Rolle der Phosphodiesterase 4 in der Hyperoxie-induzierten Lungenreifungsstörung der Maus

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Kathrin Woyda

aus Bad Muskau

Giessen, 2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molecular Biology and Medicine of the Lung“ (MBML) am Institut für Innere Medizin – Medizinische Klinik II/V des Universitätsklinikums Giessen und Marburg (UGLC, University of Giessen Lung Center) in der Zeit von September 2004 bis April 2008 unter der Leitung von Prof. Dr. Ralph Schermuly angefertigt.

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Peter R. Schreiner Institut für Organische Chemie, FB 08 Justus-Liebig-Universität Gießen Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen
Erstgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Michael U. Martin Professur für Immunologie, FB 08 Justus-Liebig-Universität Gießen Winchesterstraße 2, 35394 Gießen
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Ralph T. Schermuly Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Parkstraße 1, 61231 Bad Nauheim

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2008

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGEN IV

1. EINLEITUNG 1

1.1 Lungenentwicklung 1
1.1.1 Phasen der Lungenentwicklung 1
1.1.2 Transkriptionsfaktoren während der Lungenentwicklung 3

1.2 Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) 4
1.2.1 Was ist BPD? 4
1.2.2 Formen der BPD 5
1.2.3 Pathogenese 6
1.2.4 Pathophysiologie 7
1.2.5 Prävention und Therapie 7
1.2.6 Prognose 9
1.2.7 Das experimentelle Mausmodell zur Untersuchung der hyperoxischen Lungenschädigung 9

1.3 Phosphodiesterasen 10
1.3.1 Der *second messenger* cAMP und sein Signalweg 10
1.3.2 Überblick über die PDEs 12
1.3.3 Strukturelle und funktionelle Domänen 14
1.3.4 Die PDE4-Familie 15

1.4 Fragestellung 20

2. MATERIAL 21

2.1 Geräte 21

2.2 Chemikalien 22

2.3 Verbrauchsmaterialien 22

2.4 Enzyme und Größenstandards 23

2.5 Kits und Assays 23

2.6 Verwendete Primer 24

2.7 Verwendete Antikörper 26

3. METHODEN 27

3.1 Modell für Hyperoxie der Lunge in der Maus 27
3.1.1 Tiere 27
3.1.2 Hyperoxie-Exposition 27
3.1.3 Gewebepräparation 27
3.1.4 Quantitative Analyse der Lungenmorphometrie 28
3.1.5 Messung der dynamischen Compliance 28
3.1.6 Verabreichung des PDE4-Inhibitors 28

3.2 Kultivierung von Zelllinien 29
3.2.1 A549 29
3.2.2 MLE12 29

3.3 Zellinkubation 30
3.3.1 Hyperoxie-Exposition 30
3.3.2 Inkubation mit chemischen Substanzen 30

3.4 Untersuchung der Genexpression 30
3.4.1 Isolation der Gesamt-RNA 30
3.4.2 Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) 31
3.4.3 PCR 32

3.5 Untersuchung der Proteinexpression 35
3.5.1 Proteinextraktion aus Gewebe 35
3.5.2 Proteinextraktion aus Zellen 35
3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration 36
3.5.4 SDS-PAGE 36
3.5.5 Western Blot 37

3.6 Immunhistochemie 38

3.7 cAMP-Enzymimmunassay (EIA) 39

3.8 MTT Proliferationsassay 40

3.9 Phosphodiesterase-Aktivitätsassay 41

3.10 IL-6 - ELISA 42

3.11 Statistik 43

4. ERGEBNISSE 44

4.1 PDE-Expression in der Lunge neugeborener Mäuse unter Hyperoxie 44
4.1.1 Einfluss der Hyperoxie auf die Genexpression der PDEs 44
4.1.2 PDE-Proteinexpression unter Hyperoxie 46
4.1.3 PDE4-Lokalisation im Lungengewebe 51

4.2 PDE4-Hemmung im hyperoxischen Mausmodell 53
4.2.1 Körpergewicht 53
4.2.2 Lungenstruktur 54
4.2.3 Lungenmorphometrie 55
4.2.4 Dynamische Compliance 56

4.3 Auswirkungen der Hyperoxie auf die PDE4 in alveolären Epithelzellen 57
4.3.1 PDE4 – Proteinexpression unter Hyperoxie 57
4.3.2 PDE4-Aktivität unter Hyperoxie 59
4.3.3 Intrazelluläre cAMP – Konzentration unter Hyperoxie 59
4.3.4 Sekretion von IL-6 unter Hyperoxie 60

4.4 Wirkung von IL-6 auf PDE4 61
4.4.1 Wirkung von IL-6 auf die PDE4A-Phosphorylierung 61
4.4.2 Wirkung von IL-6 auf die PDE4 – Aktivität 63

4.5 PDE4-Hemmung in hyperoxischer Zellkultur 64
4.5.1 Proliferation alveolärer Epithelzellen mit Cilomilast 64
4.5.2 Stat3-Phosphorylierung unter Hyperoxie 65
4.5.3 Stat3-Phosphorylierung unter Hyperoxie mit Cilomilast 65
4.5.4 SP-B – Expression in Typ II Epithelzellen nach Cilomilast-Behandlung 67

5. DISKUSSION 69

5.1 Hyperoxie führt zu einer Erhöhung der PDE4-Expression in der Mauslunge 69

5.2 Der PDE4-Inhibitor Cilomilast verbessert die Lungenstruktur und – funktion unter Hyperoxie 72

5.3 Rolle der PDE4 in alveolären Epithelzellen 74

5.4 IL-6 erhöht die PDE4-Aktivität in alveolären Epithelzellen 76

5.5 Proliferation alveolärer Epithelzellen mit Cilomilast 77

5.6 Cilomilast beeinflusst die veränderte STAT3-Phosphorylierung unter Hyperoxie und erhöht die SP-B-Expression in alveolären Epithelzellen 78

5.7 Ausblick 80

6. ZUSAMMENFASSUNG 81

7. ABSTRACT 83

8. LITERATUR 84

9. ANHANG 98

Abkürzungen

[^{3}H]	Tritium
°C	Grad Celsius
µ	Mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AKAP	*A Kinase–anchoring Protein*
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Atemnot-Syndrom (*Acute Respiratory Distress Syndrome*)
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ca^{2+}	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	*CREB-binding protein*
cDNA	*complementary* DNA
C_{Dyn}	Dynamische Compliance
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cilo	Cilomilast
CLD	Chronische Lungenkrankheit (*Chronic Lung Disease*)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*)
CRE	*cAMP response element*
CREB	*cAMP response element-binding protein*
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EIA	Enzymimmunassay
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EPAC	*Exchange protein directly activated by cAMP*

ERK	*Extracellular-signal Regulated Kinase*
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
f	femto
FCS	Fetales Kälberserum (*Fetal Calf Serum*)
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H_2O	Wasser
HCl	Salzsäure
HYX	Hyperoxie
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
ICER	*Inducible cAMP Early Repressor*
Ig	Immunglobulin
IGF	*Insulin-like growth factors*
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
LR	Linker Region
m	Milli
M	Molar (mol/l)
MAP	*Mitogen-activated Protein*
MAPK	MAP-Kinase
min	Minute
MLI	*Mean linear Intersept*
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	*messenger*-RNA
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl oder Nano
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	Normoxie
O_2	Sauerstoff
p	Pico

p21	Protein p21; *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	*Platelet-derived growth factor*
PKA	Proteinkinase A, B, C, G
PMA	Postmenstruelles Alter
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTP	Protein-Tyrosin Phosphatase
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay buffer*
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
Ser	Serin
SP	Surfactantprotein
Stat	*Signal Transducers and Activators of Transcription*
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	*Tris-Buffered Saline Tween-20*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TTF-1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
UCR	*Upstream conserved Region*
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
w/v	Gewicht (*weight*) pro Volumen
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Lungenentwicklung

1.1.1 Phasen der Lungenentwicklung

Die Lunge des Menschen, deren Lufträume vor der Geburt noch mit Flüssigkeit gefüllt sind, nimmt ihre Funktion im Gegensatz zu anderen Organsystemen erst mit der Geburt auf. Wenn die Flüssigkeit durch Atemluft ersetzt wird, tritt die innere Lungenoberfläche zum ersten Mal mit den Atemgasen in Kontakt. Dabei wird die embryonale Durchblutung auf postnatale Durchblutungsverhältnisse umgestellt. Bis die Lunge jedoch ihre Aufgabe als Gasaustauscher erfüllen kann, braucht es den Aufbau eines weit verzweigten Bronchialsystems mit einem mukoziliären Reinigungsmechanismus, die Ausbildung einer komplexen Gasaustauschregion mit kurzer Diffusionsstrecke (Luft-Blut-Schranke) und großer Flächenausdehnung. Außerdem benötigt es den Aufbau eines dichten Kapillarnetzes mit optimalem Kontakt zur Luft der Alveolen und die Ausbildung eines Oberflächenfilms (Surfactant), welcher die durch die Oberflächenspannung bedingte Kollapsneigung des Lungenparenchyms verhindert. Die Entwicklung der Lunge wird in mehrere Stadien eingeteilt und ist erst im Kleinkindalter abgeschlossen (Abb. 1.1). Diese werden im Folgenden kurz erläutert.

Embryonale Phase

Das erste Entwicklungsstadium im Menschen dauert bis zur 8. Gestationswoche, stellt aber keine spezifische Entwicklungsphase der Lunge dar. Nachdem aus dem endodermalen Keimblatt eine epitheliale Lungenknospe entstanden ist, findet ein invasives Wachstum epithelialer Tubuli ins umgebende Mesenchym statt. Diese teilen sich anschließend vielfach dichotom. Entlang des sich gebildeten Bronchialbaumes erfolgt daraufhin die Entstehung der Pulmonalarterien. Das Vorwachsen der Lungenvenen geschieht hingegen innerhalb der mesenchymalen und später bindegewebigen Septen.

Pseudoglanduläres Stadium

Die eigentlichen Lungenentwicklungsstadien beginnen in der Übergangszeit zwischen Embryonal- und Fetalperiode mit dem pseudoglandulären Stadium von der 5. bis zur 17. Gestationswoche. Das mikroskopische Aussehen der Lunge gleicht in dieser Zeit einer verzweigten Drüse. Die zentralen, leitenden Atemwege differenzieren sich und zukünftige Atemwege wachsen bis etwa zur 20. Generation (1). Am Ende dieser Phase besteht bereits der vollständige Baum der präazinären Lufträume. Die Zellen und Gewebe der zentralen Luftwege sind bereits teilweise differenziert und zeigen typische Merkmale der adulten Strukturen.

Kanalikuläres Stadium

Das sich anschließende kanalikuläre Stadium (16. – 26. Woche) ist von der Kontaktaufnahme zwischen den sich ausdehnenden epithelialen Tubuli und den wachsenden Kapillarnetzen zu Kanalikuli geprägt. Diese sind gegenüber dem pseudoglandulären Stadium deutlich dilatiert. Zwischen den zukünftigen gasaustauschenden Lufträumen gibt es reichlich Bindegewebe, in dem die Kapillaren proliferieren. Zudem beginnt sich das Epithel zu Typ-I-Zellen (dünne Blut-Luft-Schranke) und Typ-II-Zellen (Surfactantproduktion) zu differenzieren.

Sakkuläres Stadium

In diesem Stadium, welches sich von der 24. Woche bis zur Geburt erstreckt, steht die massive Erweiterung des Lungenparenchyms im Vordergrund. An den terminalen Endigungen des Lungenbaumes bilden sich glattwandige Sakkuli, ausgekleidet mit Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten, welche bereits Surfactant abgeben. Die primären Septen zwischen den Sakkuli sind noch dick und enthalten zwei Netzwerke von den benachbarten Sakkuli stammenden Kapillaren. Ihre weitere Differenzierung erfolgt in der Alveolarisierungs- und vaskulären Reifungsphase. Zur Zeit der Geburt, d.h. am Ende der sakkulären Phase sind alle Generationen des leitenden und parenchymatösen Bronchialbaumes entstanden. Die Sakkuli sind dünne, glattwandige Säcke und entsprechen den späteren Sakkuli alveolares.

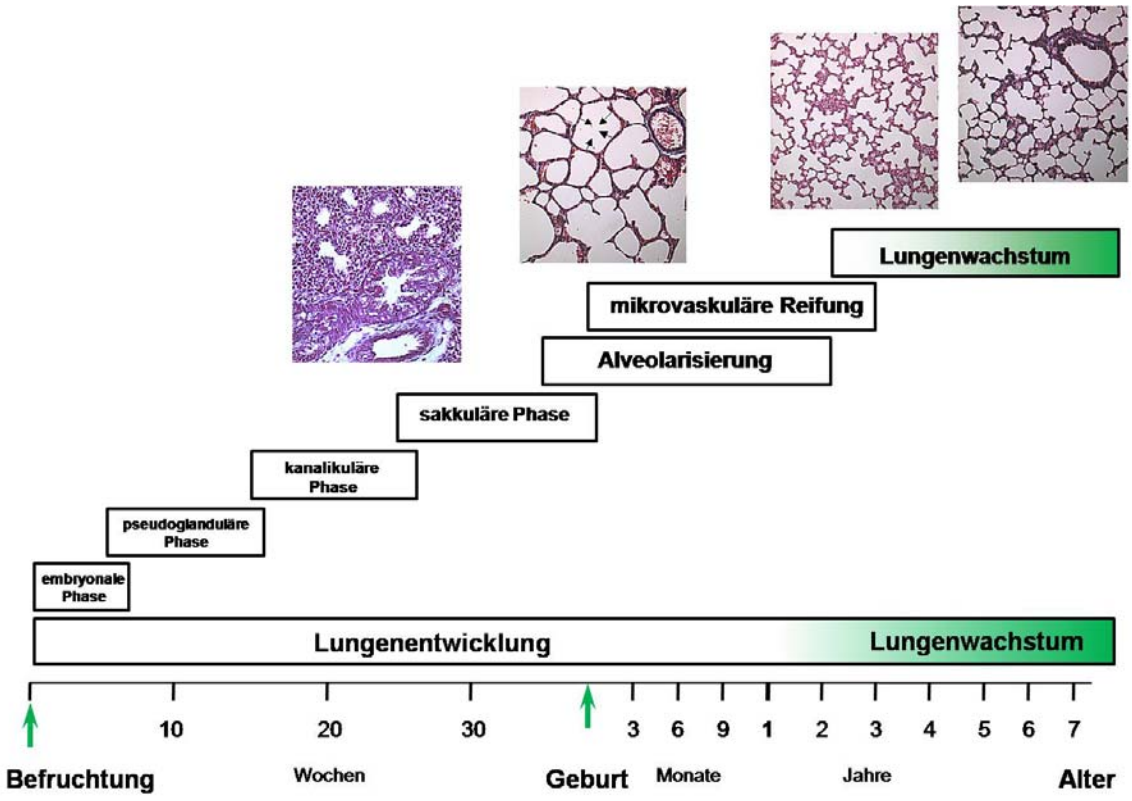


Abbildung 1.1 Zeiträume der fetalen und postnatalen Lungenentwicklung und des Lungenwachstums beim Menschen (modifiziert nach Zeltner und Burri 1987 (2))

Alveolarisierung

Dieses Stadium (36. Gestationswoche bis 18 Monate postnatal) beginnt bereits intrauterin. Die Hauptmasse der Alveolen entsteht aber erst nach der Geburt, so dass dieses Stadium der postnatalen Periode zugerechnet wird. Durch die Unterteilung der peripheren Lufträume und das Wachstum sog. Sekundärsepten wird die Komplexität des Parenchyms gesteigert und die innere Oberfläche rasch und massiv vergrößert. Im Laufe der alveolären Phase nimmt der Bindegewebsanteil zwischen den Kapillarnetzen kontinuierlich ab, so das letztere immer näher beieinander zu liegen kommen.

Mikrovaskuläre Reifung

Das Stadium der mikrovaskulären Reifung (Geburt bis 3. Lebensjahr) stellt das letzte Entwicklungsstadium vor dem bloßen Organwachstum dar und steht in engstem Zusammenhang mit der Alveolenbildung. Die primitiven dicken Septen mit doppelten Kapillarnetzen werden durch einen außergewöhnlich eingreifenden Umbau in dünne Septen mit einer einfachen Kapillarschicht umgewandelt. Ein wichtiger Schritt dazu ist die stetige Abnahme des septalen Bindegewebes, die zu einer Annäherung der beiden Kapillarschichten führt. Am Ende dieses Stadiums besitzt die Lunge eine adulte Morphologie. Die Septen sind schlank, besitzen eine sehr feine Bindegewebsachse und viele Kapillarschlingen, die mäanderförmig von der einen zur anderen Septumseite verlaufen.

Nach dem 3.Lebensjahr finden in der reifen Lunge keine bedeutenden strukturellen Veränderungen mehr statt. Die Lunge wächst von nun an aber noch erheblich bis ins jugendadulte Alter, mindestens so lange, wie der knöcherne Thorax sich ausdehnt (3).

1.1.2 Transkriptionsfaktoren während der Lungenentwicklung

Die Lunge besteht aus mehreren Zelltypen, die ursprünglich von endodermalen und mesodermalen Kompartimenten des frühen Embryos abstammen. Der Prozess der pulmonalen Organogenese umfasst komplexe Signalmechanismen, welche die Anzahl, Differenzierung und das Verhalten von Zellen während der einzelnen Lungenentwicklungsstadien steuern. Eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche in endodermal abstammenden Zellen der sich entwickelnden Lunge aktiv sind, heißen TTF-1, β-Catenin, FOX, GATA-6, SOX und Mitglieder der ETS-Familie und werden für die normale Lungenentwicklung und –funktion benötigt (4). Transkriptionsfaktoren, die im Lungenmesenchym aktiv sind, aus dem sich später pulmonale Gefäße und bronchiale glatte Muskelzellen entwickeln, sind FOXF1, POD1, GLI und Mitglieder der HOX-Familie (4). Die Entwicklung der Lunge ist von der wechselseitigen Signalübermittlung zwischen den Zellen der endodermalen und mesenchymalen Kompartimente abhängig. Diese leiten die transkriptionellen Prozesse, welche die Lungen-

entwicklung und die Anpassung an die Atmung nach der Geburt steuern. In der folgenden Tabelle werden wichtige Faktoren für die Steuerung der einzelnen Stadien der Lungenentwicklung in der Maus wieder gegeben.

Stadium	Faktoren
Embryonisch	TTF-1, Foxa2, Shh, Ptch, Smo, Hip, FGFs, Foxj1a, Foxf1, Hoxa/b, Gli2/3, Pitx-2, BMP-4, mSpry2, Tbx4/5, RA, RAR, Nodal, Lefty1/2
Pseudoglandulär	TGF-β, Smad, FGFs, GATA-6, N-myc, Shh, BMP-4, mSpry2, VEGF, HIFs
Kanalikulär	VEGF, eNOS, HIFs, Mash1, Hes1, Pod-1, TTF-1, Foxa2, GATA-6
Sakkulär	TGF-β, IGF-1, GC, GR, MK, HIFs, VEGF
Alveolär/Mikrovaskulär	Foxa2, GATA-6, PDGFs, IGFs, EGFs, TGFs, FGFs, TTF-1, RAR, VEGF, MK, Foxf1, HIFs

Tabelle 1.1 Wichtige Faktoren während der Lungenentwicklung (nach Groenman *et al.* 2005 (5))

1.2 Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)

1.2.1 Was ist BPD?

Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine chronische potentiell reversible Lungenerkrankung Frühgeborener, die wegen eines akuten Atemnotsyndroms (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) mechanisch beatmet und mit erhöhten inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen behandelt werden mussten (6-8). Obwohl die Störung hauptsächlich mit der verfrühten Geburt der Kinder in Zusammenhang gebracht wird, kann sie auch bei normal geborenen Kindern auftreten, die aufgrund einer akuten Lungenerkrankung eine massive Beatmungstherapie benötigen (9).

Die BPD wurde zuerst durch Northway und seine Mitarbeiter im Jahr 1967 charakterisiert (8) und ist die häufigste chronische Lungenerkrankung im Kindesalter. Sie wird bei allen Frühgeborenen diagnostiziert, die nach einer Phase maschineller Beatmung für mehr als 28 Tage persistierende Zeichen der Atemnot aufweisen, zur Behandlung von Hypoxämie sauerstoffabhängig bleiben und charakteristische radiologische Veränderungen der Lunge in der 36. Woche PMA (postmenstruelles Alter) aufweisen (6). Frühgeborene mit RDS (Respiratory Distress Syndrome), maschineller Beatmung und einem Geburtsgewicht < 1500g erkranken zu 50% an einer chronischen Lungenkrankheit (CLD, chronic Lung Disease) (10). Am häufigsten, zu 75%, wird eine CLD bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1000g diagnostiziert. Wie durch Rojas *et al.* berichtet wurde, steigt das Risiko an BPD zu erkranken mit abnehmendem Geburtsgewicht (11). So liegt die Inzidenz

an BPD zu erkranken bei Frühgeborenen zwischen 500g und 699g bei 85%, bei mehr als 1500g jedoch nur bei 5% (11).

1.2.2 Formen der BPD

Das Krankheitsbild der chronischen Lungenkrankheit hat sich seit Einführung der Surfactant-Therapie in seiner Pathologie verändert (11-13); (14); (15). Die klassische BPD („alte BPD“) oder schwere Form der CLD entwickelte sich vor Einführung der Surfactant-Substitutionstherapie häufig bei Frühgeborenen mit schwerem Atemnotsyndrom. Die Kinder, welche über mehrere Tage mit hohen Beatmungsdrücken und hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen behandelt wurden, entwickelten interstitielle Emphyseme und wiesen eine prominente Fibrosierung des Lungengewebes auf. Mit Einführung der Surfactant-Therapie und Verbesserungen der Beatmungstherapie ist diese schwere Form der CLD selten geworden. Die „neue BPD“ wird hauptsächlich durch eine Störung des distalen Lungenwachstums definiert (9). Sie entwickelt sich bei Frühgeborenen, die während der ersten Tage nach der Geburt keiner oder nur kurzzeitiger maschineller Beatmung und geringen inspiratorischen O_2-Konzentrationen ausgesetzt waren (11; 12). Die Autopsie der Lungen von Kindern mit „neuer BPD“ zeigte eine Lungenhistologie, die von Regionen mit gleichmäßigerer und geringerer Entzündung, vor allem aber von herabgesetztem alveolärem und vaskulärem Wachstum geprägt war. In Tabelle 1.2 werden die pathologischen Veränderungen der „alten“ und „neuen“ BPD zusammengefasst.

Prä-Surfactant („Alte BPD“)	**Post-Surfactant („Neue BPD“)**
Abwechselnd Atelektasen (durch ungenügende Belüftung kollabierte Lungenabschnitte) und Hyperinflation	Geringere regionale Heterogenität der Lungenerkrankung
Schwere epitheliale Läsionen der Atemwege	Weniger epitheliale Läsionen in den Luftwegen
Deutliche Hyperplasie der glatten Muskulatur der Luftwege	Schwächere Verdickung der glatten Atemwegsmuskulatur
Extensive und diffuse Fibroproliferation	Weniger fibroproliferative Veränderungen
Hypertensives Remodelling der Pulmonalarterien	Weniger, aber fehlentwickelte Arterien
Herabgesetzte Alveolarisierung und verkleinerte Oberfläche	Weniger, vergrößerte und vereinfachte Alveoli

Tabelle 1.2 Pathologische Unterschiede zwischen der „neuen“ und „alten“ BPD (nach Kinsella *et al.,* 2006 (16))

1.2.3 Pathogenese

Eine Grundvoraussetzung für die Entstehung einer BPD ist die Unreife der Lunge, die sowohl die anatomischen Strukturen als auch funktionelle Systeme wie das Surfactantsystem, Enzyme zur O_2-Detoxifikation (Katalase, Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase) sowie notwendige Faktoren zur Epithelregeneration (Vitamin A) betrifft. Außerdem führen u.a. das mechanische Beatmungstrauma (17; 18), eine erhöhte Sauerstoffzufuhr (19; 20), pränatale Infektionen mit dem Erreger der Chorioamnionitis (21; 22), postnatale pulmonale und systemische Infektionen, ein hohes Flüssigkeitsvorkommen und eine pulmonale Hyperperfusion bei offenem Duktus arteriosus (23) zu einer akuten Lungenläsion.
Des Weiteren kann die Schwere der neonatalen Lungenerkrankung durch genetische Faktoren wie rassen- oder geschlechtsspezifische Unterschiede beeinflusst werden. Die Surfactantproteine SP-B und SP-C spielen bei der Regulation der Surfactantaktivität und auch bei der körpereigenen Abwehr eine wichtige Rolle. Polymorphismen im 4.Intron des SP-B Gens (24) und dominante Mutationen von SP-C (25) konnten ebenfalls mit BPD assoziiert werden.
Die Toxizität des Sauerstoffs und das Baro-/Volutrauma führen zu einer persistierenden Entzündungsreaktion, welche eine gesteigerte pulmonale mikrovaskuläre Permeabilität hervorruft. Diese wird u.a. durch diverse Lipidmediatoren und Peptidleukotriene ausgelöst und führt zum Einstrom von Plasmaproteinen (u.a. Albumin und Fibrinogen) in die Atemwege, welche das Surfactantsystem inaktivieren und so den bronchoalveolären Entzündungsprozess fördern. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1β, IL-6 (26) und lösliches ICAM-1 (27) konnten schon am 1.Tag in der Lavage-Flüssigkeit von Frühgeborenen mit RDS gemessen werden und erreichten ihren Peak in der zweiten Woche. IL-1β induziert die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, aktiviert Entzündungszellen und erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen. Die in die Atemwege eingewanderten Entzündungszellen tragen durch Freisetzung proteolytischer Enzyme (u.a. Elastase (28), Kollagenase), Zytokine und toxischer Sauerstoffradikale zu einer direkten proteolytischen und oxidativen Schädigung des Lungenparenchyms bei. Dies hat u.a. die Oxidation und somit die Inaktivierung der Alpha-1-Antiprotease, einer protektiven Antiprotease, zur Folge. Des Weiteren geht die Infiltration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mit einem Verlust der endothelialen Basalmembran und von interstitiellen Glycosaminoglycanen (GAGs) einher (29), welche sonst eine antifibrotische Wirkung haben. Im Folgenden werden die Faktoren zusammengefasst, welche zur Pathogenese der BPD beitragen.

Prädisponierende Faktoren zur BPD sind (nach Kinsella *et al.* 2006 (16)):

- Fetale Infektionen oder Entzündungen
- Pränatale Steroide
- Oxidativer Stress
- Schädigung der Lunge durch maschinelle Beatmung
- Postnatale Entzündungen/Infektionen
- Ernährung
- Genetische Faktoren
- Veränderte Signalwege der Wachstumsfaktoren

1.2.4 Pathophysiologie

Die Lungenmechanik von Frühgeborenen mit BPD ist durch ein niedriges Lungenvolumen und durch eine erniedrigte Compliance gekennzeichnet (30). Sowohl eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes (31), als auch Atelektasen und Emphyseme führen zu einer Hypoxämie, d.h. zu einem Sauerstoffmangel im Blut, der eine Zuführung von Sauerstoff notwendig macht. Bei Frühgeborenen wird durch die akute Schädigung der Lunge zudem auch das Wachstum, die Struktur und die Funktion der sich entwickelnden pulmonalen Zirkulation geschädigt (32). Neben einer verringerten Angiogenese durchläuft die Media kleiner Pulmonalarterien mit der Proliferation glatter Muskelzellen, der Umwandlung von Perizyten in glatte Muskelzellen und dem Einbau von Fibroblasten in die Gefäßwand deutliche Veränderungen, welche durch die Verengung des Gefäßdurchmessers und die herabgesetzte vaskuläre Compliance zum hohen pulmonalen Gefäßwiderstand beitragen (33).

1.2.5 Prävention und Therapie

Pränatale Kortikosteroide:

Studien zur pränatalen Lungenreifungsbehandlung belegen, dass eine mindestens 24h vor der Geburt durchgeführte Kortikosteroidbehandlung der Mutter die Inzidenz des Atemnotsyndroms und die frühe neonatale Sterblichkeit von Frühgeborenen zu 50% reduzieren kann (34).

Surfactantsubstitution:
Diese führt zu einer deutlichen Verminderung der akuten pulmonalen Schädigung und einer Senkung der neonatalen Sterblichkeit (35).

Vitamin A:
Zur Herstellung normaler Retinol-Konzentrationen im Serum wurden in einer Studie systemische Vitamin A-Supplementierungen durchgeführt. Diese resultierten in einer verminderten Sterblichkeit und reduzierten die Sauerstoffabhängigkeit nach einem Lebensmonat. Des Weiteren wurde auch die Sauerstoffabhängigkeit von Kindern mit 36 Wochen PMA gesenkt (36; 37).

Beatmungsstrategie:
Weil das Baro-/Volutrauma ein Hauptfaktor für die Entstehung einer BPD darstellt, werden Beatmungsstrategien wie die permissive Hyperkapnie verwendet, welche eine Reduktion der Tidalvolumina sowie des Spitzendruckes ermöglicht (38). Dadurch ist eine besonders protektive Beatmung möglich. Eine weitere Art der Beatmung ist die Hochfrequenzoszillation. Diese wird, neben der Behandlung mit Surfactant, in Frühgeborenen mit schwerer Atemnot angewendet und führt zu einer geringfügigen Verringerung der BPD-Rate (39). Eine Alternative zur Intubation und zur mechanischen Beatmung ist eine kontinuierliche nasale Beatmung bei deren Anwendung sich die niedrigste Inzidenz der BPD zeigte (40). Dies muss jedoch noch in randomisierten Studien belegt werden.

Persistierender Duktus arteriosus (PDA):
Da ein PDA als eindeutiger Risikofaktor für eine BPD identifiziert wurde, sollte eine frühzeitige Behandlung durch eine Flüssigkeitsrestriktion, Therapie mit Indometacin oder auch eine Duktusligatur erfolgen.

Sauerstoff:
Um bei etablierter BPD der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie vorzubeugen, müssen die Kinder eine entsprechende Sauerstoffzufuhr erhalten, d.h. der arterielle Sauerstoffpartialdruck sollte zwischen 50 und 70mmHg liegen (O_2-Sättigung > 90%). Für eine befriedigende Gewichtszunahme ist eine ausreichende Sauerstoffzufuhr ebenfalls erforderlich.

Kortikosteroide:
Die Behandlung mit Kortikosteroiden führt zur rascheren Entwöhnung von der maschinellen Beatmung und zu einer Abnahme des O_2-Bedarfs. Zudem verbessert sich der Gasaustausch

und die Entzündung wird merklich reduziert (41; 42) Diesen positiven Auswirkungen stehen jedoch auch erhebliche Nebenwirkungen gegenüber (43), die u.a. zu einer beeinträchtigten neurologischen und kognitiven Entwicklung führen können (44; 45). Deshalb sollte die Behandlung mit Kortikosteroiden nur in niedrigen Dosen über kurze Zeiträume durchgeführt werden.

1.2.6 Prognose

In den meisten Fällen kommt es zu einer progressiven Verbesserung der Lungenfunktion. Dies geht mit einem Rückgang der Atemnotsymptomatik und einer Entwöhnung von der Sauerstofftherapie einher. Nur wenige BPD-Patienten bleiben bis zum Alter von 2 Jahren oder darüber hinaus noch sauerstoffabhängig (46). Mit einem Alter von 2-3 Jahren befindet sich die Lungenfunktion gewöhnlich im niedrigen bis normalen Bereich. Jedoch zeigen Kinder die an BPD erkrankt sind häufig eine verzögerte neuronale Entwicklung (47; 48).

1.2.7 Das experimentelle Mausmodell zur Untersuchung der hyperoxischen Lungenschädigung

Um die Entstehung und Ursachen der BPD besser erforschen zu können, wird mit verschiedenen Tiermodellen gearbeitet. Dazu zählen neonatale Mäuse (19; 49; 50), Ratten (51; 52), Lämmer (53), Meerschweinchen (54) und auch Paviane (55; 56). In dieser Arbeit dienten neugeborene Mäuse für die Untersuchung der hyperoxischen neonatalen Lungenschädigung. Diese eignen sich besonders gut, da sich die Lungenentwicklung der Maus zum Zeitpunkt der Geburt in der sakkulären Phase befindet, die erst 3-5 Tage später in die Phase der Alveolarisierung übergeht und nach etwa 14 Tagen abgeschlossen ist (57). Dies stimmt mit dem Entwicklungsstand frühgeborener Babies überein, deren Lunge sich zum Zeitpunkt ihrer Geburt ebenfalls in der späten kanalikulären bzw. sakkulären Phase befindet (16). Neonatale Mäuse, die für längere Zeit einer Hyperoxie von 85%O_2 ausgesetzt sind, entwickeln wie der Mensch eine chronische Lungenerkrankung, die durch eine gestörte Alveolarisierung und Vaskularisierung charakterisiert werden kann (50). Um die Vorgänge während dieser Entwicklungsstörung näher untersuchen zu können, wurde das Mausmodell herangezogen.

1.3 Phosphodiesterasen

1.3.1 Der *second messenger* cAMP und sein Signalweg

Die *second messenger* cAMP (zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat) und cGMP (zyklisches Guanosin-3´,5´-monophosphat) können in verschiedenen Geweben und in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen eine wichtige regulatorische Rolle spielen. Sie sind z.B. an der Steuerung von Prozessen wie dem Sehen, dem Geruchsvermögen, der Thrombozytenaggregation, der Aldosteron-Synthese, der Insulin-Sekretion, der T-Zell-Aktivierung und der Relaxation glatter Muskelzellen beteiligt (58-60).

Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wird durch die Balance zweier Enzyme reguliert: Von der Adenylatzyklase und von zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterasen (PDEs). Beide Enzyme werden durch eine große Anzahl von Genen kodiert, welche sich in ihren Expressionsmustern und Regulationsmechanismen unterscheiden. Die Aktivitätsregulation beider Enzyme kann durch andere Signalwege positiv oder negativ beeinflusst werden. Dazu gehören der Kalzium-Signalweg (mit Calmodulin, der Kalzium-abhängigen Proteinkinase II und IV und Calcineurin), Untereinheiten anderer G-Proteine (z.B. G_i, G_o und G_q-Proteine), Inositol-Lipide (durch die PKC) und Rezeptor-Tyrosinkinasen (durch ERK und PKB). Neben der Proteinkinase A (PKA) wurden außerdem das GTP-Austauschprotein EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) und zyklisch-Nukleotid gesteuerte Ionenkanäle als Proteine identifiziert, die durch cAMP gesteuert werden (61-64). Die PKA phosphoryliert und moduliert nach der Bindung von cAMP auch andere Komponenten des cAMP-Signalweges. Dies sind zum Beispiel Rezeptoren, verschiedene Varianten der Adenylatzyklase und auch PDEs. Eine Phosphorylierung dieser Proteine kann eine Verstärkung des cAMP-Signals, z.B. bei der Hemmung der PDEs, oder eine schnelle Abschwächung, z.B. bei der Repression der Adenylatzyklase-Aktivität (V und VI) oder der Hemmung des β-adrenergen Rezeptors, zur Folge haben (65-70).

Die transkriptionelle Regulation durch die PKA erfolgt hauptsächlich durch die direkte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, zu welchen CREB (cAMP-responsive-element-binding protein), CREM (cAMP-responsive-element-binding modulator) und ATF1 (activating transcription factor) gehören. Nach der Phosphorylierung durch die PKA an Ser133 in CREB, Ser117 in CREM und Ser63 in ATF1 können die aktivierten Transkriptionsfaktoren mit den Co-Aktivatoren CBP (CREB binding protein) und p300 interagieren (71-73). Das besondere am CREM-Gen ist, dass es viele verschiedene Isoformen kodiert, von denen einige eine repressive Funktion haben. Eines davon ist der Repressor ICER (inducible cAMP early repressor), welcher durch die Transkription von einem alternativen cAMP-induzierbaren Promotor innerhalb des CREM-Gens gebildet wird und der cAMP-induzierten Transkription

entgegen wirkt, indem er mit den Aktivatoren CREB und CREM um die DNA-Bindestelle konkurriert (71; 73). Ähnlich wie CREB wird auch NF-κB durch die PKA-Phosphorylierung aktiviert und interagiert dann mit CBP/p300 (74).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass entweder cAMP allein den MAPK (mitogen-activated protein kinase) - Signalweg durch die Bindung an EPAC, welches als spezifisches GTP-Austauschprotein für die kleine GTPase Rap1 fungiert, modulieren kann (75; 76) oder Rap1 in PKA-abhängiger Weise aktiviert wird und dann mit B-Raf interagiert (77) (Abb.1.2). Ferner konnte in Fibroblasten und glatten Muskelzellen festgestellt werden, dass eine Behandlung mit cAMP eine Phosphorylierung von Raf1 durch die PKA zur Folge hat und letztendlich zu einer Hemmung der ERK-Aktivierung führt (78-80) (Abb.1.2).

