

Zusammenfassung

Die aerosolische Administration von Peptidomimetika könnte in der Zukunft bei der Behandlung einer Vielzahl pulmonaler und systemischer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Insbesondere ergeben sich durch die neuen Verfahren der rationalen Substanzentwicklung Möglichkeiten, spezifische Pharmaka zu entwerfen, die durch Transportproteine effizient durch das Epithel transportiert werden. Von den zwei derzeit bekanntesten Pharmakatransportern PEPT1 und PEPT2, die aus menschlichem Gewebe kloniert worden sind, konnte der hochaffine PEPT2-Transporter in der Lunge nachgewiesen werden. Es handelt sich um ein Membranprotein mit 12 transmembranären Domänen, welches durch Kopplung an einen zelleinwärts gerichteten elektrochemischen Protonengradienten Substrate transportiert. In den menschlichen Atemwegen konnte die Expression von PEPT2 im Bronchialepithel und in Pneumozyten Typ 2 gefunden werden. Aufnahmestudien zeigen, dass sowohl Peptide sowie auch Peptidomimetika wie Antibiotika, antivirale Substanzen und Zytostatika durch PEPT2 transportiert werden. PEPT2 ist ebenso verantwortlich für den Transport der Delta-Aminolävulinsäure, die in der photodynamischen Therapie und Diagnostik von pulmonalen Neoplasien verwendet wird. Ausgehend von neuesten Erkenntnissen im Bereich Substratbindung- und -Transport rückt PEPT2 als Transportsystem zukünftiger, mittels rationaler Substanzentwicklung generierter Atemwegstherapeutika und Prodrugs in das Blickfeld therapeutischer Überlegungen.

Abstract

The aerosolic administration of peptidomimetic drugs with a peptide backbone may play a crucial role in the future treatment of diseases. Especially rational drug design offers an option to synthesize new drugs that are carried by specific drug transporters. Out of the presently identified transporter proteins PEPT1 and PEPT2, the high-affinity transporter PEPT2 is found in the respiratory tract. The transporter possess 12 membrane spanning domains and catalyses an electrogenic uphill drug transport using a transmembrane electrochemical proton gradient. PEPT2 is expressed in the bronchial epithelium and in alveolar type II pneumocytes in human airways. Kinetic studies demonstrated that peptidomimetic compounds including antibiotic, antiviral and antineoplastic drugs are carried by PEPT2. The transporter also carries delta-aminolevulinic acid into the airways. This molecule can be used for the diagnostics of pulmonary neoplasms and for photodynamic therapy. Using the recently published data on minimal structural requirements for PEPT2-substrates, rational drug design may lead to a new generation of respiratory drugs and prodrugs, which are delivered to the airways via the molecular mechanisms of the PEPT2 transport system.

Institutsangaben

¹Abteilung für Pneumologie, Medizinische Hochschule Hannover, (Leiter: Prof. Dr. T. Welte)
²Klinische Forschergruppe Allergologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin, (Leiter: Prof. Dr. A. Fischer)

Korrespondenzadresse

Priv.-Doz. Dr. med. David A. Groneberg · Allergie-Centrum-Charité, Charité-Universitätsmedizin Berlin · Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin · Augustenburger Platz 1-OR-1 · 13353 Berlin, Germany · E-mail: david.groneberg@charite.de

Eingang: 25. Februar 2005 · Nach Revision akzeptiert: 23. Juni 2005

Bibliografie

Pneumologie 2005; 59: 461–469 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
DOI 10.1055/s-2004-870942
ISSN 0934-8387

Einleitung

Neben seiner Bedeutung als gasaustauschendes Gewebe spielt das respiratorische Epithel eine wichtige Rolle als Grenzbarriere zwischen dem Organismus und seiner Umwelt. Die große Oberfläche kann dabei zur Administration verschiedenster Pharmaka bei Erkrankungen wie Asthma bronchiale, COPD, Mukoviszidose, Pneumonien oder chronischem Husten genutzt werden [1,2]. Allerdings ist die Wirksamkeit einer topischen Anwendung von verschiedenen Faktoren abhängig, einschließlich der chemischen Struktur des Pharmakons, der Eigenschaften des Transportsystems und der Möglichkeiten des Abtransports von Fragmenten [3].

In Anbetracht der Tatsache, dass die Lunge beim erwachsenen Menschen eine innere Oberfläche von 70–140 m² besitzt und über die Lungenvenen eine enge Verbindung zum systemischen Kreislauf besteht, kann die aerosolische Pharmaka-Administration zwei Ziele erreichen: Erstens können Atemwegstherapeutika topisch angewendet und damit systemische Nebeneffekte vermindert werden. Zweitens kann die aerosolische Gabe auch bei systemischen Erkrankungen Verwendung finden, da die Pharmaka über die Lungenvenen direkt in den systemischen Kreislauf gelangen. Ist die Anwendung von Medikamenten mit geringer oraler Bioverfügbarkeit unabdingbar, können so intravenöse Gaben vermieden werden.

Bereits jetzt spielt die aerosolische Gabe von Arzneimitteln bei der Behandlung einer Vielzahl von pulmonalen und systemischen Erkrankungen eine große Rolle. Allerdings wurden die genauen molekularen Transportvorgänge einzelner Pharmaka im respiratorischen Epithel und die damit verbundenen Optionen bezüglich eines Rational Drug Designs neuer Substanzen bis jetzt noch nicht im Detail analysiert. Hinsichtlich des möglichen Vorteils topischer Therapien und der neuesten Erkenntnisse über die Expression und Funktion von Pharmakatransportern in den Atemwegen, befasst sich der vorliegende Übersichtsartikel mit Aspekten des optimierten aerosolischen Pharmakatransportes und neuen Methoden topischer Administration. Im Vordergrund steht dabei der Vorteil einer Transporter-vermittelten Pharmakaaufnahme, die im Vergleich zur passiven Diffusion wesentlich höhere Konzentrationen zulässt (Abb. 1).

Geschichtlicher Hintergrund

Bereits vor 4000 Jahren wurden inhalative Pharmaka zur Behandlung respiratorischer Erkrankungen verwendet, z.B. in Form von Atropa belladonna-Blättern, die geraucht wurden, um Husten zu unterdrücken.

Auch zu Hippokrates Zeiten waren Aerosole, heiße Dämpfe und Meerwasser-Inhalationen üblich, um Atemwegobstruktionen zu erleichtern. Während der industriellen Revolution gab es so genannte Asthma-Zigaretten, die Stramoniumextrakte aus der Pflanze *Datura stramonium* (Weißer Stechapfel) enthielten. Im späten neunzehnten Jahrhundert wurde erstmals eine Vielzahl von Verneblern konstruiert, die hauptsächlich mit Luftdruck arbeiteten.

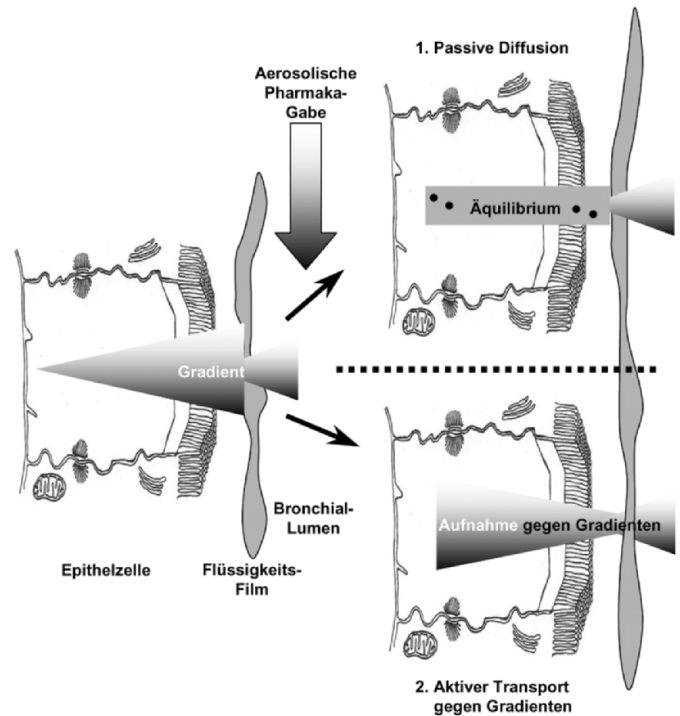


Abb. 1 Unterschied zwischen aktivem Transport und passiver Diffusion. Ausgehend von der Situation einer aerosolischen Gabe eines Pharmakons, bietet sich die Möglichkeit einer passiven Diffusion und eines aktiven Pharmakatransportes. Dabei können durch aktive Transportvorgänge sogar gegen einen Konzentrationsgradienten wesentlich höhere Konzentrationen aufgebaut werden, als durch passive Diffusion.

