbei die Systeme für den Transport von Stickstoffgruppen wie singuläre Aminosäuren, Oligopeptide und Proteine, so ist der Nachweis PEPT2s in den extrem stoffwechselaktiven Typ II-Pneumozyten ein neuer Anhalt für die Diversifizierung der Stickstoffversorgungswege dieser Zellen.

Neben den Systemen für Cystein (Knickelbein et al., 1997), Glutamin (Hautamaki et al., 1992) und dem Natrium-Aminosäure-Kotransporter (Brown et al., 1985), deren Transportkinetiken in Lungenzelllinien und Membranpräparationen charakterisiert wurden, konnte die Expression mehrerer anderer Aminosäuretransporter cDNAs in der Lunge gezeigt werden. Hierzu gehören der Taurin Transporter TAUT (Liu et al., 1992), ein Glyzin Transporter (Borowsky et al., 1993), sowie mehrere unspezifische kationische Aminosäuretransporter (CAT-4 [Palacín et al., 1998]), anionische Aminosäuretransporter (EAAT1 [Arriza et al., 1994], EAAT3 [Kanai und Hediger, 1992]) neutrale Aminosäuretransporter (rBAT, D2 [Bertran et al., 1992]) und zwitterionische Aminosäuretransporter (ASCT1 [Arriza et al., 1993], ATB° [Kekuda et al., 1996]).

Bei der Hydrolyse von Proteinen im Alveolarraum entstehen nicht nur singuläre Aminosäuren, sondern auch Oligo- und Polypeptide. Eine Vielzahl von Peptidasen wurde in der Lunge bereits charakterisiert (Juillerat-Jeanneret et al., 1997, Abb. 25). Obwohl die Tendenz bestand, diese Enzyme nach einzelnen Substraten zu benennen, z. B. Angiotensin Converting Enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) oder Enkephalinase (Neutrale Endopeptidase 24.11 [NEP], EC 3.4.24.1), sind sie nicht spezifisch für ein einzelnes Substrat, sondern erkennen die Aminosäuren in der Umgebung der potentiellen Hydrolysestelle. Die

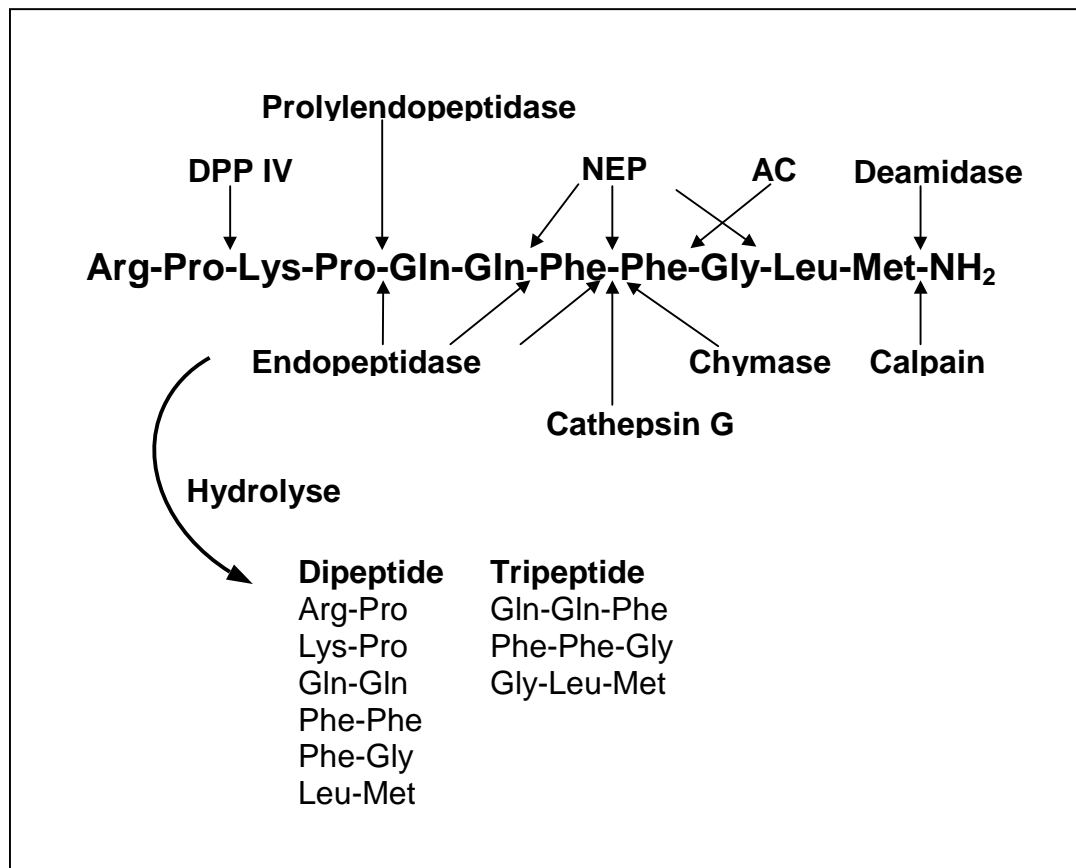
Peptidasen können generell in zwei Gruppen getrennt werden: Endopeptidasen und Ektopeptidasen. Endopeptidasen hydrolysieren eine innerhalb eines Peptids liegende Peptidbindung, während Ektopeptidasen Fragmente von ein bis zwei Aminosäuren vom N- oder C-Terminus des Peptids entfernen (Funkhouser et al., 1991). Als Resultat dieser Reaktionen entstehen freie Polypeptide, Oligopeptide und singuläre Aminosäuren.