Die intrazelluläre Kompartimentierung der PKA wird durch ihre Assoziation mit AKAPs (A-kinase anchoring proteins) bestimmt. Dies ist eine Familie strukturell verwandter Proteine, die aus mehr als 50 Mitgliedern besteht (81). Durch AKAPs wird die PKA an spezifische Substrate und subzelluläre Kompartimente gebunden (81-83). Durch ihre Gerüst-Funktion können AKAPs neben der PKA auch andere regulatorische Proteine wie Phosphatasen oder cAMP-spezifische PDEs an einem Ort in der Zelle versammeln. Auf diese Weise erfolgt eine komplexe räumliche und zeitliche Integration der Komponenten des PKA-Signalweges in ein bestimmtes Zellkompartiment, was für die präzise Regulation der PKA-Signalweiterleitung notwendig ist (81-83).

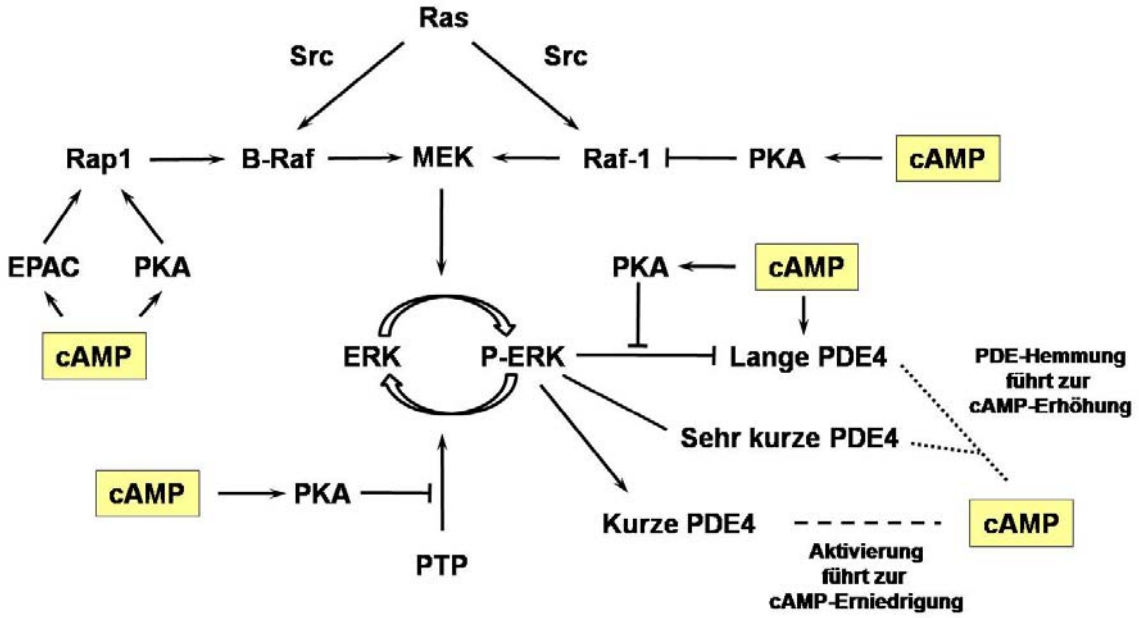


Abbildung 1.2 „Cross-talk“ zwischen den cAMP- und ERK-Signalwegen (modifiziert nach Houslay und Baillie, 2003 (84))

1.3.2 Überblick über die PDEs

Die Phosphodiesterasen (PDEs) bilden eine große Enzymfamilie von Metallophospho-hydrolasen, welche die second messenger zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosin-3´,5´-monophosphat (cGMP) in ihre entsprechenden inaktiven 5´-Monophosphate hydrolysieren (85) (Abb.1.3). Ein Mechanismus, durch den der Spiegel an cAMP/cGMP in der Zelle erhöht werden kann, ist die Hemmung der PDEs, welche als einzige Enzyme cAMP und cGMP abbauen (86). Bis heute konnten 11 PDE-Familien mit variierenden Selektivitäten für cAMP oder cGMP identifiziert werden (87; 88). Jede Familie unterscheidet sich funktionell durch ihre einzigartige Kombination aus enzymatischen Eigenschaften und ihrem pharmakologischen Inhibitor-Profil. Innerhalb dieser Familien existieren mehrere Isoformen, die entweder aus unterschiedlichen Genen oder durch alternatives Spleißen bzw. durch unterschiedliche Transkriptions-Startstellen vom gleichen Gen gebildet werden können. Bis heute konnten 44 verschiedene menschliche PDE-Proteine identifiziert werden und die Anzahl neuer PDEs nimmt stetig zu (89; 90). Diese Vielzahl von PDE-Proteinen erlaubt eine spezifische intrazelluläre Lokalisation und die Nähe zu verschiedenen Effektorproteinen, was einer besseren Feinabstimmung der cAMP- und cGMP-Regulation dient. Im Gewebe des Herzens konnte festgestellt werden, dass die PDEs neben ihrem Vorkommen im Zytoplasma auch an andere Zellkompartimente gekoppelt sind. So sind z.B. die PDEs 2, 3 und 4 mit dem Sarkolemma der Muskelzellen assoziiert (91; 92). Die PDE3 war zudem hauptsächlich mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum verbunden (93) und in der Leber wurden die PDEs 2 und 3 in der Golgi-Endosom-Fraktion gefunden (94) Bei der Untersuchung von nukleären Extrakten aus Schafherzen konnte durch Lugnier *et al.* eine Bindung von PDE4 an die Kernhülle festgestellt werden (95). Ein Überblick über die PDEs mit ihren Substraten, selektiven Inhibitoren und ihrer Regulation ist in Tabelle 1.3 zusammen gefasst.

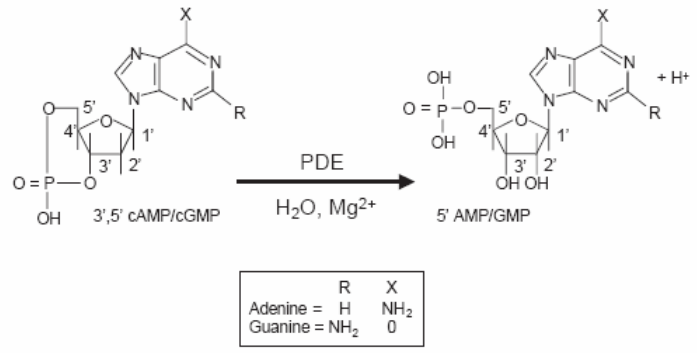


Abbildung 1.3 Hydrolyse zyklischer Nukleotide durch Phosphodiesterasen (aus Lugnier, 2007 (96))

PDE-Familie	Gen-produkte	Sub-strate	Selektive Inhibitoren	Regulation	Experimentelle und klinische Anwendung
PDE1	1A, 1B, 1C	cAMP/ cGMP	Vinpocetin Nicardipin 8-MeOM-IBMX IC224 SCH51866	Ca^{2+}/Calmodulin PKA/PKG	Demenz, Gedächtnisverlust
PDE2	2A	cAMP/ cGMP	EHNA IC933 Bay 60–7550 PDP	Durch cGMP stimuliert	Sepsis, ARDS, Gedächtnisverlust
PDE3	3A, 3B	cAMP/ cGMP	Lixazinon Cilostamid Milrinon Cilostazol OPC-33540 Dihydropyridazinon	Durch cGMP gehemmt Durch PKB phosphoryliert	Nierenentzündung, Hydropische Herzinsuffizienz, Thrombose, Pulmonale Hypertonie
PDE4	4A, 4B, 4C, 4D	cAMP	Rolipram Ro 20–1724 Piclamilast Cilomilast Roflumilast SCH 351591 V11294A AWD 12–281 L-826,141	Durch PKA phosphoryliert Durch ERK phosphoryliert	Nierenentzündung, Asthma, COPD, Depression, Gehirnentzündung, Organ-Transplantation
PDE5	5A	cGMP	Sildenafil (Viagra) Zaprinast Dipyridamol Vardenafil Tadalafil E4021 DMPPO DA-8159	Bindet cGMP Durch PKA phosphoryliert Durch PKG phosphoryliert	Chronisches Nierenversagen, Pulmonale Hypertonie, Erektile Dysfunktion, Organ-Transplantation
PDE6	6A, 6B, 6C	cGMP	Zaprinast Dipyridamol E4021	Aktiviert durch Transducin	
PDE7	7A, 7B	cAMP	IC242 BRL 50481 BMS-586353 Thiadiazole Dipyridamol	Insensitiv gegenüber Rolipram	
PDE8	8A, 8B	cAMP	Dipyridamol	Insensitiv gegenüber Rolipram Insensitiv gegenüber IBMX	
PDE9	9A	cGMP	Zaprinast SCH 51866 BAY 73-6691	Insensitiv gegenüber IBMX	
PDE10	10A	cAMP/ cGMP	Dipyridamol Papaverin	unbekannt	
PDE11	11A	cAMP/ cGMP	Dipyridamol Zaprinast Tadalafil	unbekannt	

Tabelle 1.3: Übersicht über die Substratspezifität, Regulation und Inhibition der PDEs (modifiziert nach Cheng und Grande, 2007 (97))

1.3.3 Strukturelle und funktionelle Domänen

Die PDEs bestehen aus drei funktionellen Domänen. Wie in Abb. 1.4 gezeigt, setzen sich diese aus einem etwa 270 Aminosäuren umfassenden konservierten katalytischen Zentrum, einem regulatorischen N-Terminus und aus dem C-Terminus zusammen (98-100). Beim Vergleich der Aminosäurezusammensetzung zwischen den katalytischen Regionen von PDEs unterschiedlicher Familien besteht eine Identität von 20-45%. Die katalytische Domäne jeder PDE enthält übereinstimmende Metallbindedomänen: 2 Zn^{2+}-Bindemotive Hx_3Hx_nE/D und ein Mg^{2+}-Bindemotiv, welches mit dem von Metallionen-Phosphohydrolasen verwandt ist (101).

Die N- und C-Termini hingegen, sind stark heterolog. Der N-Terminus nimmt in mehreren PDE-Familien eine regulatorische Rolle ein. Zum Beispiel befindet sich in dieser Region der PDE1 eine Calmodulin-Bindedomäne, GAF-Domänen in den PDEs 2, 5, 6, 10 und 11 (102; 103), eine PAS-Domäne in PDE8, in PDE2 eine cGMP-Bindestelle, autoinhibitorische Sequenzen in den PDEs 1 und 4, in den PDEs 1, 3, 4 und 5 Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen, Membranbindungsdomänen in den PDEs 2 bis 4 und in PDE6 eine Transducin-Bindedomäne.

Obwohl berichtet wurde, dass die C-terminale Region der PDE4D1 der Dimerisierung dient (104), ist weniger klar welche funktionelle Rolle der C-terminalen Region zugeordnet werden soll. Die Verbindung der drei Domänen erfolgt durch eine Art flexibles Scharnier, welches der N- oder C-terminalen Domäne erlaubt, sich durch Falten auf die katalytische Region zu legen und so den Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum zu beeinflussen (99). Die Veränderung der Tertiärstruktur ermöglicht durch das Einführen oder Aufheben einer sterischen Hemmung einen Mechanismus, bei dem allosterische Regulatoren die Enzymaktivität erhöhen oder verringern können.

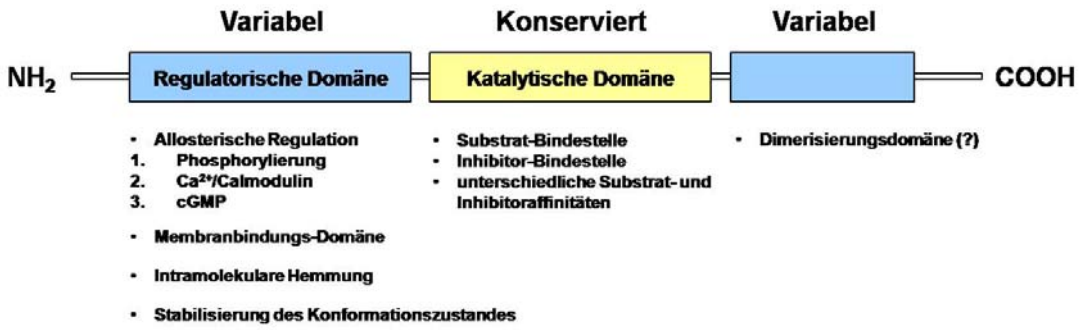


Abbildung 1.4 Funktionelle Domänen der PDEs (modifiziert, nach Torphy, 1998 (105))

1.3.4 Die PDE4-Familie

Die PDE4 ist eine cAMP-spezifische PDE und wurde früher auch als cAMP-PDE, ROI-PDE (Rolipram-inhibierte PDE) und PDE IV bezeichnet. Sie wird hauptsächlich im Gehirn (106), in Entzündungszellen (107), in kardiovaskulärem Gewebe (108) und in glatten Muskelzellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die PDE4 spezifisch durch Rolipram (K_i = 0,8µM) und Ro-201724 inhibiert werden kann und gegenüber cGMP nicht sensitiv ist (109; 110), wodurch sich die PDE4-Familie von der Familie der PDE3 pharmakologisch unterscheidet (111; 112).

Struktur

Die PDE4 wird durch vier sehr ähnliche Gene mit den Bezeichnungen PDE4A bis 4D kodiert. Ihre Spleißvarianten werden, basierend auf dem Vorhandensein oder Fehlen der N-terminalen UCR (upstream conserved region) - Domäne, in drei Varianten eingeteilt: die lange Form, die kurze Form und die sehr kurze Form (113; 114) (Abb.1.5). Die lange Variante enthält UCR1, die erste Linker-Region (LR1), UCR2, eine zweite Linker-Region und die katalytische Domäne. Die kurze und sehr kurze Form haben LR1-UCR2-LR2 bzw. UCR2 (verkürzt)-LR2 in der N-terminalen Region. UCR1, welche eine PKA-Phosphorylierungsstelle enthält, ist mit UCR2 durch die erste Linker-Region verbunden. UCR2 besitzt eine hydrophile N-terminale Region, welche intramolekular mit dem hydrophoben C-terminalen Teil von UCR1 interagiert (115). Durch die Interaktion von UCR2 mit der katalytischen Domäne sind UCR1 und 2 in die enzymatische Regulation der PDE4 involviert (68; 116; 117). Des weiteren sind sie an der Dimerisierung der PDE4 beteiligt (118). Obwohl das katalytische Zentrum der PDE4 den kompetitiven Inhibitor Rolipram bindet, kann sich die Affinität des Zentrums, abhängig von der Konformation des Enzyms, sehr verändern. Dabei kann das Enzym zwischen dem so genannten „LARBS“ (low-affinity rolipram - binding state) und dem „HARBS“ (high-affinity rolipram - binding state) – Zustand wechseln (119; 120).

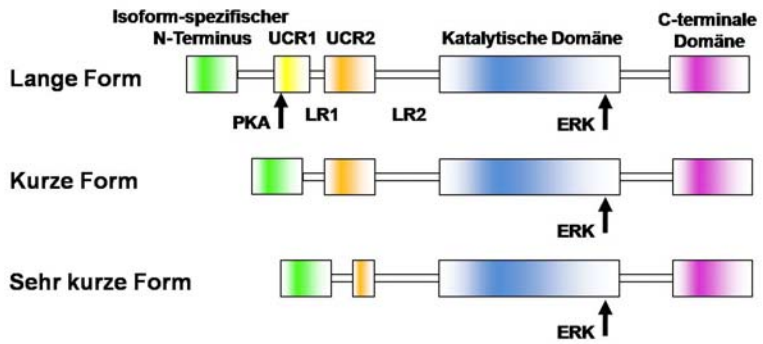


Abbildung 1.5 Darstellung der unterschiedlichen PDE4-Spleißvarianten (modifiziert, nach Omori und Kotera, 2007 (121)

Expression

Die Expression der PDE4A ist in menschlichen Geweben grundsätzlich ubiquitär (122; 123). Dabei kodiert die PDE4A1 eine kurze Variante der PDE4A und die Proteine der PDE4A4B, 4A8, 4A10 und 4A11 sind lange Formen. In T-Zellen wird hauptsächlich die PDE4A4B exprimiert (122), wohingegen die PDE4A10 im Herz und im Dünndarm eine hohe Expression zeigt (124). Transkripte der PDE4A11 konnten in verschiedenen Geweben gefunden werden (125), wobei eine hohe Expression im fetalen Gehirn, nicht aber im adulten Gehirn festgestellt werden konnte. In Ratten wird die PDE4A hauptsächlich in Neuronen und im olfaktorischen System exprimiert (126).
Die Spleißvarianten der PDE4B sind ebenfalls in vielen Geweben exprimiert. In Immunzellen werden z.B. hauptsächlich die PDE4B und 4D Isoformen gebildet. Dabei konnte eine kurze Variante, die PDE4B2, in Leukozyten, genauer in neutrophilen Granulozyten und in normalen B-Zellen, lokalisiert werden (127; 128)
Auch die Expression der PDE4C-Varianten 4C1 bis 4C3 zeigt eine ubiquitäre Verteilung. Jedoch sind sie in der Lunge nur sehr gering und im Blut gar nicht exprimiert (123).
Generell kann auch die PDE4D in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Die sehr kurzen Varianten der PDE4D sind die PDE4D2 und 4D6, PDE4D1 kodiert für eine kurze Form und die PDEs 4D3 bis 4D5 und 4D7 bis 4D9 kodieren für lange Varianten. Die Transkripte der PDE4D7 werden hauptsächlich in der Lunge und in der Niere gefunden, wohingegen die PDE4D4 und 4D6 Gehirn-spezifisch exprimiert werden. Die PDE4D8 ist vorwiegend im Herz- und Skelettmuskelgewebe (123; 129-131) und die PDE4D5 hauptsächlich in humanem Bronchialepithelium exprimiert (123; 132).

Regulation

Die Aktivität der PDE4 wird durch Phosphorylierung, Assoziation mit anderen Proteinen oder endogene Mediatoren reguliert. Die Phosphorylierung durch die PKA, welche in der UCR1-Domäne der langen PDE4-Varianten erfolgt, hat eine aktivitätssteigernde Wirkung (68; 133; 134) (Abb. 1.6; Tab.1.4). Diese findet bei der PDE4D3 am Serin 54 statt, welches sich in der PKA-Konsensus-Sequenz Arg-Arg-Glu-Ser-Phe befindet (68). Die PKA-Phosphorylierung der PDE4, die durch einen erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle ausgelöst wird, stellt einen Rückkopplungsmechanismus dar, der zum Rückgang des cAMP-Spiegels auf basale Konzentrationen führt (135). Des Weiteren wird beschrieben, dass die Aktivitätssteigerung durch eine Störung der UCR1-UCR2-Interaktion zustande kommt, wobei die UCR2-Domäne nicht mehr mit der katalytischen Region interagieren kann und diese somit nicht mehr konstitutiv hemmt (115; 136). Durch Richter und Conti konnte zudem gezeigt werden, dass eine Dimerisierung der langen PDE4-Formen für die volle Aktivierung durch die PKA und

auch durch Phosphatidsäure (PA), einem Phospholipid welches ebenfalls lange PDE4-Formen aktiviert, notwendig ist. Die Dimerisierung wird dabei ebenfalls durch die UCR-Domänen vermittelt (118; 137).

Ein weiterer Regulator, der Spleißvarianten-abhängig entweder hemmend oder aktivierend auf die Enzymaktivität der PDE4 wirkt, ist ERK2 ($p42^{MAPK}$) (68; 117; 138) (Abb.1.2; Abb.1.5; Tab.1.4). Das ERK-Konsensus-Motiv (Pro-X-Ser-Pro) ist in der dritten Unterdomäne der katalytischen Domäne der PDE4 lokalisiert und ist ausgenommen von der PDE4A in allen anderen Isoformen vorhanden. Zusätzlich sorgen in unmittelbarer Nähe zum phosphorylierten Serinrest ein KIM-Motiv als Kinase-Andockstelle und ein FQF-Motiv für die spezifische Bindung von ERK (139). Die Phosphorylierung der langen PDE4-Formen durch ERK2 führt zur Hemmung der PDE4-Aktivität, wohingegen die kurzen Formen aktiviert werden (117; 139). Jedoch kann die Hemmung der PDE4 zu einem lokalen Anstieg der cAMP-Konzentration führen, was wiederum eine Aktivierung der PKA und auch der PDE4 zur Folge hat. Daher ist die hemmende Phosphorylierung durch ERK2 nur transient und kann durch die PKA-Phosphorylierung inaktiviert werden (117).

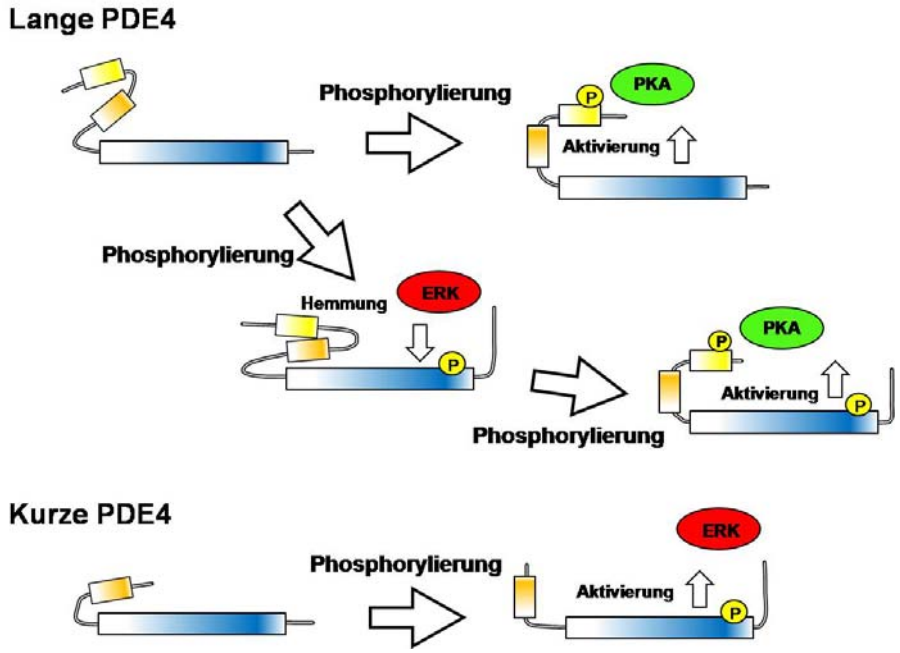


Abbildung 1.6 Regulation der PDE4-Aktivität durch PKA- bzw. ERK-Phosphorylierung (modifiziert nach Omori und Kotera, 2007 (121))

Des Weiteren wird die PDE4 durch die Interaktion mit assoziativen Proteinen wie Immunophillin, Proteinen mit SH3-Domäne, β-Arrestin, RACK1 und AKAPs reguliert, die im Folgenden in Tabelle 1.4 zusammengefasst werden.

PDE	Assoziative Proteine	Kinase	Veränderung/Auswirkung
PDE4 (lange Formen)		PKA	Aktivierung der PDE-Aktivität
PDE4A	AKAP95, AKAP149, AKAP450, MTG		Verankerung an Organellen
PDE4A5	Immunophillin XAP2		Hemmung der PDE-Aktivität
PDE4A5	SH3-Domänen von c-Abl, Crk, Csk, Lck, Lyn, Fyn und v-Src		Hemmung der PDE-Aktivität
PDE4B	DISC1		Hemmung der PDE-Aktivität
PDE4B, D (C) (kurze Formen)		ERK	Aktivierung der PDE-Aktivität
PDE4D	Myomegalin		Verankerung am Golgi-Apparat/Zentrosom
PDE4D (B, C) (lange Formen)		ERK	Hemmung der PDE-Aktivität
PDE4D3	mAKAP		Perinukleäre Lokalisation
PDE4D3	Epac1		Adapter-Protein zur lokalen cAMP-Regulation
PDE4D3	Ryr2		Regulation von Fehlfunktionen des Herzens und Herzrhythmusstörungen
PDE4D5	RACK1		Gerüst-Protein für Komplex-Bildung zur lokalen cAMP-Regulation
PDE4D3/4D5	β-Arrestin		Regulation des β2-Adrenozeptor-Signalweges

Tabelle 1.4: Regulation der PDE4 durch assoziative Proteine und Kinasen (modifiziert nach Omori und Kotera, 2007 (121))

Neben der kurzzeitigen Regulation durch Phosphorylierung kann die PDE4 auch durch Veränderungen in der Genexpression reguliert werden. Eine länger andauernde Akkumulation von cAMP, welche durch die Stimulation mit cAMP-erhöhenden Substanzen wie β_2-Agonisten oder PDE4-Inhibitoren erreicht werden kann, induzierte die Expression bestimmter PDE4-Isoformen wie der PDE4A und 4B in humanen promonozytären U937-Zellen (140). Durch Vicini *et al*. konnte gezeigt werden, dass die Transkription der PDE4D1/2 in der Ratte durch einen cAMP-gesteuerten Promotor geregelt wird (141). Ähnliches wurde auch für die PDE4D5 in humanen glatten Muskelzellen der Atemwege beschrieben. Ihre Transkription wird auch durch einen cAMP-abhängigen Promotor gesteuert, welcher mehrere C/EBP-Bindestellen und zwei CRE-Bindestellen enthält (142).

Hemmung der PDE4

Selektive PDE4-Inhibitoren, welche direkt an das aktive Zentrum in der katalytischen Domäne binden, hemmen die Funktion einer Vielzahl inflammatorischer und immun-modulatorischer Zellen, weswegen sie für die Behandlung entzündlicher Atemwegs-erkrankungen wie Asthma und COPD getestet werden (143; 144). Der Prototyp unter den PDE4-Inhibitoren ist Rolipram (Abb.1.7), welches ursprünglich als Antidepressivum entwickelt wurde. Aufgrund der starken Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen bei der Anwendung in klinischen Tests, die mit der Bindung von Rolipram an die HPDE4 (*High affinity Rolipram-binding* PDE4; HARBS) im ZNS zusammen hängen, wurde Rolipram jedoch

nicht für die Therapie von Krankheiten eingesetzt (120; 145). Seit dem werden neuere Generationen von PDE4-Hemmern entwickelt, die durch die bevorzugte Bindung der LPDE4 (*Low affinity Rolipram-binding* PDE4; LARBS) weniger Nebenwirkungen aufweisen. Zu diesen zählt neben Roflumilast auch Cilomilast (Ariflo, SB-207499) (Abb.1.7) (146), welches sich schon in mehreren klinischen Phase 3-Studien an COPD-Patienten bewährt hat (147). In diesen konnte gezeigt werden, dass Cilomilast bei einer Dosis von zweimal täglich 15mg neben seiner bronchodilatatorischen Wirkung auch die Allergen-induzierte Produktion von IFN-γ und IL-5, die Degranulation von Neutrophilen und die Histamin-Freisetzung humaner Basophiler Granulozyten hemmt (147). In einer weiteren Studie an bronchialen Epithel- und Sputumzellen von COPD-Patienten konnte gezeigt werden, dass Cilomilast neben der chemotaktischen Aktivität von Neutrophilen ebenfalls die Freisetzung von TNF-α und GM-CSF hemmt, die Freisetzung von IL-8 wurde jedoch nicht gehemmt (148). Somit wird deutlich, dass Cilomilast mit seinen zahlreichen anti-inflammatorischen Effekten und seiner bronchodilatatorischen Wirkung gut für die Behandlung von entzündlichen Atemwegs-erkrankungen geeignet ist.

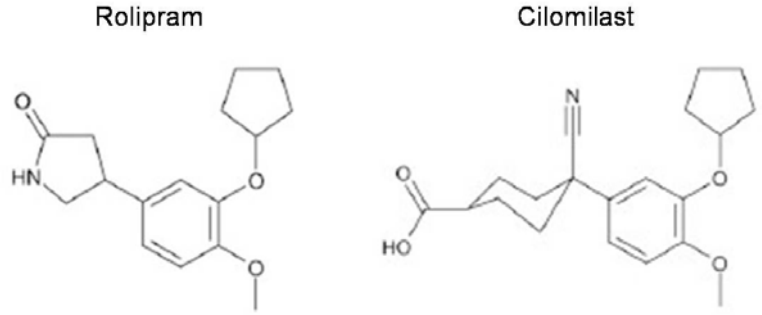


Abbildung 1.7 Chemische Struktur der PDE4-spezifischen Inhibitoren Rolipram und Cilomilast (aus Houslay *et al*., 2005 (149))

1.4 Fragestellung

Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine chronische potentiell reversible Lungenerkrankung Frühgeborener, die u.a. durch maschinelle Beatmung und hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen verursacht wird. Sie stellt eine Lungenreifungsstörung dar, welche durch eine deutlich herabgesetzte Septierung der Alveolarstrukturen, eine verminderte Vaskularisierung und durch eine persistierende Entzündungsreaktion in der Lunge charakterisiert werden kann.
Während der normalen Lungenentwicklung nehmen *second messenger* durch die Regulation des pulmonalen Gefäßwiderstandes und der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen eine bedeutsame Stellung ein. Sowohl ihre Erzeugung durch *second messenger*-generierende Enzyme, als auch ihr Abbau durch Phosphodiesterasen (PDEs) sind wichtige Steuerfaktoren bei der intrazellulären Signaltransduktion. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die PDEs eine Rolle in der Hyperoxie-induzierten Lungenreifungsstörung der Maus spielen und ob eine Therapie mit einem PDE-Inhibitor zur Verbesserung der Lungenentwicklung beiträgt.

Ziele dieser Arbeit waren daher:

1. Untersuchung der Phosphodiesterase-Expression auf Gen- und Proteinebene in den Lungen 7 bis 28 Tage alter Hyperoxie-exponierter Mäuse
2. Analyse der Auswirkungen einer PDE-Inhibitor - Therapie auf die Hyperoxie-induzierte Lungenreifungsstörung der Maus
3. Untersuchung der unter Hyperoxie im Lungengewebe veränderten Phosphodiesterasen in Hyperoxie-exponierten pulmonalen Epithelzellen *in vitro*
4. Aufklärung möglicher Mechanismen, die für die Veränderung der PDE-Expression und – Aktivität unter Hyperoxie verantwortlich sind
5. Untersuchung der Auswirkungen der PDE-Inhibition unter Hyperoxie *in vitro*

2. Material

2.1 Geräte

BioDocAnalyzer	Biometra, Göttingen
Dispergiergerät	Heidolph Instruments, Schwabach
Elektrophoresekammern	Biometra und Bio-Rad
Entwicklermaschine	AGFA, Mechelen, Belgien
Heizblock Thermostat TM130-6	HLC-Biotech, Bovenden
Homogenisator „Precellys24“	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Kühlzentrifuge „Biofuge® fresco“	Heraeus/Kendro, Hanau
Leica DMLA Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Licht-Mikroskop	Hund, Wetzlar
Mikroplattenlesegerät „Infinite® 200“	Tecan, Crailsheim
Mini-Trans-Blot	Bio-Rad, München
Mx3000P® QPCR System	Stratagene
pH-Meter „inolab“	WTW, Weilheim
Photometer „BioPhotometer“	Eppendorf, Hamburg
Pipetten „reference®“(variabel)	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage „Direct-Q®3“	Millipore, Schwalbach
Sicherheitswerkbank „Herasafe“	Heraeus/Kendro, Hanau
Spannungsgerät für die Elektrophorese	Biometra und Bio-Rad
Spektrophotometer „ND-1000“	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Taumelschüttler	Biometra, Göttingen
Thermocycler „T3000“	Biometra, Göttingen
Thermocycler „TGradient“	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Vortexer	VWR
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad	Medingen
Zellinkubator „HERAcell“	Heraeus/Kendro, Hanau
Zentrifuge „Rotanta 460“	Hettich, Tuttlingen

2.2 Chemikalien

Die meisten verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München) und Roth (Karlsruhe) bezogen und werden nicht im Einzelnen aufgeführt.

2.3 Verbrauchsmaterialien

96-well Mikroplatten	Corning B.V. Life Sciences,
AGFA Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA, Mortsel, Belgien
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Blottingpapier	Whatman Schleicher & Schuell, Dassel
Gelladespitzen	Kisker-Biotech, Steinfurt Niederlande
Nitrozellulose-Membran “BioTrace™ NT”	PALL Life Sciences, Dreieich
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Real-time PCR-Reaktionsgefäße	Abgene, Hamburg

PDE-Aktivitätsassay:

[*methyl*-^{3}H]Thymidine (9.25 MBq, 250 µCi)	GE Healthcare, München
Chromatographie-Säulen „Poly-Prep“	Bio-Rad, München
QAE Sephadex A-25	GE Healthcare, München
Rotiszint® eco plus	Roth, Karlsruhe
Szintillationsgefäße “Pico prias vials”	PerkinElmer LAS (Germany), Rodgau-Jügesheim

Zellkultur:

Accutase	PAA Laboratories, Cölbe
DMEM F12 – Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid**)**	Sigma-Aldrich, München
DPBS (1x ohne Ca^{2+}, ohne Mg^{2+})	Invitrogen, Karlsruhe
Einfrierröhrchen	Corning B.V. Life Sciences,
FCS	Biowest S.A.S, Nuaillé, Frankreich

FCS-Gold	PAA Laboratories, Cölbe
HEPES (1M)	Lonza, Wuppertal
Hydrokortison-Lösung (50µM)	Sigma-Aldrich, München
ITS-Lösung (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin (200mM, 100x)	PAN-Biotech, Aidenbach
MEM Non essential Aminoacids (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
MEM Vitamine Solution (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Multipette	Eppendorf, Hamburg
NaCl (0,9%)	B. Braun, Melsungen
Neubauer-Zählkammer	Optik-Labor, Niederlande
Pasteurpipetten	
Penicillin/Streptomycin (10000u/ml)	PAN-Biotech, Aidenbach
PP-Röhrchen (15ml und 50ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Serologische Pipetten (5 - 50ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Steriles Wasser	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Trypsin/EDTA (10x)	PAN-Biotech, Aidenbach
Zellkulturflaschen, -schalen, -platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen
β-Estradiol	Sigma-Aldrich, München

2.4 Enzyme und Größenstandards

DNA:	
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GoTaq®Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Protein:	
Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker	GE Healthcare, München

2.5 Kits und Assays

cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA)	GE Healthcare, München
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
FastLane Cell cDNA Kit	Qiagen, Hilden
Histostain-SP Kit (AEC, Rabbit)	Invitrogen, Karlsruhe

Human IL-6 ELISA Kit	RayBiotech, Norcross, USA
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
MTT Cell Proliferation Assay	LGC Promochem, Wesel
Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Verwendete Primer

Die Primer wurden mit dem kostenlosen Internet-Programm „Primer 3“ entwickelt und dann als 100µM Lösung von der Metabion GmbH (Martinsried) bezogen.
Die in Tabelle 2.1 aufgeführten Maus-spezifischen Primer wurden für die Semiquantitative PCR (Abschnitt 3.4.3.1) verwendet:

Gen	Primersequenz	bp	T_{Anneal}
PDE1A	Forw. 5´-GCTTCCATTTTCTCCACTTTGTG-3´	361	60,5°C
	Rev. 5´-AGCCAACTCTTTCCACCTCTCT-3´		
PDE1B	Forw. 5´-TGGAGACAGGCTATGGGAAA-3´	680	56,5°C
	Rev. 5´-AGTCAGCACAGAGAAGGTTGG-3´		
PDE1C	Forw. 5´-TTTAGACAGGGTGACAGAGAAGC-3´	751	56°C
	Rev. 5´-AGGTAATGCGACTTGTGGAACT-3´		
PDE2A	Forw. 5´-CATTCTCTGCTTCCCTATCAAGA-3´	864	60°C
	Rev. 5´-TCATAACCCACTTCAGCCATCT-3´		
PDE3A	Forw. 5´-GAAGAAACACTTTGACTTTGTAGCC-3´	506	60,5°C
	Rev. 5´-GGTGCTGAGTTATTTGGCAGTAG-3´		
PDE3B	Forw. 5´-GAAACCCAAGAAGAAGAGACCAT-3´	732	59°C
	Rev. 5´-GCGAGAAAGATACAGATTCCAAG-3´		
PDE4A	Forw. 5´-AGGAGCGGGACTTACTGAAGA-3´	1057	59°C
	Rev. 5´-CCTTTGACCTTTGACTGTTCCAT-3´		
PDE4B	Forw. 5´-ATCACCTTGCTGTGGGATTC-3´	746	58,5°C
	Rev. 5´-AATGTCTATGTCAGTCTCTTCCAGA-3´		
PDE4D	Forw. 5´-ATGGAGATGACTTGATTGTGACC-3´	461	59°C
	Rev. 5´-CAACTTCTTGACCCCACTGAT-3´		
PDE5A	Forw. 5´-CCTGACTCTTTCTCTCGTGTGTT-3´	342	57°C
	Rev. 5´-CTGCTCATCATTTTGGTTGA-3´		
PDE7A	Forw. 5´-AACAGAAAGAAGAGGTTCCCATC-3´	807	61°C
	Rev. 5´-CCATCGTCAAGGTGTAAGTCAC-3´		

PDE7B	Forw. 5´-TCAAAACTAACCACCATCTTGC-3´ Rev. 5´-ATTCCTCACAGACCCTTTCACTC-3´	357	59°C
PDE8A	Forw. 5´-GAAACTCAGGGCTTGTAACTCAG-3´ Rev. 5´-CTTTTGGGTATGGTAAACTCCTTG-3´	256	61,5°C
PDE8B	Forw. 5´-GGAAGCCGTTACACATAAAAGG-3´ Rev. 5´-GAGGATTTGGTTCTCAGGAAAGT-3´	622	60°C
PDE9A	Forw. 5´-CACCTTTGATGTCTGGCTTTG-3´ Rev. 5´-CTGTTGCTTTGGTCACTTTGTCT-3´	758	60°C
PDE10A	Forw. 5´-CGGGTTCCTTACCACAACTG-3´ Rev. 5´-CCTGAAATCCACATTGCTGTCT-3´	770	60°C
GAPDH	Forw. 5´-GCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3´ Rev. 5´-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3´	493	58,5°C

Tabelle 2.1 Maus-spezifische Primer für die semiquantitative PCR

Die im Folgenden aufgeführten Primer für die Real-time PCR (Abschnitt 3.4.3.2) sind Intron-überspannend und ebenfalls Maus-spezifisch:

Gen	Primersequenz	bp	T_{Anneal}
PBGD	Forw. 5´-GGTACAAGGCTTTCAGCATCGC-3´ Rev. 5´-ATGTCCGGTAACGGCGGC-3´	138	57°C
SP-B	Forw. 5´-GCTGAGCGCTACACAGTTCTC-3´ Rev. 5´-AGTGTCCTGTAGTGGCCATTCT-3´	159	60°C
SP-C	Forw. 5´-CCTCCACATGAGTCAAAAACAT-3´ Rev. 5´-TGGTAGTCATACACAACGATGC-3´	150	57°C

Tabelle 2.2 Primer für die Real-time PCR

2.7 Verwendete Antikörper

In Tabelle 2.3 sind alle für Western Blot-Analysen (Abschnitt 3.5.5) verwendeten Antikörper (AK) aufgeführt. Sie wurden alle in 5% (w/v) Milch/TBST verdünnt.