Die Geschichte der modernen aerosolischen Pharmaka kann bis zur ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts zurückverfolgt werden [4]. Nachdem sich herausragende Perspektiven abzeichneten, die sich durch die topische Verabreichung von Medikamenten in den Atemtrakten ergaben [5–7], wurden verschiedenste topische und systemische Aerosole propagiert [8].

Es wurde schnell klar, dass die geeignetsten Verbindungen für eine aerosolische Administration niedermolekulare Substanzen waren, weil sie die Fähigkeit besitzen, direkt die Zielzellen im Respirationstrakt zu erreichen bzw. schnell in die Lungenvenen zu diffundieren und so in den systemischen Kreislauf zu gelangen. Folglich waren es die Anästhesisten und Notfallmediziner, die als erste die Verabreichung von Medikamenten über die Luftwege anwendeten, um so einen schnellen Zugang zum systemischen Kreislauf zu haben. Dadurch wurden bedeutsame neue Therapiestrategien entwickelt, angefangen von inhalativen Anästhetika bis hin zu Opioiden.

Obwohl die orale und intravenöse Verabreichung von Medikamenten derzeit in der Behandlung von systemischen Erkrankungen den medizinischen Alltag beherrschen, wächst doch das Interesse an neueren inhalativen Anwendungen, nicht zuletzt wegen der großen Nachfrage nach angenehmeren Therapieformen seitens der Patienten [9]. Auch hinsichtlich der Fortschritte auf den Gebieten der aerosolischen Verabreichungstechniken und der als „Rational Drug Design“ bezeichneten rationalen Substanzentwicklung [10] werden Peptidomimetika und Proteine mit Hilfe der systemischen pulmonalen Therapie, die Möglich-

keit eröffnen, chronische Krankheiten, wie z. B. Diabetes mellitus nicht-invasiv zu behandeln [11].

Im Gegensatz zu der Behandlung von systemischen Erkrankungen mittels aerosolischer Pharmaka wird in der Lungenheilkunde die inhalative Therapie mit kleinen Molekülen bereits dominierend bei Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale eingesetzt.

Eine Vielzahl von Substanzklassen wie Steroide [12–14], β_2 -Sympathomimetika [15], und Anticholinergika [15–17] werden üblicherweise inhalativ eingesetzt. Auch für die Therapie anderer Atemwegserkrankungen werden Inhalativa verwendet. Z.B. haben sich inhalative Prostaglandine bei der Behandlung der pulmonalen Hypertension als effektiv erwiesen. Ebenso können Antibiotika bei rekurrenten Atemwegsinfektionen, z. B. bei der Mukoviszidose eingesetzt werden [10,18,19].

Bezüglich des „Rational Drug Designs“ stellt die Identifikation von spezifischen Transportern in den Atemwegsepithelien eine notwendige Voraussetzung dar.

In dieser Hinsicht eröffnete 1996 die molekulare Identifikation eines hochaffinen Peptidtransporters PEPT2 [20] und die Darstellung seiner funktionalen Expression in den Atemwegen [21,22] einen viel versprechenden neuen Angriffspunkt für zukünftige aerosolisch applizierte Pharmaka.

Expression und Funktion von PEPT2 in den Atemwegen

Nachdem der hochaffine Pharmakatransporter PEPT2 in den Nieren [20] und der niedrig-affine Pharmakatransporter PEPT1 im Dünndarm [23,24] entdeckt wurden, versuchte man Zusammenhänge zwischen bereits dargestellten Aufnahmekapazitäten in den Atemwegen [25,26] und den Transporterproteinen zu entschlüsseln [1].

Mittels Northern Blot und RT-PCR konnte dabei PEPT2 nicht jedoch PEPT1 im respiratorischen Epithel der Ratte nachgewiesen werden [27]. Um die Expression von PEPT2 zellspezifisch nachweisen zu können, wurde das Verfahren der nicht radioaktiven mRNA In-situ-Hybridisierung angewendet. Die Expression von PEPT2 mRNA konnte so im respiratorischen Epithel und in Typ 2 Pneumozyten dargestellt werden [21]. Nachdem Antikörper gegen den Transporter entwickelt wurden [28,29], konnte durch Immunhistochemie in den Atemwegen von Ratte und Maus eine Kolokalisation von PEPT2-Protein und mRNA im respiratorischen, Epithel und in Pneumozyten Typ 2 gefunden werden.

Um diesen Beobachtungen auch auf der funktionellen Ebene nachgehen zu können, wurden ex vivo Aufnahmestudien („uptake studies“) durchgeführt. Dabei wurde das Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Dipeptid D-Ala-Lys-AMCA für die Visualisierung der pulmonalen Peptidaufnahme verwendet. Die Inkubation von Mäuselungen mit dem Reportermolekül zeigte eine Aufnahme und intrazelluläre Anreicherung des markierten Substrates entlang des Atemtraktes in Pneumozyten Typ 2 sowie auch in Bronchial- und Trachealepithelzellen. Dadurch wurden die morphologischen Daten der Immunhistochemie und In-situ-Hybri-

disierung bestätigt [21]. Die gleichzeitige Darstellung von Transporter-mRNA und Protein sowie der Transporterfunktion konnte so beweisen, dass Peptidomimetika durch PEPT2 transportiert werden [21]. Letztlich wurde der Peptidtransporter in der humanen Lunge durch Immunhistochemie nachgewiesen, wobei die PEPT2-Proteinexpression mit der in der Ratten- und Mäuselunge korrelierte [30].

Da wiederholte Atemwegsinfekte bei Mukoviszidose-Patienten die primäre Indikation für aerosolische Antibiotika-Therapie darstellen, wurde ebenfalls untersucht, ob PEPT2 im Lungengewebe von Mukoviszidose-Patienten exprimiert wird, wobei ein qualitativ identisches Expressionsmuster mittels Immunhistochemie festgestellt wurde [22]. Jedoch zeigte sich in funktionellen Studien zur Quantifikation der Aufnahmekapazität des Transportsystems, dass durch die großen Mengen an Mukus im Atemwegslumen das markierte Substrat unter den Bedingungen der Mukoviszidose weniger stark im Atemwegsepithel angereichert wurde [31]. Die Quellen des Mukus liegen dabei in Bereichen von epithelialen Becherzellen und Schleimdrüsen [32–36].

Funktionelle Eigenschaften der Pharmakatransporter

Der Pharmakatransporter PEPT2 gehört zur Familie der Protonen-abhängigen Oligopeptid-Transporter (POT), die zur Zeit ~ 70 klonierte Transporter in einer Vielzahl von Spezies umfasst. PEPT2 war zusammen mit dem intestinalen PEPT1-Transporter der erste identifizierte Säugetier-Transporter, der einen elektrochemischen Gradienten als treibende Kraft (Abb. 2) benutzt [37].