**Abbildung 25:** Pulmonale Lokalisation von Peptidasen, deren Hydrolyseprodukte potentielle PEPT2-Substrate sind. Abk.: ACE, Angiotensin Converting Enzym; CPM, Carboxypeptidase M; CPN, Carboxypeptidase N; NEP, Neutrale Endopeptidase.

Zu den wichtigsten in der Lunge vorkommenden Peptidasen gehören die Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11 [Goetzl et al., 1989, Baraniuk et al., 1995]), Mastzellen Tryptase (Caughey et al., 1988, Tam und Caughey, 1990), Mastzellen Chymase (Franconi et al., 1989), Aminopeptidase P (EC 3.4.11.9 [Sidorowicz et al., 1984]), Aminopeptidase N (Funkhouser et al., 1991), Carboxypeptidase N (CPN, EC 3.4.17.3 [Erdös, 1979]) und Dipeptidylpeptidase II (EC 3.4.15.1 [Erdös, 1979]). Die Bedeutung dieser Peptidasen liegt unter anderem in der Hydrolyse und Deaktivierung von biologisch aktiven Neuropeptiden wie Tachykininen (Martins et al., 1990, Dragovic et al., 1993) oder Vasoaktivem Intestinalen Polypeptid (VIP [Thompson et al., 1990, Hachisu et al., 1991, Lilly et al., 1993, 1994]). Die aus der Hydrolyse entstehenden Fragmente sind teilweise Di- und Tripeptide und somit potentielle PEPT2-Substrate.

Als Beispiel für die Fragmentierung eines Polypeptids in mehrere Dipeptidfragmente kann die Hydrolyse des Neurotransmitters Substanz P genommen werden (Abb. 26). Hierbei entstehen sechs mögliche Dipeptide und drei mögliche Tripeptide, die durch einen PEPT2 vermittelten Transport in die Zelle zurückgeführt werden können.



**Abbildung 26:** Hydrolyse zu möglichen Oligopeptidfragmenten durch Lungenpeptidasen am Beispiel von Substanz P. NEP, Neutrale Endopeptidase; ACE, Angiotensin Converting Enzyme; DPP IV, Dipeptidyl Peptidase IV.

In gleicher Weise wie Substanz P werden die verschiedensten Proteine, z. B. Bestandteile der zellulären Matrix, Surfactantproteine, Mukusproteine oder mikrobielle Proteine im Alveolarraum gespalten. Dadurch ist anzunehmen, dass eine große Anzahl an Oligopeptiden entsteht, welche durch PEPT2-vermittelten Transport in das respiratorische Epithel aufgenommen und in den intrazellulären Stickstoffpool zurückgeführt werden können. Eine genaue Quantifizierung des Anteils von Oligopeptiden und des Anteils von singulären Aminosäuren und Polypeptiden als Produkte des pulmonalen Stickstoffmetabolismus könnte zu einer besseren Einschätzung des Anteils des Oligopeptidtransports am Gesamttransport von Stickstoffgruppen im Lungenepithel führen. Bis jetzt



wurden derartige Studien noch nicht durchgeführt. Ein erster Anhalt für die Dimension des Oligopeptidanteils kann ein Vergleich mit der Situation im Systemkreislauf bieten: Versuche an verschiedenen Tiermodellen zeigten, dass ca. 50 % der zirkulierenden Plasmaamino-säuren als Peptide vorliegen, die Mehrzahl davon als Di- und Tripeptide (Schlagheck und Webb, 1984, Seal und Parker, 1991, R  rat et al., 1992).