Primäre Antikörper				
Antikörper	**Firma**	**Bestell-Nr.**	**Verdünnung Primär-AK**	**Verdünnung Sekundär-AK**
α-ERK 1/2	Santa Cruz	sc-93	1:1000	1:50000 (R)
α-Phospho-ERK 1/2	Santa Cruz	sc-16982-R	1:1000	1:40000 (M)
α-GAPDH	Novus	NB 600-502	1:5000	1:50000 (M)
α-p21	BD Pharmingen	556431	1:1000	1:30000 (M)
α-PDE1A	abcam	ab14599	1:500	1:25000 (R)
α-PDE4A	FabGennix	PD4-112AP	1:1000	1:45000 (R)
α-Phospho-PDE4A	FabGennix	PPD4-140AP	1:1000	1:40000 (R)
α-PDE4D	FabGennix	PD4-401AP	1:1000	1:45000 (R)
α-Phospho-PDE4D	FabGennix	PPD4-440AP	1:1000	1:35000 (R)
α-PDE5A	Cell Signaling	2395	1:1000	1:45000 (R)
α-PDE7A	Santa Cruz	sc-25566	1:2000	1:25000 (R)
α-Stat3	Cell Signaling	9132	1:1000	1:50000 (R)
α-Phospho-Stat3$_{Tyr705}$	Cell Signaling	9131	1:1000	1:50000 (R)
α-Phospho-Stat3$_{Ser727}$	Cell Signaling	9134	1:1000	1:50000 (R)
Sekundäre Antikörper (Peroxidase gekoppelt)				
Goat α-Rabbit (R)	Pierce (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) [Bestell-Nr. 31460]			
Rabbit α-Mouse (M)	Sigma-Aldrich, München [Bestell-Nr. A9044]			

Tabelle 2.3 Im Western Blot verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen

3. Methoden

3.1 Modell für Hyperoxie der Lunge in der Maus

Die Durchführung sämtlicher tierexperimenteller Versuche, welche in Abschnitt 3.1 beschrieben sind, erfolgte durch die Tierärztin Silke Köbrich (AZ GI 20/10 Nr. 04/2006).

3.1.1 Tiere

Für die Versuche wurden C57Bl6N Mäuse verwendet. Die trächtigen weiblichen Mäuse (embryonaler Tag 15: E15) wurden von Charles River (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Bis zum Entbindungstag (E19) wurden die Tiere mit Futter und Wasser in einer Umgebungsluft mit 21% Sauerstoff (normaler Sauerstoffpartialdruck) gehalten.

3.1.2 Hyperoxie-Exposition

Innerhalb von 12h nach der Geburt wurden die neugeborenen Mäuse in Studiengruppen randomisiert und unter kontrollierten Bedingungen einer Hyperoxie von 85% O_2 bzw. Raumluft von 21% ausgesetzt. Da sich 85% O_2 toxisch auf die Muttertiere auswirkt, wurden diese alle 24h zwischen den hyperoxischen und den Kontrolljungtieren ausgetauscht. Die Haltung der Tiere erfolgte für 28 Tage in Plexiglas-Kammern (Merck), welche mit einer Flussrate von 3,5 l/min mit Sauerstoff begast wurden. Der kontinuierliche Fluss von entweder 85% O_2 oder 21% O_2 wurde mit Pro:Ox 110 Sauerstoff-Sensoren (Biosherix; Redfield, NY) überwacht und so konstant gehalten.

3.1.3 Gewebepräparation

Nach 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Natriumpentobarbital betäubt. Danach wurde der Thorax geöffnet und die Lunge wurde entweder mit NaCl-Lösung gespült und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren oder sie wurde über einen Katheter durch die Luftröhre mit 4,5% Formaldehyd fixiert. Nach der Fixierung der Lungen über Nacht, wurden sie mit Hilfe eines automatischen Vakuum-Gewebeprozessors (Leica TP1050, Bensheim) in PBS gewaschen und danach durch steigende Alkoholkonzentrationen dehydriert. Letztendlich wurden sie in Paraffin eingebettet.

3.1.4 Quantitative Analyse der Lungenmorphometrie

Dafür wurden zunächst 3µm dicke Gewebeschnitte der in Paraffin eingebetteten Lungen angefertigt. Diese wurden im Anschluss mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt und dann unter dem Lichtmikroskop (Leica DMLA) betrachtet. Die morphometrischen Messungen wurden am Computer mit Hilfe einer speziellen Leica QWin Analyse-Software durchgeführt. Zunächst wurde der gesamte Schnitt bei 5facher Vergrößerung eingescannt und dann in ein Raster eingeteilt, welches aus 870 x 690µm großen Analysefeldern bestand. Bei Gewebeschnitten 28 Tage alter Mäuse wurden 40 bis 45 Felder mehrerer Schnitte bei einer 10fachen Vergrößerung vermessen. Das Lungengewebe wurde durch eine stärkere Farbintensität von den Lufträumen unterschieden. Dann wurden der Luftanteil blau und der Gewebeanteil grau eingefärbt. Im Anschluss wurden nicht-parenchymatöse Bereiche wie Bronchien und Gefäße in jedem Analysefeld umrandet und so von der Analyse ausgeschlossen. Bei der Vermessung der Respiratorischen Fläche wurden Parameter wie der Mean Linear Intersept (MLI), das heißt der mittlere Abstand zwischen zwei Alveolarsepten, die mittlere Septendicke und der Gesamtluftanteil im Lungengewebe untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte in Excel.

3.1.5 Messung der dynamischen Compliance

Bei der Messung der Compliance wird die Elastizität des Lungengewebes gemessen. Wenn die Lunge besonders dehnbar ist, besitzt sie eine hohe Compliance, ist sie eher steif ist die Compliance niedriger.
Die Untersuchung der Lungenfunktion erfolgte an 28 Tage alten normoxischen Kontrolltieren, DMSO behandelten hyperoxischen Tieren und Cilomilast behandelten hyperoxischen Tieren. Die Tiere wurden bei ausreichender Analgosedierung unter Ketamin und Xylazin (50µg Ketamin/g / 10µg Xylazin/g) über die Luftröhre intubiert und dann in einer temperierten Atembox (Bodyplethysmograph) mit einem Tidalvolumen von 6ml/kg mechanisch beatmet. Die dynamische Compliance (C_{dyn}) wurde durch eine Volumen-kontrollierte und Druck-limitierte Compliance-Methode (150) bestimmt. Am Versuchsende wurden die Tiere medikamentös in tiefer Analgosedierung getötet.

3.1.6 Verabreichung des PDE4-Inhibitors

Für die Untersuchungen mit dem PDE-Inhibitor Cilomilast (Altana Pharma) wurde eine Gruppe hyperoxischer Tiere mit dem Inhibitor behandelt. Das Cilomilast wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und einmal täglich von Tag 14 bis Tag 28 in einer Konzentration von 5mg/kg Körpergewicht durch eine subkutane Injektion in den Nacken der Tiere

verabreicht. Um Effekte durch das Lösungsmittel DMSO ausschließen zu können, wurde einer weiteren Gruppe hyperoxischer Tiere in gleicher Weise durch eine Injektion mit DMSO behandelt.

3.2 Kultivierung von Zelllinien

3.2.1 A549

Die A549 Zellen (ATCC CCL-185) wurden in DMEM/F-12-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium: F-12 Nutrient Mixture 1:1) mit Vitaminen (1%), Penicillin/Streptomycin (1%), MEM nicht-essentiellen Aminosäuren (1%), Glutamin (1%) und 10% Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C mit 5% CO_2 in Zellkulturflaschen (75cm^2 Kulturfläche) kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 8ml DPBS gewaschen. Nach entfernen des PBS wurden die Zellen mit 2ml Trypsin/EDTA für 1min bei 37°C inkubiert bis sie sich von der Oberfläche abgelöst haben. Dann wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 8ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen zur Zellerhaltung im Verhältnis 1:10 in neue Zellkulturflaschen verteilt und 48-72h inkubiert.

3.2.2 MLE12

Die MLE12 Zellen (ATCC CRL-2110) wurden in DMEM/F-12-Medium mit Hydrokortison (10nM), Hydrobeta-Östrogen (10nM), Penicillin/Streptomycin (1%), ITS-Lösung (1%; enthält 5µg/ml Insulin, 10µg/ml Transferrin und 30nM Na-Selenit), Glutamin (1%), HEPES (10mM) und 2% fötalem Kälberserum (FBS „Gold“) bei 37°C mit 5% CO_2 in 10cm Zellkulturschalen kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 8ml DPBS gewaschen. Nach entfernen des PBS wurden die Zellen mit 2ml Accutase für 2-5min bei 37°C inkubiert bis sie sich von der Oberfläche abgelöst haben. Dann wurden 8ml Kulturmedium zu den Zellen gegeben und diese zur Zellerhaltung im Verhältnis 1:10 in neue Zellkulturschalen verteilt und 48h inkubiert.

3.3 Zellinkubation

3.3.1 Hyperoxie-Exposition

Vor der Aussaat der Zellen wurde zunächst die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Im Anschluss wurden 2 x 10^5 bis 1 x 10^6 Zellen in 6 Well Platten bzw. 10cm Schalen ausgebracht und ca. 24h inkubiert. Vor Beginn des Experiments wurde das Medium der Zellen durch frisches ersetzt und die Zellen in die Hyperoxie-Kammer (Modular Incubator Chamber, Billups-Rothenberg inc., Del Mar, Kalifornien) gestellt. Zur Aufrechterhaltung der Luftfeuchtigkeit in der Kammer wurde eine Schale mit sterilem Wasser hinzugefügt. Anschließend wurde die Kammer mit 95% O_2 + 5% CO_2 (Carbogen) gefüllt, verschlossen und für bis zu 48h in den Zellinkubator gestellt. Das Gas wurde über den gesamten Versuchszeitraum alle 8h erneuert.

3.3.2 Inkubation mit chemischen Substanzen

Vor der Behandlung der Zellen mit IL-6 (Interleukin-6, Sigma) oder mit Cilomilast (Altana-Pharma), wurden die Substanzen zunächst in Zellkulturmedium verdünnt und danach steril filtriert.

Cilomilast ist nur in DMSO löslich und musste daher stark verdünnt werden, um auf die Zellen nicht toxisch zu wirken. Nach dem Aussähen der Zellen am Vortag, wurden sie dann für 24h bis 48h unter Normoxie bzw. Hyperoxie mit verschiedenen Cilomilastkonzentration inkubiert.

Die Inkubationszeit mit IL-6 betrug 30min bis 48h.

3.4 Untersuchung der Genexpression

3.4.1 Isolation der Gesamt-RNA

Für die Isolation von RNA aus Gewebe wurden ca. 100-200mg Gewebe zusammen mit 1ml TRIzol (Invitrogen) in ein 2ml Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Dispergiergerät auf Eis zerkleinert.

Bei der Isolation aus Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und danach mit 8ml PBS gewaschen. Für Zellen in einer 10cm Schale wurde 1ml TRIzol auf die Zellen gegeben und diese dann mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

Daraufhin wurden die Proben für 10min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen und im Anschluss mit 200µl Chloroform versetzt. Nachdem die Proben durch invertieren gemischt wurden, erfolgte eine weitere 10min Inkubation bei RT. Nach der anschließenden 15min Zentrifugation bei 12000g, 4°C wurde die obere wässrige Phase in ein neues Tube überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Die Tubes wurden wiederum durch invertieren gemischt und weitere 10min bei RT inkubiert. Die ausgefallene RNA wurde im nächsten Schritt durch eine 10min Zentrifugation bei 12000g, 4°C pelletiert und danach mit 1ml 75% Ethanol gewaschen. Nachdem die RNA-Pellets an der Luft getrocknet waren, wurden sie in 20-50µl DEPC-Wasser resuspendiert und für 10min im Wasserbad bei 55°C vollständig gelöst. Die Messung der RNA-Konzentration und –Reinheit erfolgte mit dem NanoDrop-Spektrophotometer. Die anschließende Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.4.2 Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der Synthese von komplementärer DNA (cDNA) wird die mRNA in zwei Schritten in cDNA umgeschrieben. Dafür wird die RNA im ersten Schritt mit einem oligo$(dT)_{15}$-Primer inkubiert, welcher an den 3´ poly(A)-Schwanz der mRNA bindet. Im zweiten Schritt erfolgt dann die cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase (RT), welche an den Primer bindet und ihn zu einem komplementären DNA-Strang verlängert.
Die cDNA wurde mit Hilfe des ImProm-II™ Reverse Transcription Systems aus der isolierten Gesamt-RNA hergestellt. Dafür wurden zunächst alle RNA-Proben, durch die Verdünnung mit DEPC-H_2O, auf eine einheitliche Konzentration von 1µg Gesamt-RNA angeglichen und dann in einem Volumen von 5µl mit dem Oligo(dT)-Primer bei 70°C für 6min im Thermocycler inkubiert. Daraufhin wurde der Mastermix mit der Reversen Transkriptase hergestellt und im Anschluss zum RNA-Primer-Gemisch gegeben. Dann erfolgte eine weitere Inkubation im Thermocycler für zunächst 5min bei 25°C, dann 1h bei 42°C und letztendlich 15min bei 70°C für die Inaktivierung des RT-Enzyms. Anschließend wurde die cDNA bei -20°C gelagert und später für PCR-Experimente verwendet.
Im Folgenden werden der Reaktionsansatz sowie das Programm der RT-PCR wieder gegeben:

Schritt 1:

Komponenten:	Volumen:	Endkonz.:	Programm:
RNA [1µg/µl]	1µl	1µg	6min 70°C
oligo(dT)$_{15}$-Primer [500µg/ml]	1µl	25ng	
DEPC-H_2O	3µl		
	5µl		
Schritt 2:			
Reaktionspuffer [5x]	4µl		5min 25°C
$MgCl_2$ [25mM]	2µl	2,5mM	1h 42°C
dNTP-Mix [10mM]	1µl	0,5mM	15min 70°C
Ribonuklease-Inhibitor [40U/µl]	1µl	2U/µl	
Reverse Transkriptase	1µl		
DEPC-H_2O	6µl		
	15µl		
Gesamt:	20µl		

3.4.3 PCR

3.4.3.1 Semiquantitative PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Methode, bei welcher kurze DNA-Abschnitte wie z.B. einzelne Gene durch wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase vervielfältigt werden können.

Die Untersuchung der PDE-Gentranskription erfolgte mit der semiquantitativen PCR, bei der das Endprodukt der PCR im Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe von interkalierenden DNA-Farbstoffen sichtbar gemacht wird.

Als Template diente die cDNA, die aus der RNA der Gewebe bzw. Zellen synthetisiert wurde. Der PCR-Reaktionsansatz, der sich aus dem einfach-konzentrierten Reaktionspuffer; 1,5mM $MgCl_2$; 0,2mM dNTP-Mix (bestehend aus allen 4 Desoxy-Nukleotiden dATP, dGTP, dCTP und dTTP), jeweils 0,2µM eines forward- und reverse-Primers; 1,25U einer thermostabilen Taq DNA-Polymerase und 1,5µl der hergestellten cDNA zusammensetzte, wurde im Anschluss im Thermocycler für 30 Vervielfältigungszyklen inkubiert. Danach wurden die PCR-Produkte einer Agarose-Gel-Elektrophorese unterzogen. Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes und das verwendete Programm sind im Folgenden aufgeführt:

Ansatz:

Komponenten:	Volumen:	Endkonz.:
Reaktionspuffer [5x]	5µl	1x
$MgCl_2$ [25mM]	1,5µl	[1,5mM]
dNTP-Mix [10mM]	0,5µl	[0,2mM]
forward Primer [10µM]	0,5µl	[0,2µM]
reverse Primer [10µM]	0,5µl	[0,2µM]
Taq Polymerase [5U/µl]	0,25µl	[1,25U]
cDNA [1µg/µl]	1,5µl	
H_2O	15,25µl	
Gesamt:	25µl	

Programm:

Abschnitt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturieren	94°C	5min	
Denaturieren	94°C	1min	30 x
Annealing	57-61°C	1min	
Elongation	72°C	1min	
Elongation	72°C	10min	
Kühlen	4°C	∞	

3.4.3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden diese im Anschluss an die PCR in einem Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt. Das meist 1%ige Gel wurde aus Agarose (Sigma) und 1 x TAE-Puffer (Tris-acetat 40mM; EDTA 1mM; pH 7,6) hergestellt. Nach Kochen der Agarose in der Mikrowelle wurde diese auf etwa 60°C abgekühlt und dann mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) versetzt. Als das Gel erstarrt war, wurden 5µl eines DNA-Standards und 5-10µl des PCR-Produkts auf das Gel geladen. Nachdem sich die PCR-Produkte bei einer Spannung von 100V aufgetrennt hatten, wurde das Gel unter UV-Licht bei 320nm im BioDocAnalyzer fotografiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Banden mit der BioDocAnalyze-Software.

3.4.3.2 Quantitative PCR (Real-time PCR)

Die quantitative real-time PCR beruht auf denselben Grundlagen wie die PCR und bietet zudem die Möglichkeit der Quantifizierung. Diese erfolgt durch Messungen der Fluoreszenz, die während des PCR-Laufes proportional mit dem PCR-Produkt zunimmt.

In dieser Arbeit wurde SYBR®Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dieser ist, wie auch Ethidiumbromid, ein relativ unspezifischer DNA-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und dadurch stärker fluoresziert als im ungebundenen Zustand. Während der proportionalen Zunahme doppelsträngiger DNA-Moleküle lagert sich immer mehr SYBR®Green I an die DNA an und steigert so die Fluoreszenz.

Um die Spezifität der Reaktion und die Gegenwart von Primer-Dimeren oder Verunreinigungen zu überprüfen, wird am Ende des PCR-Laufes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei dieser wird die Temperatur von 55°C bis 95°C in kleinen Schritten kontinuierlich erhöht, so dass doppelsträngige DNA zum Einzelstrang aufschmilzt und der SYBR®Green I-Farbstoff wieder freigesetzt wird. Da spezifische PCR-Produkte eine größere Fragmentlänge aufweisen als unspezifische Primer-Dimere oder andere unspezifische Produkte, können diese anhand der Schmelztemperatur voneinander unterschieden werden.

Für die Herstellung des Reaktionsansatzes wurde der Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix-UDG der Firma Invitrogen verwendet. Die Durchführung der Real-time PCR erfolgte mit dem Mx3000P® QPCR System der Firma Stratagene.

Im Folgenden werden der Reaktionsansatz sowie das Programm der Real-time PCR wiedergegeben:

Ansatz:

Komponenten:	Volumen:	Endkonz.:
Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix-UDG	12,5µl	1x
$MgCl_2$ [50mM]	1µl	5mM*
forward Primer [10µM]	0,5µl	0,2µM
reverse Primer [10µM]	0,5µl	0,2µM
ROX Reference Dye [25µM]	0,1µl	0,1µM
cDNA [0,25µg/µl]	2µl	0,5µg
DEPC-H_2O	8,4µl	
Gesamt:	25µl	

*Da der SuperMix bereits 3mM $MgCl_2$ enthält, wurde für eine Endkonzentration von 5mM $MgCl_2$ nur 1µl $MgCl_2$ [50mM] pipettiert.

Programm:

Abschnitt:	Temperatur:	Dauer:	Wiederholungen:
Denaturieren	95°C	10min	
Denaturieren	95°C	30sec	40 x
Annealing	57/60°C	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
Denaturierung	95°C	1min	
Schmelzkurve	55°C-95°C		
Abkühlen	25°C	∞	

Die Berechnung der Real-time PCR-Ergebnisse erfolgte nach der Delta-Delta Ct-Methode.

3.5 Untersuchung der Proteinexpression

3.5.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Für die Extraktion von Proteinen aus Lungengewebe wurden ca. 150mg Gewebe in 1ml kaltem Lysispuffer (50mM Tris, 10mM $CaCl_2$, 150mM NaCl, 60mM NaN_3, 1% Triton X-100, 15% Protease-Inhibitor, 1mM PMSF, 1mM Na-Orthovanadat) mit dem Dispergiergerät oder dem Homogenisator homogenisiert. Um zu verhindern, dass sich die Proben zu sehr erwärmen wurden sie während der Homogenisierung immer wieder auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Gewebereste für 30min bei 13000rpm, 4°C pelletiert und der Überstand in ein neues Tube überführt. Das Pellet wurde verworfen. Danach wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt, die Proteinlösung aliquotiert und im Anschluss bei -80°C gelagert.

3.5.2 Proteinextraktion aus Zellen

Vor Beginn der Isolation wurden die Zellen zunächst einmal mit 8ml PBS gewaschen. Danach wurden die 10cm-Zellkulturschalen auf Eis gestellt und mit 200-250µl RIPA Lysispuffer (Santa Cruz) (50mM Tris; 150mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Na-Deoxycholat; 0,1% SDS; 0,004% Na-Azid; 2% Protease-Inhibitor; 2mM PMSF; 1mM Na-Orthovanadat) lysiert. Nach einer ca. 10-20min Inkubation auf Eis, wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale entfernt und in ein neues Eppendorftube pipettiert. Nach mehrmaligem vortexen erfolgte eine 30min Zentrifugation bei 13000rpm, 4°C. Im Anschluss wurde der Protein-

überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dessen Proteinkonzentration bestimmt und in Aliquots bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC Protein Assay von Bio-Rad verwendet, der auf dem Prinzip des Lowry-Assays (151) basiert.
Vor der Messung der Konzentration wurden die Proteinproben aus Gewebe im Verhältnis 1:20 bis 1:40 und die Proteine aus Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:10 in H_2O vorverdünnt. Als Standard wurde eine BSA-Lösung (2mg/ml) von Bio-Rad verwendet. Aus dieser wurde eine Standardreihe von 0,2mg/ml bis 1,6mg/ml hergestellt. Für den Leerwert wurde der Lysispuffer im gleichen Verhältnis wie die Proteinproben in Wasser verdünnt. Dann wurde der Assay in eine 96-well Mikroplatte pipettiert. Zunächst wurden jeweils 5µl des Leerwerts, der Standardreihe und der verdünnten Proteinproben im Duplikat in die Wells pipettiert. Anschließend wurden 25µl von Reagenz A (vorher wurde 1ml Reagenz A mit 20µl Reagenz S gemischt) und danach 200µl von Reagenz B in jedes Well gegeben. Dann wurde die 96-well Platte in das ELISA-Messgerät gestellt und zunächst für 15min unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 750nm im ELISA-Messgerät. Die Berechnung der Standardkurve und der Proteinkonzentrationen erfolgte mit der Magellan™ Standard-Software von Tecan.

3.5.4 SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (152) werden vorher denaturierte Proteine in einem denaturierenden Gel der Größe nach aufgetrennt.
Das Sammel- und Trenngel setzen sich wie folgt zusammen:

Sammelgel:		**Trenngel:**	
Komponente:	Endkonz.:	Komponente:	Endkonz:
Tris/Cl pH 6,8	125mM	Tris/Cl pH 8,9	375mM
Acrylamid	6%	Acrylamid	7-15%
SDS	0,1%	SDS	0,1%
APS	0,05%	APS	0,05%
TEMED	0,1%	TEMED	0,1%

Die Proteine wurden zunächst an eine einheitliche Proteinkonzentration angeglichen und im Anschluss mit einem 5fach konzentrierten SDS-Probenpuffer (375mM Tris; 10% SDS; 12,5% β-Mercaptoethanol; 50% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau) versetzt. In diesem denaturierenden und reduzierenden Puffer wurden die Proteine anschließend für 10min bei 100°C im Thermoblock gekocht. Nach einer kurzen Zentrifugation, bei der mögliche Präzipitate pelletiert wurden, waren die Proben fertig für die Elektrophorese. Je nachdem, welches Protein detektiert werden sollte, wurden zwischen 30 und 60µg Gesamtprotein im Gel bei 130V aufgetrennt. Der Laufpuffer setzte sich aus 25mM Tris, 192mM Glycin und 0,1% SDS zusammen.

3.5.5 Western Blot

Der Western Blot oder Immunoblot ist eine Methode zur spezifischen Detektion von Proteinen, die vorher auf eine Membran übertragen wurden.

Dafür wurde das Mini Trans-Blot Cell-System von Bio-Rad verwendet. Dabei handelt es sich um ein Nass- oder Tankblot-System, bei dem der Proteintransfer vertikal in einem Tank gefüllt mit Blot-Puffer stattfindet. Vor dem Zusammenbau des Blots, wurden eine Nitrozellulose-Membran, 2 dünne Filterpapiere, 2 Kunststofffaserpads und das Gel in Blot-Puffer (25mM Tris; 80mM Glycin; 20% Methanol) equilibriert. Dann wurde der Blot in der Blot-Kassette in der Reihenfolge Kunststofffaserpad – Filterpapier – Membran – Gel – Filterpapier – Kunststofffaserpad zusammen gebaut und in das Elektrodenmodul gesteckt. Nachdem der Puffertank mit Puffer gefüllt und ein Kühlakku hinzugefügt war, wurde der Transfer für 1h bei 100V durchgeführt.

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran in 5% Milch (in TBST) geblockt, wobei unspezifische Bindungen abgesättigt wurden. Die Inkubation im Primärantikörper, der in 5% Milch verdünnt wurde, erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 3 x 8 bis 10min in TBST (20mM Tris; 137mM NaCl; 0,1% Tween 20) gewaschen und dann für 1h in Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (in 5% Milch) inkubiert. Danach wurde die Membran wiederum für 3 x 8 bis 10min in TBST gewaschen und dann kurz mit Aqua dest abgespült. Zur Entwicklung des Western Blots wurde das Peroxidase-Substrat ECL Plus von GE Healthcare verwendet, in welchem die Membran 5min inkubiert wurde. Danach wurden mehrere Chemilumineszenz-Filme für 1-10min auf der Membran exponiert und danach mit der Entwicklermaschine entwickelt. Zur Auswertung wurde der Film mit dem BioDocAnalyzer fotografiert und die Banden mit der BioDocAnalyze-Software quantifiziert.

Wenn die Membran ein zweites Mal mit einem anderen Antikörper inkubiert werden sollte, wurde diese gestrippt. Das heißt, die gebundenen Antikörper wurden durch 30min Inkubation bei 60°C im Stripping-Puffer (62,5mM Tris; 2% SDS; 0,8% β-Mercaptoethanol) entfernt („gestrippt"). Danach wurde die Membran 3 x 10min in TBST gewaschen und danach wieder für 1h in 5% Milch geblockt. Danach wurde sie, wie schon beschrieben, mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und entwickelt.

3.6 Immunhistochemie

Um heraus zu finden in welchen Zellen eines Gewebes ein bestimmtes Protein exprimiert und somit lokalisiert ist, wird eine immunhistochemische Färbung durchgeführt.
Dafür wurden am Mikrotom zunächst 3µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die dann auf einen Objektträger überführt und getrocknet wurden. Die Schnitte wurden aus Lungen angefertigt, die vorher in Paraffin eingebettet worden sind. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dann zunächst bei 60°C für 30 – 40min entparaffiniert. Die anschließende 3 x 10min Inkubation in Xylol diente ebenfalls der Entfernung des Paraffins. Dann wurden die Schnitte einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 5min 100%; 2 x 5min 95%; 2 x 5min 70%; 2 x 5min 30% EtOH) unterzogen und so rehydriert. Nach zwei 5min Waschschritten in PBS (150mM NaCl; 1,7mM KH_2PO_4; 5,2mM Na_2HPO_4, pH 7,4), wurden die Schnitte für 20min in einer Zitratpufferlösung, pH 6,0 gekocht und so das Antigen demaskiert. Nachdem die Schnitte aus dem kochenden Wasserbehälter genommen wurden, kühlten sie für 5min ab und wurden dann für 5min in PBS gespült. Anschließend erfolgte das Blockieren der endogenen Peroxidase durch 20min Inkubation in 3% H_2O_2. An diesen Schritt schlossen sich zwei 5min PBS-Waschschritte an. Dann wurde die Flüssigkeit rund um die Schnitte vorsichtig entfernt und das Gewebe vorsichtig mit einem PAP-Stift umrandet.
Ab dem nächsten Schritt, dem Blocken, wurde das Histostain-SP Kit der Firma Zymed/Invitrogen verwendet. So wurden auf jeden Schnitt 2-3 Tropfen bzw. 100µl der Serum-Blocklösung gegeben und für 10-15min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit, wurde die Blocklösung mit einem Tuch aufgesaugt und ca. 100µl des primären Antikörpers in der gewünschten Verdünnung auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte dann bei 4°C über Nacht in einer Feuchtekammer.

Verwendeter Antikörper	**Verdünnung**
α-PDE4A (FabGennix)	1:75
α-PDE4D (abcam)	1:75

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst für 30min auf RT erwärmt und anschließend dreimal für 5min in PBS gewaschen. Daran schloss sich eine 10min Inkubation mit 100µl des sekundären biotinylierten Antikörpers an. Nach weiteren zwei 5min PBS-Waschschritten erfolgte die Inkubation mit 100µl des Streptavidin-Peroxidase Konjugats für 10min. Vor der Zugabe des Substrats wurden die Schnitte erneut 2 x 5min in PBS gewaschen. Nach der Herstellung des Substrat-Chromogen AEC-Mixes aus 3 Lösungen des Kits, wurden ca. 100µl dieses Mixes auf die Schnitte gegeben und unter Beobachtung vor einem weißen Blatt Papier für 2-10min inkubiert. Zum Stoppen der Färbung wurden die Schnitte in PBS überführt und für 5min gewaschen. Für die Gegenfärbung wurden anschließend 100µl Hämatoxylin-Lösung auf die Schnitte gegeben und für 1-2min inkubiert. Danach wurde zweimal 5min in Aqua dest gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte mit 2 Tropfen GVA-Eindeckmedium und einem Deckgläschen bedeckt. Bis zur mikroskopischen Auswertung der Färbung am nächsten Tag, wurden die Schnitte dunkel bei RT in einer Mappe für Objektträger gelagert.

3.7 cAMP-Enzymimmunassay (EIA)

Für die Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurde das cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System von GE Healthcare verwendet.

Der Assay ist kompetitiv und basiert darauf, dass unmarkiertes cAMP mit einer definierten Menge von Peroxidase-gekoppeltem cAMP um eine begrenzte Anzahl von Bindestellen an einem cAMP-spezifischen Antikörper konkurriert. Das heißt, je mehr unmarkiertes cAMP in der Probe vorhanden ist, desto weniger Peroxidase-gekoppeltes cAMP kann an den Antikörper binden.

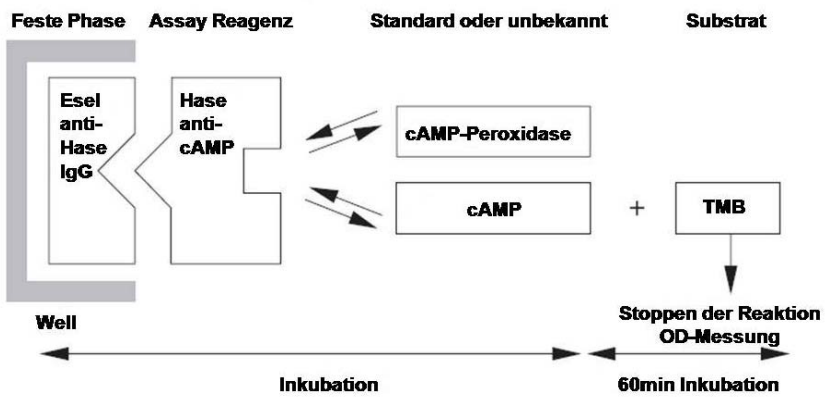


Abbildung 3.1 Prinzip des Enzymimmunassays

Für den Assay wurden zunächst ca. 24h vor Versuchsbeginn 7 x 10^3 Zellen in 96-well Platten ausgesäht. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24h bzw. 48h der Hyperoxie bzw. 21% O_2 ausgesetzt.

Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und es wurden 200µl des Lysispuffers mit 0,5mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine), einem unspezifischen PDE-Inhibitor, auf die Zellen gegeben. Dann wurde die 96-well Platte für 15min auf einen Mikroplatten-Schüttler gestellt, um die Zelllyse zu erleichtern.

Inzwischen wurde die Standardreihe im Bereich von 12,5fmol – 3200fmol hergestellt. Dann wurden jeweils 100µl des Standards und der Zelllysate und 100µl des Anti-cAMP-Serums im Duplikat in die Wells der mit anti-Hasen IgG beschichteten 96-well Platte pipettiert. Nach kurzem Mischen auf dem Schüttler, wurde der Assay für 2h auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte die Zugabe von 50µl cAMP-Peroxidase-Konjugat und die Platte wurde erneut gemischt und dann für weitere 60min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Wells viermal mit jeweils 400µl Waschpuffer gewaschen und am Ende auf einem Tuch abgetrocknet. Nach sofortiger Zugabe von 150µl des TMB-Enzymsubstrats wurde die Platte für genau 60min auf dem Mikroplattenschüttler bei RT inkubiert. Dabei entwickelte sich eine Blaufärbung, die am Ende der Inkubation bei 630nm im ELISA-Messgerät gemessen werden konnte. Um die Reaktion jedoch zu stoppen wurden 100µl 1M Schwefelsäure in jedes Well pipettiert, was zu einem Gelbumschlag führte. Danach wurde die optische Dichte bei 450nm im ELISA-Messgerät bestimmt. Die Berechnung der Standardkurve und der cAMP-Konzentrationen erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 8.0.

3.8 MTT Proliferationsassay

Um die Vitalität bzw. die Anzahl lebender Zellen nach Behandlung mit einer chemischen Substanz zu bestimmen, kann ein MTT-Proliferationstest durchgeführt werden. Bei diesem Assay wird das gelbe Tetrazolium MTT (3- (4, 5-Dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid) durch metabolisch aktive Zellen zum violetten wasserunlöslichen Formazan reduziert, welches gelöst und spektrophotometrisch quantifiziert werden kann.

Dazu wurde der MTT Proliferation Assay der Firma ATCC/LGC Promochem verwendet. Zu Beginn wurden 7 x 10^3 bis 1,5 x 10^4 Zellen im Dreifachansatz in einem Volumen von 100µl in 96-well Platten ausgesäht. Am nächsten Tag, ca. 24h später, wurden die Zellen für 24h bis 48h serumfrei gesetzt. Danach erfolgte die Inkubation mit verschiedenen Cilomilast-Konzentrationen unter Kontroll- bzw. hyperoxischen Bedingungen für 24h bzw. 48h. Am Ende der Inkubationszeit wurden jeweils 10µl des MTT-Reagenzes in jedes Well pipettiert und die Zellen für weitere 2-4h unter Normoxie bzw. Hyperoxie inkubiert. Nach maximal 4h

wurden die Zellen durch Zugabe von 100µl Detergenz-Lösung lysiert und die violetten Formazan-Präzipitate gelöst. Zur vollständigen Auflösung des Formazans wurden die Platten in Aluminiumfolie eingepackt und über Nacht bei RT stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Absorption bei 570nm im ELISA-Messgerät bestimmt. Bei der Auswertung wurde die Absorption des Leerwertes von der Absorption der übrigen Messwerte abgezogen.

