

Napsin A Knockout Mäuse zeigen Surfactant Prozessierungsstörungen und Induktion von ER-Stress aber keinen fibrotischen Lungenphänotyp

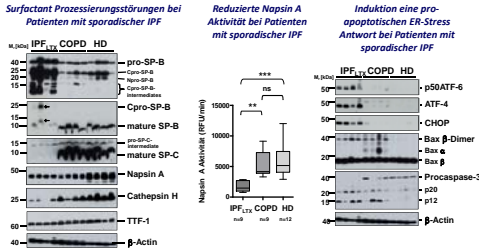
C. Ruppert^{1,2}, E. Lopez-Rodriguez³, M. Korfei^{1,2}, I. Henneke^{1,2}, W. Seeger^{1,2,4}, A. Günther^{1,2,4}

¹ Universities of Gießen and Marburg Lung Center (UGMLC), Medizinische Klinik II, Justus-Liebig-Universität, 35392 Gießen,
² Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL), ³ Institut für Biochemie, Biologische Fakultät, Complutense Universität, Madrid, Spanien,
⁴ Agaplesion Lung Clinic Waldhof Elgershausen, 35753 Greifenstein, Germany

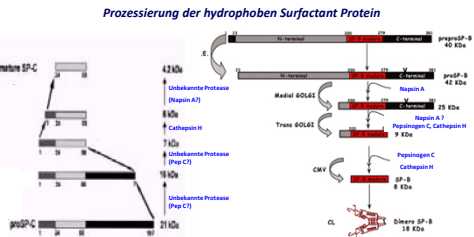
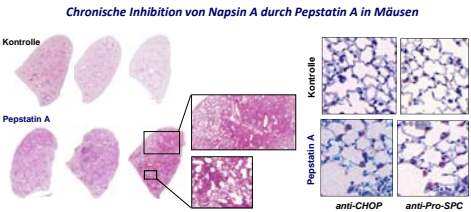
Hintergrund

Die Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF) gehört zu den häufigsten Formen interstitieller Lungenerkrankungen und zeichnet sich durch einen progredienten Verlauf und eine besonders schlechte Prognose aus. Eine chronische Epithelzellschädigung scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen, die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch nicht genau bekannt.

Kürzlich konnten bei Patienten mit sporadischer IPF eine gestörte posttranslationale Prozessierung der hydrophoben Surfactant-Proteine SP-B und SP-C mit intrazellulärer Akkumulation von unvollständig prozessierten Vorstufen und Induktion einer pro-apoptischen endoplasmatischen Retikulum (ER)-Stress Antwort der AECII Zelle nachgewiesen werden.



Napsin A (Napsa) ist eine Aspartatprotease, die in alveolären Typ II Zellen (AECII) exprimiert wird und für die posttranslationale Prozessierung des hydrophoben Surfactantproteins (SP-) B essentiell ist. Der si-RNA vermittelte Knockdown von Napsa in Lungenepithelzellen (MLE12) führt zur Akkumulation von ProSP-B und Induktion einer ER-Stress Antwort. Die chronische pharmakologische Inhibition von Napsin A durch Peptstatin A in Mäusen führt zu einer erhöhten Mortalität, Beeinträchtigung der Lungenfunktion (Complianceverlust), Induktion von ER-Stress und Entwicklung einer Lungenfibrose.



In der vorliegenden Studie wurde daher untersucht, ob ein Knockout des Napsa Gens in Mäusen zu Surfactantdysfunktion, ER-Stress Induktion und nachfolgender Entwicklung einer Lungenfibrose führt.

Generierung der Napsa KO Mäuse

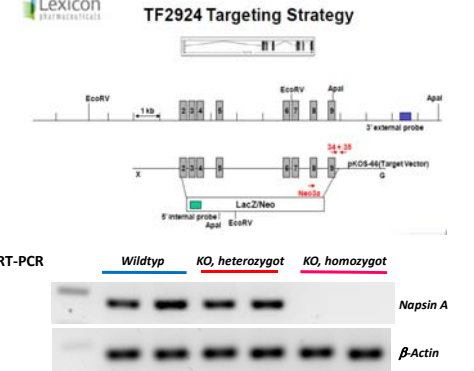


Abb.1: Fehlen von Napsa mRNA Transkript als Folge der Deletion der Exone 2-9

Ergebnisse

Charakterisierung Napsa KO Mäuse

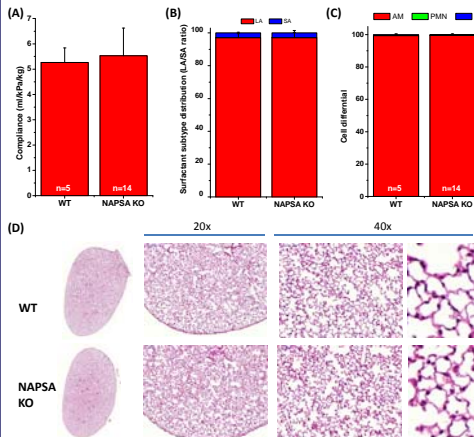


Abb.2: Napsa KO Mäuse zeigen keinen Lungenphänotyp. Lungenfunktion (Compliance) (A) und Surfactant Subtypen Verteilung (B) sind in KO Mäusen unverändert, Analyse der BAL Zellen zeigen keine Anzeichen einer Inflammation (C) und H&E gefärbte Lungenschnitte weisen eine normale Morphologie auf (D)