Ein weiterer Aspekt des Abtransports von Oligopeptiden in der Lunge ist die Bedeutung hinsichtlich der alveolären Flüssigkeitsbilanz. Eine Erhöhung des alveolären Proteingehalts aufgrund einer Akkumulation von Peptiden kann den osmotischen Gradienten erhöhen und somit über eine Verdickung des alveolären Flüssigkeitsfilms zu einer erschwerten Gasdiffusion führen.

Die genaue Rolle des Peptidtransporters PEPT2 muss diesbezüglich noch untersucht werden. Ansätze hierfür wären die Entwicklung eines Knockout-Modells.

#### **4.2.2 Endogene Substrate für PEPT2 mit Bedeutung für die lungeneigene Homöostase**

Mit Bezug auf die Barrierewirkung gegen schädliche Umwelteinflüsse und den erhöhten Sauerstoffkontakt des respiratorischen Epithels ist eine Bedeutung PEPT2s beim Transport membranstabilisierender Substanzen möglich. Der Nachweis des Dipeptid-Transports von  $\beta$ -Ala-(L)-His (Synonym: Carnosin) im Trachealepithel durch Yamashita et al. (1998) stützt diese Hypothese. In der peripheren Lunge beeinflusst Carnosin den intrazellulären pH (Tikhomirova et al., 1993) und übt regenerative Effekte bei Verletzungen der Lungenintegrit  t aus (Perel  man et al., 1989a, b). Dies könnte unter anderem an seiner membranstabilisierenden und antioxidativen Wirkung liegen (Boldyrev et al., 1993). Auch wurde beschrieben, dass Carnosin den Alterungsprozess von fetalen Lungenzellen verzögert (McFarland und Holliday, 1994). Die Expression des Carnosin-transportierenden Proteins PEPT2 in Typ II-Pneumozyten und Bronchialepithelzellen gibt diesen Zellen die Fähigkeit, Carnosin nicht nur durch Synthese herstellen zu können, sondern auch direkt aus dem extrazellulären Raum aufnehmen zu können. Dieser zusätzliche Versorgungsweg für das membranstabilisierende und antioxidative Carnosin könnte einen weiteren Faktor der guten Regenerations- und Proliferationsfähigkeit der Typ II-Pneumozyten darstellen.

Weitere PEPT2-Substrate mit Bedeutung für die Lungenhom  ostase sind Di- und Tripeptide, die Cystein oder Cystin enthalten. Cystein ist ein limitierender Faktor für die Synthese von Glutathion, das als wichtiges Antioxidans in der Lunge gilt (Brown et al., 1992, Deneke et al., 1989). Neben der Aufnahme durch Cystin und Cystein Transportsysteme (Knickelbein et al., 1997) kann eine Aufnahme dieser wichtigen Aminosäure auch

als oligopeptidgebundene Form über PEPT2 erfolgen.

#### **4.2.3 Systemischer Peptidmetabolismus**

Neben der hohen Wertigkeit von Oligopeptiden und singulären Aminosäuren für die lungeneigene Proteinsynthese (Frissell, 1982), wurde in jüngerer Zeit auch eine wichtige Rolle der Lungen im Aminosäurehaushalt des Gesamtorganismus postuliert (Plumley et al., 1990a).

Es werden beispielsweise große Mengen an Stickstoffdonatoren in die systemische Zirkulation während Systemerkrankungen wie dem septischen Schock freigesetzt (Plumley et al., 1990b, Austgen et al., 1991).