Die Mechanismen der Substraterkennung, Aufnahme und der Transfer durch PEPT2 sind stark abhängig vom Membranpotential und dem extrazellulären pH-Wert. Der PEPT2-abhängige Transport von Pharmaka und Peptiden ist elektrogen und hat, abhängig von der Ladung des jeweiligen Substrates, ein pH-Optimum bei 4,5–6,5 [38].

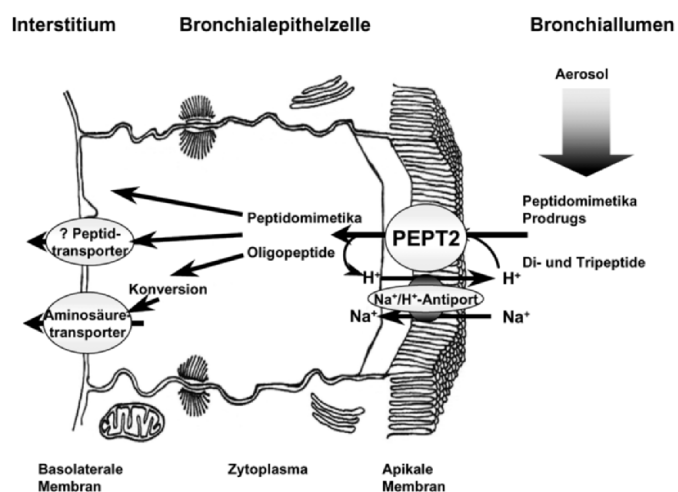


Abb. 2 Transportmechanismen in den Atemwegen. Topisch applizierte Pharmaka können, wie Oligopeptide mittels des Transporters PEPT2 vom Atemwegsepithel aufgenommen werden. Dabei folgt die Substrattranslokation einem transmembranären elektrochemischen Protonengradienten vom Lumen ins Innere der Epithelzelle. Der Protonengradient wird über einen Na^+/H^+ -Austausch aufrechterhalten.

Da die Umgebung des respiratorischen Epithels unter normalen Bedingungen einen relativ stabilen, leicht sauren pH von ~6.5 besitzt, findet ein physiologisch optimaler Transport von Peptidomimetika statt, die bei einem pH von 6.5 ungeladen vorliegen.

Die Transportrate kann erhöht werden, wenn das Membranpotential hyperpolarisiert ist und ein niedrigerer pH mit einem extrazellulären Überschuss an Protonen vorliegt, wie es beispielsweise bei Asthma bronchiale der Fall ist.

Somit kann die Kapazität des über PEPT2 vermittelten Transportes von einzelnen Medikamenten in pathologischen Situationen mit einem saurem Oberflächen-pH sogar erhöht sein.

Durch die Kopplung des Substrattransports an einen elektrochemischen Gradienten, kann das PEPT2-System ebenfalls als ein zellulärer Säure-Lieferant im Lungenepithel angesehen werden. Aufgrund der Abhängigkeit von einem Na^+ - H^+ -Antiport wird auf der anderen Seite die Na^+ -Aufnahme in die Zelle erhöht, um die intrazelluläre pH-Homöostase zu gewährleisten. Im Verdauungstrakt konnte nachgewiesen werden, dass der Na^+ - H^+ -Austauscher NHE3 als sekundär aktiver Transport in die Prozesse eingebunden ist [39]. Dieser Austauscher ist in den Atemwegen nicht vorhanden [40]. Daher könnten es andere Transporter wie z. B. NHE1 [41] sein, die die Aufgabe des Na^+ -Austausches in den Atemwegsepithelzellen übernehmen.

Nach Aufnahme von Di- und Tripeptiden in die Epithelzellen der Atemwege werden diese schnell durch zelluläre zytosolische Peptidasen hydrolysiert. Die so entstehenden Aminosäuren können dann von den Zellen für die Synthese spezifischer Mediatoren oder auch für den zellulären Stoffwechsel genutzt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Abtransport durch basolaterale Aminosäuretransporter.

Hydrolyse-resistente Substrate von PEPT2, wie z. B. Peptidomimetika, akkumulieren in den Atemwegszellen, wie es in den Aufnahmestudien gezeigt werden konnte, und werden dann über bislang noch nicht auf der molekularen Ebene identifizierte Transporter in den Extrazellulärraum entlassen. Renale und intestinale Epithelzellen besitzen in dieser Hinsicht basolaterale Transportsysteme, die ähnliche Merkmale haben wie PEPT2 und die den basolateralen Transport von Oligopeptiden und Peptidomimetika vermitteln [42–44]. Ob es ähnliche Transportproteine in der basolateralen Membran des Atemwegsepithels gibt, ist noch unbekannt.

Während PEPT2 ein hochaffiner Transporter (Km-Werte 5–500 μM) mit geringerer Transportkapazität ist, besitzt PEPT1 eine hohe Transportkapazität mit niedriger Affinität (Km-Werte 200 μM –10 mM) [44]. Neben diesen funktionellen Unterschieden werden die beiden Transporter auch in unterschiedlichen Organen exprimiert. PEPT2 wird in den Atemwegen [21, 22], den Nieren [45, 46], im peripheren und zentralen Nervensystem [47–49] und in der laktierenden Brustdrüse [50] exprimiert. Die Expression von PEPT1 konnte demgegenüber im Intestinaltrakt [51], den Nieren [52] und im Gallengangsepithel [53] nachgewiesen werden.

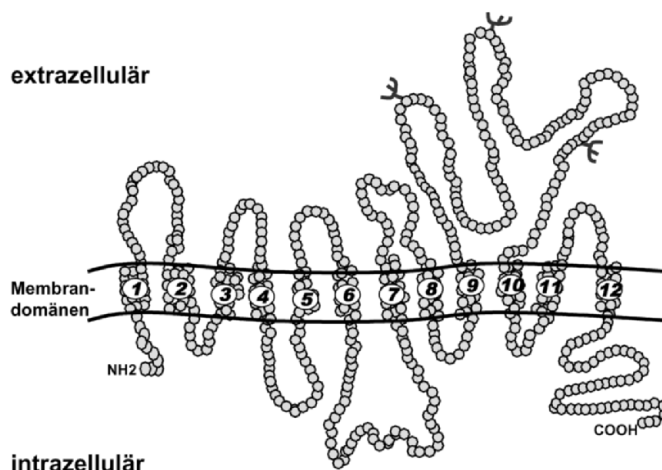


Abb. 3 Topologie des Transporterproteins. Das Transporterprotein PEPT2 bildet 12 Transmembrandomänen (TMD) mit jeweils intrazellulär lokalisierten C- und N-terminalen Enden.

Transporterstruktur

Der humane PEPT2-(hPEPT2)-Transporter wurde durch homologes Screening [54] identifiziert und das kodierende Gen auf dem Chromosom 3q13.3-q21 (55) lokalisiert. Er gehört zur POT-Familie genannten Peptid-Transporter-Familie. Diese Transporterproteine variieren in ihrer Größe von 450 bis über 700 Aminosäuren. Dabei sind sie in Prokaryonten wesentlich kleiner als in Eukaryonten. Die cDNA besteht aus einem 2.190-bp-langen offenen Leseramen mit einem Protein aus ~729 Aminosäuren (Abb. 3). Die Molekulargröße von hPEPT2 ist noch nicht identifiziert, jedoch beträgt die Größe des homologen PEPT2 aus dem Kaninchen für das glykosylierte reife Protein ~107 kD und für das nicht-glykosylierte Protein ~83 kD. Die Analyse der Aminosäuresequenz lässt auf 12 transmembranäre Domänen schließen mit ähnlicher Struktur wie bei PEPT1. Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende liegen im Zytosol (Abb. 3). Die Primärstruktur von PEPT2 weist eine 50%ige Identität zum humanen intestinalen H^+ -Peptid-Kotransporter PEPT1 auf [54]. Die größten Unterschiede zwischen den beiden Transporterproteinen wurden in der großen extrazellulären Schleife gefunden, die die transmembranären Domänen (TMDs) 9 und 10 miteinander verbindet. Bisher wurde PEPT2 aus humanem [54], Kaninchen- [20], Ratten- [56] und Mäusegewebe [57] kloniert. Parallel zur humanen Form wurde das Maus PEPT2-Gen auf der korrespondierenden Region des zentralen Mausechromosoms 16 nahe D16Mit4 und D16Mit59 lokalisiert [57]. PEPT2 Gen-depletierte Mäuse wurden vor kurzem erstmals beschrieben [58, 59], aber bislang noch nicht auf die Atemwegsphysiologie und -pathophysiologie untersucht.