Analyse des Surfactant System

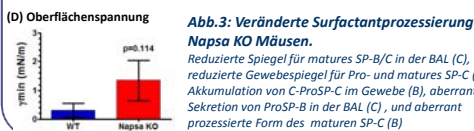
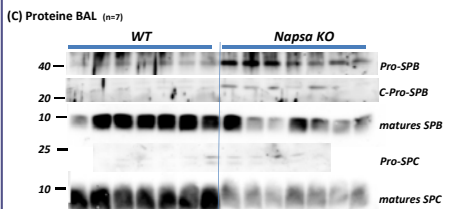
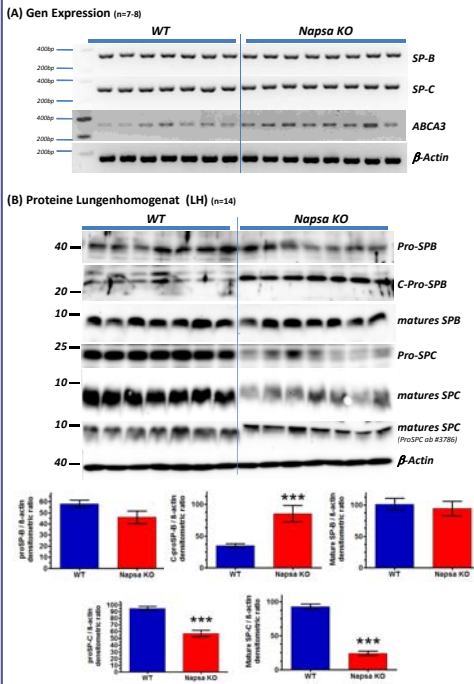


Abb.3: Veränderte Surfactantprozessierung bei Napsa KO Mäusen. Reduzierte Spiegel für matures SP-B/C in der BAL (C), reduzierte Gewebespiegel für Pro- und matures SP-C (B), Akkumulation von C-ProSP-C im Gewebe (B), aberrante Sekretion von ProSP-B in der BAL (C), und aberrant prozessierte Form des matures SP-C (B)

Analyse der ER-Stress Antwort

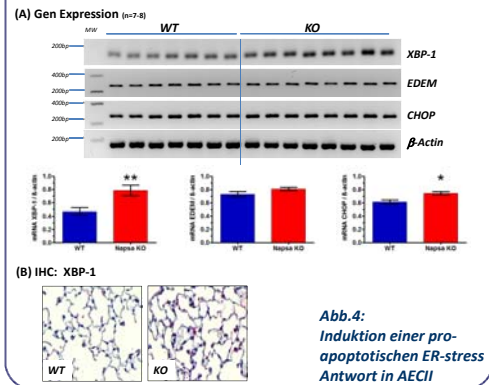


Abb.4: Induktion einer pro-apoptischen ER-stress Antwort in AECII

Analyse von Aspartat- und Cysteinproteasen

Napsin A → in AECII, Clara Zellen und Makrophagen nachgewiesen
 Cathepsin E → in Clara Zellen
 Cathepsin D → in AECII
 Peptinogen C → in AECII

Subject sequence	Max identity	Positives
Cathepsin E	47%	63%
Cathepsin D	47%	63%
Peptinogen C	39%	55%

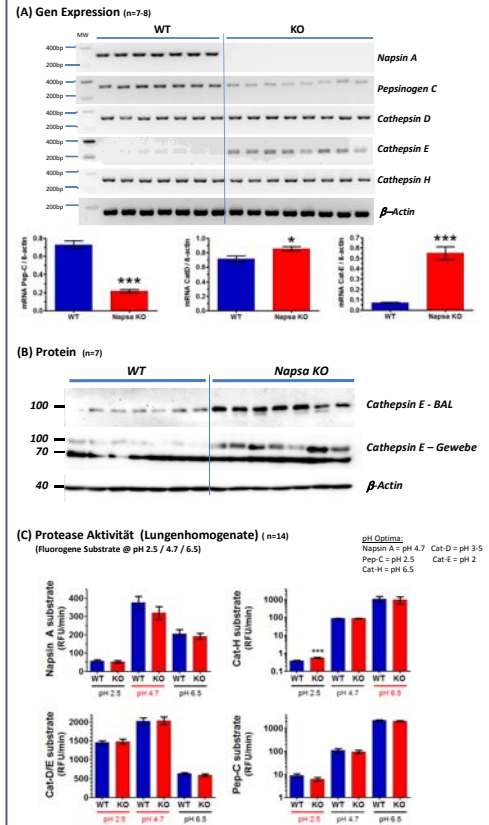


Abb.5: Veränderte Expression von Aspartatproteasen

Schlussfolgerung

- Trotz Fehlen von Napsin A werden die hydrophoben Surfactantproteine weitgehend korrekt prozessiert und in aktiver Form in den Alveolarraum sezerniert, was die postulierte Schlüsselfunktion für Napsin A bei der Surfactantprotein Prozessierung in Frage stellt.
- Die erhöhte Expression der Cathepsine D/E lässt auf einen proteolytischen Kompensationsmechanismus schließen
- Napsa KO Mäuse entwickeln keine Lungenfibrose, zeigen jedoch eine Akkumulation von Pro-SP-B im Gewebe und weniger mature Surfactant Proteine in der BAL und weisen Anzeichen von ER-Stress auf. Möglicherweise sind sie anfälliger für AECII Apoptose und Entwicklung einer Fibrose nach Schädigung mit einem „second hit“.