Die genaue Ursache hierfür ist noch nicht bekannt, jedoch scheint insbesondere pulmonales Glutamin eine wichtige Rolle im Zustand der Sepsis zu spielen (Souba et al., 1990). Glutamin als nichtessentielle Aminosäure ist die am häufigsten vorkommende Aminosäure im Blutkreislauf und im freien Aminosäurepool des Körpers (Bergström et al., 1974). Der Nachweis der Inhibition des Transports von (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA durch Glycylglutamin in Zellen des respiratorischen Epithels und die Identifikation von PEPT2 in diesen Zellen sind Hinweis dafür, dass innerhalb des Lungen-Glutamin-Metabolismus neben dem Transport durch ein Glutamin-spezifisches Transportsystem (Hautamaki et al., 1992) auch noch ein Transport durch den Oligopeptidtransporter PEPT2 erfolgen kann.

#### **4.2.4 Die Expression des Transporters in normalen und pathologischen humanen Geweben**

Als Antibiotika-transportierendes Protein spielt PEPT2 eine wesentliche Rolle bei der renalen Reabsorption verschiedener Betalaktame (Daniel und Adibi, 1993). Darüber hinaus wird die intestinale Isoform PEPT1 für die gute Aufnahme von Betalaktam-antibiotika im Magen-Darm-Trakt verantwortlich gemacht (Wenzel et al., 1995). Die Expression von PEPT2 in der Lunge rückt den Transporter in das Blickfeld therapeutischer Überlegungen bezüglich bakterieller Infektionen der Lunge, die als weit verbreitete Erkrankungen schwerwiegende sozioökonomische Folgen haben. Insbesondere bei Patienten mit zugrunde liegenden chronischen Lungen- und Systemerkrankungen können diese Infektionen schwere Destruktionen der Lunge bzw. eine respiratorische Insuffizienz bewirken und somit wesentlich zur Progression der Erkrankung beitragen. Pneumonien sind eine unausweichbare Komplikation der Systemerkrankung Mukoviszidose bei Patienten, die die Neugeborenenperiode überleben (Falbel und Smaczny, 1993). Die

Lungen der Mukoviszidosepatienten sind nach der Geburt histologisch noch vollkommen unauffällig (MacLusky und Levison, 1990). Schon bald jedoch erfolgt eine Verlegung der Luftwege durch Mukus aufgrund der gestörten mukoziliären Clearance, mit der Folge einer bakteriellen Besiedlung (Armstrong et al., 1995, Kahn et al., 1995, Smith et al., 1996). Pneumonien gelten als Hauptmortalitätsursache der Erkrankung - ca. 95 % aller Mukoviszidosepatienten sterben an einer pulmonalen Komplikation (Elborn et al., 1991).

Mit Hinsicht auf diese zentrale Rolle der bakteriellen Infektionen bei der Progression der Erkrankung steht die Antibiotikatherapie an vorderster Stelle. Seit der Einführung der gezielten Antibiotikatherapie konnte dementsprechend auch eine wesentliche Verbesserung der Überlebenszeit erreicht werden (FitzSimmons, 1994, Rosenstein und Zeitlin, 1994).

Traditionell wird die Serumkonzentration eines Antibiotikums mit der minimalen inhibitorischen Konzentration (minimal inhibitory concentration, MIC) verglichen, derer es bedarf, um 90 % der Bakterienstämme zu inhibieren (MIC 90). Obwohl die MIC ein wichtiges Kriterium im Falle einer Bakteriämie darstellt, spielt die Konzentration des antimikrobiellen Agens am Ort der Infektion in der Lunge die wesentliche Rolle bei der Eradikation der Erreger.

Mehrere Faktoren, welche sich auf die Eigenschaften systemisch applizierter Antibiotika gründen, limitieren ihre klinische Effektivität in der Therapie von Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose. Die schlechte Anreicherung der systemischen Präparate in Bronchialsekreten aufgrund des pathologisch veränderten Lungenepithels und der hohen Viskosität des Schleims resultiert in minimalen Sputumkonzentrationen. Aus diesem Grund bedarf es hoher Dosen systemisch applizierter Präparate um adäquate Dosen zu erhalten, mit der Folge, dass die Rate an unerwünschten Wirkungen zunimmt. Darüber hinaus erfordern akute Exazerbationen oft eine Kombination verschiedener intravenöser Antibiotika, wodurch eine Hospitalisierung notwendig wird (Honeybourne, 1997).