Um herauszufinden, welche genaue Rolle die Proteindomänen für die funktionellen Eigenschaften von PEPT1 und PEPT2 spielen, wurden Mutagenese-Studien durchgeführt und chimäre Peptidtransporter, bestehend aus bestimmten PEPT1 und PEPT2 Regionen analysiert. Diese Studien zeigten, dass erhaltene Histidin-Reste in der zweiten und vierten TMD von PEPT2 und PEPT1 für die Transportaktivität notwendig sind [60–62]. Weitere Studien mit chimären Peptidtransportern zeigten außerdem, dass es insgesamt die ersten 6 TMDs und Schleifen des PEPT2-Proteins

sind, die den Phänotyp determinieren [63,64] und dass die TMD 7 bis 9 für die Affinität zu Zwitterionen eine Rolle spielen. Die ersten 6 TMDs stellen insgesamt die Basis für die Substratbindungsstelle dar (Abb. 3) [65].

Andere PEPT1-PEPT2-Chimären wurden mit dem Ziel hergestellt, kleinere Segmente innerhalb des N-terminalen Endes, die zu den kinetischen Eigenschaften des Transporters beitragen, zu analysieren [66]. Im Einzelnen wurden die ersten 59 bzw. 91 Aminosäure-Reste von PEPT1 benutzt, um korrespondierende Stellen von PEPT2 zu ersetzen. *Xenopus laevis* Oozyten wurden dabei als Expressionssystem verwendet, und zeigten, dass die Substrataffinität von beiden Chimären für das Zwitterionensubstrat D-Phe-Ala zwischen denen für PEPT1 bzw. PEPT2 liegt. Wenn jedoch geladene Substrate angewendet wurden, besaßen beide Chimären die Affinität von PEPT1. Chimären mit dem N-terminalen Ende des 59-Aminosäurerests von PEPT1 wiesen in Bezug auf die pH- und Spannungsabhängigkeit einen PEPT2-ähnlichen Phänotyp auf. In Chimären mit dem 91-Aminosäuren-Ende von PEPT1 konnte eine starke Veränderung der pH-Abhängigkeit beobachtet werden, mit den höchsten Transportraten bei pH-Werten von pH 4.0. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass die zwei identifizierten Regionen des Amino-Endes die entscheidende Rolle bezüglich der Substrataffinität spielen [66].

Transportmechanismen

PEPT2 wurde ursprünglich als Transportsystem für Oligopeptide (Di- und Tripeptide) identifiziert. In Anbetracht der Tatsache, dass es 20 proteinogene L-alpha-Aminosäuren gibt, ergeben sich 400 verschiedene Di- und bis zu 8000 verschiedene Tripeptide, die ein Molekulargewicht zwischen 96,2D (Di-Glycine) bis zu 522,6 D (Tri-Tryptophan) besitzen und die durch PEPT2 transportiert werden können. Da außerdem Oligopeptide mit einer D-enantiomeren Aminosäure im N-terminalen Ende eine hohe Affinität und Transportrate aufweisen können, ist die Anzahl möglicher PEPT2-Substrate sogar noch erheblich größer. Neben Peptiden transportiert PEPT2 ebenso eine große Anzahl von pharmakologisch aktiven Substanzen (Abb. 4) und ist dadurch in das Blickfeld therapeutischer Überlegungen gerückt worden. Zusammen mit den endogenen Oligopeptiden bilden Arzneimittel, die durch PEPT2 transportiert werden, eine große Bandbreite molekularer Strukturen mit einer Vielzahl an verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften.

Definition der minimalen strukturellen Anforderungen für PEPT2-Substrate

Um ein Rational Drug Design für PEPT2-transportierte Pharmaka zu ermöglichen, ist es notwendig, die molekularen Merkmale, die die Substrataffinität und den Transport bestimmen, zu kennen. Deswegen wurden eine Reihe von Aminosäure-Derivaten und modifizierten Dipeptiden synthetisiert [67] und kinetische Konstanten für die Interaktion zwischen Test-Verbindungen und PEPT2 in kompetitiven Versuchen ermittelt, in denen man heterologe PEPT2-Expressionssysteme benutzte. Die elektrogeneren Transporteigenschaften des Substrates wurden mit der „Voltage-clamp“-Technik in PEPT2-exprimierenden *Xenopus laevis*

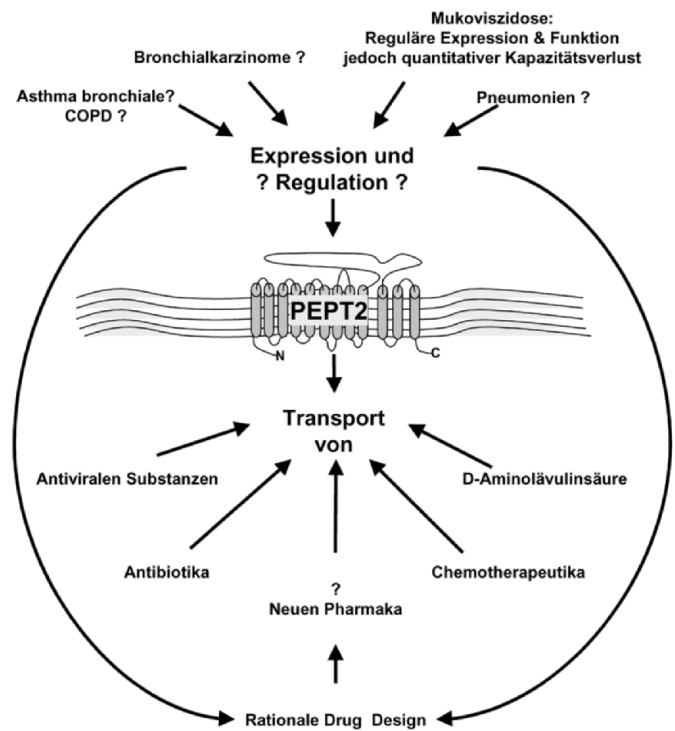


Abb. 4 Expression und Funktion von PEPT2 im Atemtrakt. Durch Kinetikstudien konnte der PEPT2-abhängige Transport einer Vielzahl von Pharmakaklassen nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem Antibiotika, antivirale Substanzen, antineoplastische Substanzen und Delta-Aminolävulinsäure, die zur photodynamischen Therapie und Diagnose von Atemwegsneoplasien verwendet werden kann. Bis jetzt konnte die Expression und Funktion unter normalen Bedingungen und bei Mukoviszidose entschlüsselt werden.