3.9 Phosphodiesterase-Aktivitätsassay

Der Phosphodiesterase-Aktivitätsassay (PDE-Assay) wurde mit leichten Modifikationen nach dem Protokoll von Thompson *et al.* (153) durchgeführt.

Das Prinzip des Assays besteht aus zwei enzymatischen Reaktionen. In Reaktion 1 hydrolysiert die PDE4 [^{3}H]-markiertes cAMP zu [^{3}H]-AMP. In der zweiten Reaktion wird der Phosphatrest des entstandenen 5´-Nukleotids durch eine 5´-Nukleotidase des Schlangengiftes von *Crotalus atrox* abgespalten, wobei das ungeladene Nukleosid [^{3}H]-Adenosin entsteht. Im Folgenden werden beide Reaktionen noch einmal wieder gegeben:

Reaktion 1:

$$[^3H]\text{-cAMP} + H_2O \xrightarrow{\text{PDE4}} [^3H]\text{-AMP}$$

Reaktion 2:

$$[^3H]\text{-AMP} + H_2O \xrightarrow{\text{5´-Nukleotidase}} [^3H]\text{-Adenosin} + P_i$$

Dann wird das [^{3}H]-Adenosin durch eine QAE Sephadex A25 Anionenaustauschersäule von nicht umgesetzten [^{3}H]-cAMP bzw. [^{3}H]-AMP abgetrennt. Dabei bindet negativ geladenes [^{3}H]-cAMP und [^{3}H]-AMP an die Säule und [^{3}H]-Adenosin wird im Anschluss mit Ammoniumformiat (NH_4COOH) in Szintillationsgefäße eluiert.

Versuchsdurchführung:

Zunächst wurde das Protein mit 250µl Lysispuffer (20mM Tris-HCl pH 8,2; 140mM NaCl; 3,8mM KCl; 1mM $MgCl_2$; 1mM EGTA; 1mM β-Mercaptoethanol; 15% Protease-Inhibitor; 5µM Trypsininhibitor; 10µM Leupeptin; 10µM Pepstatin A; 2mM Benzamidin; 50µM PMSF) aus den Zellen isoliert. Dann wurde die Proteinkonzentration in jeder Probe auf 20µg Gesamtprotein in einem Volumen von 10µl angeglichen.

Danach wurde der Testmix, bestehend aus 40mM Hepes pH 7,6; 5mM $MgCl_2$ und 0,1% BSA, hergestellt.

Im Anschluss wurden 65µl des Testmixes in einer 96-well Mikroplatte vorgelegt. Nachdem im Anschluss jeweils 10µl Proteinlösung in jedes Well pipettiert wurden, erfolgte die Zugabe des Inhibitors. Als unspezifischer PDE-Hemmer, welcher fast alle PDEs inhibiert, wurden 200µM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) verwendet. Als spezifischer PDE4-Hemmer wurden 10µM Rolipram eingesetzt. Dann erfolgte die Zugabe des radioaktiven Substrates. Dafür wurde ein Gemisch aus 1µM cAMP und 18,2nCi (40000cpm) [^{3}H]-cAMP in die Wells pipettiert. Dann wurde die Mikroplatte für 15min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nachdem die Platte zum Stoppen der Reaktion für 3min in ein 100°C heißes Wasserbad gestellt wurde, erfolgte eine kurze Abkühlung auf Eis. Dann wurden 25µl der 5´-Nukleotidase (2mg/ml) hinzugegeben und die zweite Reaktion für 30min unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die QAE-Sephadex A25-Säulen zunächst mit 5ml HCl gespült und danach mit 30mM Ammoniumformiat pH 6,0 equilibriert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das gesamte Reaktionsvolumen auf die Säulen gegeben und danach mit 1ml 30mM Ammoniumformiat in mit 2ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Szintillationsgefäße eluiert. Als Leerwert wurde der Testmix inkl. dem [3H]-cAMP-Gemisch verwendet. Im Anschluss wurden die Gefäße gut gemischt und die Menge an [^{3}H]-Adenosin im Betacounter ausgezählt. Die Säulen wurden zur Regeneration mit 5ml 0,2M HCl gespült und danach in 10mM NaOH bei 4°C gelagert.

3.10 IL-6 - ELISA

Zur Bestimmung der IL-6-Freisetzung von Zellen ins Medium wurde ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Dabei handelte es sich um einen „Sandwich"-ELISA, bei dem zwei gegen IL-6 gerichtete Antikörper verwendet werden. Der erste ist an eine feste Phase d.h. das Well der Mikroplatte gebunden und bindet das Antigen (IL-6) an einer Stelle. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym zur Detektion gekoppelt und bindet das Antigen an einer anderen Stelle. Durch Zugabe des Enzymsubstrates kann die Menge an gebundenem Antigen quantifiziert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete IL-6 ELISA Kit wurde von der Firma RayBiotech bezogen.

Für den ELISA wurde das Zellkulturmedium verwendet, in dem die Zellen verschieden lang unter normoxischen bzw. hyperoxischen Bedingungen gewachsen sind. Davon wurde 1ml abgenommen und bei -20°C bis zum Assay gelagert.

Vor Beginn des Assays wurden alle Reagenzien auf RT erwärmt. Dann wurde durch eine Verdünnungsreihe der Standard hergestellt. Anschließend wurden jeweils 100µl des Standards, der Proben und des Leerwertes in zweifacher Ausführung in die 96-well Assayplatte pipettiert und zugedeckt bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden

die Wells zunächst viermal mit 200µl Waschpuffer gewaschen und dann für 1h bei RT mit 100µl biotinyliertem Antikörper inkubiert. Danach wurde wiederum viermal gewaschen und dann mit 100µl Streptavidin-Lösung für 45min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde dann fünfmal gewaschen bevor 100µl der TMB-Substratlösung hinzugegeben wurden. Die Reaktion fand nun für 30min (in Aluminiumfolie eingepackt) im Dunkeln statt. Dann wurden 50µl der Stopp-Lösung hinzugegeben und der Assay bei 450nm gemessen. Die Standardkurve und die IL-6-Konzentrationen wurden vom Programm „Magellan“ berechnet.

3.11 Statistik

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ± SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test mit der Software SPSS. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1 PDE-Expression in der Lunge neugeborener Mäuse unter Hyperoxie

Der *second messenger* cGMP spielt während der Lungenentwicklung eine wichtige Rolle bei der Regulation des pulmonalen Gefäßwiderstandes. Durch ansteigende NO-Konzentrationen steigt auch der intrazelluläre cGMP-Spiegel, was zu einer Entspannung der vaskulären glatten Muskelzellen führt. Kurz vor und auch nach der Geburt erfolgt eine komplexe Regulation cGMP-spezifischer PDEs wie der PDE5A (154). In diesem Teil der Arbeit sollte herausgefunden werden, ob auch andere PDEs während der postnatalen Lungenentwicklung reguliert werden und wie sich die Expression der PDEs unter Hyperoxie verändert.

4.1.1 Einfluss der Hyperoxie auf die Genexpression der PDEs

Da bisher nichts zur Regulation der PDE-Genexpression in der Lunge hyperoxischer Mäuse bekannt ist, wurde diese mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR untersucht. Dafür wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den Lungen 7, 14, 21 und 28 Tage alter Mäuse isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Mit semiquantitativer PCR wurde dann bestimmt, wie stark die einzelnen PDEs unter Hyperoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle transkribiert werden. Unter Normoxie erfolgte bei fast allen PDEs eine ähnliche Regulation. Zunächst war die Expression der PDEs an Tag 7 sehr hoch und fiel an Tag 14 auf ein niedrigeres Niveau ab. Ab dem 21.Tag zeigte sich bei fast allen Genen wieder ein Anstieg in der Genexpression, der bis zum 28. Tag entweder weiter anstieg oder auf gleichem Niveau blieb. Unter Hyperoxie wurden die PDEs unterschiedlich reguliert. Eine erhöhte Expression konnte bei den PDEs 1A, 1B, 1C, 2A und in der PDE4-Familie bei 4A und 4D festgestellt werden (Abb. 4.1). Bei den PDEs 7A und B und bei den PDEs 9A und 10A (Abb. 4.2) zeigte sich ebenfalls eine gesteigerte Expression nach der Hyperoxie. Bei den PDEs 3A, 3B, 4B und 8A, 8B zeigte sich keine Veränderung oder nur eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die einzige PDE, bei der eine herabgesetzte Expression im Lungenhomogenat festgestellt werden konnte, ist die PDE5A (Abb. 4.2).

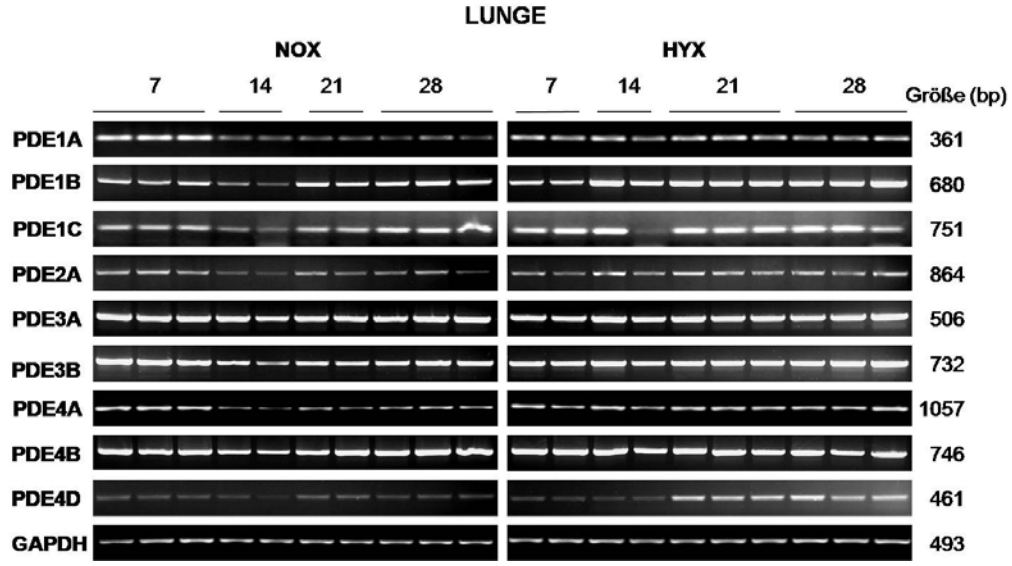


Abbildung 4.1 Semiquantitative PCR zur Bestimmung der PDE1-4-Expression im Lungenhomogenat 7 bis 28 Tage alter normoxischer und hyperoxischer Mäuse.

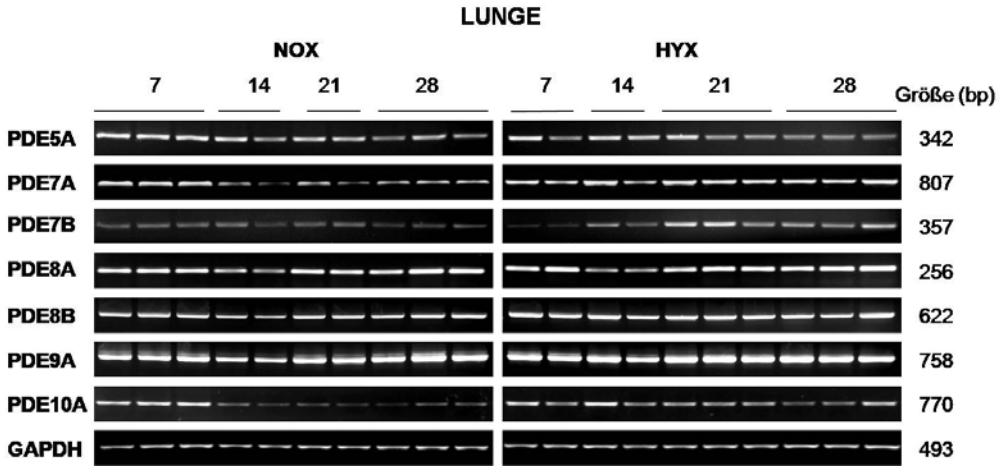


Abbildung 4.2 Semiquantitative PCR zur Bestimmung der PDE5-10-Expression im Lungenhomogenat 7 bis 28 Tage alter normoxischer und hyperoxischer Mäuse.

Um zu überprüfen, ob die Expressionsveränderungen nur auf das Lungengewebe beschränkt sind, wurde die Expression der PDEs 1A, 4A, 7A und 10A auch an Nierengewebe untersucht (Abb. 4.3). Jedoch konnten in der Niere keine Hyperoxie-bedingten Veränderungen in der PDE-Expression festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die Veränderungen lungenspezifisch sind.

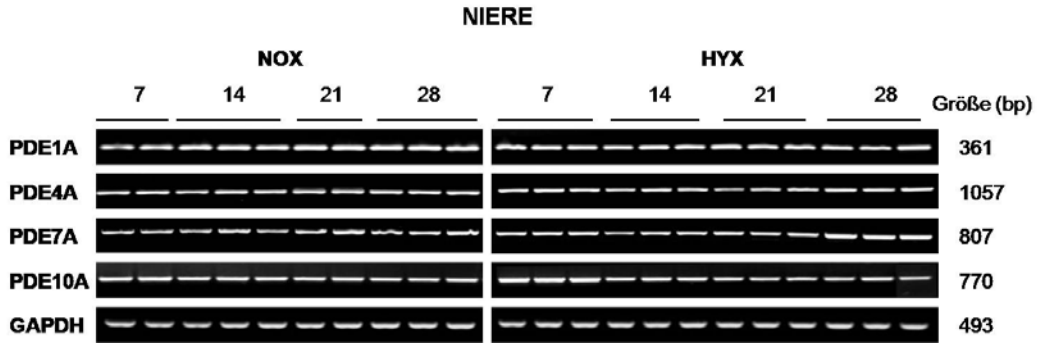


Abbildung 4.3 Semiquantitative PCR zur Bestimmung der PDE-Expression im Nierengewebe 7 bis 28 Tage alter normoxischer und hyperoxischer Mäuse

4.1.2 PDE-Proteinexpression unter Hyperoxie

Im Anschluss an die Transkriptionsanalyse der PDEs wurden die in der mRNA herauf regulierten Gene auf ihre Proteinexpression im Lungenhomogenat untersucht. Nach der Isolation der Proteine aus den Lungen von 7 bis 28 Tage alten normoxischen und hyperoxischen Tieren, wurden die Proben an eine einheitliche Konzentration angeglichen und die Proteine einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot unterzogen. Danach erfolgte die spezifische Detektion der PDEs mit polyklonalen Antikörpern.

Die Expression des PDE1A-Proteins stimmte mit der mRNA-Expression an Tag 7 und 14 überein. An beiden Tagen bildete sich unter Hyperoxie mehr PDE1A als unter Kontrollbedingungen (Abb. 4.4). An den weiteren Untersuchungstagen zeigte sich jedoch eine abfallende Tendenz der PDE1A-Expression, was mit der Transkription nicht überein stimmte. Dieses Ergebnis wurde mit mindestens n=3 Western Blots bestätigt. Nach diesem Resultat wurde die PDE1-Familie nicht weiter untersucht.

Des Weiteren wurde auch die Expression der PDE2A auf Proteinebene untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnte ebenfalls eine herunter regulierte Proteinexpression unter Hyperoxie festgestellt werden.

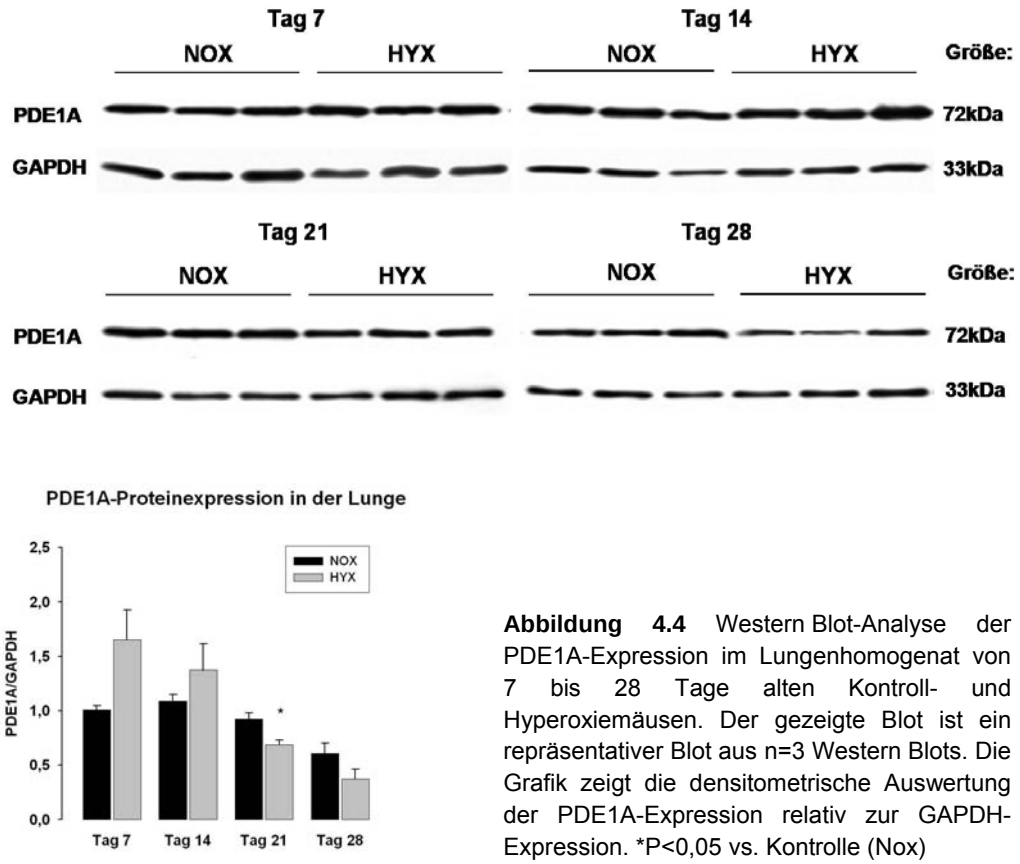


Abbildung 4.4 Western Blot-Analyse der PDE1A-Expression im Lungenhomogenat von 7 bis 28 Tage alten Kontroll- und Hyperoxiemäusen. Der gezeigte Blot ist ein repräsentativer Blot aus n=3 Western Blots. Die Grafik zeigt die densitometrische Auswertung der PDE1A-Expression relativ zur GAPDH-Expression. *P<0,05 vs. Kontrolle (Nox)

Die nächste PDE deren Proteinexpression analysiert wurde, ist die in vielen Geweben und Zellen exprimierte PDE4A. Sie zeigte in der PCR eine leicht erhöhte Genexpression. Im Western Blot konnte jedoch von Tag 7 bis Tag 28 eine ansteigende Proteinexpression unter Hyperoxie festgestellt werden. Bei der Proteinanalyse wurden mehrere PDE4A-Splicevarianten vom Antikörper detektiert. Da das Vorkommen von PDE4A-Splicevarianten in der Lunge nicht genau beschrieben ist, orientiert sich die Bezeichnung der Varianten am Datenblatt des verwendeten Antikörpers. Bei der kleinsten Variante handelt es sich um die 66kDa große PDE4A1. Das nächstgrößere 76kDa-Protein wird eigentlich als Hoden-spezifische Variante bezeichnet, wird jedoch auch in der Lunge exprimiert. Bei etwa 102kDa konnte eine PDE4A-Variante detektiert werden, die als PDE4Ax beschrieben wird und die größte in der Mauslunge exprimierte PDE4A ist die 106kDa große PDE4A8 (Abb. 4.5). Alle Spleißvarianten zeigten eine höhere Expression unter Hyperoxie, welche an Tag 28 am stärksten war. Da die Hyperoxie-Exposition der Mäuse auch einen Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge zur Folge hat, welche ebenfalls PDE4A exprimieren, wird die Expression der PDE4A dadurch verstärkt.

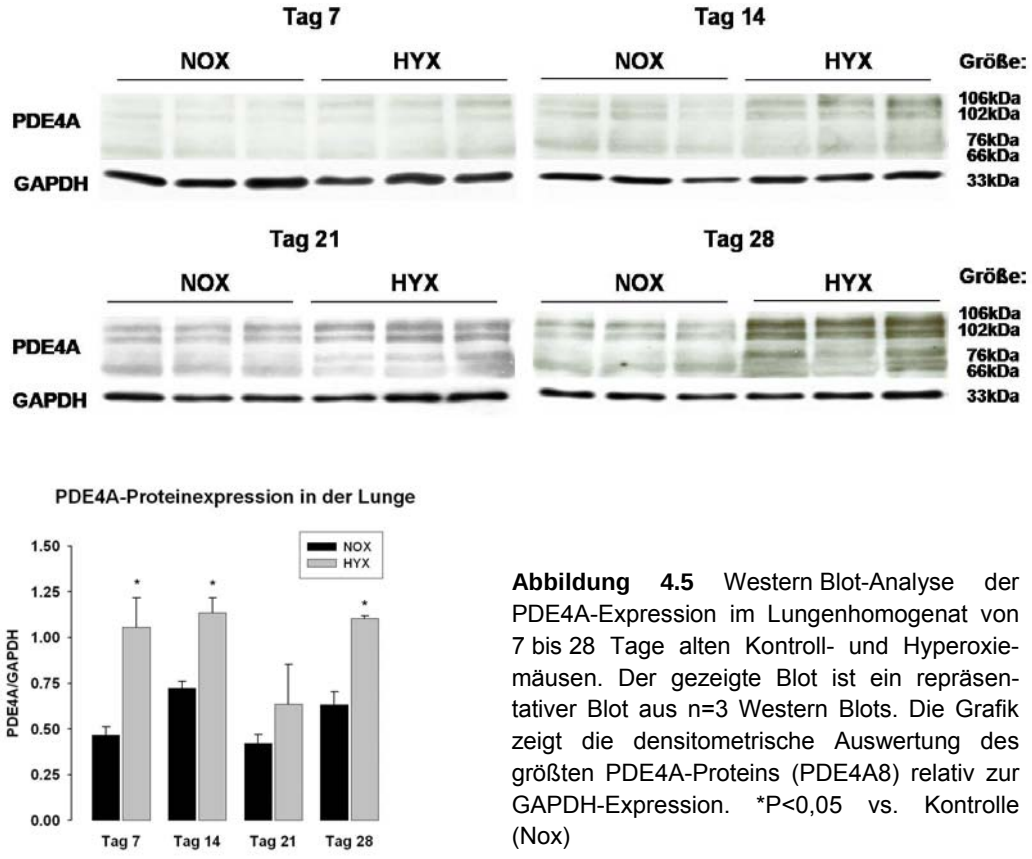
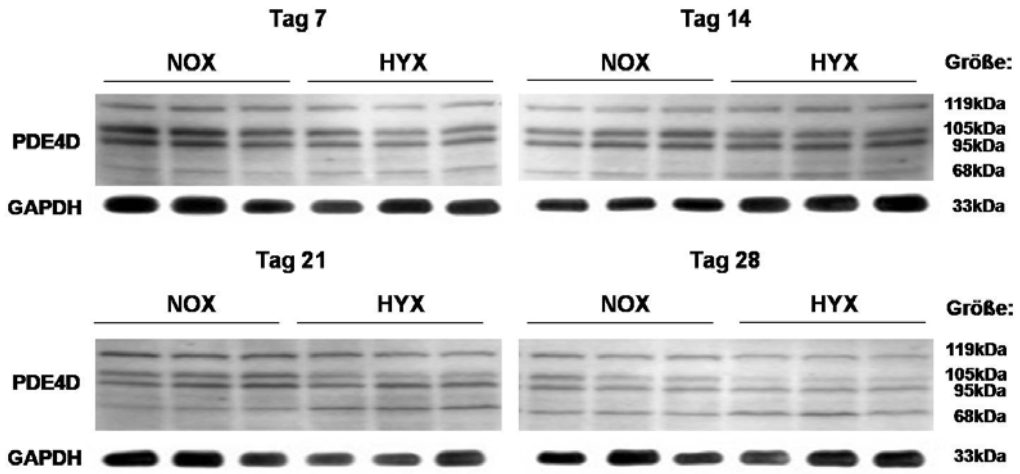


Abbildung 4.5 Western Blot-Analyse der PDE4A-Expression im Lungenhomogenat von 7 bis 28 Tage alten Kontroll- und Hyperoxiemäusen. Der gezeigte Blot ist ein repräsentativer Blot aus n=3 Western Blots. Die Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des größten PDE4A-Proteins (PDE4A8) relativ zur GAPDH-Expression. *P<0,05 vs. Kontrolle (Nox)

Die zweite auf Transkriptionsebene erhöht exprimierte PDE4-Isoform ist die PDE4D. Diese war an Tag 21 und 28 besonders stark erhöht. Auf Proteinebene konnte man nach der Auflösung im SDS-Gel ebenfalls mehrere PDE4D-Splicevarianten detektieren. In der grafischen Darstellung der Densitometrie in Abbildung 4.6 wird wiedergegeben, wie sich diese in der Expression unter Hyperoxie voneinander unterscheiden. Es wird deutlich, dass die größte PDE4D-Variante (4D4; 119kDa) bis zum Tag 21 unter Normoxie und Hyperoxie in etwa gleichen Mengen gebildet wird. An Tag 28 ist Menge an PDE4D4 geringer. Anders verhält es sich hingegen mit der nächstkleineren PDE4D5 (105kDa). Diese wird nur bis zu Tag 7 in beiden Gruppen auf gleichem Niveau exprimiert. Von Tag 14 bis 28 ist die PDE4D5-Expression unter Hyperoxie herab gesetzt. Bis auf Tag 14, an dem unter Hyperoxie eine schwächere Expression erfolgt, ist die Bildung des 95kDa großen PDE4D3-Proteins relativ ausgeglichen. Dies trifft auch auf die mit 68kDa kleinste PDE4D-Variante zu, welche an Tag 21 und 28 eine gesteigerte Expression aufweist.

Zusammenfassend kann anhand dieser und der vorhergehenden Ergebnisse von PDE4A eine gesteigerte bzw. teilweise erhöhte Expression der PDE4 unter hyperoxischen Bedingungen festgestellt werden.



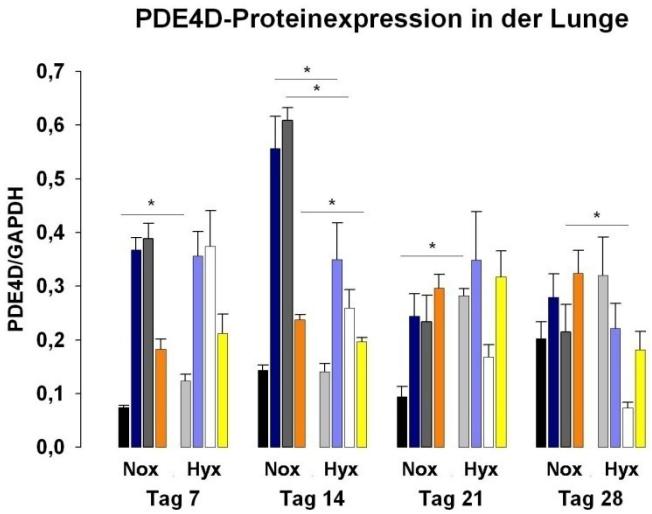


Abbildung 4.6 Western Blot zur Analyse der PDE4D-Expression im Lungenhomogenat von 7 bis 28 Tage alten Kontroll- und Hyperoxiemäusen. Der gezeigte Blot ist ein repräsentativer Blot aus n=3 Western Blots. Die Grafik zeigt die densitometrische Auswertung aller PDE4D-Proteine relativ zur GAPDH-Expression. *P<0,05 vs. Kontrolle

Dabei entsprechen die Balken: schwarz/hellgrau PDE4D1 (68kDa); dunkelblau/hellblau PDE4D3 (95kDa); dunkelgrau/weiß PDE4D5 (105kDa) und orange/gelb PDE4D4 (119kDa).

Im nächsten Experiment sollte die Expression der cGMP-spezifischen PDE5 untersucht werden. Da die Hemmung der PDE5 in einem hyperoxischen Ratenmodell von Ladha *et al.* (155) sowohl zu einer verbesserten Lungenstruktur und Angiogenese, als auch zu einem verringerten pulmonalen Gefäßwiderstand führten, könnte der cGMP-Signalweg bzw. die PDE5 auch eine Rolle im hyperoxischen Mausmodell spielen. Da man von der Transkription von Genen nicht immer auf deren tatsächliche Proteinexpression schließen kann, wurde die PDE5A, die eine geringere Genexpression unter Hyperoxie aufwies, auch auf Proteinebene untersucht (Abb. 4.7). Die Bildung des PDE5A-Proteins unter Hyperoxie war jedoch, der vorherigen Analyse entsprechend, herabgesetzt. Auch nach mehrmaliger Wiederholung des Experiments bestätigte sich die schwächere Expression der PDE5A unter Hyperoxie.

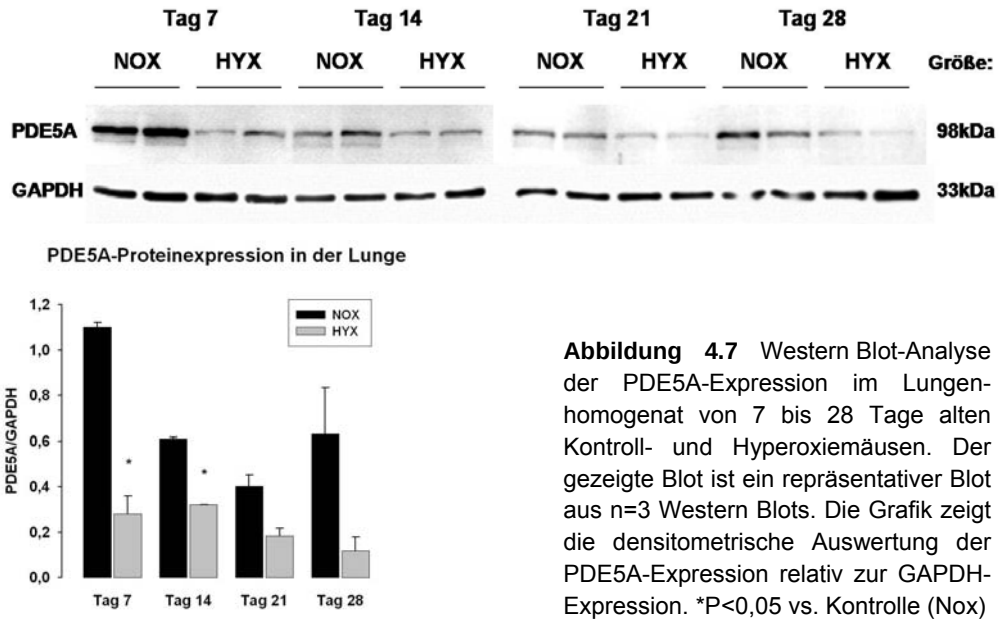


Abbildung 4.7 Western Blot-Analyse der PDE5A-Expression im Lungenhomogenat von 7 bis 28 Tage alten Kontroll- und Hyperoxiemäusen. Der gezeigte Blot ist ein repräsentativer Blot aus n=3 Western Blots. Die Grafik zeigt die densitometrische Auswertung der PDE5A-Expression relativ zur GAPDH-Expression. *P<0,05 vs. Kontrolle (Nox)

Bei der Untersuchung der cAMP-spezifischen PDE7A konnte auch eine gesteigerte Expression an allen Untersuchungstagen festgestellt werden (Abb. 4.8). Die Expression war an Tag 28 am stärksten und wird, wie auch die PDE4-Expression, durch Entzündungszellen im Lungenhomogenat beeinflusst.

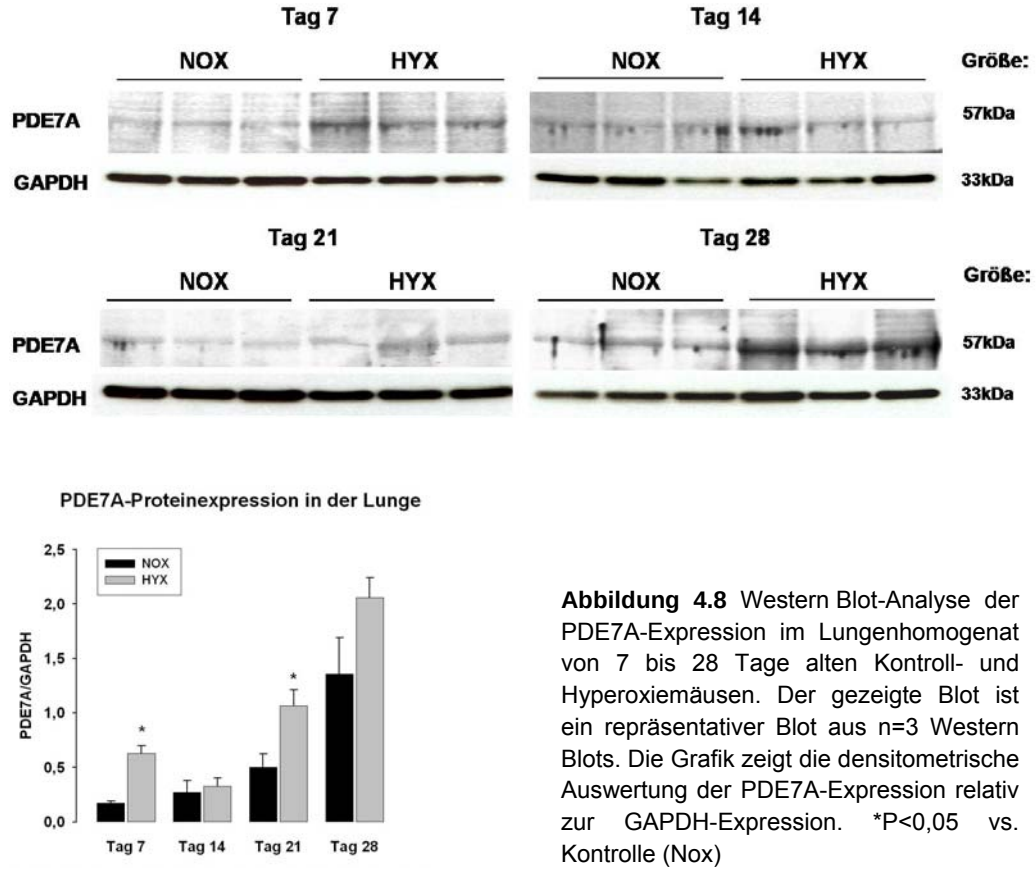


Abbildung 4.8 Western Blot-Analyse der PDE7A-Expression im Lungenhomogenat von 7 bis 28 Tage alten Kontroll- und Hyperoxiemäusen. Der gezeigte Blot ist ein repräsentativer Blot aus n=3 Western Blots. Die Grafik zeigt die densitometrische Auswertung der PDE7A-Expression relativ zur GAPDH-Expression. *P<0,05 vs. Kontrolle (Nox)

In der Expressionsanalyse hyperoxischer und normoxischer Mauslungen konnte festgestellt werden, dass vorwiegend die cAMP-abbauenden PDEs und speziell die PDE4 durch die Hyperoxie beeinflusst wurden. Um heraus zu finden, welche Rolle die PDE4 in der hyperoxischen Lungenreifungsstörung spielt, wurde im nächsten Experiment zunächst die Lokalisation der PDE4 im Lungengewebe normoxischer und hyperoxischer Tiere untersucht.

4.1.3 PDE4-Lokalisation im Lungengewebe

Zur Lokalisierung der PDE4A wurde eine immunhistochemische Färbung (Abschnitt 3.6) von 3µm dicken Lungen-Gewebeschnitten 28 Tage alter normoxischer und hyperoxischer Mäuse durchgeführt. Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop bei 200facher und 400facher Vergrößerung ausgewertet.

Die Färbung ist hauptsächlich im Zytoplasma alveolärer Epithelzellen, vermehrt aber in Typ II Epithelzellen zu finden, welche vorwiegend die Ecken der Alveolen auskleiden. Außerdem wurden auch Makrophagen und in den Blutgefäßen befindliche Immunzellen, die auch PDE4A exprimieren, gefärbt. Aufgrund der weniger ausdifferenzierten Struktur des hyperoxischen Lungengewebes wurden insgesamt etwas weniger Epithelzellen gefärbt, als im Kontrollgewebe.