Demgegenüber stellt die aerosolische Antibiotikatherapie mit Vernebelung des Agens eine attraktive Alternative dar, die wesentliche theoretische Vorteile beherbergt (Niven et al., 1990, Hoover et al., 1992, Patton und Platz, 1992). Durch aerosolische Administration kann das Agens in hohen Konzentrationen direkt an den Ort seiner Wirkung gelangen. Dadurch werden „First-pass“- Metabolismus in der Leber und schnelle Inaktivierung durch renale Elimination ausgeschaltet und systemische unerwünschte Wirkungen reduziert (Eisenberg, 1996). Trotzdem ist die Effektivität der aerosolischen Antibiotikatherapie sehr kontrovers (Itokazu und Weinstein, 1998).

Eine Reihe an Publikationen berichtete über aerosolische Behandlungen von Lungeninfektionen hauptsächlich mit Aminoglykosiden (Kun et al., 1984, Steinkamp et al., 1989, Ramsey et al., 1993) aber auch Betalaktamen (Hodson et al., 1981, Nolan et al., 1982, Stead et al., 1987, Bressolle et al., 1992, Sustronck et al., 1995). Trotz der Vielzahl an Therapiestudien ist bis jetzt nur relativ wenig über den Metabolismus der Aerosole bekannt. Einige Studien konnten Ergebnisse über die quantitative Verteilung (Mukhopadhyay et al., 1994), Bioverfügbarkeit (Cooney et al., 1994) und zellulären Effekte (Palmer et al., 1998) erzielen. Über die genauen Transportvorgänge wurden bis jetzt noch keine Daten veröffentlicht.

Der Nachweis des Peptidtransporters PEPT2 im respiratorischen Epithel ist ein erster Hinweis auf den pulmonalen Transportmetabolismus einiger Betalaktame nach einer aerosolischer Applikation.

Die Anwendung aerosolischer Betalaktame konnte sich bis jetzt nicht durchsetzen. In einer Plazebo-kontrollierten Studie konnte die Effektivität von aerosolischem Carbenicillin und Gentamicin nachgewiesen werden (Hodson et al., 1981). Auch Stead et al. konnten in einer randomisierten Plazebo-kontrollierten Studie eine Verbesserung der Lungenfunktion durch Therapie mit aerosolischen Ceftazidime bzw. Carbenicillin in Kombination mit Gentamicin nachweisen (Stead et al., 1987). Demgegenüber wurde in einer Studie von Nolan et al. keine Effektivität von Cephaloridin nachgewiesen, was jedoch wahrscheinlich auf einer primären Resistenz der Bakterien beruhte (Nolan et al., 1982). In einer unkontrollierten Studie wurde aerosolisches Ticarcillin in Kombination mit Gentamicin getestet und ein Rückgang von Krankenhaustagen aufgrund akuter Exazerbationen festgestellt (Wall et al., 1983).

Mit der in den Ex-vivo-Studien nachgewiesenen Verdrängung (D)-Ala-(L)-Lys-AMCAs durch Cefadroxil in normalen humanen Lungengeweben sowie Mukoviszidoseresektaten wurde indirekt der Transport des Betalaktams durch einen Oligopeptidtransporter nachgewiesen. Cefadroxil, ein semi-synthetisches Cephalosporin, das effektiv gegen Gram-positive und -negative Infektionen der Lunge eingesetzt werden kann (Chisholm et al., 1986), wurde bereits in früheren Arbeiten als ein durch PEPT2-transportiertes Substrat in renalen Bürstensaummembranen (Ries et al., 1994) und *Xenopus laevis* Oozyten (Boll et al., 1996) charakterisiert. Neben der antibiotischen Potenz Cefadroxils in der Lunge ist ein zusätzlicher Aspekt seine Wirksamkeit in der Reduzierung Antigen-induzierter bronchialer Hyperreaktivität (Boichot et al., 1993). Dieser Effekt ist nicht mit der Reduktion von Eosinophilen verbunden.

Der Nachweis der Expression PEPT2s in Typ II-Pneumozyten ist Hinweis auf eine Akkumulation pulmonal applizierter Betalaktame in diesem Zelltyp.