Oozyten untersucht. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Omega-Amino-Fettsäuren, die keine Affinität zu PEPT2 aufweisen, nur das Hinzufügen einer einzigen Carbonylgruppe im Grundgerüst des Substrats sowohl die Affinität als auch den Transportfluss um mehr als das 30fache erhöht. Durch Elongation von Omega-Amino-Fettsäuren an ihrem N-terminalen Ende mit einem Alaninrest konnte gezeigt werden, dass dadurch die Affinität und Funktion abnahmen. Im Gegensatz dazu verursachte die Elongation am Carboxylende einen weniger deutlichen Effekt [67]. Aufgrund dieser Kenntnisse und der Vielzahl von Substraten, die erkannt und transportiert werden, können neue Atemwegtherapeutika und Prodrugs entwickelt werden und in heterologen Expressionssystemen auf ihre Transportfähigkeit via PEPT2 getestet werden [68]. Im Folgenden werden einige der pharmakologisch relevanten Substratgruppen und ihr potenzieller Nutzen in der Therapie von Atemwegserkrankungen diskutiert (Abb. 4).

Antibiotika: Bakterielle Pneumonien

Neben ihrer Bedeutung im Bereich von stationär und ambulant erworbenen Pneumonien spielen bakterielle Infektionen ebenfalls im Verlauf von chronischen Lungenerkrankungen wie der Mukoviszidose eine entscheidende Rolle und können durch eine progressive Zerstörung des Lungengewebes zu einem progredienten Lungenversagen führen [69]. Bei Patienten mit Mukovis-

zidose treten stets Infektionen der unteren Atemwege auf, und trotz der bestehenden Therapiemöglichkeiten bleibt die Pneumonie eine der Hauptursachen für die Morbidität und Mortalität bei Mukoviszidose [70]. Da die lokale Konzentration des antimikrobiellen Agens in der Lunge als entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Erreger-Eradikation angesehen wird, stellt das Alveolar- und Bronchialepithel theoretisch ein hervorragendes Anwendungsgebiet für die topische Gabe von Antibiotika dar [71]. Folgende Vorteile sind dabei durch die direkte Administration mittels hochaffiner Transportersysteme, wie PEPT2 zu erwarten: 1) Deposition am Ort der Infektion ermöglicht eine hohe lokale Konzentration des Wirkstoffes [72]. 2) Möglichkeit der Dosisreduktion bei inhalativer Anwendung, wodurch systemische unerwünschte Wirkungen reduziert werden können.

Innerhalb der verschiedenen Lungenkompartimente gelten das Alveolarepithel und die Makrophagen als wesentlich in Bezug auf die Erregerabwehr [73–76]. In diesen Kompartimenten ist deshalb eine hohe Konzentration des antimikrobiellen Wirkstoffes für die Erreger-Eradikation von entscheidender Bedeutung und in einer Vielzahl von Studien wurde das Verhältnis der Wirkstoffkonzentration in diesen Kompartimenten im Verhältnis zur klinischen Effektivität von Antibiotika ermittelt [77–81]. In Hinsicht auf die zentrale Rolle der Antibiotikatherapie und in Anbetracht der zahlreichen klinischen Studien, die sich mit der Entwicklung der lokalen Antibiotikaadministration befassen [82–84], führte die Identifikation des Transporters PEPT2 als ein wesentlicher Transportweg für Antibiotika in das Atemwegsepithel zu neuen Optionen im Bereich des „Ration Drugs Designs“. In der großen Gruppe der Antibiotika sind es vor allem die Betalaktame mit Penicillinen und Cephalosporinen, die aufgrund ihrer hohen Wirksamkeits- und Sicherheitsprofile am häufigsten angewendet werden. Eine große Anzahl an Betalaktamen wird durch das Transportsystem PEPT2 transportiert, da ihre Basisstruktur denen der Tripeptide ähnelt und die C-terminale Peptidbindung in den Betalaktamring integriert ist. Wenn die C-N Bindung des Betalaktamringes um 180° rotiert wird, verhält sich die D-enantiomere Stereochemie der Betalaktame wie die L-enantiomere Stereochemie eines endogenen Tripeptids. So erklären sich die hohe Affinität und der Transport dieser Antibiotika durch PEPT2. Ein beispielhaftes Substrat von PEPT2 ist das Aminocephalosporin Cefadroxil. Mit einer Michaelis-Menten-Kinetik (K_m) von $50 \mu\text{M}$ [85] wurde es unter anderem benutzt, um die Funktion von PEPT2 im Atemtrakt nachzuweisen [22]. In der Erkennung und dem Transport von Antibiotika bestehen zwischen den beiden Transportsystemen PEPT2 und PEPT1 Unterschiede. PEPT2 hat diesbezüglich eine höhere Affinität für zwitterionischen Betalaktame, während anionische Betalaktame wie Cefitibuten und Cefixime eine höhere Affinität für PEPT1 zeigen [86,87]. Wenn man den pH-Abfall der Atemwegsoberfläche bei Asthma bronchiale oder COPD berücksichtigt, so führt diese Ansäuerung im extrazellulären pH zu einem verbesserten Transport von anionischen oder dianionischen Substraten wie Cefixime. Insofern kann angenommen werden, dass unter pathologischen Bedingungen wie der COPD, aufgrund des stärker ausgeprägten sauren Milieus die Transporterfunktionen sogar optimiert sind. Neben dieser Funktionssteigerung bei erniedrigten pH-Werten behindern jedoch wahrscheinlich größere Mengen an Schleimproteinen wie MUC5AC oder MUC5B [33,35] die Transportsysteme. Der kürzlich entwickelte PEPT2 Gen-depletierte Maus-

stamm wird eine genauere Charakterisierung der Rolle von PEPT2 als Antibiotika-Transporter in den Atemwegen ermöglichen und zeigen, ob die aerosolische Administration von Antibiotika eine verminderte klinische Effizienz in einem Pneumoniemodell bei PEPT2 Gen-depletierten Mäusen hervorruft.

Antineoplastische Pharmaka: Lungenneoplasien

Im Hinblick auf den potenziellen Anwendungsbereich von Peptidomimetika im Rahmen der Therapie von Neoplasien konnte gezeigt werden, dass die Expression von Peptidtransportern in epithelialen und nicht epithelialen Tumorzellen außerhalb der Lunge hochreguliert sein kann [53,88,89]. Das Peptidomimetikum Bestatin (Ubimex) ist ein Zytostatikum, welches durch PEPT1 und PEPT2 transportiert wird. Es inhibiert kompetitiv die Leucin-Amino-peptidase und die Amino-peptidase B und wirkt so als ein indirektes antineoplastisches Substrat [90,91]. Zur Erfassung der Bedeutung von Peptidtransportern für die antineoplastische Therapie wurden Peptidtransporter-exprimierende HeLa-Zellen in Balb/c nu/nu Mäuse implantiert. Bei der Charakterisierung der Bedeutung von Peptidtransportsystemen für den tumorselektiven Pharmakatransport stellte sich heraus, dass die Administration von Bestatin über einen Monat die Lebensfähigkeit der implantierten Tumorzellen signifikant verringern konnte [90]. Zum Nachweis der therapeutischen Relevanz von Peptidtransporter-vermitteltem Zytostatika-Transport in Tumoren, müssen weitere Studien über die Expression von Transportern in pulmonalen Neoplasien, gefolgt von funktionellen Aufnahme-studien, durchgeführt werden. Diesbezüglich konnte bereits für epitheliale Gallenblasentumorzelllinien eine Peptidtransporter-Expression beschrieben werden [53], ebenso für Pankreaskarzinomzelllinien [88] und Fibrosarkomzelllinien [89].