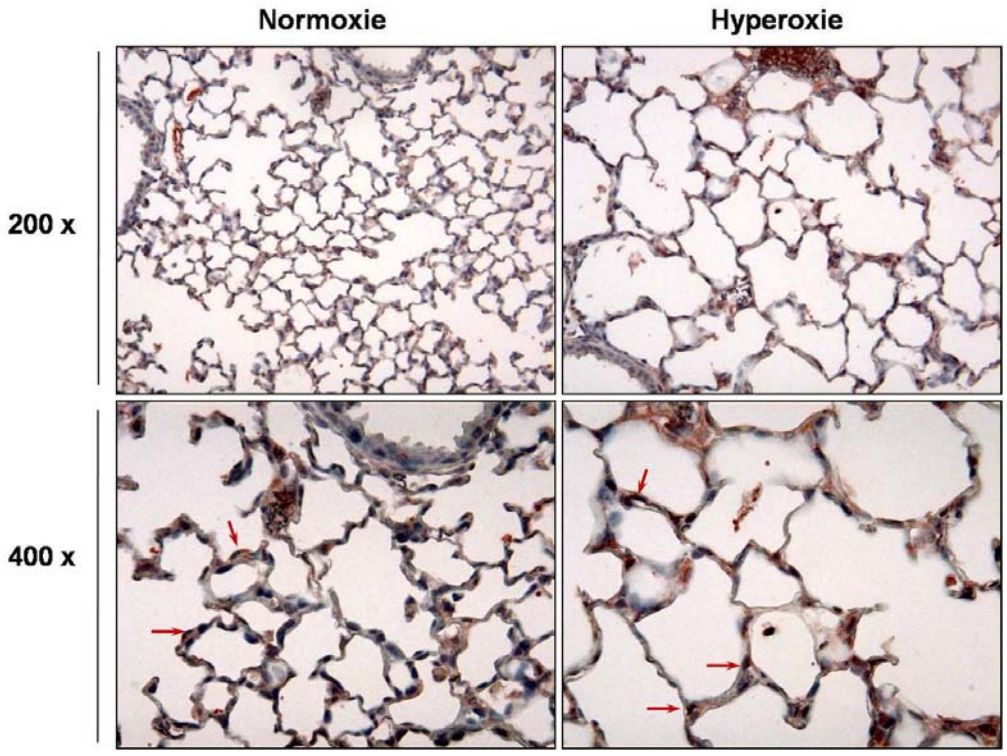


Abbildung 4.9 Immunhistochemische Färbung der PDE4A in Lungengewebeschnitten von 28 Tage alten Kontrolltieren (links) und hyperoxischen Tieren (rechts) bei 200facher bzw. 400facher Vergrößerung. Der Umsatz des AEC-Substrates durch die am Antigen (durch Biotin-Streptavidin-) gebundene Peroxidase ruft eine rot-braune Färbung es PDE4A-Proteins hervor.

Die Färbung der PDE4D wurde ebenfalls an Gewebeschnitten 28 Tage alter Kontroll- und Hyperoxie-exponierter Mäuse durchgeführt. Auch hier wurde die Auswertung bei 200facher und 400facher Vergrößerung vorgenommen.

Im Gegensatz zur Färbung der PDE4A, welche hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert war, ist die detektierte PDE4D eher nukleär lokalisiert. Das Zytoplasma ist nur sehr schwach gefärbt. Bei der Färbung der PDE4D wurden ebenfalls vereinzelt Makrophagen detektiert, welche ebenso PDE4D exprimieren. Auch bei der PDE4D wurden durch eine geringer ausdifferenzierte Alveolarstruktur weniger Epithelzellen gefärbt als im Gewebe der Kontrollmäuse.

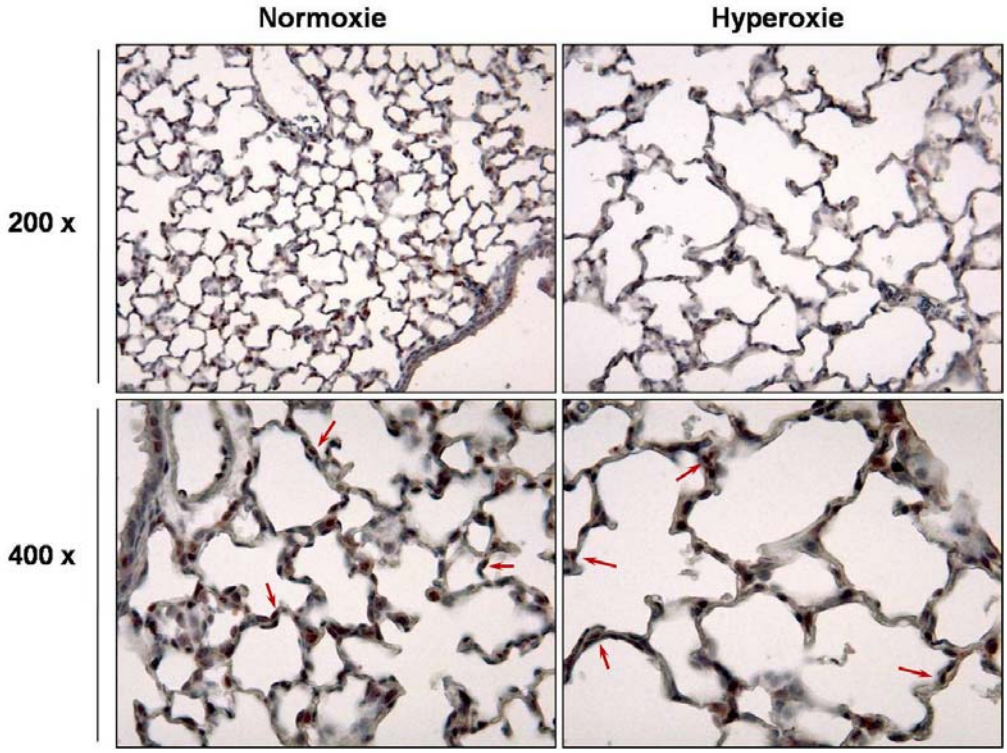


Abbildung 4.10 Immunhistochemische Färbung der PDE4D in Lungengewebeschnitten von 28 Tage alten Kontrolltieren (links) und hyperoxischen Tieren (rechts) bei 200facher bzw. 400facher Vergrößerung. Der Umsatz des AEC-Substrates durch die am Antigen (durch Biotin-Streptavidin-) gebundene Peroxidase ruft eine rot-braune Färbung des PDE4D-Proteins hervor.

4.2 PDE4-Hemmung im hyperoxischen Mausmodell

Durch Untersuchungen der Gentranskription und der Proteinexpression im Lungenhomogenat Hyperoxie-exponierter Mäuse konnte eine erhöhte PDE4-Expression festgestellt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die PDE4 in Lungenepithelzellen lokalisiert ist, welche unter Hyperoxie durch Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS) geschädigt werden, was Entzündungsreaktionen auslösen kann und die Lungenentwicklung stört (156).

Aufgrund dessen sollte der Einfluss einer Therapie mit dem PDE4-spezifischen Inhibitor Cilomilast auf die Lungenentwicklung hyperoxischer Mäuse untersucht werden. Dafür wurde eine Gruppe hyperoxischer Tiere von Tag 14 bis Tag 28 mit einer täglichen Injektion von 5mg/kg Körpergewicht Cilomilast behandelt. Zur Kontrolle wurde eine weitere Gruppe Hyperoxie-exponierter Tiere mit DMSO behandelt.

4.2.1 Körpergewicht

Nach 28 Tagen zeigten sich deutliche Unterschiede im Körpergewicht zwischen normoxischen Kontrolltieren (Nox P28, n=5), DMSO-behandelten hyperoxischen Tieren (Hyx P28, n=7) und Cilomilast-behandelten hyperoxischen Tieren (Hyx P28/Cilo, n=6). Die hyperoxischen Tiere wogen im Durchschnitt mit 7,9g ± 0,2 etwa 50% weniger als die gleichalten Kontrolltiere mit 16,4g ± 0,4 bei 21% O_2 (Abb. 4.11). Zudem wirkte sich die Hyperoxie negativ auf die körperliche Aktivität der Tiere aus. Das Körpergewicht der Cilomilast-behandelten Tiere war mit 8,8g ± 0,6 zwar nicht signifikant erhöht, deutete aber zusammen mit einer Aktivitätssteigerung der Tiere auf ein verbessertes Allgemeinbefinden der Tiere hin.

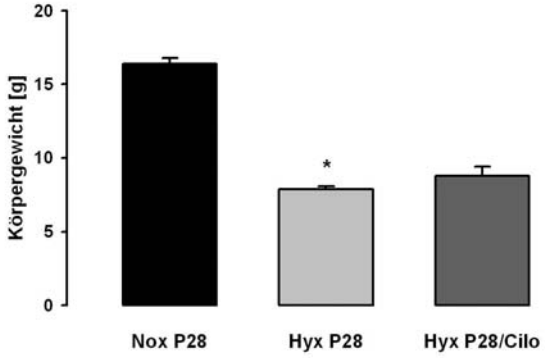


Abbildung 4.11 Darstellung des Körpergewichts nach 14 tägiger Behandlung hyperoxischer Tiere (n=6) mit Cilomilast (5mg/kg Körpergewicht)

*P<0,05 vs. Kontrolle (Nox P28)

4.2.2 Lungenstruktur

Da die Lungenreifung in der Maus postnatal stattfindet, erfolgt der Vorgang der Alveolarisierung in den ersten zwei Wochen nach der Geburt (157). Die 4 Wochen andauernde Exposition der Tiere in 85% O_2 führte daher sowohl zu gravierenden Veränderungen im Lungenwachstum als auch in der alveolären Entwicklung. Mit einer geringeren Anzahl von Alveolen veränderte sich auch die Struktur der Azini, die dadurch vereinfacht wurden und so deutlich vergrößerte Lufträume bildeten (Abb. 4.12). Die Lungenstruktur der normoxischen Kontrolltiere wies eine dem Alter entsprechende Entwicklung auf, die durch eine normale Alveolarisierung und kleinere Lufträume charakterisiert werden kann. Die Lungenstruktur der mit Cilomilast behandelten Tiere wies eine leichte Verbesserung auf. Diese bezieht sich auf eine etwas kompaktere Alveolarstruktur die zu einer Abnahme des Luftraumes führte. Diese Beobachtungen bestätigen sich im Folgenden bei der Analyse der Parameter der Lungenhistomorphometrie.

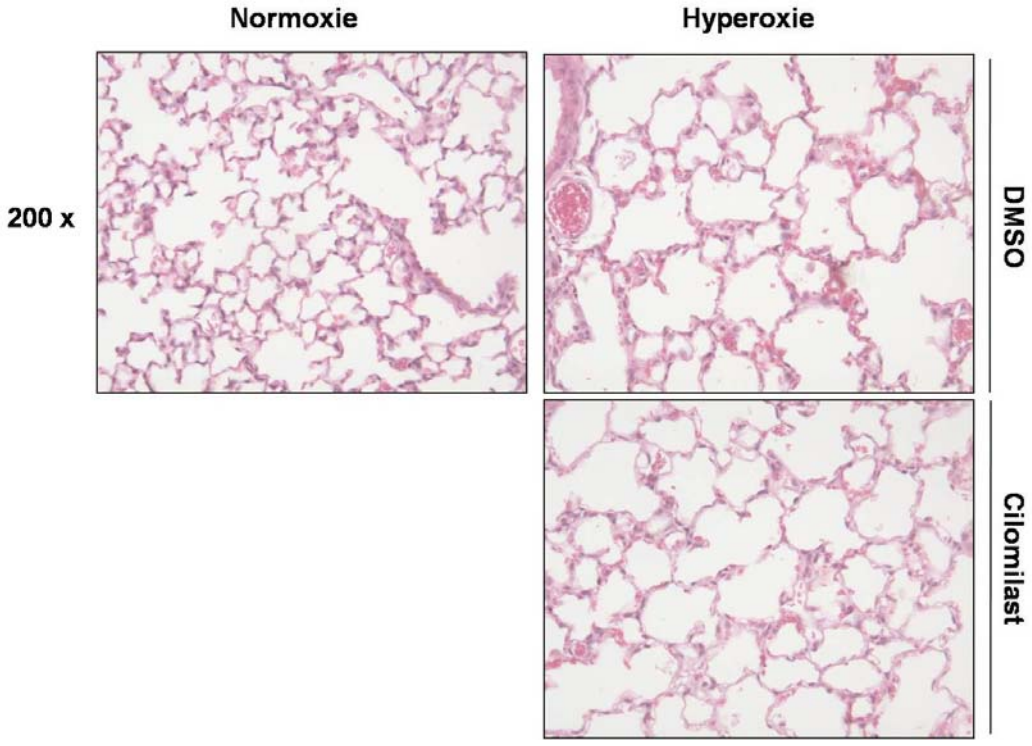


Abbildung 4.12 Vergleich der Lungenstruktur 28 Tage alter Kontrolltiere mit Hyperoxie-exponierten Tieren und Cilomilast-behandelten Tieren. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und bei 200facher Vergrößerung fotografiert.

4.2.3 Lungenmorphometrie

Bei der quantitativen Bestimmung der respiratorischen Fläche wurden drei Parameter untersucht. Der erste war der Mean Linear Intersept (MLI), welcher den mittleren interalveolären Abstand im Lungengewebe beschreibt. Unter Hyperoxie war der MLI signifikant erhöht. Der gemessene MLI von hyperoxischen Mäusen war mit einem Wert von 39,7µm ± 0,6 (n=10) fast doppelt so hoch wie der MLI der Kontrollmäuse (22,0µm ± 0,2; n=4) (Abb. 4.13 A). Der MLI der Cilomilast-behandelten Tiere wurde mit einem Wert von 37,5µm ± 0,7 (n=8) geringfügig aber signifikant verbessert.

Der zweite untersuchte histomorphometrische Parameter war die Septendicke. Diese war nach 28 Tagen Hyperoxie mit 6,3µm ± 0,1 (n=10) zu den Kontrolltieren (5,7µm ± 0,5 n=4) signifikant erhöht. Die Behandlung mit Cilomilast reduzierte die Septendicke signifikant auf 5,8µm ± 0,2 (n=8) (Abb. 4.13 B).

Zuletzt wurde der prozentuale Luftanteil in den Gewebeschnitten bestimmt. Dieser betrug bei den unbehandelten hyperoxischen Tieren einen Wert von 76% ± 0,3 (n=10) und in den Kontrolltieren 63% ± 1,3 (n=4). Die Behandlung mit dem PDE4-Hemmer konnte den Luftanteil auf 73% ± 0,4 (n=8) absenken (Abb. 4.13 C).

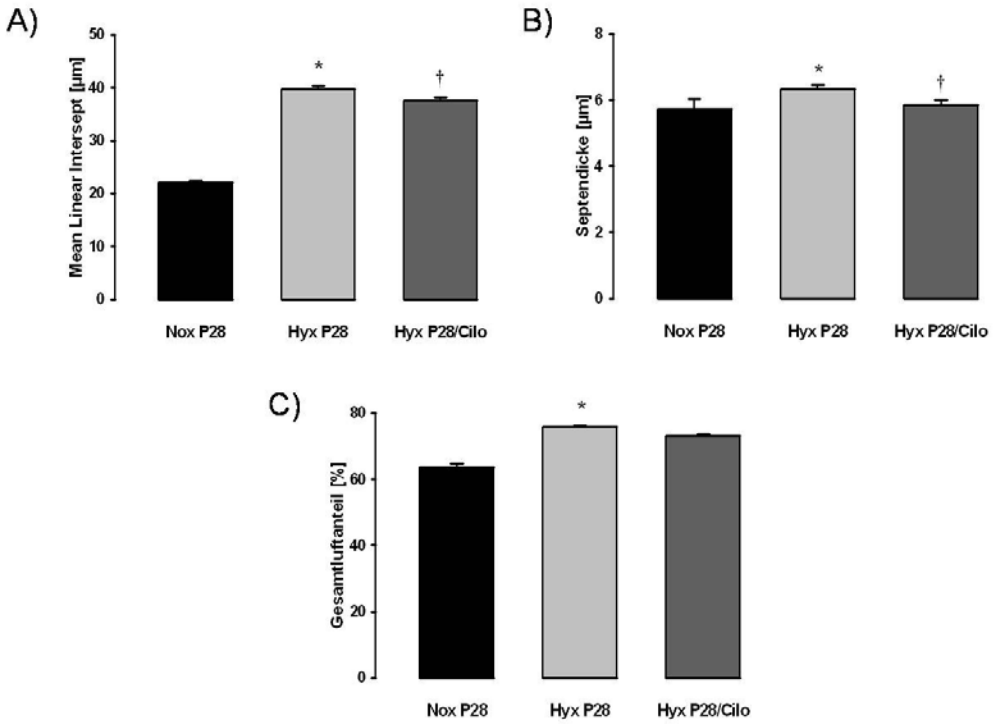


Abbildung 4.13 Vergleich der lungenhistomorphometrischen Parameter nach der Behandlung mit Cilomilast (A) Mean Linear Intersept, (B) Septendicke und (C) Gesamtluftanteil in 28 Tage alten Kontrolltieren (Nox P28), hyperoxischen Tieren (Hyx P28) und Cilomilast-behandelten Tieren (Hyx P28/Cilo). *P<0,05 vs. Kontrolle (Nox P28) †P<0,05 vs. Hyperoxie (Hyx P28)

4.2.4 Dynamische Compliance

Die Lungenfunktion wurde durch eine Bodyplethysmography in einer Volumen-angepassten und druckregulierten Messung an 4 Wochen alten Tieren bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die 4-wöchige Hyperoxie-Exposition zu einer verminderten Lungenfunktion führte. Diese Veränderungen in der Lungenfunktion Hyperoxie-exponierter Mäuse werden auch an frühgeborenen Babys beobachtet, die an BPD erkrankt sind. In unserem Experiment zeigten die hyperoxischen Tiere (C_{dyn}=5,2 ± 0,6 n=6) im Vergleich zur Kontrolle (C_{dyn}=6,4 ± 0,5 n=5) eine verminderte Lungencompliance. Die Compliance der Cilomilast-behandelten Tiere war hingegen mit C_{dyn}=6,9 ± 0,9 (n=5) auf ein Wert angestiegen, der dem der Kontrolle entspricht (Abb. 4.14).

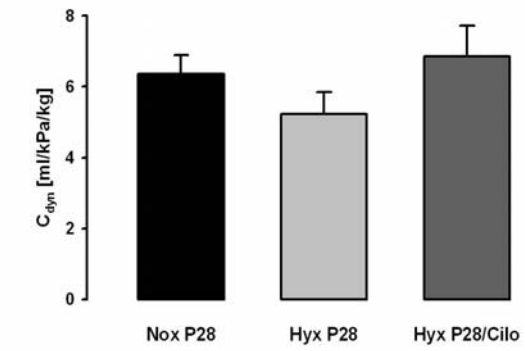


Abbildung 4.14 Dynamische Compliance (C_{dyn} ml/kPa/kg) von 28 Tage alten Kontrolltieren, hyperoxischen Tieren und Cilomilast-behandelten Tieren.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Therapie mit einem PDE4-spezifischen Inhibitor im hyperoxischen Mausmodell positiv auf die Lungenstruktur und – funktion auswirkt. Da durch die Inhibition mit dem PDE4-Inhibitor nicht zwischen den PDE4-Enzymen in Entzündungszellen wie z.B. Makrophagen und den PDE4-Enzymen in den Epithelzellen des Lungenparenchyms unterschieden werden konnte, sollte die PDE4 in den folgenden Zellkulturexperimenten weiter untersucht werden.

4.3 Auswirkungen der Hyperoxie auf die PDE4 in alveolären Epithelzellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich die Expression und Aktivität der PDE4 in pulmonalen Epithelzellen unter Hyperoxie verändert. Dafür wurden A549 Zellen und MLE12 Zellen verwendet. A549 Zellen sind humane Typ II Epithelzellen, die ihren Ursprung in einem Lungenkarzinom haben. MLE 12 Zellen sind ebenfalls Epithelzellen mit Typ II Eigenschaften. Sie stammen aus Lungentumoren die in SV40 Transgenen Mäusen generiert wurden. Alle Expressionsstudien wurden mit beiden Zelllinien durchgeführt. Da sich beide Zelllinien im Hinblick auf die Reaktion gegenüber 95% O_2 identisch verhielten, werden im Folgenden nur die Ergebnisse der A549 Zellen wieder gegeben.

4.3.1 PDE4 – Proteinexpression unter Hyperoxie

Nach der Inkubation der Zellen für 24h und 48h in 21% O_2 bzw. in 95% O_2 wurden die Proteine isoliert. Diese wurden dann in einem SDS-Gel aufgetrennt und die PDE4 danach in einem Western Blot detektiert. Als Positivkontrolle wurde das p21-Protein verwendet, da es nach 24h und 48h unter Hyperoxie verstärkt exprimiert wird (158).
Nach 24h und 48h Inkubation konnte auch in den Epithelzellen eine erhöhte Expression der PDE4A-Splicevarianten festgestellt werden. Jedoch war der Anstieg in der PDE4A-Expression nach 24h eher moderat. Nach 48h hingegen stieg insbesondere die Expression der kleinsten PDE4A-Variante, der PDE4A1 deutlich an (Abb.4.15 A+B). Die anderen beiden detektierten Varianten zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression. Um die Aktivierung der PDE4A durch Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) zu untersuchen, wurde die Protein-gebundene Membran mit einem Anti-Phospho-PDE4A-Antikörper inkubiert. Es wurden zwei phosphorylierte PDE4A-Varianten detektiert. Zum einen die 76kDa große Hoden-spezifische PDE4A und zum anderen die 109kDa große PDE4A5. Da durch die PKA hauptsächlich die langen PDE4A-Splicevarianten phosphoryliert und damit aktiviert werden (67), (68), ist die Bande der PDE4A5 besonders deutlich. Die 76kDa große Hoden-spezifische PDE4A wurde hingegen nicht so stark phosphoryliert. Kleine PDE4A-Varianten werden aufgrund ihrer fehlenden UCR1-Domäne (Upstream conserved region), an der die Phosphorylierung durch die PKA stattfindet, nicht phosphoryliert. Die Betrachtung der PDE4A-Phosphorylierung im Vergleich zur Expression der PDE4A zeigte, dass nach 24h unter 95% O_2 eine etwa 40%ige Reduktion der Phosphorylierung beider detektierten Varianten stattfand. Diese abnehmende Phosphorylierung zeigte sich auch nach 48h Hyperoxie, wobei bei der einen Variante (76kDa) eine 57%ige und bei der anderen (109kDa) eine etwa 35%ige Abnahme festzustellen war (Abb. 4.15 A+C).

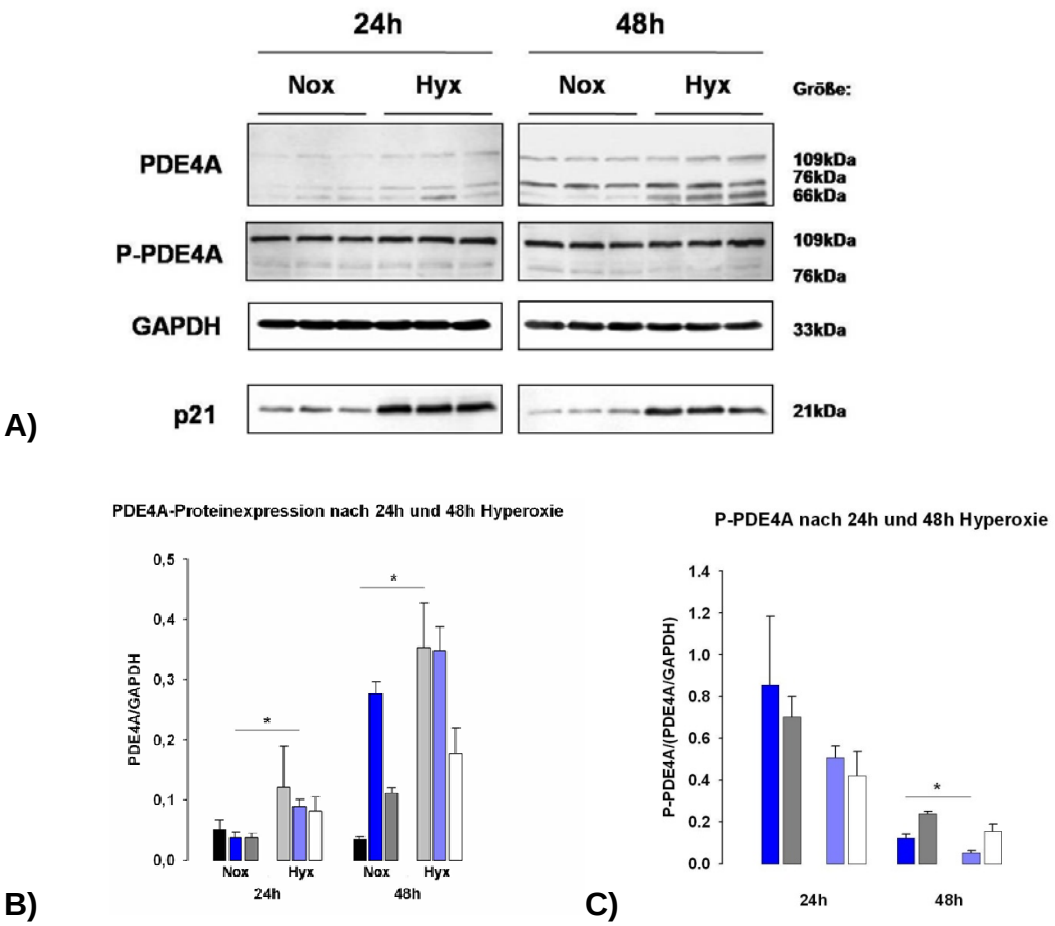


Abbildung 4.15 Untersuchung der PDE4A und P-PDE4A-Expression in A549 Zellen nach 24h und 48h Hyperoxie (95% O_2) **A)** Western Blot der PDE4A, P-PDE4A, GAPDH und p21 (Positivkontrolle für die Hyperoxie) **B)** Densitometrie der PDE4A-Splicevarianten Expression relativ zu GAPDH: schwarz/hellgrau = PDE4A1 (66kDa); dunkelblau/hellblau = PDE4A (Hoden spez.; 76kDa); dunkelgrau/weiß = PDE4A5 (109kDa) **C)** Densitometrie der P-PDE4A relativ zur PDE4A: dunkelblau/hellblau = PDE4A (Hoden spez.; 76kDa); dunkelgrau/weiß = PDE4A5 (109kDa) *P<0,05 vs. Kontrolle

Bei der Untersuchung des PDE4D-Proteins konnten wie auch im Lungenhomogenat mehrere Spleißvarianten detektiert werden. Außer der großen Variante, der PDE4D4 (119kDa), konnten in den A549 Zellen die PDE4D1 (68kDa), die PDE4D3 (95kDa) und die PDE4D5 (105kDa) nachgewiesen werden (Abb. 4.16). Jedoch zeigten sich kaum oder nur sehr schwache Änderungen in der PDE4D-Proteinexpression unter hyperoxischen Bedingungen. Wie auch bei der PDE4A werden die langen Varianten der PDE4D durch die PKA phosphoryliert, was zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms führt. Bei der Untersuchung der phosphorylierten PDE4D konnten jedoch keine großen PDE4D-Varianten detektiert werden. Die einzigen nachgewiesenen Banden haben die Größe der kleinsten Variante, der PDE4D1 (68kDa) und einer etwas größeren Spleißvariante, die nach 24h Hyperoxie-Inkubation detektiert werden konnte. Diese zeigten jedoch verglichen zur Kontrolle ebenfalls keine Änderungen unter Hyperoxie.

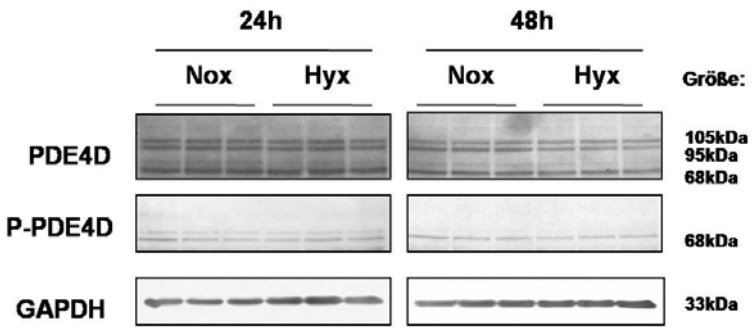


Abbildung 4.16 Western Blot zur Untersuchung der PDE4D und P-PDE4D-Expression in A549 Zellen nach 24h und 48h Hyperoxie (95% O_2). GAPDH diente als Ladekontrolle

4.3.2 PDE4-Aktivität unter Hyperoxie

Um heraus zu finden, wie stark sich die Aktivität der PDE4 unter Hyperoxie verändert, wurde ein PDE4-Aktivitätsassay durchgeführt. Dafür wurde zunächst das Protein aus den A549-Zellen isoliert die zuvor 48h in Hyperoxie inkubiert wurden. Dann wurden 20µg des Proteins in den Assay eingesetzt. Zur Bestimmung der Gesamt-PDE-Aktivität wurde die Reaktion in Gegenwart von 200µM IBMX durchgeführt. Um die PDE4-Aktivität zu bestimmen, wurde dem Reaktionsmix 10µM Rolipram hinzu gegeben, welches spezifisch alle PDE4-Enzyme hemmt. Die Ergebnisse des Assay (n=3) zeigten, dass die PDE4-Aktivität nach 48h Hyperoxie um rund 55% verringert war (Abb.4.17).

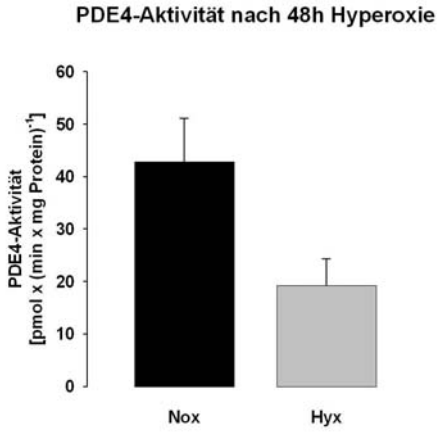


Abbildung 4.17 PDE4-Aktivität in A549 Zellen nach 48h Hyperoxie.

P = n.s.

4.3.3 Intrazelluläre cAMP – Konzentration unter Hyperoxie

Da die Konzentration von cAMP in der Zelle in großem Maße durch die PDE4 bestimmt wird, sollte im nächsten Experiment festgestellt werden, wie sich der Spiegel von intrazellulärem cAMP nach 24h und 48h Hyperoxie verändert.

Dafür wurde in 3 unabhängigen Experimenten ein cAMP-Enzymimmunassay (EIA) durchgeführt. Nachdem A549-Zellen für 24h und 48h in 96 well-Platten unter Hyperoxie und

Normoxie gewachsen waren, wurden die Zellen lysiert und der Überstand in die 96 well-Assayplatte übertragen. Anhand eines Standards wurde dann bestimmt, wie viel cAMP in den Zellen gebildet worden war.

Nach dem Erstellen der Standardkurve, wurde dann die Differenz zwischen den Proben aus 21% O_2 und 95% O_2 berechnet. Dazu wurde zunächst die Zellzahl von Zellen des gleichen Experiments bestimmt. Nach 24h hyperoxischer Inkubation nahm die Zellzahl im Vergleich zur normoxischen Kontrolle um etwa 21% ab. Nach 48h waren es 56% weniger Zellen. Daraus ergab sich, dass die cAMP-Konzentration in den Zellen nach 24h Hyperoxie-Exposition im Vergleich zur Kontrolle um rund 42% gesteigert war (Abb. 4.18). Nach 48h konnte in den hyperoxischen Zellen eine um 73% gesteigerte cAMP-Konzentration bestimmt werden (Abb. 4.18).

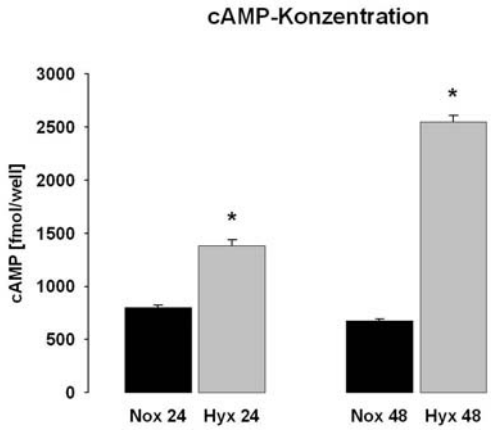


Abbildung 4.18 cAMP-Konzentration in A549-Zellen nach 24h und 48h Hyperoxie (n=3). *P<0,05 vs. Kontrolle

4.3.4 Sekretion von IL-6 unter Hyperoxie

Hyperoxie führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche eine entzündliche Schädigung der Lunge hervorrufen können. Eine der Auswirkungen der Hyperoxie ist die Schädigung und das Absterben pulmonaler Epithelzellen, was durch eine erhöhte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine begleitet wird (159). IL-6 ist ein Zytokin, welches von einer Vielzahl von Zellen einschließlich pulmonalen Epithelzellen gebildet werden kann (160).

Zur Bestimmung der IL-6-Freisetzung unter Hyperoxie wurden A549-Zellen für 1h bis 48h in 95% O_2 inkubiert. Danach wurde die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand mit einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Wie in Abbildung 4.19 gezeigt, setzen die Zellen bis zu 7h nach Beginn der Inkubation in 95% O_2 keine messbaren Konzentrationen an IL-6 frei. Nach 9h und 12h konnten IL-6-Konzentrationen unter 1pg/ml nachgewiesen werden, welche nach 24h Inkubation auf 2pg/ml anstieg. Die höchste Freisetzung von IL-6 fand nach 48h Hyperoxie statt. Es konnte eine Konzentration von

39,7pg/ml ± 4,2 (n=3) gemessen werden. In den Kontrollzellen wurden nach 24h rund 1pg/ml und nach 48h 3pg/ml ± 0,6 (n=3) gemessen.

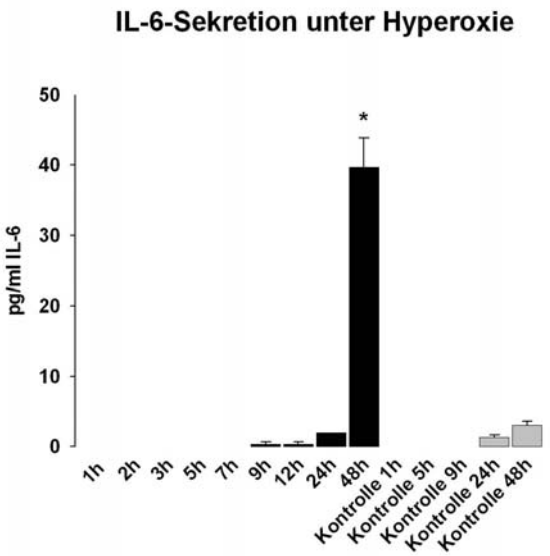


Abbildung 4.19 IL-6-Freisetzung von A549-Zellen in den Zellkulturüberstand nach 1h bis 48h Hyperoxie *P<0,05 vs. Kontrolle

4.4 Wirkung von IL-6 auf PDE4

4.4.1 Wirkung von IL-6 auf die PDE4A-Phosphorylierung

Um zu untersuchen, ob die Stimulation mit rekombinanten IL-6 einen Effekt auf die PDE4 hat, wurden zunächst in Vorversuchen mehrere Konzentrationen IL-6 mit verschiedenen Stimulationszeiten in serumhaltigem und serumfreien Zellkulturmedium getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass die 76kDa große Hoden-spezifische PDE4A-Variante mit 5ng/ml IL-6 nach einer 30min Stimulation im Vergleich zur Kontrolle deutlich phosphoryliert wird (Abb.4.20). Diese Phosphorylierung nahm nach weiteren 30min bereits wieder etwas ab und stieg nach etwa 36h wieder an (Daten nicht gezeigt). Diese späte Aktivierung der PDE4A nach 36h IL-6-Stimulation war jedoch auch mit einem Anstieg der PDE4A-Expression verbunden. Die Phosphorylierung der größeren PDE4A5 zeigte ebenfalls eine leichte Änderung, jedoch nicht so deutlich wie die kleinere 76kDa-Variante. Ein Effekt des Serums im Zellkulturmedium auf die PDE4A-Phosphorylierung konnte nicht festgestellt werden.