Demgegenüber wurde bezüglich einer erfolgreichen Eradikation von Bakterien insbesondere eine hohe Konzentration des antimikrobiotischen Agens im epithelialen Flüssigkeitsfilm und in Alveolarmakrophagen für wichtig erachtet (Retsema et al., 1990), wobei der Ort der Infektion in erster Linie neben dem infektiösen Sputum in der Mukosa gesehen wurde.

Anhand von Pneumokokken-Pneumonie-Tiermodellen konnte eine positive Relation zwischen Gewebekonzentration und therapeutischem Erfolg gezeigt werden (Vallee et al., 1991, Azoulay-Depuis, et al., 1991). Die Konzentration des Antibiotikums innerhalb der Makrophagen und Neutrophilen spielt vor allem im Rahmen von Infektionen durch intrazelluläre Erreger eine Rolle (Edelstein et al., 1996). Gegenüber Makroliden und Quinolonen, die sehr gute Eigenschaften bezüglich der Anreicherung in diesen Zellen aufweisen, werden Betalaktame nur als weniger gut anreichernd eingestuft (Honeybourne, 1994, Cook et al., 1996). Diese Beobachtungen werden jetzt durch den Befund unterstützt, dass im Gegensatz zu Bronchialepithelzellen und Typ II-Pneumozyten in Makrophagen und Neutrophilen keine Expression PEPT2s oder ein funktioneller Oligopeptidtransport nachgewiesen werden konnte.

Bis jetzt liegen noch keine Daten bezüglich der Wirksamkeit PEPT2-transportierter Betalaktame gegenüber nicht-PEPT2-transportierter Betalaktame vor. Ein Vergleich der Wirksamkeit beider Gruppen in Pneumonie-Tiermodellen könnte die Frage klären, in wieweit die Deposition und Akkumulation PEPT2-transportierter Betalaktame in Typ II-Pneumozyten und Bronchialepithel bezüglich der Effektivität eines pulmonal applizierten Betalaktams eine Rolle spielt.

Eine weitere Frage hinsichtlich der biologischen Bedeutung der pulmonalen Deposition PEPT2-transportierter Substrate besteht im Rahmen der Beobachtungen über selektive Hemmstoffe der pulmonalen Humanen Leukozyten Elastase (HLE, EC 3.4.21.37). Die hohe Aktivität dieser Serin-Protease wird kausal mit Erkrankungen wie der Mukoviszidose (Jackson et al., 1984), der chronischen Bronchitis (Stockley et al., 1991), dem Lungenemphysem (Janoff, 1985) und dem Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS [Merritt et al., 1983]) in Verbindung gebracht. Die Präsenz HLEs im interzellulären Raum resultiert in einer unkontrollierten Proteolyse und Zerstörung von zellulären Strukturen (Snider, 1987).

Bei der Entwicklung von HLE-Inhibitoren (Trainor, 1987, Travis und Fritz, 1991) wurde auch die inhibitorische Wirkung von Cephalosporinen auf HLE erkannt (Doherty et al., 1986, Hagman et al., 1989, Doherty et al., 1990, Shah et al., 1990). In der Folgezeit konnte festgestellt werden, dass unter HLE-inhibierenden Cephalosporinen, insbesondere nonpolare, hydrophobe Formen (Finke et al. 1990) geeignet sind, HLE zu blockieren. Finke et al. konnten 1992 die Synthese eines aerosolischen Cephalosporins mit HLE-inhibitorischer Wirkung berichten. Hier stellt sich die Frage, ob der Wirkungsgrad einzelner HLE-inhibierender Cephalosporine nicht nur von deren Affinität zur HLE abhängig ist, sondern auch durch den PEPT2-vermittelten Abtransport aus dem interzellulären Raum gemindert wird.

In Bezug auf die Expression PEPT2s in pathologischen Geweben wurde durch die Lokalisation des Transporters in Mukoviszidosegeweben auf immunhistologischer Ebene kein Unterschied zu normalen Geweben gefunden. Das Verteilungsmuster des Transporters ist also in Mukoviszidosegeweben, die als Substrat der Hauptindikation für aerosolische Antibiotikatherapie gelten, qualitativ identisch mit der normalen Gewebsverteilung. Die Untersuchung der Effektivität von PEPT2-transportierten gegenüber nicht-transportierten Antibiotika würde somit nicht durch eine erkennbare Störung der Verteilung des Transportsystems im pathologisch veränderten Lungengewebe in Frage gestellt. Die limitierte Aussagekraft immunhistochemischer Befunde in Bezug auf quantitative Veränderungen der Expression PEPT2s in pathologischen Geweben könnte durch künftige Studien mit quantifizierenden Methoden (Fink et al., 1998) erweitert werden.