Delta-Aminolävulinäure und die photodynamische Therapie

Die Identifikation der Delta-Aminolävulinäure (d-ALA) als ein PEPT2-transportiertes Substrat führt ebenso zu einer neuen Perspektive in der photodynamischen Therapie (PDT). Die PDT ist eine relativ neue Technik in der diagnostischen und therapeutischen Onkologie, die die Akkumulation von verschiedenen Photosensibilisatoren (lichtsensibilisierende Wirksubstanzen) durch Tumorzellen nutzt [92]. Durch Lichtexposition einer bestimmten Wellenlänge aktiviert, generiert das sensibilisierende Agens reaktive Sauerstoff-Radikale, die Apoptose und Nekrose in neoplastischen Zellen verursachen [93]. Die Erzeugung von indirekten Photosensibilisatoren, die nach Applikation von Vorläufer-Molekülen endogen generiert werden, ist eine attraktive Alternative zur Injektion direkter Photosensibilisatoren im Rahmen der PDT und stellt ein sich schnell entwickelndes Forschungsfeld dar. Eine der vielversprechendsten Methoden ist in diesem Zusammenhang die intrazelluläre Akkumulation von Porphyrinen, wobei der Precursor d-ALA oral, parenteral oder topisch für die Synthese von Protoporphyrin IX verabreicht wird [94]. Die Akkumulation von Porphyrinen kann auch erreicht werden, indem Enzyme der Häm-Biosynthese inhibiert werden [94]. Da die Expression und Aktivität von Peptidtransporter-Genen in verschiedenen epithelialen Tumorzellen nachgewiesen wurde [53,88,89], könnte PEPT2 in epithelialen Tumoren ein entschei-

dender Transporter für Photosensitizer sein. Allerdings gibt es nur wenige Daten über den genauen zellulären Aufnahmemechanismus von Photosensitizern in Säugetiergeweben [95]. Da pulmonale Tumoren für ihren Metabolismus und ihr Wachstum große Mengen an Stickstoff und somit Aminosäuren benötigen, könnten Peptidtransportersysteme wie PEPT2 in epithelialen Tumorzellen ebenfalls hochreguliert sein, um den erhöhten nutritiven Bedarf zu decken. In diesem Zusammenhang würden sie auch einen optimalen molekularen therapeutischen Angriffspunkt darstellen, um d-ALA oder andere Photosensitizer zu transportieren. Die d-ALA-Aufnahme und die Porphyrin-Akkumulation werden ebenfalls diagnostisch verwendet, um frühe Tumorstadien in den Atemwegen zu erkennen [96–98]. Die Identifikation von PEPT2 im Atemtrakt gibt in dieser Hinsicht ebenfalls einen ersten Einblick in die molekularen Mechanismen, die der Tumordiagnostik zu Grunde liegen.

Prodrugs: Virale Pneumonien

Neben Adenovirus-Infektionen sind bei immunsupprimierten Patienten viele andere virale Infekte weit verbreitet [99]. So treten als häufige Erreger die drei Herpesviren Herpes simplex, Varizella-Zoster und das Zytomegalie-Virus auf. Dabei sind sowohl die Diagnosestellung, z. B. einer Herpesvirus-Infektion als auch ihre Therapie extrem komplex. Viren, wie Herpesviren oder auch das Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV), vermehren sich in respiratorischen Epithelzellen [100–104]. Ähnlich wie bei bakteriellen Pneumonien ist eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration in diesem Kompartiment entscheidend für den Erfolg der Therapie. In dieser Hinsicht bietet die Expression von PEPT2 in den Atemwegen das Potenzial, antivirale Verbindungen topisch zuzuführen. So konnte gezeigt werden, dass Valacyclovir, ein Valylester von Acyclovir, ein von PEPT2 transportiertes Substrat ist [105]. Ebenso wird das bei Zytomegalie-Infektionen eingesetzte Valganciclovir, das Valylester von Ganciclovir, via PEPT2 transportiert [106]. Daneben ist das Valylester von Zidovudine ein Substrat des Peptidtransporters und wird als Therapeutikum bei HIV-Erkrankungen angewendet [107]. Insgesamt erscheint die Herstellung eines „Prodrugs“ durch die Veresterung von Pharmaka mit einem Aminosäure-Rest, so wie bei den oben beschriebenen antiviralen Nukleotiden, ein viel versprechendes Modell bei der Entwicklung von PEPT2-transportierten Pharmaka zu sein.

Fazit

Die pulmonale Administration von Pharmaka spielt eine wichtige Rolle bei der Behandlung von verschiedenen respiratorischen und systemischen Erkrankungen und stellt ein attraktives Forschungsfeld für die Entwicklung neuer Pharmaka dar. Vor kurzem konnte PEPT2 als der für den pulmonalen Transport von Oligopeptiden und Peptidomimetika zuständige Transporter in den Atemwegen von Mensch, Ratte und Maus identifiziert werden. Aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften könnte PEPT2 im Bereich des Rational Drug Designs neuer aerosolischer Pharmaka eine entscheidende Rolle spielen. Vor dem Einsatz im Bereich der Entwicklung neuer Substanzen müssen jedoch noch weitere Studien durchgeführt werden, die mit Hilfe von Techniken, wie z. B.

Gene Arrays [108], nicht radioaktiver In-Situ-Hybridisierung [109,110], Laser-assistierter Mikrodisektion [111] oder morphologischer Ansätze [112–116] die Expression und Funktion der Transportsysteme bei Atemwegserkrankungen, wie Asthma bronchiale, COPD oder pulmonalen Neoplasien untersuchen.

Danksagung

Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (GR 2014/2–1) und die Deutsche Atemwegsliga.

Literatur

- 1 Groneberg DA. Expression, Lokalisation und funktionelle Aspekte des Peptidtransporters PEPT2 im gesunden Atemtrakt und bei Mukoviszidose. *Pneumologie* 2003; 57: 104–105
- 2 Groneberg DA. Chronischer Husten: Assoziationen zwischen Klinik und nervalen Einflüssen. *Pneumologie* 2003; 57: 473–474
- 3 Groneberg DA, Witt C, Wagner U et al. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respir Med* 2003; 97: 382–387
- 4 Cushing IE, Miller WF. Nebulization therapy. *Clin Anesth* 1965; 1: 169–218
- 5 Bates DV, Kaneko K, Henderson JA et al. Recent experimental and clinical experience in studies of regional lung function. *Scand J Respir Dis Suppl* 1966; 62: 15–29
- 6 Bertalanffy FD. Respiratory tissue: structure, histophysiology, cytodynamics. I. Review and basic cytomorphology. *Int Rev Cytol* 1964; 16: 233–328
- 7 Wagner Jr HN, Tow DE, Lopez-Majano V et al. Factors influencing regional pulmonary blood in man. *Scand J Respir Dis Suppl* 1966; 62: 59–72
- 8 Miller WF. Aerosol therapy in acute and chronic respiratory disease. *Arch Intern Med* 1973; 131: 148–155
- 9 Corkery K. Inhalable drugs for systemic therapy. *Respir Care* 2000; 45: 831–835
- 10 Newhouse MT, Corkery KJ. Aerosols for systemic delivery of macromolecules. *Respir Care Clin N Am* 2001; 7: 261–275
- 11 Harsch IA, Hahn EG, Konturek PC. Syringe, pen, inhaler – the evolution of insulin therapy. *Med Sci Monit* 2001; 7: 833–836
- 12 Cole CH. Inhaled glucocorticoid therapy in infants at risk for neonatal chronic lung disease. *J Asthma* 2000; 37: 533–543
- 13 O’Riordan TG. Optimizing delivery of inhaled corticosteroids: matching drugs with devices. *J Aerosol Med* 2002; 15: 245–250
- 14 Kelly HW. Comparative potency and clinical efficacy of inhaled corticosteroids. *Respir Care Clin N Am* 1999; 5: 537–553
- 15 Fink J, Dhand R. Bronchodilator resuscitation in the emergency department. Part 2 of 2: dosing strategies. *Respir Care* 2000; 45: 497–512
- 16 Rau Jr JL. Recent developments in respiratory care pharmacology. *J Perianesth Nurs* 1998; 13: 359–369
- 17 Rodrigo CJ, Rodrigo C. Aerosol and inhaled therapy in treatment of acute adult airway obstruction in the emergency department. *Respir Care Clin N Am* 2001; 7: 215–231
- 18 O’Riordan T, Faris M. Inhaled antimicrobial therapy. *Respir Care Clin N Am* 1999; 5: 617–631
- 19 Smaildone GC, Palmer LB. Aerosolized antibiotics: current and future. *Respir Care* 2000; 45: 667–675
- 20 Boll M, Herget M, Wagener M et al. Daniel. Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 284–289
- 21 Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J et al. Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake. *Am J Pathol* 2001; 158: 707–714
- 22 Groneberg DA, Eynott PR, Doring F et al. Distribution and function of the peptide transporter PEPT2 in normal and cystic fibrosis human lung. *Thorax* 2002; 57: 55–60
- 23 Boll M, Markovich D, Weber MW et al. Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of