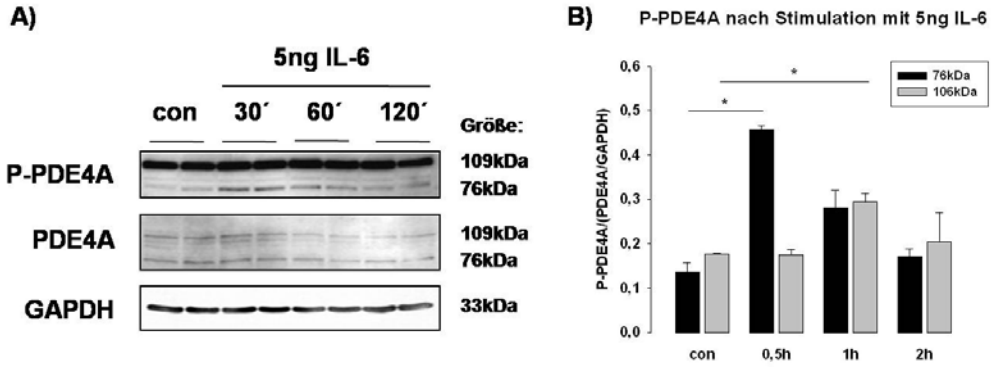


Abbildung 4.20 A549-Zellen wurden für 30, 60 und 120min mit 5ng/ml IL-6 stimuliert. **A)** Der Western Blot der Phospho-PDE4A und der PDE4A und detektiert eine 76kDa und eine 109kDa große PDE4A-Variante, die einer Hoden-spezifischen PDE4A und der PDE4A5 entsprechen. **B)** Die densitometrische Auswertung verdeutlicht den Anstieg der Phosphorylierung nach 30min Stimulation. *P<0,05 vs. Kontrolle

Neben der Phosphorylierung der PDE4A wurden auch die von IL-6 aktivierten Signalwege, der MAPK-Weg und der JAK/STAT-Weg, im Western Blot untersucht. Es wurde deutlich, dass bei allen drei IL-6-Konzentrationen nach 30min Stimulation eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1 und auch von ERK2 stattfindet (Abb. 4.21). Diese ging jedoch nach 60min wieder auf den Kontrollwert zurück. Ähnlich verhielt es sich mit Stat3, welches nach 30min ebenfalls die stärkste Phosphorylierung zeigte. Dabei wurde Stat3 am Tyr705 deutlich stärker phosphoryliert als am Ser727. Zudem war die Phosphorylierung von Stat3 am Tyr705 im Vergleich zur Kontrolle nach 60min noch immer erhöht.

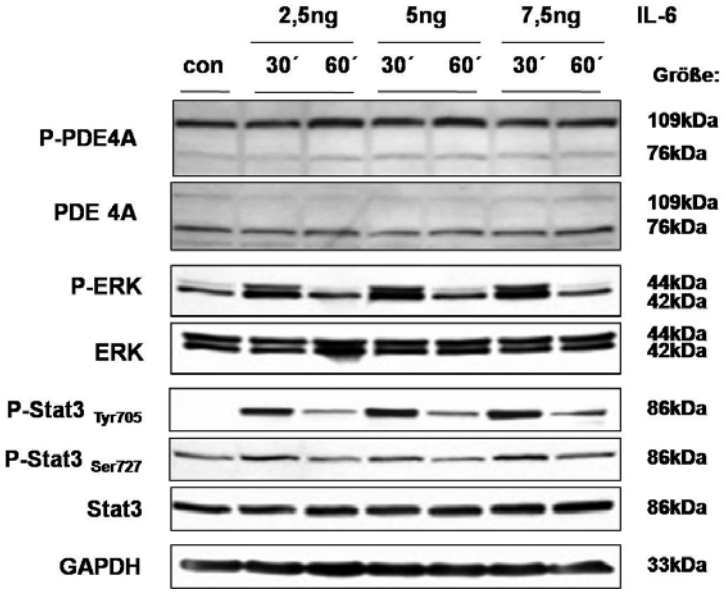


Abbildung 4.21 Western Blot-Analyse der P-PDE4A/PDE4A, P-ERK/ERK und P-Stat3/Stat3-Expression nach 30 bzw. 60min Stimulation von A549 Zellen mit 2,5; 5 und 7,5ng IL-6 zeigt die Aktivierung der PDE4A, des MAPK-Signalweges und des JAK-STAT-Signalweges.

4.4.2 Wirkung von IL-6 auf die PDE4 – Aktivität

Aufgrund der erhöhten PKA-Phosphorylierung der PDE4A nach der Stimulation mit IL-6 sollte zudem untersucht werden, ob die aktivierende Phosphorylierung auch mit einer Aktivitätssteigerung der PDE4 einhergeht. Dazu wurden A549-Zellen zunächst für 1h mit 5ng/ml IL-6 stimuliert. Danach wurde wie in Abschnitt 3.9 beschrieben das Protein isoliert und der PDE-Aktivitätsassay mit 20µg Protein in Gegenwart von 10µM Rolipram für die Bestimmung der PDE4-Aktivität durchgeführt. Bei der Auswertung des Assays konnte festgestellt werden, dass die PDE4 nach Stimulation mit 5ng/ml IL-6 verglichen zur nicht stimulierten Kontrolle eine Aktivitätssteigerung von 50% aufwies (Abb. 4.22).

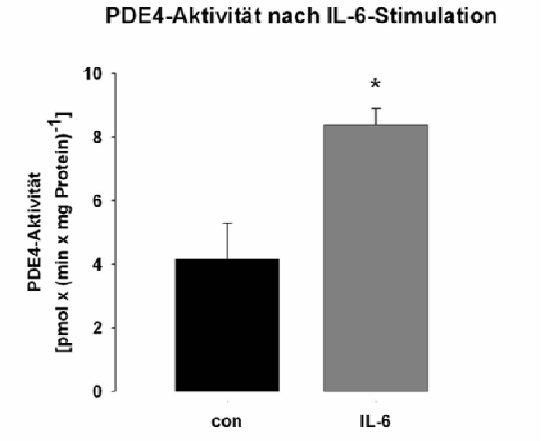


Abbildung 4.22 Aktivität der PDE4 in A549-Zellen nach 1h Stimulation mit 5ng/ml IL-6 *P<0,05 vs. Kontrolle

4.5 PDE4-Hemmung in hyperoxischer Zellkultur

4.5.1 Proliferation alveolärer Epithelzellen mit Cilomilast

Um zu untersuchen, wie sich Cilomilast auf die Proliferation pulmonaler Epithelzellen unter Hyperoxie auswirkt, wurden sowohl A549-Zellen als auch MLE12-Zellen nach einem Serumentzug, der die Zellen zunächst auf die G0/G1-Phase des Zellzyklus synchronisierte, für 24h und 48h in Hyperoxie bzw. 21% O_2 mit verschiedenen Cilomilast-Konzentrationen inkubiert (n=3). Im Anschluss erfolgte dann, wie in Abschnitt 3.8 beschrieben, die Zugabe des gelben MTT-Reagenzes, welches während der Inkubationszeit zu violettem Formazan reduziert wurde und in den Zellen präzipitierte. Bei der Absorptionsmessung des gelösten Formazans wurde sowohl in A549-Zellen als auch in MLE12-Zellen deutlich, dass Cilomilast die Proliferation der Zellen unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen nicht steigern konnte (Abb. 4.23). Der Kontrolle ähnliche oder etwas darüber liegende Messwerte wurden nur unter normoxischen Kontrollbedingungen mit 0,5µM bzw. mit 1µM Cilomilast erreicht. Bei diesen beiden Cilomilast-Konzentrationen lag die DMSO-Konzentration im Medium unter 0,1%. Mit 10µM und 20µM Cilomilast konnte in den normoxischen Zellen eine

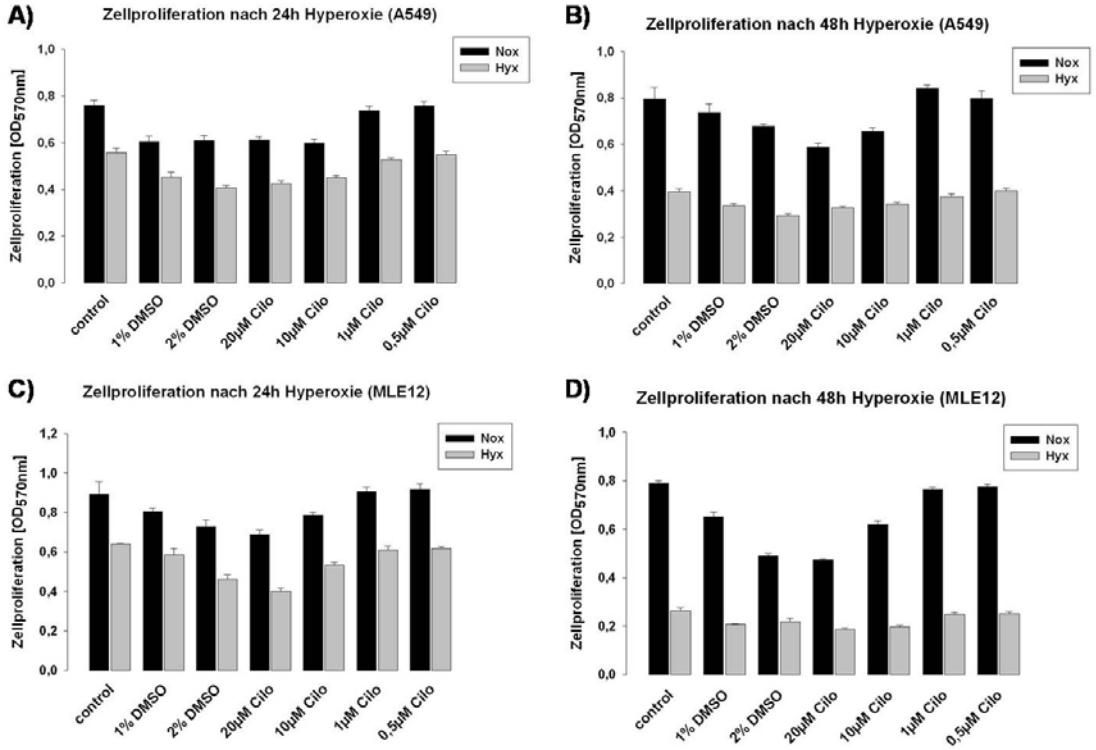


Abbildung 4.23 Proliferation von A549-Zellen (A+B) und MLE12-Zellen (C+D) nach 24h und 48h Hyperoxie mit verschiedenen Cilomilast-Konzentrationen (n=3). 1% DMSO = Kontrolle für 10µM Cilo; 2% DMSO = Kontrolle für 20µM Cilo

deutliche Verringerung der Zellproliferation gemessen werden. Unter Hyperoxie proliferierten die A549- und MLE12-Zellen mit 0,5µM bzw. 1µM Cilomilast genauso stark wie die unbehandelten Kontrollzellen. Cilomilast in Konzentrationen von 10µM und 20µM hatte nach 24h einen stärker inhibierenden Effekt als nach 48h. Dies wurde sowohl bei A549 als auch bei MLE12-Zellen beobachtet.

4.5.2 Stat3-Phosphorylierung unter Hyperoxie

Stat3 liegt in nicht-stimulierten Zellen als inaktives Monomer im Zytoplasma vor. Nach einer Stimulation, z.B. durch IFN-γ, wird Stat3 durch JAKs an einem Tyrosinrest an Position 705 phosphoryliert und bildet Homodimere mit sich selbst oder geht Heterodimere mit Stat1 ein (161). Nur als aktiviertes Dimer kann Stat3 in den Kern translozieren und durch die Bindung an die DNA die Genexpression steuern. Durch Wen *et al.* wurde beschrieben, dass die volle transkriptionelle Aktivierung jedoch nur durch eine Phosphorylierung von Stat3 an Tyr705 und Ser727 erreicht werden kann (162). In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob der unter Hyperoxie schützend wirkende Transkriptionsfaktor Stat3 in Hyperoxie verändert exprimiert und aktiviert wird.

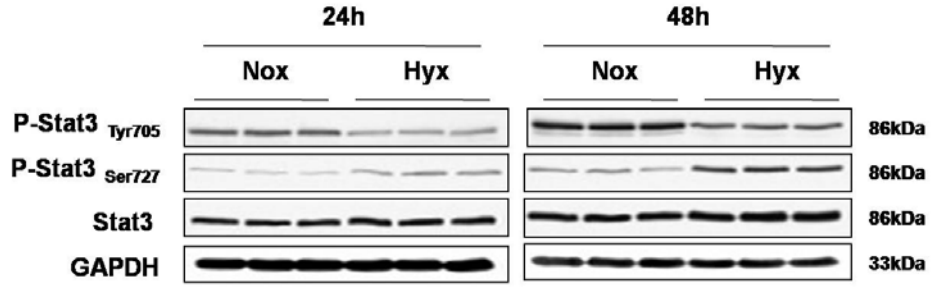


Abbildung 4.24 Western Blot von P-Stat3$_{Tyr705}$, P-Stat3$_{Ser727}$ und Stat3 aus A549-Zellen, die für 24h und 48h in Hyperoxie bzw. 21%O_2 inkubiert wurden. Für die Detektion von Stat3 wurde die Membran von P-Stat3$_{Ser727}$ gestrippt und mit α-Stat3-Antikörper inkubiert.

4.5.3 Stat3-Phosphorylierung unter Hyperoxie mit Cilomilast

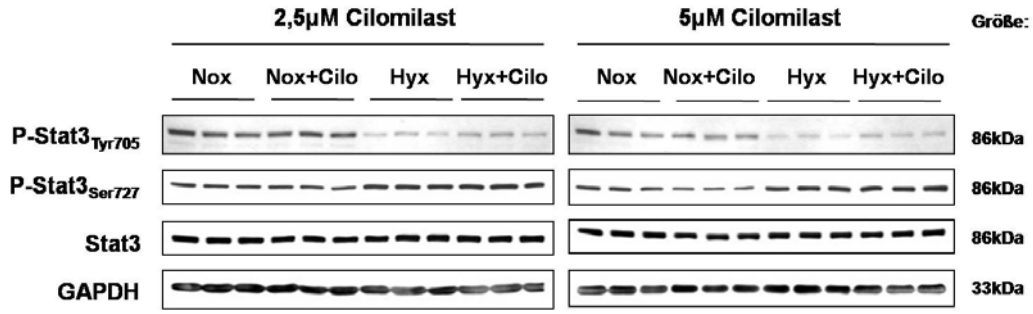
Bei der hyperoxischen Inkubation der pulmonalen Epithelzellen wurde eine deutlich abgeschwächte Tyr705-Phosphorylierung an Stat3 festgestellt. Diese schwächere Phosphorylierung deutet darauf hin, dass unter Hyperoxie eine verringerte Signalweiterleitung durch Stat3 stattfindet.

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit Cilomilast, und damit die Hemmung der PDE4, eine Änderung der Phosphorylierung am Tyrosin 705 bewirken kann. Dafür wurden A549-Zellen in Gegenwart von 2,5µM und 5µM Cilomilast für 48h unter Hyperoxie inkubiert. Bei der Verdünnung von Cilomilast in DMSO wurde darauf

geachtet, dass die DMSO-Konzentration im Zellkulturmedium bei 0,05% lag. Als Kontrolle wurden Zellen bei 21% O_2 ebenfalls mit den gleichen Konzentrationen Cilomilast behandelt. Im Anschluss wurde das Protein isoliert und einem Western Blot mit Antikörpern gegen P-Stat3$_{Tyr705}$, P-Stat3$_{Ser727}$ und Stat3 unterzogen.

Wie der Abbildung 4.25 A und B zu entnehmen ist, konnte sowohl mit 2,5µM als auch mit 5µM Cilomilast eine leichte Erhöhung der Stat3$_{Tyr705}$-Phosphorylierung erreicht werden. Unter Kontrollbedingungen hatte Cilomilast fast keinen Effekt auf die Stat3$_{Tyr705}$-Phosphorylierung. In Bezug auf die Serin 727-Phosphorylierung von Stat3 konnte eine geringfügige Abschwächung festgestellt werden. Diese konnte in den Kontrollzellen mit 5µM Cilomilast ebenfalls festgestellt werden.

A)



B)

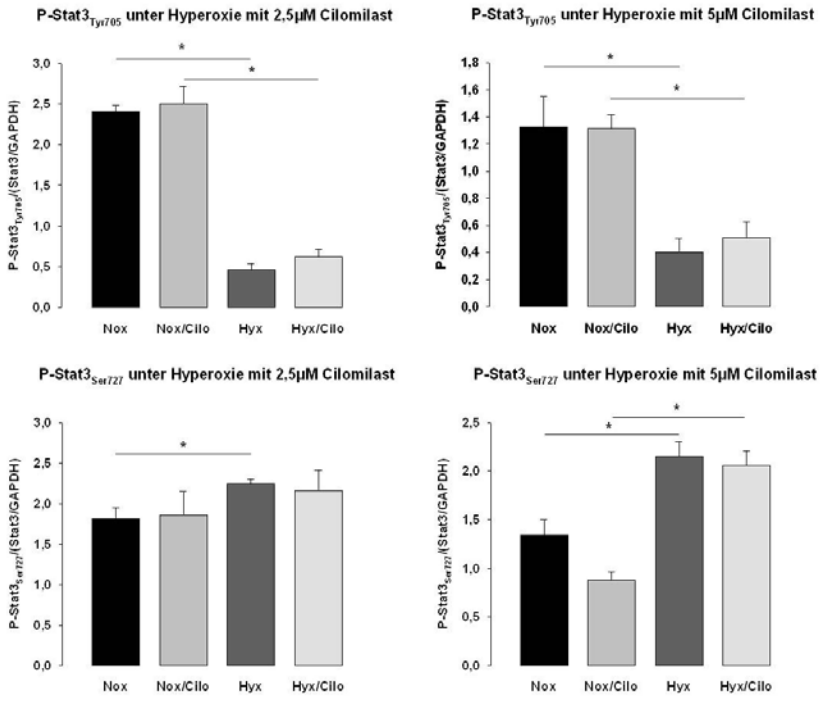


Abbildung 4.25 Cilomilast hat einen Effekt auf die Stat3-Phosphorylierung unter Hyperoxie **A)** Western Blot von P-Stat3$_{Tyr705}$, P-Stat3$_{Ser727}$ und Stat3 von A549-Zellen, die für 48h in Hyperoxie mit 2,5µM und 5µM Cilomilast behandelt wurden. B) Densitometrische Auswertung des Western Blots *P<0,05 vs. Kontrolle

4.5.4 SP-B – Expression in Typ II Epithelzellen nach Cilomilast-Behandlung

Die Lungenfunktion ist von der Differenzierung und Proliferation respiratorischer Epithelzellen und deren Synthese und Sekretion von Surfactant-Lipiden und –Proteinen abhängig. Während der respiratorischen Entzündungsreaktion haben Zytokine, welche durch Makrophagen und Epithelzellen ausgeschüttet werden, einen signifikanten Einfluss auf die Surfactant-Protein-Homöostase. Durch Yan und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass JAK1 und Stat3 die Promotor-Aktivität von SP-B in Epithelzellen als Antwort auf die Stimulation durch IL-6, IL-11 und Retinsäure aktiviert (163).

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Cilomilast durch die vorher gezeigte Änderung der $Stat3_{Tyr705}$-Phosphorylierung eine Änderung der SP-B-Expression in Typ II Epithelzellen unter Hyperoxie bewirken kann.

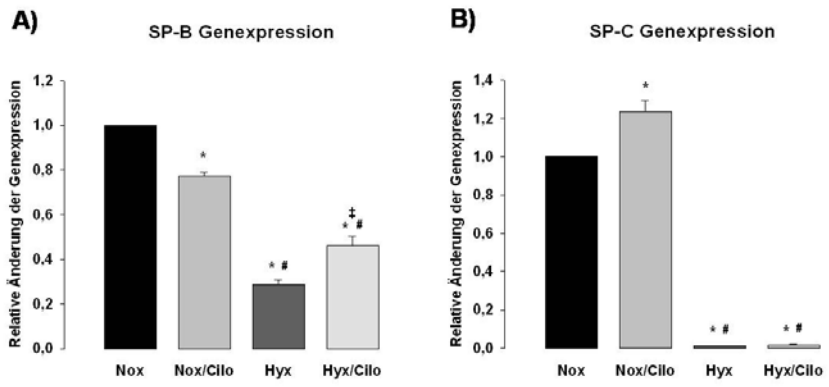


Abbildung 4.26 Real-time PCR zur Untersuchung der SP-B (A) und SP-C (B) Genexpression an MLE12-Zellen nach 48h Inkubation in Hyperoxie und Behandlung mit 10µM Cilomilast *P<0,05 vs. Kontrolle (Nox); #P<0,05 vs. Kontrolle + Cilomilast (Nox/Cilo); ‡P<0,05 vs. Hyperoxie (Hyx)

In diesem Versuch wurden MLE12-Zellen verwendet, da diese SP-B und SP-C exprimieren und A549-Zellen nicht. Die Zellen wurden für 48h unter Hyperoxie und Normoxie angezogen. Sie wurden in diesem Experiment mit 10µM Cilomilast behandelt, um den Effekt der mit 2,5µM bzw. 5µM Cilomilast erreichten $Stat3_{Tyr705}$-Phosphorylierung noch zu verstärken. Die Gesamt-RNA wurde mit dem FastLane Cell cDNA Kit der Firma Qiagen isoliert und von genomischer DNA-Kontamination befreit. Im Anschluss wurde sie in cDNA umgeschrieben. Dann wurde die cDNA in die Real-time PCR zur Bestimmung der SP-B und SP-C Genexpression eingesetzt. Als Housekeeping-Gen wurde PBGD verwendet. Die PCR wurde wie in Abschnitt 3.4.3.2 beschrieben durchgeführt.

Die Auswertung der Real-time PCR erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode und zeigte, das die SP-B Expression unter Hyperoxie um 71% schwächer ist als unter Kontrollbedingungen. Die Behandlung mit 10µM Cilomilast führte jedoch zu einer rund 17%igen Erhöhung der SP-B Expression, was zu den Ergebnissen der Stat3-Phosphorylierung passt. In den Kontrollzellen

zeigte sich ebenfalls ein Effekt, hier wurde die SP-B Expression um etwa 23% abgeschwächt. Etwas anders verhielt sich die SP-C Expression. Hier zeigte sich eine mit fast 99% sehr starke Reduktion der Expression, welche auch durch Cilomilast nicht signifikant angehoben werden konnte. In der Kontrolle jedoch stieg die Expression von SP-C um rund 23% an.

5. Diskussion

5.1 Hyperoxie führt zu einer Erhöhung der PDE4-Expression in der Mauslunge

Oxidativer Stress spielt bei der Entwicklung von BPD, welche vor allem durch eine verringerte Alveolarisierung und Vaskularisierung der sich entwickelnden Lunge charakterisiert wird (7; 9), eine wichtige Rolle. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) führen zu einer Schädigung des Lungengewebes und zu einer persistierenden Entzündungs-reaktion, die auch eine Veränderung der cAMP-Konzentration in den Zellen zur Folge hat. Durch Parker *et al.* wurde berichtet, dass cAMP u.a. die Freisetzung lysosomaler Enzyme aus Entzündungszellen, die Antigen-induzierte Lymphozytenaktivierung, die Aggregation von Blutplättchen und Lymphozyten und die Empfindlichkeit von Neutrophilen und Makrophagen gegenüber chemotaktischer und phagozytotischer Stimuli inhibiert (164). Die ubiquitären *second messenger* cAMP und cGMP entstehen durch die Aktivierung der Adenylat- bzw. Guanylatzyklase und übermitteln Signale vieler Hormone, Neurotransmitter und anderer zellulärer Effektoren durch die Bindung an spezifische intrazelluläre Regulatorproteine (165). Dies sind z.B. die Proteinkinase A (PKA), zyklische Nukleotid-aktivierte Ionenkanäle und cAMP/cGMP stimulierte GTPase-Austauschfaktoren (60). Zur Terminierung des Signals werden cAMP und cGMP durch PDEs abgebaut. Bis heute sind 11 Familien von PDEs bekannt, welche jeweils eine variierende Spezifität gegenüber cAMP und cGMP aufweisen. Zur Erhöhung des intrazellulären cAMP/cGMP-Spiegels können die PDEs durch spezifische Inhibitoren gehemmt werden, was zur Aktivierung spezifischer Signalwege durch Protein-phosphorylierung führt und verschiedene Prozesse wie z.B. die Funktion des Zentralnerven-systems (ZNS), des kardiovaskulären Systems (166), von Entzündungszellen und dem Immunsystem (167), der Zelladhäsion und von metabolischen Prozessen (168) beeinflussen kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße sich die Expression der PDEs in der Lunge von Mäusen verändert, die für 7 bis 28 Tage einer Hyperoxie von 85%O_2 ausgesetzt waren. Dafür wurde die mRNA- und Proteinexpression der PDEs im Lungenhomogenat mit semiquantitativer PCR bzw. Western Blot-Analyse untersucht. Das Ergebnis der transkriptionellen Analyse der PDEs zeigte sowohl eine erhöhte bzw. gleichbleibende Expression der cAMP-spezifischen PDEs (PDE4, 7, 8) als auch der dualspezifischen PDEs (cAMP/cGMP; PDE1, 2, 3, 10). Bei den untersuchten cGMP-spezifischen PDEs (PDE5, 9) fiel vor allem bei der PDE5 eine schwächere Expression unter Kontroll- und hyperoxischen Bedingungen auf.

Bei der Analyse der Proteinexpression konnte im Fall der PDE1A eine herabgesetzte Expression festgestellt werden, was bei der erhöhten Genexpression nicht erwartet wurde. Da die PDE1A jedoch genau wie die PDE5A eine höhere Affinität für cGMP als für cAMP aufweist (169), könnte ihre abnehmende Expression mit der ebenfalls geringeren Aktivität der Komponenten des NO/cGMP-Signalweges unter Hyperoxie (nicht veröffentlichte Daten von Silke Köbrich) in der Mauslunge einhergehen. Von Ca^{2+}, welches im Komplex mit Calmodulin die Aktivität der PDE1A erhöht, wird berichtet, dass seine intrazelluläre Konzentration unter oxidativem Stress in Ratten-Endothelzellen (170), menschlichen pulmonalen Epithelzellen (171) und auch in humanen Makrophagen (171) ansteigt. Liegt das Substrat der PDE1A jedoch nur in geringen Konzentrationen vor, führt auch ein aktivitätssteigernder Co-Faktor zu keinem höheren Substratumsatz.

Auch die cGMP-spezifische PDE5 zeigte auf Proteinebene eine herabgesetzte Expression, was mit dem Ergebnis der Genexpression aber überein stimmt. Es erfolgte auch hier wahrscheinlich eine schwächere Expression, da der gesamte cGMP-Signalweg in diesem Mausmodell eine geringere Priorität zu haben scheint. Ähnlich wie in dem von uns verwendeten Mausmodell konnte durch die Gruppe von Wagenaar *et al.* mittels Mikroarray-Analyse in den Lungen neonataler hyperoxischer Ratten, welche für 10 Tage in 100%O_2 gehalten wurden, ebenfalls eine schwächere PDE5-Expression unter Hyperoxie gemessen werden (172). In einer anderen Gruppe um Ladha *et al.* führte jedoch die Behandlung von hyperoxischen Ratten (95%O_2) mit Sildenafil, einem PDE5-Hemmer, zu einer verbesserten Alveolarisierung, einer gesteigerten Angiogenese und zur Abschwächung der Symptome einer pulmonalen Hypertonie (155), was auf eine gesteigerte Expression und Aktivität der PDE5 in den glatten Muskelzellen der Gefäße schließen lässt. Da beide Gruppen bezüglich auf Ratten unterschiedliche Ergebnisse zur PDE5 publizieren, kann nicht geschlussfolgert werden, ob sich die Expression der PDE5 in der Mauslunge ähnlich verhält wie in der Ratte. Die Ergebnisse von Ladha *et al.* werden jedoch durch die erst kürzlich publizierten Ergebnisse von Farrow *et al.* bekräftigt. Die 24h Hyperoxie-Exposition fetaler pulmonal arterieller glatter Muskelzellen (FPASMC) vom Schaf führte zu einer geringeren Sensitivität gegenüber NO, was mit einer erhöhten mRNA- und Proteinexpression und auch mit einer gesteigerten Aktivität der PDE5 einherging. Die herabgesetzte NO-Sensitivität konnte durch die Behandlung mit Sildenafil teilweise wieder hergestellt werden (173). Da die Therapie mit inhalativem NO (Stickstoffmonoxid) auch bei Frühgeborenen mit pulmonaler Hypertonie eine vasorelaxierende Wirkung zeigt, könnte die Aktivität der PDE5 in den glatten Muskelzellen ebenfalls erhöht sein. Trotzdem machen diese Ergebnisse deutlich, dass es sehr große Unterschiede zwischen den verschiedenen Tiermodellen gibt, was eine Schlussfolgerung für eine Therapie im Menschen sehr erschwert.

Bei der Analyse des PDE4-Proteins im Lungenhomogenat wurden die Isoformen PDE4A und 4D genauer untersucht. Bei beiden Isoformen konnten mehrere Spleißvarianten detektiert werden, die im Fall der PDE4A unter Hyperoxie eine gleichmäßige und deutliche Hochregulation aufwiesen. Bei der PDE4D zeigte sich hingegen eine heterogene Expression der Spleißvarianten, was in einer schwächeren oder gleichbleibenden Expression der langen und einer stärkeren Expression der kurzen Varianten zum Ausdruck kam. Die PDE4-Isoformen 4A bis 4D werden ubiquitär exprimiert, hauptsächlich jedoch im Gehirn, in vaskulären Endothelzellen und in Entzündungszellen (Leukozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen) (174; 175). Daher ist die deutliche Zunahme der PDE4-Expression im Lungenhomogenat wahrscheinlich vorrangig auf die in der Lunge vorherrschende Entzündungsreaktion zurückzuführen. Jedoch konnte durch die immunhistochemische Färbung gezeigt werden, dass die PDE4A und 4D ebenfalls in alveolären Epithelzellen exprimiert werden und dort eine Rolle in der Wachstumsstörung des Alveolarepithels spielen könnten. Wie auch durch Wright *et al*. beschrieben, wird die PDE4 auch in menschlichen primären alveolären Epithelzellen exprimiert und macht dort den Hauptanteil der cAMP-hydrolysierenden PDE-Aktivität in der Zelle aus (176). Daher sollte die Rolle der PDE4 in alveolären Epithelzellen unter Hyperoxie weiter untersucht werden.

Wie die PDE4 zeigte auch die PDE7 als cAMP-spezifische PDE nach der Hyperoxie-Exposition auf Transkript- und Proteinebene eine erhöhte Expression. Auch durch Perkowski *et al.* konnte im Mikroarray eine erhöhte Transkription des PDE7A-Gens im Lungenhomogenat adulter Mäuse festgestellt werden, die bis zu 48h in 95%O_2 gehalten wurden (177). Diese erhöhte Expression kann ebenfalls durch die im Lungengewebe vorherrschende Entzündung erklärt werden, da die drei Spleißvarianten der PDE7A, 7A1 bis 7A3 hauptsächlich in T-Zellen aber auch im Gehirn und in Muskelzellen exprimiert (178; 179) werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die PDE4 und die PDE7 die am meisten durch Hyperoxie regulierten PDEs sind. Da die PDE7-Expression jedoch hauptsächlich auf Entzündungszellen beschränkt war, wurde sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf die PDE4 konzentriert, die neben ihrem Vorhandensein in Entzündungszellen ebenfalls in alveolären Epithelzellen exprimiert wurde und daher als potenzielles Ziel für die Behandlung der Hyperoxie-induzierten Lungenreifungsstörung in Frage kam.

5.2 Der PDE4-Inhibitor Cilomilast verbessert die Lungenstruktur und - funktion unter Hyperoxie

Wie im ersten Teil dieser Arbeit festgestellt werden konnte, zeigte die PDE4, welche sowohl in Entzündungszellen als auch in alveolären Epithelzellen exprimiert wurde, eine erhöhte Expression unter hyperoxischen Bedingungen. Aus diesem Grund sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Hemmung der PDE4 im hyperoxischen Mausmodell zu einer Verbesserung der für BPD charakteristischen Lungenreifungsstörung führt.

Wie auch in anderen Tiermodellen mit neonatalen Mäusen (19; 50), Ratten (51; 52), Pavianen (55; 56), Lämmern (53) oder Meerschweinchen (54) führte die 28 tägige Hyperoxie-Exposition der Mäuse zu einer gestörten Lungenentwicklung wie sie auch bei Frühgeborenen mit der neuen Form der BPD beobachtet werden kann. Diese zeichnete sich durch eine veränderte Lungenmorphologie mit stark vereinfachten Alveolen und einem vergrößerten Luftanteil, durch eine verringerte dynamische Compliance und eine verschlechterte Vaskularisierung aus. Zudem wirkte sich die gestörte Entwicklung der Lunge auch auf das Körpergewicht aus, welches in den hyperoxischen Tieren verglichen zu den Kontrolltieren fast 50% weniger betrug. Die Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor Cilomilast von Tag 14 bis 28 führte zu einer geringfügigen Steigerung des Körpergewichts und zu einer Verbesserung des Allgemeinbefindens, was wahrscheinlich mit der Absenkung der Entzündungsreaktion in der Lunge durch Cilomilast zusammen hing. Zu diesem Ergebnis kam auch de Visser *et al.*, der hyperoxische neonatale Ratten mit Rolipram oder Piclamilast, einem PDE4-Inhibitor der zweiten Generation, behandelte (180). Jedoch sind seine Ergebnisse etwas kontrovers, da beide PDE4-Inhibitoren zu einer bis zu 7 Tage längeren Lebensdauer führten, das Körpergewicht der behandelten hyperoxischen Tiere jedoch während der gesamten Behandlungsdauer von 10 Tagen unter dem der unbehandelten hyperoxischen Kontrolltiere lag (180). In einer früheren Publikation der gleichen Gruppe führte die Behandlung der hyperoxischen Ratten mit Pentoxifyllin, einem unspezifischen PDE-Hemmer, ebenfalls zu einer bis zu 3 Tage verlängerten Lebensdauer (181). Anhand dessen wird deutlich, dass spezifische PDE4-Inhibitoren deutlich effektiver wirken als unspezifische PDE-Inhibitoren die nur zu einem Anstieg von cAMP und cGMP führen. Das zeigt sich daran, dass der spezifische PDE4-Inhibitor Ciclamilast in einem Mausmodell für allergisches Asthma sowohl die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wie IL-4, TNF-α und Eotaxin aus Entzündungszellen, als auch deren Expression unterdrückte (182). Des Weiteren konnte durch Deng *et al*. in diesem Mausmodell gezeigt werden, dass Ciclamilast abhängig von der Dosis außerdem die Gesamtanzahl an Entzündungszellen, besonders aber von neutrophilen

und eosinophilen Granulozyten, in der Lavageflüssigkeit reduzierte (182) was zu einer deutlichen Verbesserung der Krankheitssymptome führte.

In der gleichen Studie konnten zudem der elastische Lungenwiderstand und die dynamische Compliance, die zuvor durch Methacholin verschlechtert wurden, durch Behandlung mit Ciclamilast deutlich verbessert werden. Eine Verbesserung der Lungenfunktion konnte auch bei der Messung der dynamischen Compliance in unserem Mausmodell festgestellt werden. Die ermittelten Messwerte der mit Cilomilast behandelten Tiere entsprachen denen der normoxischen Kontrolltiere. Da sich die Lungenstruktur unter Cilomilast-Behandlung jedoch nur leicht verbesserte, könnte die gesteigerte Lungenfunktion mit Veränderungen bei den Strukturproteinen der extrazellulären Matrix Elastin und Kollagen zusammen hängen. Wie durch Bruce *et al*. beschrieben, erfolgt durch Hyperoxie eine geringere mRNA-Expression des löslichen Elastin-Vorläufers Tropoelastin in Fibroblasten aus fetalen oder postnatalen Rattenlungen (183). Weiterhin ist bekannt, dass die Genexpression von Tropoelastin in Haut-Fibroblasten (184) und in neonatalen Fibroblasten (185) der Rattenlunge durch erhöhte Konzentrationen von TNF-α und IL-1β herunter reguliert wird. Da die spezifische Hemmung der PDE4 die Freisetzung bzw. Expression dieser inflammatorischen Zytokine hemmt, könnte die Behandlung mit Cilomilast durchaus eine Steigerung der Lungenelastizität über die erhöhte Expression von Tropoelastin bewirkt haben.