In den Ex-vivo-Aufnahmestudien wurde parallel zu den Ergebnissen der Immunhistochemie kein Unterschied im Aufnahmemuster zwischen den Resektaten der Mukoviszidosepatienten und den normalen Lungengeweben gefunden. (D)-Ala-(L)-Lys-AMCA akkumulierte in den Flimmerepithelzellen und Typ II-Pneumozyten.

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

#### **4.2.5 Delta-Aminolävulinsäure als PEPT2-Substrat in der Lunge**

Der kürzlich erfolgte Nachweis des Transports von Delta-Aminolävulinsäure ( $\delta$ -ALA) durch PEPT2 (Döring et al., 1998a, Novotny et al., 2000) ist ein Befund mit mehreren physiologischen und pharmakologischen Bedeutungen im Atemtrakt.

Auf der Basis eines Substrats für die Hämsynthese besitzt  $\delta$ -ALA eine Rolle bei der pulmonalen Produktion von Kohlenmonoxid (CO). Neben Stickstoffmonoxid (Hamid et al., 1993) wird CO eine mögliche Bedeutung bei der Reaktion auf oxidativen Stress eingeräumt (Zayasu et al., 1997, Horvath et al., 1998). CO wird durch das Stress-induzierbare Hitzeschockprotein Hämoxxygenase I (Lee et al., 1996) und seine konstitutive Isoform Hämoxxygenase II generiert (Maines, 1988). In der humanen Lunge wurde eine Expression dieser Proteine unter anderem in Bronchialepithelzellen gefunden (Lim et al., im Druck), in denen jetzt ebenfalls PEPT2 nachgewiesen werden konnte.

Neben der Bedeutung von CO als Marker von oxidativem Stress liegt die therapeutische Relevanz der pulmonalen Aufnahme von  $\delta$ -ALA in der Photodynamischen Therapie (PDT, Rowe, 1998, Dougherty et al. 1998).

Es besteht ein wachsendes Interesse bezüglich der Biokinetik und des Metabolismus von  $\delta$ -ALA seit der erstmaligen Anwendung in der PDT (Peng et al., 1992, 1997, Fromm et al., 1996, Bown und Rogowska, 1999). Bei systemischer, topischer oder oraler Gabe (Loh et al., 1993, Webber et al., 1997)  $\delta$ -ALAs kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation dieser Substanz und zur Bildung von Porphyrinen. Über eine Photoaktivierung der Porphyrine wird die Zellapoptose eingeleitet (Steinbach et al., 1995, Gibson et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb kurzer Zeit nach oraler Gabe von  $\delta$ -ALA ein relativ hoher Plasmaspiegel erreicht wird (Fromm et al., 1996). Auch erfolgte der Nachweis einer Akkumulation und Wirkung  $\delta$ -ALAs in verschiedenen Epithelzellen (Loh et al., 1992, Bedwell et al., 1992, Goff et al., 1992, Wyss-Desserich et al., 1996). Der Transport im Gastrointestinaltrakt wurde auf den intestinalen Oligopeptidtransporter PEPT1 zurückgeführt (Döring et al., 1998a).

Darüber hinaus wird die Plasmakonzentration  $\delta$ -ALAs durch die Rückresorption aus dem proximalen Tubulus (O'Flaherty et al., 1981, Cheeks und Weden, 1986) sowohl durch PEPT2 als auch PEPT1 beeinflusst (Döring et al., 1998a).

Auch in der Lunge wird  $\delta$ -ALA sowohl in der Diagnose (Baumgartner et al., 1996) als auch in der Therapie (Sutedja und Postmus, 1996) von Neoplasien eingesetzt. Der Nachweis von PEPT2 im respiratorischen Epithel ist der erste Hinweis bezüglich des Aufnahmemechanismus  $\delta$ -ALAs in der Lunge. Weitere Studien müssen die Expression von PEPT2 in Tumorzelllinien untersuchen, um eine mögliche Rolle des Transporters in Lungenkarzinomen zu definieren.