- peptides, β -lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflugers Arch* 1994; 429: 146–149
- 24 Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 1994; 368: 563–566
- 25 Yamashita F, Kim KJ, Lee VH. Gly-L-Phe transport and metabolism across primary cultured rabbit tracheal epithelial cell monolayers. *Pharm Res* 1997; 14: 238–240
- 26 Yamashita V, Kim KJ, Lee VH. Dipeptide uptake and transport characteristics in rabbit tracheal epithelial cell layers cultured at an air interface. *Pharm Res* 1998; 15: 979–983
- 27 Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J et al. Pulmonary uptake of oligopeptides: Expression and functional aspects of PEPT2 in airway tissue. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: A38
- 28 Doring F, Michel T, Rosel A et al. Expression of the mammalian renal peptide transporter PEPT2 in the yeast *Pichia pastoris* and applications of the yeast system for functional analysis. *Mol Membr Biol* 1998; 15: 79–88
- 29 Ogihara H, Saito H, Shin BC et al. Immuno-localization of H+/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 848–852
- 30 Groneberg DA, Doring F, Daniel H et al. Distribution of the oligopeptide transporter PEPT2 in normal human lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: A150
- 31 Groneberg DA, Dinh QT, Eynott F et al. Peptide transport mechanisms in cystic fibrosis and normal human lung. *Allergy* 2001; 56: A19
- 32 Groneberg DA, Eynott PR, Oates T et al. Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med* 2002; 96: 81–86
- 33 Groneberg DA, Eynott PR, Lim S et al. Expression of respiratory mucins in fatal status asthmaticus and mild asthma. *Histopathology* 2002; 40: 367–373
- 34 Chung KF, Caramori G, Groneberg DA. Airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1459–1461
- 35 Groneberg DA, Wagner U, Chung KF. Mucus and fatal asthma. *Am J Med* 2003; 116: 66–67
- 36 Groneberg DA, Peiser D, Dinh QT et al. Distribution of respiratory mucin proteins in human nasal mucosa. *Laryngoscope* 2003; 113: 520–524
- 37 Paulsen IT, Skurray RA. The POT family of transport proteins. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 404
- 38 Daniel H, Rubio-Aliaga I. An update on renal peptide transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F885–892
- 39 Thwaites DT, Kennedy DJ, Raldua D et al. H/dipeptide absorption across the human intestinal epithelium is controlled indirectly via a functional Na/H exchanger. *Gastroenterology* 2002; 122: 1322–1333
- 40 Dudeja PK, Hafez N, Tyagi S et al. Expression of the Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger isoforms in proximal and distal human airways. *Am J Physiol* 1999; 276: L971–978
- 41 Al-Bazzaz FJ, Hafez N, Tyagi S et al. Detection of Cl⁻/HCO₃⁻ and Na⁺-H⁺ exchangers in human airways epithelium. *Jop* 2001; 2: 285–290
- 42 Irie M, Terada T, Sawada K et al. Recognition and transport characteristics of nonpeptidic compounds by basolateral peptide transporter in Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 711–717
- 43 Terada T, Sawada K, Saito H et al. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am J Physiol* 1999; 276: G1435–1441
- 44 Terada T, Sawada K, Ito T et al. Functional expression of novel peptide transporter in renal basolateral membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F851–857
- 45 Groneberg DA, Doring F, Nickolaus M et al. Renal assimilation of short chain peptides: visualization of tubular peptide uptake. *Pharm Res* 2002; 19: 1209–1214
- 46 Shen H, Smith DE, Yang T et al. Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *Am J Physiol* 1999; 276: F658–665
- 47 Groneberg DA, Rubio-Aliaga I, Nickolaus M et al. Direct visualization of peptide uptake activity in the central nervous system of the rat. *Neurosci Lett* 2004; 364: 32–36
- 48 Berger UV, Hediger MA. Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 1999; 199: 439–449
- 49 Groneberg DA, Doring F, Nickolaus M et al. Expression of PEPT2 peptide transporter mRNA and protein in glial cells of rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 2001; 304: 181–184
- 50 Groneberg DA, Doring F, Theis S et al. Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E1172–1179
- 51 Groneberg DA, Doring F, Eynott PR et al. Intestinal peptide transport: ex vivo uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G697–704
- 52 Smith DE, Pavlova A, Berger UV et al. Tubular localization and tissue distribution of peptide transporters in rat kidney. *Pharm Res* 1998; 15: 1244–1249
- 53 Knutter I, Rubio-Aliaga I, Boll M et al. H+/peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G222–229
- 54 Liu W, Liang R, Ramamoorthy S et al. Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H+/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1235: 461–466
- 55 Ramamoorthy S, Liu W, Ma YY et al. Proton/peptide cotransporter (PEPT 2) from human kidney: functional characterization and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1240: 1–4
- 56 Saito H, Terada T, Okuda M et al. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1280: 173–177
- 57 Rubio-Aliaga I, Boll M, Daniel H. Cloning and characterization of the gene encoding the mouse peptide transporter PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 734–741
- 58 Shen H, Smith DE, Keep RF et al. Targeted disruption of the PEPT2 gene markedly reduces dipeptide uptake in choroid plexus. *J Biol Chem* 2003; 278: 4786–4791
- 59 Rubio-Aliaga I, Frey I, Boll M et al. Targeted disruption of the peptide transporter *Pept2* gene in mice defines its physiological role in the kidney. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 3247–3252
- 60 Brandsch M, Brandsch C, Ganapathy ME et al. Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H+/peptide cotransport systems in intestine (PEPT 1) and kidney (PEPT 2). *Biochim Biophys Acta* 1997; 1324: 251–262
- 61 Fei YJ, Liu W, Prasad PD et al. Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H+/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry* 1997; 36: 452–460
- 62 Terada T, Saito H, Mukai M et al. Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H+/peptide cotransporter, PEPT1. *FEBS Lett* 1996; 394: 196–200
- 63 Doring F, Dorn D, Bachfischer U et al. Functional analysis of a chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J Physiol* 1996; 497 (Pt 3): 773–779
- 64 Fei YJ, Liu JC, Fujita T et al. Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporters PEPT1 and PEPT2 using PEPT1-PEPT2 and PEPT2-PEPT1 chimeras. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 39–44
- 65 Terada T, Saito H, Sawada K et al. Inui. N-terminal halves of rat H+/peptide transporters are responsible for their substrate recognition. *Pharm Res* 2000; 17: 15–20
- 66 Doring F, Martini C, Walter J et al. Importance of a small N-terminal region in mammalian peptide transporters for substrate affinity and function. *J Membr Biol* 2002; 186: 55–62
- 67 Theis S, Hartrodt B, Kottra G et al. Defining minimal structural features in substrates of the H(+)/peptide cotransporter PEPT2 using novel amino acid and dipeptide derivatives. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 214–221
- 68 Daniel H. Nutrient transporter function studied in heterologous expression systems. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 184–192
- 69 Koch C, Hoiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 1993; 341: 1065–1069
- 70 Rosenstein BJ, Zeitlin PL. Prognosis in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 1995; 1: 444–449
- 71 Ramsey BW. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1996; 335: 179–188
- 72 Honeybourne D. Antibiotic penetration into lung tissues. *Thorax* 1994; 49: 104–106
- 73 Baldwin DR, Honeybourne D, Wise R. Pulmonary disposition of antimicrobial agents: in vivo observations and clinical relevance. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1176–1180
- 74 Baldwin DR, Honeybourne D, Wise R. Pulmonary disposition of antimicrobial agents: methodological considerations. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1171–1175