Überdies kann die Struktur der respiratorischen Fläche anhand weiterer Parameter wie dem Mean Linear Intersept (MLI), der Septendicke und dem Gesamtluftanteil charakterisiert werden. Der MLI, der den mittleren interalveolären Abstand im Lungengewebe beschreibt, wies im Vergleich zur Kontrolle eine fast 50%ige Steigerung auf, welche durch die Behandlung mit Cilomilast geringfügig aber signifikant reduziert werden konnte. In dem im Vorfeld genannten hyperoxischen Rattenmodell von de Visser *et al*. zeigte der MLI nach der Behandlung mit Rolipram oder Piclamilast jedoch keine signifikante Veränderung (180; 180). Dennoch konnte durch de Visser *et al*. eine signifikante Erhöhung der Genexpression des VEGFR2 und des FGFR4 nach der Behandlung mit Rolipram und Piclamilast beobachtet werden (180), was eigentlich auf eine verbesserte Lungenstruktur schließen lassen würde. Außerdem führte die PDE4-Inhibition im hyperoxischen Rattenmodell zu einer Reduktion der Septendicke, welche auf einen geringeren Anteil von Leukozyten und Makrophagen in den Septen und im alveolären Lumen zurückzuführen war (180). Nach der Behandlung mit Cilomilast konnte auch in unserem Mausmodell eine signifikante Reduktion der Septendicke festgestellt werden, welche ebenfalls durch eine geringere Einwanderung von Entzündungszellen ins Gewebe zu erklären ist. Da sich die Abnahme der Septendicke und die durch eine offenbar etwas verbesserte Differenzierung des Lungengewebes herbei

geführte Verkleinerung des MLI mehr oder weniger die Waage hielten, fiel die Abnahme des Gesamtluftraumes ziemlich gering aus.
Dennoch kann zusammenfassend festgestellt werden, das Cilomilast durch die Hemmung der PDE4, hauptsächlich mit der Abschwächung der Entzündungsreaktion, zu einer verbesserten Lungenstruktur, einer Besserung der Lungenfunktion und des weiteren zu einer gesteigerten Vitalität der Tiere geführt hat was auch im klinischen Alltag bei der Behandlung von BPD seine Anwendung finden könnte.

5.3 Rolle der PDE4 in alveolären Epithelzellen

Wie schon im Vorfeld erläutert wurde, erstreckt sich die Expression der PDE4 neben den Entzündungszellen auch auf pulmonale Epithelzellen. Während der Exposition in Hyperoxie kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche eine entzündliche Schädigung der Lunge und somit eine Schädigung und das Absterben pulmonaler Epithelzellen hervorrufen können (159). Der Zelltod der Epithelzellen durch Hyperoxie ist einer der Gründe für die herabgesetzte Lungenentwicklung bei BPD und weist sowohl nekrotische als auch apoptotische Charakteristika auf (186). Da eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration, abhängig vom Zelltyp, durch die Aktivierung der PKA sowohl bei der Zelldifferenzierung und Proliferation als auch bei der Apoptose von Zellen eine Rolle spielt (187-190), sollte untersucht werden, wie die sich Expression und Aktivität der cAMP-spezifischen PDE4 in pulmonalen Epithelzellen unter Hyperoxie verändert.
Bei der Untersuchung der PDE4-Expression in A549 bzw. MLE12-Zellen, welche für 24h und 48h unter Hyperoxie inkubiert wurden, konnte festgestellt werden, dass die Expression der PDE4A, nicht aber der PDE4D, nach 48h Hyperoxie deutlich erhöht war. Die 66kDa große vollständig Membran-assoziierte PDE4A1 (191) zeigte dabei die signifikanteste Erhöhung. Die aktivitätssteigernde Phosphorylierung durch die PKA, welche am N-terminalen Ende von UCR1 erfolgt, war jedoch unter Hyperoxie schwächer, als unter Kontrollbedingungen, was auf eine herabgesetzte PDE4-Aktivität unter Hyperoxie hindeutet. Und tatsächlich stellte sich im PDE-Aktivitätsassay eine geringere PDE4-Aktivität nach Hyperoxie-Exposition heraus. Diese ging mit einer gesteigerten intrazellulären cAMP-Konzentration nach 24h und 48h Hyperoxie einher. Ob die erhöhte Expression der kurzen PDE4A1 in Lungenepithelzellen auch auf die CRE (cAMP Response Element) -mediierte Transkription des PDE4A-Gens durch die Aktivierung der PKA und durch den PKC-MAPK-Signalweg (192) zurück geführt werden kann, ist nicht genau bekannt. Dieser Mechanismus führt jedoch in vaskulären glatten Muskelzellen zur Steigerung der Expression der kurzen PDE4D1 und 4D2-Varianten (192). Bei vergleichenden Untersuchungen der Proteinkinase- und Phosphatase-Aktivitäten in normoxischen und hyperoxischen Rattenlungen und in alveolären Typ II-Zellen stellte sich

heraus, dass sich die PKA-Aktivität unter Hyperoxie im Vergleich zur Kontrolle kaum veränderte (193; 194). Das lässt darauf schließen, dass die cAMP-Konzentration auch unter Hyperoxie nicht so stark anstieg wie in unseren Experimenten. Bei der Hyperoxie-Exposition von MDCK (Madin-Darby canine kidney) Epithelzellen konnte jedoch wie in unserem Experiment ebenfalls ein erhöhter cAMP-Spiegel in den Zellen festgestellt werden (195). Da hohe intrazelluläre cAMP-Konzentrationen gewöhnlich zu einer Aktivierung der PKA führen, welche anschließend durch Phosphorylierung die PDE4 aktiviert, ist das gleichzeitige Vorhandensein von einem hohen cAMP-Spiegel und einer herabgesetzten PDE4-Aktivität in der Zelle recht ungewöhnlich. Es sei denn die PDE wird durch ein anderes Protein gehemmt, was die hohen Konzentrationen an cAMP erklären und das erhöhte Absterben der Epithelzellen unter Hyperoxie verstärken könnte. Dies konnte durch Yan *et al*. in Kardiomyozyten beobachtet werden, in denen die PDE3A mit dem cAMP Response Element-Modulator ICER (*Inducible cAMP early Repressor*) in einer positiven Rückkopplungsschleife zu einer erhöhten Apoptose der Kardiomyozyten führte (196). Die gesteigerte Expression von ICER, welche sich aus der Aktivierung des β-adrenergen Rezeptors und durch Angiotensin II ergab, hatte eine Repression der PDE3A-Expression zu Folge, die wiederum durch die gesteigerte cAMP-Konzentration in der Zelle zur PKA-Aktivierung und damit zur Phosphorylierung von CREB (CRE-Bindeprotein) führte, welches die Transkription des ICER-Gens aktivierte (196).

Obwohl in unserem Experiment keine reprimierte PDE4-Expression festgestellt wurde, könnte eine Interaktion mit einem Repressor-Protein wie ICER trotzdem der Grund für die Aktivitätsänderung der PDE sein, was die erhöhte intrazelluläre *second messenger*-Konzentrationen zur Folge hat (Abb. 5.1).

Des Weiteren konnte in den A549-Zellen nach längerer Hyperoxie-Exposition eine verstärkte IL-6-Freisetzung ins Zellkulturmedium festgestellt werden. Diese stieg bis zum 24h Zeitpunkt nur leicht an, zeigte aber nach 48h einen deutlichen Anstieg. Diese verstärkte IL-6-Freisetzung korrelierte mit der erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration unter Hyperoxie, die wahrscheinlich neben anderen Faktoren über die Aktivierung der PKA und CREB zur gesteigerten IL-6 Expression beitrug. Wie durch die Studie von Hershko *et al*. bekannt ist, potenziert cAMP die durch IL-1β induzierte IL-6-Produktion in humanen intestinalen Epithelzellen (197). Des Weiteren wurde gezeigt, dass cAMP zwar in der Lage war die DNA-Bindeaktivität der Transkriptionsfaktoren CREB, AP-1 (Aktivator Protein-1) und C/EBP (CCAAT/ Enhancer Binding Protein) zu erhöhen, jedoch allein nicht ausreichte um die IL-6-Expression und Produktion zu aktivieren (197). Daher ist cAMP ein wichtiger Modulator der IL-6-Bildung. In einer anderen Studie von Yoshida *et al.* wurde ebenfalls bestätigt, dass

reaktive Sauerstoffintermediate (ROIs) an der Bildung von IL-6 bronchialen und alveolären Epithelzellen beteiligt sind (198), was mit unseren Resultaten übereinstimmt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die PDE4A in den pulmonalen Epithelzelllinien A549 und MLE12 unter Hyperoxie erhöht und die PDE4D gleichbleibend stark exprimiert wird, jedoch die gesamte PDE4-Familie eine geringere enzymatische Aktivität zu haben scheint. Dies könnte durch ein inhibitorisches Protein hervorgerufen werden, welches den cAMP-Spiegel in der Zelle und die IL-6-Freisetzung ansteigen lässt und somit die Apoptose der Epithelzellen unter Hyperoxie fördert.

5.4 IL-6 erhöht die PDE4-Aktivität in alveolären Epithelzellen

Um zu untersuchen, ob erhöhte IL-6-Konzentrationen außerhalb der Zelle einen Einfluss auf die PDE4 haben, wurden pulmonale Epithelzellen mit rekombinantem IL-6 stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation eine erhöhte Phosphorylierung der PDE4A durch die PKA zur Folge hat, was des Weiteren zu einer Steigerung der enzymatischen Aktivität der PDE4 führte. Eine Aktivierung von PDEs durch Zytokine ist bisher nur von IL-3 und IL-4 bekannt, die in myeloiden FDCP2-Zellen die PDE3 und die PDE4 über unterschiedliche Signalwege aktivieren (199). Dabei führte die Stimulation der myeloiden Zellen mit IL-4 zu einer PI3-K – abhängigen und bezüglich auf die PDE4 auch zu einer MAPK-abhängigen Aktivierung der PDE3 und PDE4, die durch TNF-α geblockt werden konnte. Die Stimulation mit IL-3 und auch mit GM-CSF, die nicht sensitiv gegenüber TNF-α war, hatte ebenfalls eine MAPK-abhängige Aktivierung der PDE4 zur Folge, die durch einen MEK-1-Inhibitor gehemmt werden konnte (199). Da die PDE4-Aktivierung durch IL-3 und IL-4 in Abhängigkeit von MAPK erfolgt, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die IL-6 mediierte Aktivierung der PDE4 über MAPK geschieht. Da durch die Stimulation mit IL-6 eine Aktivierung von ERK1/2 erfolgt, wäre daraufhin auch eine PDE4-Aktivierung möglich. Diese könnte bei allen PDE4-Familienmitgliedern außer der PDE4A erfolgen, da diese kein ERK-Konsensus-Motiv in der dritten Unterdomäne ihrer katalytischen Untereinheit besitzt, an der die Phosphorylierung durch ERK an einem Serin-Rest (Ser579) erfolgt (200). Diese Phosphorylierung wirkt auf die langen und sehr kurzen PDE4-Isoformen inhibierend, jedoch auf die kurzen Isoformen aktivierend (117) (Abb. 1.2). Die hemmende ERK-Phosphorylierung hat jedoch letztendlich einen aktivierenden Effekt, da es durch die PDE-Hemmung zu einer cAMP-Akkumulation kommt, welches wiederum die PKA und somit auch die PDE4 aktiviert, was dann den inhibierenden Effekt der ERK-Phosphorylierung aufhebt (117). Da die Phosphorylierung der PDE4A durch ERK wie schon erwähnt nicht möglich ist, muss die Aktivierung der PKA auf einem anderen Signalweg erfolgen. Außerdem ist es möglich, dass

die anderen hier nicht untersuchten PDE4-Familienmitglieder ebenfalls durch IL-6 aktiviert werden und so zur erhöhten Enzymaktivität beitragen.
Offensichtlich scheint es sich bei der Aktivierung der PDE4 durch IL-6 auch um einen Rückkopplungsmechanismus zu handeln, bei dem höhere cAMP-Konzentrationen, wie eben beschrieben, zu einer erhöhten IL-6 Produktion führen, welches dann durch die Aktivierung der PDE4 und somit durch die Senkung des cAMP-Spiegels zu einer herabgesetzten IL-6-Konzentration führt. Dieser Mechanismus scheint jedoch unter Hyperoxie nicht ganz zu funktionieren, da die PDE4 nicht aktiviert wird. Dies könnte wie schon erwähnt durch eine Interaktion der PDE4 mit einem Repressor-Protein erklärt werden.

5.5 Proliferation alveolärer Epithelzellen mit Cilomilast

Der Einsatz von PDE4-Inhibitoren hat hauptsächlich einen entzündungshemmenden Hintergrund. Die Akkumulation von cAMP, führt zur Abschwächung der Zytokin-Produktion, der Zellproliferation, der Chemotaxis und der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, sowie zu einer geringeren NADPH-Oxidase-Aktivität (201). Die antiproliferative Wirkung eines PDE4-Inhibitors gilt jedoch nicht nur für Immunzellen, sondern auch für andere Zelltypen. So wurde z.B. an humanen glatten Aorta-Gefäßmuskelzellen festgestellt, dass die Inhibition der PDE3, der zweitwichtigsten cAMP-spezifischen PDE, mit einhergehender Erhöhung des cAMP-Spiegels zu einer Hemmung des durch PDGF (*platelet-derived growth factor*) -stimulierten Zellwachstums führte (202). Außerdem wurden durch Hayashi *et al.* eine damit verbundene erhöhte Expression von p53 und p21 und ebenso eine gesteigerte Apoptose festgestellt. Untersuchungen einer anderen Gruppe zeigten, dass die Inhibition der PDE4 auch in humanen pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen einen anti-proliferativen Effekt hat, der bei weiterer Stimulation mit cAMP-erhöhenden Substanzen wie Iloprost oder Forskolin ebenfalls zur Induktion von Apoptose führte (203). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Hemmung der PDE4 durch Cilomilast auf die Zellproliferation von pulmonalen Epithelzellen unter Hyperoxie auswirkt. Die Ergebnisse machten deutlich, dass die Zellen, die mit Cilomilast in Konzentrationen von 0,5µM und 1µM behandelt wurden, gleiche Wachstumsraten aufwiesen, wie die unbehandelten Kontrollzellen. Das war sowohl unter normoxischen als auch unter hyperoxischen Bedingungen der Fall. Eine Verschlechterung der Zellproliferation war nur mit höheren Cilomilast-Konzentrationen zu beobachten, wobei außerdem höhere DMSO-Konzentrationen im Medium eine Rolle spielten. Das könnte man dadurch erklären, dass die geringeren Cilomilast-Konzentrationen keine vollständige Hemmung der PDE4 bewirkten und damit zu keinem proliferations-hemmenden Anstieg des cAMP-Spiegels unter Normoxie führten. Dies konnte jedoch mit 10µM und 20µM Cilomilast unter Normoxie beobachtet werden, da die Hemmung und somit

der cAMP-Anstieg ausgeprägter waren. Unter Hyperoxie konnte mit 10µM und 20µM Cilomilast nach 24h eine stärker ausgeprägte Proliferationsinhibition beobachtet werden, als nach 48h, da der cAMP-Spiegel bereits durch die längere Hyperoxie-Exposition in der Zelle deutlich erhöht war. Abschließend kann man sagen, dass Cilomilast ab Konzentrationen von 10µM auch in pulmonalen Epithelzellen einen anti-proliferativen Effekt hat, der sich wahrscheinlich auch pro-apoptotisch auswirkt, was jedoch noch nicht untersucht wurde.

5.6 Cilomilast beeinflusst die veränderte STAT3-Phosphorylierung unter Hyperoxie und erhöht die SP-B-Expression in alveolären Epithelzellen

Der Transkriptionsfaktor Stat3 ist an einer Vielzahl biologischer Aktivitäten wie der Proliferation, dem Überleben und der Apoptose von Zellen beteiligt und wird hauptsächlich durch autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren und Zytokine der IL-6-Familie aktiviert (204). Seine Aktivierung erfolgt durch JAKs (Januskinasen), die Stat3 am Tyr705 phosphorylieren, wonach Stat3 entweder mit sich selbst oder mit Stat1 dimerisiert, in den Zellkern transloziert und dort die Transkription von Zielgenen anschaltet. In mehreren Studien konnte festgestellt werden, dass Stat3 durch die Stimulation von Zellproliferation und durch die Hemmung von Apoptose eine wichtige Rolle in der normalen embryonalen Entwicklung spielt. Wie an Mäusen gezeigt werden konnte, führt die Deletion des Stat3-Gens zu einer frühen embryonalen Sterblichkeit (205). Des Weiteren wird Stat3 in alveolären Epithelzellen exprimiert und dient dort der strukturellen und funktionellen Aufrechterhaltung. Dies konnte bei der Überexpression von dominant-negativem Stat3 in Mäusen gezeigt werden, die nach Hyperoxie-Exposition eine deutlich stärker geschädigte Alveolarstruktur aufwiesen als die Stat3-exprimierenden wt-Tiere (206). Diese Stat3-abhängige Schädigung kommt u.a. auch dadurch zu Stande, weil Stat3 teilweise die SP-B (Surfactantprotein B) – Homöostase in der Lunge, oder genauer, in respiratorischen Epithelzellen reguliert. Dies erfolgt in synergistischer Weise mit dem Retinsäure-Rezeptor (163; 206). Bei Hokuto *et al.* führte die Hyperoxie-Exposition Stat3-transgener Mäuse, denen des Stat3-Gen selektiv in respiratorischen Epithelzellen deletiert wurde, zu geringeren Mengen oder völliger Abwesenheit von Surfactantproteinen und – lipiden in der BAL-Flüssigkeit (207), was deutlich macht, wie stark die SP-Synthese von Stat3 gesteuert wird.

Da sich aus der Behandlung hyperoxischer Mäuse mit Cilomilast eine verbesserte Lungenstruktur und -funktion ergab, sollte an alveolären Epithelzellen untersucht werden, ob Stat3 und damit verbunden das SP-B durch die Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor positiv beeinflusst werden. Daher konnte zunächst für Stat3 festgestellt werden, dass es unter Hyperoxie eine andere Phosphorylierung aufweist als unter Normoxie. D.h., dass die Tyr705-Phosphorylierung (Tyr-P) unter Hyperoxie geringer und die Ser727-Phosphorylierung (Ser-P) erhöht war. Obwohl zum einen publiziert wurde, dass Stat3 durch oxidativen Stress in humanen Lymphozyten (208) und durch ROS in murinen Fibroblasten und A-431 Karzinomzellen aktiviert wird (209), wurde durch Kurdi und Booz beschrieben, dass der IL-6-Signalweg in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten ebenfalls durch ROS inhibiert wird, welche durch die Behandlung mit Parthenolid, einem anti-inflammatorischen Stoff, gebildet wurden (210). Das zeigte sich darin, dass die Tyr-P als Folge der geblockten JAK1-Aktivität mit steigenden Dosen Parthenolid immer mehr abnahm. Dies konnte auch in unserem Experiment beobachtet werden. Als die Cilomilast-Behandlung durchgeführt wurde, konnte

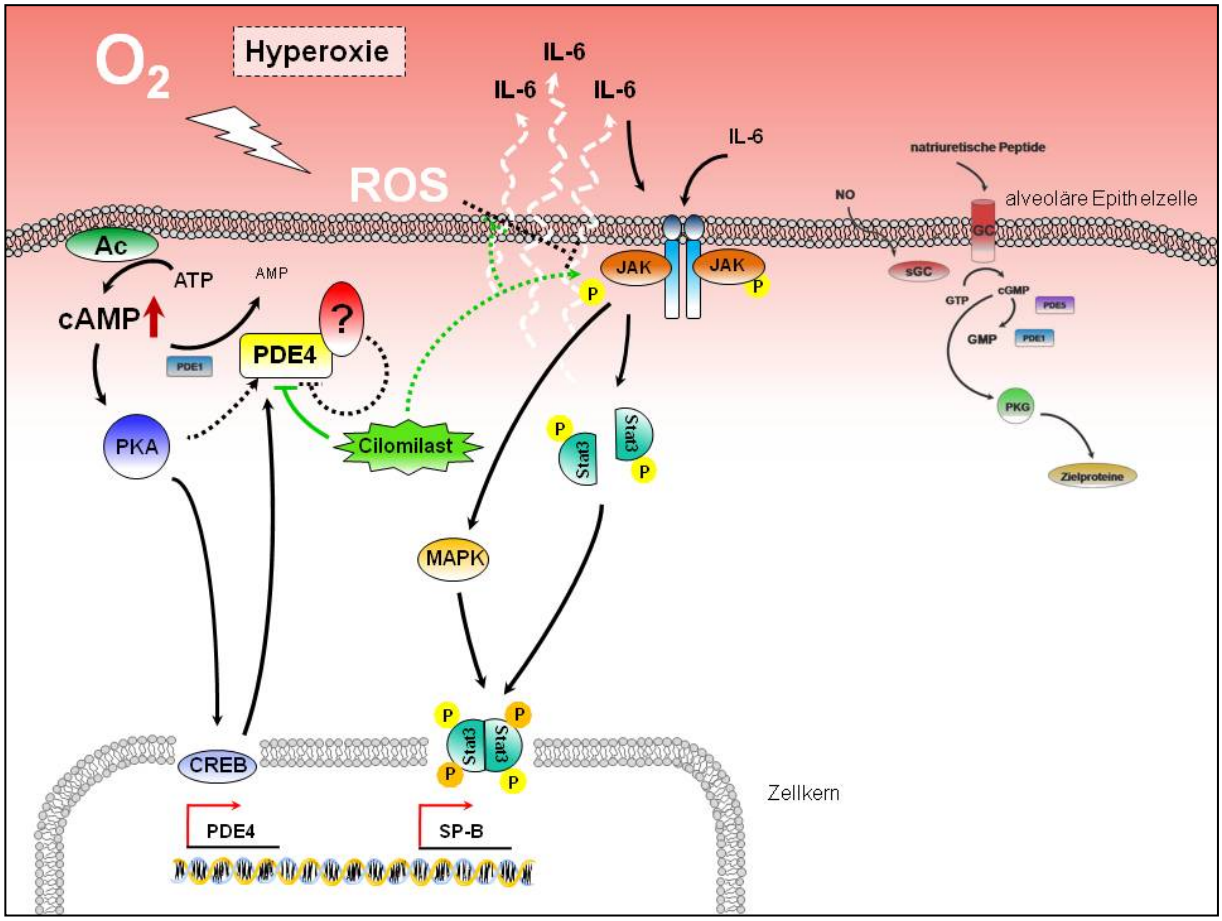


Abbildung 5.1 PDE4-Regulation unter Hyperoxie und Effekt von Cilomilast Unter Hyperoxie erfolgt in alveolären Epithelzellen eine erhöhte Expression der PDE4, die jedoch offenbar durch einen unbekannten Repressor in ihrer Aktivität gehemmt wird, was mit einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration verbunden ist. Die Phosphorylierung von Stat3, die unter Hyperoxie verändert wurde, kann durch Cilomilast teilweise wieder hergestellt werden und führt dadurch zu einer erhöhten SP-B-Expression.

jedoch beobachtet werden, dass sich die unter Hyperoxie geringer gewordene Tyr-P wieder etwas erhöhte. Damit einhergehend wurde die Ser-P etwas abgeschwächt. Wenn man die abfallende Tyr-P unter Hyperoxie ebenfalls mit einer geringeren JAK1-Aktivität in Verbindung bringt, so führt die Behandlung mit Cilomilast bzw. die daraus resultierende cAMP-Erhöhung zu einer Aktivierung von JAK1. Wie bereits beschrieben, ist Stat3 neben dem Haupttranskriptionsfaktor für SP-B TTF-1, ein weiterer Aktivator der SP-B-Expression. Die Cilomilast-Behandlung führte zu einer signifikanten Erhöhung der SP-B-Expression, welche unter Hyperoxie zu ca. 2/3 abgefallen war. Das könnte genauso in den Lungen der behandelten hyperoxischen Mäuse geschehen sein, was eine Erklärung für die verbesserten Lungenparameter wäre (Abb. 5.1).

5.7 Ausblick

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, spielen Phosphodiesterasen, oder genauer gesagt, die PDE4 eine bedeutende Rolle bei der Modulation inflammatorischer Prozesse während der Hyperoxie-induzierten chronischen Lungenreifungsstörung der Maus. Aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Eigenschaften, wären spezifische PDE4-Inhibitoren klinisch gesehen eine gute Alternative zu Steroidbehandlungen, da diese längerfristig gesehen keine neurologischen Schäden hervorrufen.

Bezogen auf die pulmonalen Epithelzellen wurde jedoch deutlich, dass sich unter Hyperoxie vermehrt PDE4 bildet, diese jedoch eine stark eingeschränkte Aktivität besitzt, was zu einem drastischen cAMP-Anstieg in der Zelle führt. Dieser möglicherweise pro-apoptotische Anstieg des cAMP-Spiegels wurde durch den Einsatz des PDE4-spezifischen Inhibitors Cilomilast noch verstärkt. Es wäre daher vorstellbar, dass sich eine Aktivierung der PDE4 positiv auf das Überleben und die Proliferation pulmonaler Epithelzellen unter Hyperoxie auswirken könnte. Andererseits konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Cilomilast durch Erhöhung der Stat3-Phosphorylierung zu einer gesteigerten Surfactantprotein B – Transkription führt, was in vivo eine wichtige Bedeutung für die Lungenfunktion aber auch für die Immunabwehr hat. Jedoch ist der Mechanismus, mit dem Cilomilast zu einer gesteigerten Stat3-Phosphorylierung führt, bisher unbekannt und bedarf der weiteren Aufklärung.

6. Zusammenfassung

Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine chronische potentiell reversible Lungenerkrankung Frühgeborener, die hauptsächlich durch mechanische Ventilation und die hohe Sauerstoffkonzentration während der Behandlung des Atemnotsyndroms (ARDS) verursacht wird. Die Anzeichen der „neuen" Form der BPD, welche durch ein gestörtes alveoläres Wachstum sowie durch eine verminderte Vaskularisierung der Lunge charakterisiert wird, können auch an Lungen neonataler Hyperoxie-exponierter Mäuse beobachtet werden. Während der normalen Lungenentwicklung spielt die Regulation der *second messenger* cAMP und cGMP eine wichtige Rolle. Daher nehmen Phosphodiesterasen (PDEs), die für die Hydrolyse von cAMP und cGMP verantwortlich sind, eine bedeutsame Stellung ein.
Da es möglich ist, dass die Entwicklung einer BPD durch eine veränderte Expression und Regulation von PDEs gefördert oder beeinflusst wird, sollte diese in der vorliegenden Arbeit anhand eines neonatalen hyperoxischen Mausmodells und anhand von Hyperoxie-exponierten pulmonalen Epithelzellen untersucht werden.
PDE-Expressionsanalysen hyperoxischer Mauslungen ergaben eine erhöhte Gen- und Proteinexpression der cAMP-spezifischen PDEs und speziell der PDE4. Durch immunhistochemische Färbungen konnte die PDE4 sowohl in pulmonalen Epithelzellen, als auch in Entzündungszellen detektiert werden. Die Behandlung Hyperoxie-exponierter Mäuse mit dem PDE4-spezifischen Inhibitor Cilomilast führte neben einem verbesserten Allgemeinbefinden der Tiere auch zu leichten Verbesserungen im Körpergewicht, teilweise zu einer signifikant verbesserten Lungenstruktur und zu einer gesteigerten Lungenfunktion. Bei der Untersuchung Hyperoxie-exponierter pulmonaler Epithelzellen konnte ebenfalls eine erhöhte PDE4A-Proteinexpression festgestellt werden, die jedoch mit einer geringeren PDE4-Phosphorylierung, einer geringeren PDE4-Aktivität und einer gesteigerten intrazellulären cAMP-Konzentration und IL-6-Freisetzung unter Hyperoxie einher ging. Bei der Stimulation pulmonaler Epithelzellen mit rekombinanten IL-6 zeigte sich neben der Aktivierung des MAPK und JAK/STAT-Signalwegs auch eine erhöhte PDE4A-Phosphorylierung, die mit einer gesteigerten PDE4-Aktivität einher ging. Um den Mechanismen der durch Cilomilast bewirkten Verbesserungen der Lungenstruktur und –funktion näher auf den Grund zu gehen, wurde die Proliferation pulmonaler Epithelzellen unter Hyperoxie mit verschiedenen Cilomilast-Konzentrationen untersucht. Es wurde jedoch deutlich, dass Cilomilast in Konzentrationen ab 10µM hemmend auf das Zellwachstum pulmonaler Epithelzellen wirkt. Bei Untersuchungen des pro-proliferativen Transkriptionsfaktors Stat3, der unter Hyperoxie eine herabgesetzte Tyr705-Phosphorylierung aufwies, konnte durch Cilomilast eine leichte Wiederherstellung der Tyr705-Phosphorylierung und

wahrscheinlich damit verbunden, eine erhöhte Expression von SP-B, nicht aber von SP-C, bewirkt werden.

Zusammenfassend machen diese Ergebnisse deutlich, dass die PDEs unter hyperoxischen Bedingungen eine veränderte Expression und Aktivität aufweisen, und dass die Hemmung der cAMP-spezifischen PDE4 im hyperoxischen Mausmodell, hauptsächlich durch eine Abschwächung der Entzündungsreaktion in der Lunge, zu einer Verbesserung der Lungenstruktur und – funktion führt. In den pulmonalen Epithelzellen scheint die Aktivität der PDE4 jedoch durch einen unbekannten Faktor beeinträchtigt zu werden, der den intrazellulären cAMP-Spiegel ansteigen lässt und somit vermutlich die Apoptose der Zellen unter Hyperoxie fördert. Daher wirkt sich Cilomilast eher hemmend auf das Zellwachstum pulmonaler Epithelzellen aus. Die durch Cilomilast gesteigerte SP-B-Expression in den Zellen könnte jedoch eine Ursache für die Verbesserung der Lungenparameter sein.

7. Abstract

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a chronic lung disease seen in premature infants exposed to high oxygen levels and mechanical ventilation and is characterized by an arrest in alveolar development. The disease can be mimicked by prolonged exposure of newborn mice to hyperoxia which results in a disruption of distal lung growth with large, simplified alveolar structures and an increased septal wall thickness. During normal lung development the second messengers cAMP and cGMP play important roles in cellular signalling. Therefore Phosphodiesterases (PDEs), the cyclic nucleotide degrading enzymes, are of particular importance as they can show an altered expression and regulation during the development of BPD.

In this work the role of phosphodiesterases in hyperoxia induced lung injury in newborn mice was investigated. Further the expression and activity of PDEs in alveolar epithelial cells (AECs) exposed to hyperoxia has been analysed.

PDE expression analysis of hyperoxic mice lungs showed increased gene and protein expression of the cAMP specific PDEs, especially of PDE4. By immunohistochemical staining of mouse lung tissue PDE4 has been localized in the pulmonary epithelium as well as in inflammatory cells. Treatment of hyperoxia exposed mice with the PDE4 specific inhibitor Cilomilast resulted beside a better well-being of the animals in an improved body weight and an enhanced lung function. Investigation of hyperoxia exposed AECs also revealed increased PDE4A protein expression but accompanied by a lowered PKA-phosphorylation of PDE4, less PDE4 activity and elevated intracellular cAMP concentrations and IL-6 release. In order to clarify the mechanisms of the beneficial effects of Cilomilast on structure and function of the lung, the proliferation of AECs with different Cilomilast concentrations during hyperoxic exposure was investigated. Cilomilast was not able to improve growth of AEC under hyperoxic conditions and inhibited cell growth of AECs in concentrations higher than 10µM. In contrast Cilomilast increased phosphorylation of the proproliferative transcription factor Stat3 on tyrosine residue 705 which was decreased in hyperoxia. This led most probably to the increased expression of SP-B but not SP-C.

All together these results demonstrate that PDEs show a different expression and activity in mice lungs after hyperoxic exposure. Inhibition of PDE4 leads to a lowered inflammation and therefore to an improvement in alveolarisation and lung function. In AECs activity of PDE4 seems to be affected by an unknown factor which leads to increased cAMP concentrations and therefore probably to higher apoptosis of cells during hyperoxic exposure. As hydrophobic SP-B is indispensable for postnatal lung function and survival the treatment with Cilomilast could offer a new therapeutic modality in the clinical management of BPD.

8. Literatur

1. **Kitaoka H, Burri PH and Weibel ER**. Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips. *Anat Rec* 244: 207-213, 1996.
2. **Zeltner TB and Burri PH**. The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology. *Respir Physiol* 67: 269-282, 1987.
3. **Rieger, C., von der Hardt, H., Sennhauser, F.H., Wahn, U. und Zach, M.** (2004) Pädiatrische Pneumologie, 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
4. **Maeda Y, Dave V and Whitsett JA**. Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol Rev* 87: 219-244, 2007.
5. **Groenman F, Unger S and Post M**. The molecular basis for abnormal human lung development. *Biol Neonate* 87: 164-177, 2005.
6. **Bancalari E, Abdenour GE, Feller R and Gannon J**. Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J Pediatr* 95: 819-823, 1979.
7. **Jobe AH and Bancalari E**. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723-1729, 2001.
8. **Northway WH, Jr., Rosan RC and Porter DY**. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 276: 357-368, 1967.
9. **Jobe AJ**. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res* 46: 641-643, 1999.
10. **Shepard, F., Gray, J., Stahlman, M.T.** 1964 The Occurrence of pulmonary fibrosis in children who had idiopathic RDS. J Pediatr 65: 1078.
11. **Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claure N, Poole C and Silva-Neto G**. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 126: 605-610, 1995.
12. **Charafeddine L, D'Angio CT and Phelps DL**. Atypical chronic lung disease patterns in neonates. *Pediatrics* 103: 759-765, 1999.
13. **Husain AN, Siddiqui NH and Stocker JT**. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 29: 710-717, 1998.
14. **Bancalari, E., Gonzalez, A.** Clinical course and lung function abnormalities during development of chronic lung disease. In, Bland, R.D., Coalson, J.J., eds. Chronic lung disease in early infancy. New York: Marcel Dekker, 2000.
15. **Coalson, J.J.** Pathology of chronic lung disease of early infancy. In, Bland, R.D., Coalson, J.J., eds. Chronic lung disease of early infancy. New York: Marcel Dekker, 2000: 85-124.
16. **Kinsella JP, Greenough A and Abman SH**. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* 367: 1421-1431, 2006.
17. **Bjorklund LJ, Ingimarsson J, Curstedt T, John J, Robertson B, Werner O and Vilstrup CT**. Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatr Res* 42: 348-355, 1997.
18. **Kraybill EN, Runyan DK, Bose CL and Khan JH**. Risk factors for chronic lung disease in infants with birth weights of 751 to 1000 grams. *J Pediatr* 115: 115-120, 1989.

19. **Bonikos DS, Bensch KG and Northway WH, Jr.** Oxygen toxicity in the newborn. The effect of chronic continuous 100 percent oxygen exposure on the lungs of newborn mice. *Am J Pathol* 85: 623-650, 1976.
20. **Crapo JD, Peters-Golden M, Marsh-Salin J and Shelburne JS**. Pathologic changes in the lungs of oxygen-adapted rats: a morphometric analysis. *Lab Invest* 39: 640-653, 1978.
21. **Watterberg KL, Demers LM, Scott SM and Murphy S**. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 97: 210-215, 1996.
22. **Moss TJ, Nitsos I, Kramer BW, Ikegami M, Newnham JP and Jobe AH**. Intra-amniotic endotoxin induces lung maturation by direct effects on the developing respiratory tract in preterm sheep. *Am J Obstet Gynecol* 187: 1059-1065, 2002.
23. **Gonzalez A, Sosenko IR, Chandar J, Hummler H, Claure N and Bancalari E**. Influence of infection on patent ductus arteriosus and chronic lung disease in premature infants weighing 1000 grams or less. *J Pediatr* 128: 470-478, 1996.
24. **Makri V, Hospes B, Stoll-Becker S, Borkhardt A and Gortner L**. Polymorphisms of surfactant protein B encoding gene: modifiers of the course of neonatal respiratory distress syndrome? *Eur J Pediatr* 161: 604-608, 2002.
25. **Hallman M and Haataja R**. Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin Neonatol* 8: 19-27, 2003.
26. **Kotecha S, Wilson L, Wangoo A, Silverman M and Shaw RJ**. Increase in interleukin (IL)-1 beta and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Res* 40: 250-256, 1996.
27. **Kojima T, Sasai M and Kobayashi Y**. Increased soluble ICAM-1 in tracheal aspirates of infants with bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* 342: 1023-1024, 1993.
28. **Merritt TA, Cochrane CG, Holcomb K, Bohl B, Hallman M, Strayer D, Edwards DK, III and Gluck L**. Elastase and alpha 1-proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome. Role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Invest* 72: 656-666, 1983.
29. **Murch SH, Costeloe K, Klein NJ, Rees H, McIntosh N, Keeling JW and MacDonald TT**. Mucosal tumor necrosis factor-alpha production and extensive disruption of sulfated glycosaminoglycans begin within hours of birth in neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 40: 484-489, 1996.
30. **Bryan MH, Hardie MJ, Reilly BJ and Swyer PR**. Pulmonary function studies during the first year of life in infants recovering from the respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 52: 169-178, 1973.
31. **Goldman SL, Gerhardt T, Sonni R, Feller R, Hehre D, Tapia JL and Bancalari E**. Early prediction of chronic lung disease by pulmonary function testing. *J Pediatr* 102: 613-617, 1983.
32. **Parker TA and Abman SH**. The pulmonary circulation in bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 8: 51-61, 2003.
33. **Tomashefski JF, Jr., Oppermann HC, Vawter GF and Reid LM**. Bronchopulmonary dysplasia: a morphometric study with emphasis on the pulmonary vasculature. *Pediatr Pathol* 2: 469-487, 1984.
34. **Crowley PA**. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol* 173: 322-335, 1995.