- ⁷⁵ Wise R, Andrews J, Imbimbo BP et al. The penetration of rifloxacin into sites of potential infection in the respiratory tract. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 861–866
- ⁷⁶ Honeybourne D, Baldwin DR. The site concentrations of antimicrobial agents in the lung. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 249–260
- ⁷⁷ Honeybourne D, Andrews JM, Cunningham B et al. The concentrations of clinafloxacin in alveolar macrophages, epithelial lining fluid, bronchial mucosa and serum after administration of single 200 mg oral doses to patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 153–155
- ⁷⁸ Soman A, Honeybourne D, Andrews J et al. Concentrations of moxifloxacin in serum and pulmonary compartments following a single 400 mg oral dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 835–838
- ⁷⁹ Andrews JM, Honeybourne D, Brenwald NP et al. Concentrations of trovafloxacin in bronchial mucosa, epithelial lining fluid, alveolar macrophages and serum after administration of single or multiple oral doses to patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 797–802
- ⁸⁰ Cook PJ, Andrews JM, Wise R et al. Distribution of cefdinir, a third generation cephalosporin antibiotic, in serum and pulmonary compartments. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 331–339
- ⁸¹ Cook PJ, Andrews JM, Woodcock J et al. Concentration of amoxicillin and clavulanate in lung compartments in adults without pulmonary infection. *Thorax* 1994; 49: 1134–1138
- ⁸² Hodson ME, Penketh AR, Batten JC. Aerosol carbenicillin and gentamicin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 1981; 2: 1137–1139
- ⁸³ Bressolle F, de la Coussaye JE, Ayoub R et al. Endotracheal and aerosol administrations of ceftazidime in patients with nosocomial pneumonia: pharmacokinetics and absolute bioavailability. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1404–1411
- ⁸⁴ Nolan G, Moivor P, Levison H et al. Antibiotic prophylaxis in cystic fibrosis: inhaled cephaloridine as an adjunct to oral cloxacillin. *J Pediatr* 1982; 101: 626–630
- ⁸⁵ Rubio-Aliaga I, Daniel H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 434–440
- ⁸⁶ Ganapathy ME, Prasad PD, Mackenzie B et al. Interaction of anionic cephalosporins with the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1324: 296–308
- ⁸⁷ Terada T, Saito H, Mukai M et al. Recognition of beta-lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 1997; 273: F706–711
- ⁸⁸ Gonzalez DE, Covitz KM, Sadee W et al. An oligopeptide transporter is expressed at high levels in the pancreatic carcinoma cell lines AsPc-1 and Capan-2. *Cancer Res* 1998; 58: 519–525
- ⁸⁹ Nakanishi T, Tamai I, Sai Y et al. Carrier-mediated transport of oligopeptides in the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res* 1997; 57: 4118–4122
- ⁹⁰ Nakanishi T, Tamai I, Takaki A et al. Cancer cell-targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity. *Int J Cancer* 2000; 88: 274–280
- ⁹¹ Nielsen CU, Brodin B. Di/tri-peptide transporters as drug delivery targets: regulation of transport under physiological and patho-physiological conditions. *Curr Drug Targets* 2003; 4: 373–388
- ⁹² Rowe PM. Photodynamic therapy begins to shine. *Lancet* 1998; 351: 1496
- ⁹³ Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 889–905
- ⁹⁴ Peng Q, Warloe T, Berg K et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* 1997; 79: 2282–2308
- ⁹⁵ Peng Q, Moan J, Ma LW et al. Uptake, localization, and photodynamic effect of meso-tetra(hydroxyphenyl)porphine and its corresponding chlorin in normal and tumor tissues of mice bearing mammary carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 2620–2626
- ⁹⁶ Maier A, Tomaselli F, Matzi V et al. Comparison of 5-aminolevulinic acid and porphyrin photosensitization for photodynamic therapy of malignant bronchial stenosis: a clinical pilot study. *Lasers Surg Med* 2002; 30: 12–17
- ⁹⁷ Ost D. Photodynamic therapy in lung cancer. A review. *Methods Mol Med* 2003; 75: 507–526
- ⁹⁸ Unger M. Endobronchial therapy of neoplasms. *Chest Surg Clin N Am* 2003; 13: 129–147
- ⁹⁹ Chien JW, Johnson JL. Viral pneumonias. Infection in the immunocompromised host. *Postgrad Med* 2000; 107: 67–70, 73–74, 77–80
- ¹⁰⁰ Groneberg DA, Hilgenfeld R, Zabel P. Molecular mechanisms of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Respir Res* 2005; 6: 8
- ¹⁰¹ Morin MJ, Warner A, Fields BN. Reovirus infection in rat lungs as a model to study the pathogenesis of viral pneumonia. *J Virol* 1996; 70: 541–548
- ¹⁰² Becker S, Soukup J, Yankaskas JR. Respiratory syncytial virus infection of human primary nasal and bronchial epithelial cell cultures and bronchoalveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 369–374
- ¹⁰³ Groneberg DA, Zhang L, Welte T et al. Severe acute respiratory syndrome: global initiatives for disease diagnosis. *QJM* 2003; 96: 845–852
- ¹⁰⁴ Groneberg DA, Poutanen S, Low DE et al. Treatment and vaccines for severe acute respiratory syndrome (SARS). *Lancet Infect Dis* 2005; in Press
- ¹⁰⁵ Ganapathy ME, Huang W, Wang H et al. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 470–475
- ¹⁰⁶ Sugawara M, Huang W, Fei YJ et al. Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharm Sci* 2000; 89: 781–789
- ¹⁰⁷ Han H, de Vruet RL, Rhie JK et al. 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm Res* 1998; 15: 1154–1159
- ¹⁰⁸ Groneberg DA, Welker P, Fischer TC et al. Down-regulation of vasoactive intestinal polypeptide receptor expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1099–1105
- ¹⁰⁹ Jacob P, Rossmann H, Lamprecht G et al. Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology* 2002; 122: 709–724
- ¹¹⁰ Groneberg DA, Hartmann P, Dinh QT et al. Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC(2) mRNA in human airways. *Lab Invest* 2001; 81: 749–755
- ¹¹¹ Peiser C, Springer J, Groneberg DA et al. Leptin receptor expression in nodose ganglion cells projecting to the rat gastric fundus. *Neurosci Lett* 2002; 320: 41–44
- ¹¹² Heppt W, Peiser C, Cryer A et al. Innervation of human nasal mucosa in environmentally triggered hyperreflexic rhinitis. *J Occup Environ Med* 2002; 44: 924–929
- ¹¹³ Groneberg DA, Heppt W, Cryer A et al. Toxic rhinitis-induced changes of human nasal mucosa innervation. *Toxicol Pathol* 2003; 31: 326–331
- ¹¹⁴ Eynott PR, Paavolainen N, Groneberg DA et al. Role of nitric oxide in chronic allergen-induced airway cell proliferation and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 22–29
- ¹¹⁵ Groneberg DA, Niimi A, Dinh QT et al. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1276–1280
- ¹¹⁶ Springer J, Amadesi S, Trevisani M et al. Effects of alpha calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery. *Regul Pept* 2004; 118: 127–134