35. **Bancalari E and del MT**. Bronchopulmonary dysplasia and surfactant. *Biol Neonate* 80 Suppl 1: 7-13, 2001.
36. **Darlow BA and Graham PJ**. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD000501, 2002.
37. **Tyson JE, Wright LL, Oh W, Kennedy KA, Mele L, Ehrenkranz RA, Stoll BJ, Lemons JA, Stevenson DK, Bauer CR, Korones SB and Fanaroff AA**. Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med* 340: 1962-1968, 1999.
38. **Woodgate PG and Davies MW**. Permissive hypercapnia for the prevention of morbidity and mortality in mechanically ventilated newborn infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD002061, 2001.
39. **Courtney SE, Durand DJ, Asselin JM, Hudak ML, Aschner JL and Shoemaker CT**. High-frequency oscillatory ventilation versus conventional mechanical ventilation for very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 347: 643-652, 2002.
40. **Avery ME, Tooley WH, Keller JB, Hurd SS, Bryan MH, Cotton RB, Epstein MF, Fitzhardinge PM, Hansen CB, Hansen TN and .** Is chronic lung disease in low birth weight infants preventable? A survey of eight centers. *Pediatrics* 79: 26-30, 1987.
41. **Halliday HL**. Clinical trials of postnatal corticosteroids: inhaled and systemic. *Biol Neonate* 76 Suppl 1: 29-40, 1999.
42. **Yoder MC, Jr., Chua R and Tepper R**. Effect of dexamethasone on pulmonary inflammation and pulmonary function of ventilator-dependent infants with bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 143: 1044-1048, 1991.
43. **Watterberg KL, Gerdes JS, Cole CH, Aucott SW, Thilo EH, Mammel MC, Couser RJ, Garland JS, Rozycki HJ, Leach CL, Backstrom C and Shaffer ML**. Prophylaxis of early adrenal insufficiency to prevent bronchopulmonary dysplasia: a multicenter trial. *Pediatrics* 114: 1649-1657, 2004.
44. **Garland JS, Alex CP, Pauly TH, Whitehead VL, Brand J, Winston JF, Samuels DP and McAuliffe TL**. A three-day course of dexamethasone therapy to prevent chronic lung disease in ventilated neonates: a randomized trial. *Pediatrics* 104: 91-99, 1999.
45. **Jobe AH**. Postnatal corticosteroids for preterm infants--do what we say, not what we do. *N Engl J Med* 350: 1349-1351, 2004.
46. **Baraldi E, Filippone M, Trevisanuto D, Zanardo V and Zacchello F**. Pulmonary function until two years of life in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 149-155, 1997.
47. **Lewis BA, Singer LT, Fulton S, Salvator A, Short EJ, Klein N and Baley J**. Speech and language outcomes of children with bronchopulmonary dysplasia. *J Commun Disord* 35: 393-406, 2002.
48. **Short EJ, Klein NK, Lewis BA, Fulton S, Eisengart S, Kercsmar C, Baley J and Singer LT**. Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes. *Pediatrics* 112: e359, 2003.
49. **Bonikos DS, Bensch KG, Ludwin SK and Northway WH, Jr.** Oxygen toxicity in the newborn. The effect of prolonged 100 per cent O2 exposure on the lungs of newborn mice. *Lab Invest* 32: 619-635, 1975.

50. **Warner BB, Stuart LA, Papes RA and Wispe JR**. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 275: L110-L117, 1998.
51. **Roberts RJ, Weesner KM and Bucher JR**. Oxygen-induced alterations in lung vascular development in the newborn rat. *Pediatr Res* 17: 368-375, 1983.
52. **ter Horst SA, Fijlstra M, Sengupta S, Walther FJ and Wagenaar GT**. Spatial and temporal expression of surfactant proteins in hyperoxia-induced neonatal rat lung injury. *BMC Pulm Med* 6: 8, 2006.
53. **Walther FJ, Kuipers IM, Pavlova Z, Willebrand D, Abuchowski A and Viau AT**. Mitigation of pulmonary oxygen toxicity in premature lambs with intravenous antioxidants. *Exp Lung Res* 16: 177-189, 1990.
54. **Schulman SR, Canada AT, Fryer AD, Winsett DW and Costa DL**. Airway hyperreactivity produced by short-term exposure to hyperoxia in neonatal guinea pigs. *Am J Physiol* 272: L1211-L1216, 1997.
55. **Altiok O, Yasumatsu R, Bingol-Karakoc G, Riese RJ, Stahlman MT, Dwyer W, Pierce RA, Bromme D, Weber E and Cataltepe S**. Imbalance between cysteine proteases and inhibitors in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 318-326, 2006.
56. **Coalson JJ**. Experimental models of bronchopulmonary dysplasia. *Biol Neonate* 71 Suppl 1: 35-38, 1997.
57. **Amy RW, Bowes D, Burri PH, Haines J and Thurlbeck WM**. Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat* 124: 131-151, 1977.
58. **ASHMAN DF, LIPTON R, MELICOW MM and PRICE TD**. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 11: 330-334, 1963.
59. **SUTHERLAND EW and RALL TW**. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232: 1077-1091, 1958.
60. **Beavo JA and Brunton LL**. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 710-718, 2002.
61. **de RJ, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A and Bos JL**. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396: 474-477, 1998.
62. **Francis SH and Corbin JD**. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci* 36: 275-328, 1999.
63. **Kaupp UB and Seifert R**. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82: 769-824, 2002.
64. **Matulef K and Zagotta WN**. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 23-44, 2003.
65. **Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G and Iyengar R**. Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14100-14104, 1997.
66. **Rahn T, Ronnstrand L, Leroy MJ, Wernstedt C, Tornqvist H, Manganiello VC, Belfrage P and Degerman E**. Identification of the site in the cGMP-inhibited phosphodiesterase phosphorylated in adipocytes in response to insulin and isoproterenol. *J Biol Chem* 271: 11575-11580, 1996.

67. **Sette C, Iona S and Conti M**. The short-term activation of a rolipram-sensitive, cAMP-specific phosphodiesterase by thyroid-stimulating hormone in thyroid FRTL-5 cells is mediated by a cAMP-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 269: 9245-9252, 1994.
68. **Sette C and Conti M**. Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* 271: 16526-16534, 1996.
69. **Sharma RK and Wang JH**. Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 2603-2607, 1985.
70. **Sharma RK**. Phosphorylation and characterization of bovine heart calmodulin-dependent phosphodiesterase. *Biochemistry* 30: 5963-5968, 1991.
71. **Montminy M**. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66: 807-822, 1997.
72. **Montminy MR, Gonzalez GA and Yamamoto KK**. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 13: 184-188, 1990.
73. **Sassone-Corsi P**. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 27-38, 1998.
74. **Zhong H, Voll RE and Ghosh S**. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1: 661-671, 1998.
75. **Fang Y and Olah ME**. Cyclic AMP-dependent, protein kinase A-independent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 following adenosine receptor stimulation in human umbilical vein endothelial cells: role of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1). *J Pharmacol Exp Ther* 322: 1189-1200, 2007.
76. **Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE and Graybiel AM**. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282: 2275-2279, 1998.
77. **Wang Z, Dillon TJ, Pokala V, Mishra S, Labudda K, Hunter B and Stork PJ**. Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Mol Cell Biol* 26: 2130-2145, 2006.
78. **Burgering BM, Pronk GJ, van Weeren PC, Chardin P and Bos JL**. cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J* 12: 4211-4220, 1993.
79. **Cook SJ and McCormick F**. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262: 1069-1072, 1993.
80. **Hafner S, Adler HS, Mischak H, Janosch P, Heidecker G, Wolfman A, Pippig S, Lohse M, Ueffing M and Kolch W**. Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol Cell Biol* 14: 6696-6703, 1994.
81. **Tasken K and Aandahl EM**. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 84: 137-167, 2004.
82. **Barradeau S, Imaizumi-Scherrer T, Weiss MC and Faust DM**. Intracellular targeting of the type-I alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Trends Cardiovasc Med* 12: 235-241, 2002.
83. **Colledge M and Scott JD**. AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol* 9: 216-221, 1999.

84. **Houslay MD and Baillie GS**. The role of ERK2 docking and phosphorylation of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in mediating cross-talk between the cAMP and ERK signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 31: 1186-1190, 2003.
85. **Conti M and Jin SL**. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63: 1-38, 1999.
86. **Richter W**. 3',5' Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: members, structure, and catalytic mechanism. *Proteins* 46: 278-286, 2002.
87. **Beavo JA**. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75: 725-748, 1995.
88. **Soderling SH and Beavo JA**. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 12: 174-179, 2000.
89. **Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA and Phillips SC**. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3702-3707, 2000.
90. **Loughney K, Snyder PB, Uher L, Rosman GJ, Ferguson K and Florio VA**. Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 234: 109-117, 1999.
91. **Okruhlicova L, Tribulova N, Eckly A, Lugnier C and Slezak J**. Cytochemical distribution of cyclic AMP-dependent 3',5'-nucleotide phosphodiesterase in the rat myocardium. *Histochem J* 28: 165-172, 1996.
92. **Okruhlicova L, Tribulova N, Styk J, Eckly A, Lugnier C and Slezk J**. Species differences in localization of cardiac cAMP-phosphodiesterase activity: a cytochemical study. *Mol Cell Biochem* 173: 183-188, 1997.
93. **Lugnier C, Muller B, Le BA, Beaudry C and Rousseau E**. Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 1142-1151, 1993.
94. **Geoffroy V, Fouque F, Nivet V, Clot JP, Lugnier C, Desbuquois B and Benelli C**. Activation of a cGMP-stimulated cAMP phosphodiesterase by protein kinase C in a liver Golgi-endosomal fraction. *Eur J Biochem* 259: 892-900, 1999.
95. **Lugnier C, Keravis T, Le BA, Pauvert O, Proteau S and Rousseau E**. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim Biophys Acta* 1472: 431-446, 1999.
96. **Lugnier C**. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109: 366-398, 2006.
97. **Cheng J and Grande JP**. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors: novel therapeutic agents for progressive renal disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 38-51, 2007.
98. **Bolger GB**. Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. *Cell Signal* 6: 851-859, 1994.
99. **Conti M, Nemoz G, Sette C and Vicini E**. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. *Endocr Rev* 16: 370-389, 1995.
100. **Thompson WJ**. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology, biochemistry and function. *Pharmacol Ther* 51: 13-33, 1991.
101. **Francis SH, Turko IV and Corbin JD**. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65: 1-52, 2001.

102. **Ho YS, Burden LM and Hurley JH**. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J* 19: 5288-5299, 2000.
103. **Zoraghi R, Corbin JD and Francis SH**. Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol Pharmacol* 65: 267-278, 2004.
104. **Kovala T, Sanwal BD and Ball EH**. Recombinant expression of a type IV, cAMP-specific phosphodiesterase: characterization and structure-function studies of deletion mutants. *Biochemistry* 36: 2968-2976, 1997.
105. **Torphy TJ**. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 351-370, 1998.
106. **Houslay MD, Sullivan M and Bolger GB**. The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. *Adv Pharmacol* 44: 225-342, 1998.
107. **Tenor, H., & Schudt, C.** 1996. Analysis of PDE isoenzyme profiles in cells and tissues by pharmacological methods. In C. Schudt, G. Dent, & K.F. Rabe (Eds.), Phosphodiesterase Inhibitors, Handbook of Immunopharmacology (pp. 21-40). Academic Press.
108. **Stoclet, J.C., Keravis, T., Komas, N., & Lugnier, C.** 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. Expert Opin Investig Drugs 4, 1081-1100.
109. **Lugnier C, Stierle A, Beretz A, Schoeffter P, Lebec A, Wermuth CG, Cazenave JP and Stoclet JC**. Tissue and substrate specificity of inhibition by alkoxy-aryl-lactams of platelet and arterial smooth muscle cyclic nucleotide phosphodiesterases relationship to pharmacological activity. *Biochem Biophys Res Commun* 113: 954-959, 1983.
110. **Lugnier C, Schoeffter P, Le BA, Strouthou E and Stoclet JC**. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol* 35: 1743-1751, 1986.
111. **Komas N, Lugnier C, Le BA, Serradeil-Le GC, Barthelemy G and Stoclet JC**. Differential sensitivity to cardiotonic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues. *J Cardiovasc Pharmacol* 14: 213-220, 1989.
112. **Weishaar RE, Kobylarz-Singer DC, Steffen RP and Kaplan HR**. Subclasses of cyclic AMP-specific phosphodiesterase in left ventricular muscle and their involvement in regulating myocardial contractility. *Circ Res* 61: 539-547, 1987.
113. **Bolger G, Michaeli T, Martins T, St JT, Steiner B, Rodgers L, Riggs M, Wigler M and Ferguson K**. A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of Drosophila melanogaster are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol* 13: 6558-6571, 1993.
114. **Houslay MD**. PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 69: 249-315, 2001.
115. **Beard MB, Olsen AE, Jones RE, Erdogan S, Houslay MD and Bolger GB**. UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J Biol Chem* 275: 10349-10358, 2000.

116. **Grange M, Sette C, Cuomo M, Conti M, Lagarde M, Prigent AF and Nemoz G**. The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 is regulated by phosphatidic acid binding. Consequences for cAMP signaling pathway and characterization of a phosphatidic acid binding site. *J Biol Chem* 275: 33379-33387, 2000.
117. **Hoffmann R, Baillie GS, MacKenzie SJ, Yarwood SJ and Houslay MD**. The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *EMBO J* 18: 893-903, 1999.
118. **Richter W and Conti M**. Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs). *J Biol Chem* 277: 40212-40221, 2002.
119. **Jacobitz S, McLaughlin MM, Livi GP, Burman M and Torphy TJ**. Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: structural requirements for catalytic activity and rolipram binding. *Mol Pharmacol* 50: 891-899, 1996.
120. **Schneider HH, Schmiechen R, Brezinski M and Seidler J**. Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures. *Eur J Pharmacol* 127: 105-115, 1986.
121. **Omori K and Kotera J**. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100: 309-327, 2007.
122. **Engels P, Fichtel K and Lubbert H**. Expression and regulation of human and rat phosphodiesterase type IV isogenes. *FEBS Lett* 350: 291-295, 1994.
123. **Engels P, Sullivan M, Muller T and Lubbert H**. Molecular cloning and functional expression in yeast of a human cAMP-specific phosphodiesterase subtype (PDE IV-C). *FEBS Lett* 358: 305-310, 1995.
124. **Rena G, Begg F, Ross A, MacKenzie C, McPhee I, Campbell L, Huston E, Sullivan M and Houslay MD**. Molecular cloning, genomic positioning, promoter identification, and characterization of the novel cyclic amp-specific phosphodiesterase PDE4A10. *Mol Pharmacol* 59: 996-1011, 2001.
125. **Wallace DA, Johnston LA, Huston E, MacMaster D, Houslay TM, Cheung YF, Campbell L, Millen JE, Smith RA, Gall I, Knowles RG, Sullivan M and Houslay MD**. Identification and characterization of PDE4A11, a novel, widely expressed long isoform encoded by the human PDE4A cAMP phosphodiesterase gene. *Mol Pharmacol* 67: 1920-1934, 2005.
126. **D'Sa C, Eisch AJ, Bolger GB and Duman RS**. Differential expression and regulation of the cAMP-selective phosphodiesterase type 4A splice variants in rat brain by chronic antidepressant administration. *Eur J Neurosci* 22: 1463-1475, 2005.
127. **Smith PG, Wang F, Wilkinson KN, Savage KJ, Klein U, Neuberg DS, Bollag G, Shipp MA and Aguiar RC**. The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 105: 308-316, 2005.
128. **Wang P, Wu P, Ohleth KM, Egan RW and Billah MM**. Phosphodiesterase 4B2 is the predominant phosphodiesterase species and undergoes differential regulation of gene expression in human monocytes and neutrophils. *Mol Pharmacol* 56: 170-174, 1999.
129. **Beard MB, O'Connell JC, Bolger GB and Houslay MD**. The unique N-terminal domain of the cAMP phosphodiesterase PDE4D4 allows for interaction with specific SH3 domains. *FEBS Lett* 460: 173-177, 1999.

130. **Bolger GB, Erdogan S, Jones RE, Loughney K, Scotland G, Hoffmann R, Wilkinson I, Farrell C and Houslay MD**. Characterization of five different proteins produced by alternatively spliced mRNAs from the human cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D gene. *Biochem J* 328 (Pt 2): 539-548, 1997.
131. **Wang D, Deng C, Bugaj-Gaweda B, Kwan M, Gunwaldsen C, Leonard C, Xin X, Hu Y, Unterbeck A and De VM**. Cloning and characterization of novel PDE4D isoforms PDE4D6 and PDE4D7. *Cell Signal* 15: 883-891, 2003.
132. **Barnes AP, Livera G, Huang P, Sun C, O'Neal WK, Conti M, Stutts MJ and Milgram SL**. Phosphodiesterase 4D forms a cAMP diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium. *J Biol Chem* 280: 7997-8003, 2005.
133. **Hoffmann R, Wilkinson IR, McCallum JF, Engels P and Houslay MD**. cAMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 mutants which mimic activation and changes in rolipram inhibition triggered by protein kinase A phosphorylation of Ser-54: generation of a molecular model. *Biochem J* 333 (Pt 1): 139-149, 1998.
134. **MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, MacKenzie C, Seamons R, McSorley T, Millen J, Beard MB, van HG and Houslay MD**. Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1). *Br J Pharmacol* 136: 421-433, 2002.
135. **Oki N, Takahashi SI, Hidaka H and Conti M**. Short term feedback regulation of cAMP in FRTL-5 thyroid cells. Role of PDE4D3 phosphodiesterase activation. *J Biol Chem* 275: 10831-10837, 2000.
136. **Lim J, Pahlke G and Conti M**. Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain. *J Biol Chem* 274: 19677-19685, 1999.
137. **Richter W and Conti M**. The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases. *J Biol Chem* 279: 30338-30348, 2004.
138. **Houslay MD and Adams DR**. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 370: 1-18, 2003.
139. **MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, Bolger GB and Houslay MD**. ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH2-terminal UCR regions. *J Biol Chem* 275: 16609-16617, 2000.
140. **Torphy TJ, Zhou HL, Foley JJ, Sarau HM, Manning CD and Barnette MS**. Salbutamol up-regulates PDE4 activity and induces a heterologous desensitization of U937 cells to prostaglandin E2. Implications for the therapeutic use of beta-adrenoceptor agonists. *J Biol Chem* 270: 23598-23604, 1995.
141. **Vicini E and Conti M**. Characterization of an intronic promoter of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-specific phosphodiesterase gene that confers hormone and cAMP inducibility. *Mol Endocrinol* 11: 839-850, 1997.
142. **Le J, I, Shepherd M, van HG, Houslay MD and Hall IP**. Cyclic AMP-dependent transcriptional up-regulation of phosphodiesterase 4D5 in human airway smooth muscle cells. Identification and characterization of a novel PDE4D5 promoter. *J Biol Chem* 277: 35980-35989, 2002.

143. **Jeffery P**. Phosphodiesterase 4-selective inhibition: novel therapy for the inflammation of COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 18: 9-17, 2005.
144. **Spina D**. The potential of PDE4 inhibitors in respiratory disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3: 231-236, 2004.
145. **Zeller E, Stief HJ, Pflug B and Hernandez M**. Results of a phase II study of the antidepressant effect of rolipram. *Pharmacopsychiatry* 17: 188-190, 1984.
146. **Torphy TJ, Barnette MS, Underwood DC, Griswold DE, Christensen SB, Murdoch RD, Nieman RB and Compton CH**. Ariflo (SB 207499), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of asthma and COPD: from concept to clinic. *Pulm Pharmacol Ther* 12: 131-135, 1999.
147. **Lipworth BJ**. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 365: 167-175, 2005.
148. **Profita M, Chiappara G, Mirabella F, Di GR, Chimenti L, Costanzo G, Riccobono L, Bellia V, Bousquet J and Vignola AM**. Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF-alpha, IL-8, and GM-CSF release by airway cells of patients with COPD. *Thorax* 58: 573-579, 2003.
149. **Houslay MD, Schafer P and Zhang KY**. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 10: 1503-1519, 2005.
150. **Martin TR, Gerard NP, Galli SJ and Drazen JM**. Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse. *J Appl Physiol* 64: 2318-2323, 1988.
151. **LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL and RANDALL RJ**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
152. **Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
153. **Thompson WJ, Brooker G and Appleman MM**. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterases with radioactive substrates. *Methods Enzymol* 38: 205-212, 1974.
154. **Sanchez LS, de la Monte SM, Filippov G, Jones RC, Zapol WM and Bloch KD**. Cyclic-GMP-binding, cyclic-GMP-specific phosphodiesterase (PDE5) gene expression is regulated during rat pulmonary development. *Pediatr Res* 43: 163-168, 1998.
155. **Ladha F, Bonnet S, Eaton F, Hashimoto K, Korbutt G and Thebaud B**. Sildenafil improves alveolar growth and pulmonary hypertension in hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 750-756, 2005.
156. **Bustani P, Hodge R, Tellabati A, Li J, Pandya H and Kotecha S**. Differential response of the epithelium and interstitium in developing human fetal lung explants to hyperoxia. *Pediatr Res* 59: 383-388, 2006.
157. **Cardoso WV**. Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas. *Dev Dyn* 219: 121-130, 2000.
158. **Grath-Morrow SA and Stahl J**. Growth arrest in A549 cells during hyperoxic stress is associated with decreased cyclin B1 and increased p21(Waf1/Cip1/Sdi1) levels. *Biochim Biophys Acta* 1538: 90-97, 2001.
159. **Zaher TE, Miller EJ, Morrow DM, Javdan M and Mantell LL**. Hyperoxia-induced signal transduction pathways in pulmonary epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 42: 897-908, 2007.
160. **Takizawa H**. Airway epithelial cells as regulators of airway inflammation (Review). *Int J Mol Med* 1: 367-378, 1998.

161. **Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D and Darnell JE, Jr.** Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76: 821-828, 1994.

162. **Wen Z, Zhong Z and Darnell JE, Jr.** Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82: 241-250, 1995.

163. **Yan C, Naltner A, Martin M, Naltner M, Fangman JM and Gurel O**. Transcriptional stimulation of the surfactant protein B gene by STAT3 in respiratory epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 10967-10972, 2002.

164. **Parker CW, Sullivan TJ and Wedner HJ**. Cyclic AMP and the immune response. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 4: 1-79, 1974.

165. **Newton RP and Smith CJ**. Cyclic nucleotides. *Phytochemistry* 65: 2423-2437, 2004.

166. **Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS and Jimmo SL**. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 64: 533-546, 2003.

167. **Burnouf C and Pruniaux MP**. Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. *Curr Pharm Des* 8: 1255-1296, 2002.

168. **Pyne NJ and Furman BL**. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in pancreatic islets. *Diabetologia* 46: 1179-1189, 2003.

169. **Loughney K, Martins TJ, Harris EA, Sadhu K, Hicks JB, Sonnenburg WK, Beavo JA and Ferguson K**. Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* 271: 796-806, 1996.

170. **Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H and Kuebler WM**. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 453-463, 2006.

171. **Brown DM, Hutchison L, Donaldson K and Stone V**. The effects of PM10 particles and oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: modulating effects of calcium-signaling antagonists. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1444-L1451, 2007.

172. **Wagenaar GT, ter Horst SA, van Gastelen MA, Leijser LM, Mauad T, van d, V, de HE, Hiemstra PS, Poorthuis BJ and Walther FJ**. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 36: 782-801, 2004.

173. **Farrow KN, Groh BS, Schumacker PT, Lakshminrusimha S, Czech L, Gugino SF, Russell JA and Steinhorn RH**. Hyperoxia increases phosphodiesterase 5 expression and activity in ovine fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 102: 226-233, 2008.

174. **Ekholm D, Hemmer B, Gao G, Vergelli M, Martin R and Manganiello V**. Differential expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 and 4 activities in human T cell clones specific for myelin basic protein. *J Immunol* 159: 1520-1529, 1997.

175. **Giembycz MA, Corrigan CJ, Seybold J, Newton R and Barnes PJ**. Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2. *Br J Pharmacol* 118: 1945-1958, 1996.

176. **Wright LC, Seybold J, Robichaud A, Adcock IM and Barnes PJ**. Phosphodiesterase expression in human epithelial cells. *Am J Physiol* 275: L694-L700, 1998.
177. **Perkowski S, Sun J, Singhal S, Santiago J, Leikauf GD and Albelda SM**. Gene expression profiling of the early pulmonary response to hyperoxia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 682-696, 2003.
178. **Bloom TJ and Beavo JA**. Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14188-14192, 1996.
179. **Glavas NA, Ostenson C, Schaefer JB, Vasta V and Beavo JA**. T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6319-6324, 2001.
180. **de Visser YP, Walther FJ, Laghmani EH, van WS, Nieuwland K and Wagenaar GT**. Phosphodiesterase-4 inhibition attenuates pulmonary inflammation in neonatal lung injury. *Eur Respir J* 31: 633-644, 2008.
181. **ter Horst SA, Wagenaar GT, de BE, van Gastelen MA, Meijers JC, Biemond BJ, Poorthuis BJ and Walther FJ**. Pentoxifylline reduces fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol* 97: 2014-2019, 2004.
182. **Deng YM, Xie QM, Tang HF, Sun JG, Deng JF, Chen JQ and Yang SY**. Effects of ciclamilast, a new PDE 4 PDE4 inhibitor, on airway hyperresponsiveness, PDE4D expression and airway inflammation in a murine model of asthma. *Eur J Pharmacol* 547: 125-135, 2006.
183. **Bruce MC and Honaker CE**. Transcriptional regulation of tropoelastin expression in rat lung fibroblasts: changes with age and hyperoxia. *Am J Physiol* 274: L940-L950, 1998.
184. **Kahari VM, Chen YQ, Bashir MM, Rosenbloom J and Uitto J**. Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity. *J Biol Chem* 267: 26134-26141, 1992.
185. **Berk JL, Franzblau C and Goldstein RH**. Recombinant interleukin-1 beta inhibits elastin formation by a neonatal rat lung fibroblast subtype. *J Biol Chem* 266: 3192-3197, 1991.
186. **Wang X, Ryter SW, Dai C, Tang ZL, Watkins SC, Yin XM, Song R and Choi AM**. Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. *J Biol Chem* 278: 29184-29191, 2003.
187. **Gottesman MM and Fleischmann RD**. The role of cAMP in regulating tumour cell growth. *Cancer Surv* 5: 291-308, 1986.
188. **Jiang X, Li J, Paskind M and Epstein PM**. Inhibition of calmodulin-dependent phosphodiesterase induces apoptosis in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11236-11241, 1996.
189. **Marko D, Romanakis K, Zankl H, Furstenberger G, Steinbauer B and Eisenbrand G**. Induction of apoptosis by an inhibitor of cAMP-specific PDE in malignant murine carcinoma cells overexpressing PDE activity in comparison to their nonmalignant counterparts. *Cell Biochem Biophys* 28: 75-101, 1998.
190. **McConkey DJ, Orrenius S and Jondal M**. Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes. *J Immunol* 145: 1227-1230, 1990.
191. **Smith KJ, Scotland G, Beattie J, Trayer IP and Houslay MD**. Determination of the structure of the N-terminal splice region of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase

RD1 (RNPDE4A1) by 1H NMR and identification of the membrane association domain using chimeric constructs. *J Biol Chem* 271: 16703-16711, 1996.

192. **Liu H, Palmer D, Jimmo SL, Tilley DG, Dunkerley HA, Pang SC and Maurice DH**. Expression of phosphodiesterase 4D (PDE4D) is regulated by both the cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and expression in cells. *J Biol Chem* 275: 26615-26624, 2000.
193. **Olson DM, Sheth MV, Rodrigo MC, Burghardt JS and Eyster KM**. Effect of developmental age and hyperoxia exposure on kinase and phosphatase activities in newborn rat lungs. *Exp Lung Res* 24: 339-353, 1998.
194. **Sheth MV, Goodman BE, Friese JL and Eyster KM**. Protein kinase and phosphatase activity in the lungs of normoxic versus hyperoxic rats. *Exp Lung Res* 23: 475-494, 1997.
195. **Dreher D and Rochat T**. Hyperoxia induces alkalinization and dome formation in MDCK epithelial cells. *Am J Physiol* 262: C358-C364, 1992.
196. **Yan C, Ding B, Shishido T, Woo CH, Itoh S, Jeon KI, Liu W, Xu H, McClain C, Molina CA, Blaxall BC and Abe J**. Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 reduces cardiac apoptosis and dysfunction via inhibition of a phosphodiesterase 3A/inducible cAMP early repressor feedback loop. *Circ Res* 100: 510-519, 2007.
197. **Hershko DD, Robb BW, Luo G and Hasselgren PO**. Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1140-R1148, 2002.
198. **Yoshida Y, Maruyama M, Fujita T, Arai N, Hayashi R, Araya J, Matsui S, Yamashita N, Sugiyama E and Kobayashi M**. Reactive oxygen intermediates stimulate interleukin-6 production in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 276: L900-L908, 1999.
199. **Ahmad F, Gao G, Wang LM, Landstrom TR, Degerman E, Pierce JH and Manganiello VC**. IL-3 and IL-4 activate cyclic nucleotide phosphodiesterases 3 (PDE3) and 4 (PDE4) by different mechanisms in FDCP2 myeloid cells. *J Immunol* 162: 4864-4875, 1999.
200. **Baillie GS, MacKenzie SJ, McPhee I and Houslay MD**. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol* 131: 811-819, 2000.
201. **Souness JE, Aldous D and Sargent C**. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology* 47: 127-162, 2000.
202. **Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Taniyama Y, Nakamura T, Aoki M, Yamamoto K, Higaki J and Ogihara T**. Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension* 35: 237-243, 2000.
203. **Growcott EJ, Spink KG, Ren X, Afzal S, Banner KH and Wharton J**. Phosphodiesterase type 4 expression and anti-proliferative effects in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Respir Res* 7: 9, 2006.
204. **Zhong Z, Wen Z and Darnell JE, Jr.** Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264: 95-98, 1994.

205. **Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T and Akira S**. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3801-3804, 1997.
206. **Yang L, Lian X, Cowen A, Xu H, Du H and Yan C**. Synergy between signal transducer and activator of transcription 3 and retinoic acid receptor-alpha in regulation of the surfactant protein B gene in the lung. *Mol Endocrinol* 18: 1520-1532, 2004.
207. **Hokuto I, Ikegami M, Yoshida M, Takeda K, Akira S, Perl AK, Hull WM, Wert SE and Whitsett JA**. Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J Clin Invest* 113: 28-37, 2004.
208. **Carballo M, Conde M, El BR, Martin-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirin J, Conde J, Bedoya FJ and Sobrino F**. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J Biol Chem* 274: 17580-17586, 1999.
209. **Simon AR, Rai U, Fanburg BL and Cochran BH**. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol* 275: C1640-C1652, 1998.
210. **Kurdi M and Booz GW**. Evidence that IL-6-type cytokine signaling in cardiomyocytes is inhibited by oxidative stress: parthenolide targets JAK1 activation by generating ROS. *J Cell Physiol* 212: 424-431, 2007.

9. Anhang

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Doktorarbeit selbständig verfasst wurde und von mir keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Giessen, im Mai 2008

Kathrin Woyda

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren. Dies sind insbesondere:

Prof. Werner Seeger: Vielen Dank für die freundliche Aufnahme am Institut, für die Bereitstellung der Laborausrüstung und der Forschungsmittel!

Prof. Ralph Schermuly: Vielen Dank für die freundschaftliche und kompetente Betreuung, die Bereitstellung dieses äußerst interessanten Themas, für die Anregungen und kritischen Gespräche!

Prof. Michael Martin: Vielen Dank für die unkomplizierte Betreuung und die Übernahme des Gutachtens!

Dr. Oliver Eickelberg: Vielen Dank für die Aufnahme im internationalen Graduiertenkolleg „MBML“!

Dr. Rory Morty: Thanks for your help with the paper manuscript and for your teaching in the MBML!

Silke Köbrich: Einen Riesendank für das Handling des Tiermodells, die Behandlungen und die Organentnahmen! Für die viele und stressreiche Arbeit bin ich Dir sehr dankbar!

Dr. Soni Savai Pullamsetti und Dr. Rajkumar Savai: A special THANKS goes to both of you for all the Support, Ideas and Happiness you gave to me!

Meinen Lieblings-TAs Caro, Susanne und Andreas: Vielen, vielen Dank für Eure stetige und tatkräftige Unterstützung, die lustigen Unterhaltungen, die entspannte Atmosphäre und das freundschaftliche Verhältnis! ☺

Ying-Ju: My Dear, thank you very much for all your help, support and the discussions we had about my project! This helped me a lot! I hope we will stay in contact! ☺ Vielen Dank!

The Volhard Lab: Thanks for the very funny and refreshing breaks and discussions in between and for all your help!

Den TAs von Seltersberg Haus C und Monika: Vielen Dank für Eure Hilfe in der Zellkultur und Monika, vielen Dank für die netten Gespräche und Deine Hilfe in unserem Labor!

Dem Weltenbummler Marcel: Es war immer sehr lustig mit Dir zu arbeiten! ☺

Meiner geliebten Familie und der lieben Familie meines Freundes Andre: Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Familien für die immer währende Liebe, Unterstützung und ihrem Glauben an mich und meine Arbeit aussprechen! Das hat mir immer die nötige Kraft gegeben! Ihr seid toll!

Meinem über alles geliebten Andre: Mein Schatz, ohne Dich hätte ich das nie geschafft! Ich bin Dir so dankbar dass Du da bist! Deine Unterstützung, Dein „offenes Ohr“ und Dein Humor haben mir die ganze Schreiberei und Laborarbeit sehr erleichtert!

Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name	Kathrin Woyda
Adresse	Am Lindenberg 33 35463 Fernwald
Telefon	06404/667033
E-Mail	kathrin.woyda@uglc.de
Geburtsdatum	31.08.1978
Geburtsort	Bad Muskau, Sachsen

AUSBILDUNG

09.04 – heute	Promotion zum Dr.rer.nat. am Universitätsklinikum Giessen und Marburg Thema: „Rolle der Phosphodiesterase 4 in der Hyperoxie-induzierten Lungenreifungsstörung der Maus“
06.04	Abschluss des Studiums mit Diplom mit der Note 1,6 (gut) Erlangung des akademischen Grades der Diplom-Biologin
09.03 – 06.04	Diplomarbeit am Institut für Mikro- und Molekularbiologie Thema: „Konstruktion eines NrgB-*Streptag* exprimierenden *Bacillus subtilis*-Stammes und Interaktionsstudien zwischen der Glutamin-Synthetase und dem Trans-kriptionsfaktor TnrA“
10.98 – 06.04	Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität Giessen Hauptfächer: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Tier-physiologie
09.97 – 08.98	Freiwilliges soziales Jahr

SCHULE

06.97	Abitur
08.92 – 06.97	Städtisches Gymnasium Weißwasser
08.89 – 07.92	Städtische Mittelschule Bad Muskau

NEBENTÄTIGKEITEN

11.01 – 01.02	Studentische Hilfskraft am Institut für Tierphysiologie der JLU
07.01 – 08.01	Studentische Hilfskraft am Institut für Mikro- und Molekular-biologie der JLU
03.01 – 06.01	Studentische Hilfskraft am Institut für Landeskultur der JLU

PUBLIKATIONEN

TEILE DIESER ARBEIT WURDEN VERÖFFENTLICHT IN:

- **Inhibition of PDE4 enhances lung alveolarisation in neonatal mice exposed to hyperoxia.**
  Woyda K, Koebrich S, Reiss I, Rudloff S, Pullamsetti SS, Rühlmann A, Weissmann N, Ghofrani HA, Günther A, Seeger W, Grimminger F, Morty RE, Schermuly RT.

  Eur Respir J. 2008 Nov 14. [Epub ahead of print]

VORTRÄGE UND POSTER

- **Investigation of Phosphodiesterase Expression in Chronic Hyperoxia Induced Lung Injury in Newborn Mice**
  Poster-Präsentation auf dem ATS (American Thoracic Society) 2007 in San Francisco

- **Phosphodiesterase expression profiling in chronic hyperoxia induced lung injury in newborn mice**
  Vortrag auf dem 16th ERS (European Respiratory Society) Annual Congress 2006 in München

- **Stellen die Phosphodiesterasen ein Ziel in der Hyperoxie-induzierten chronischen Lungenreifungsstörung der Maus dar?**
  Poster-Präsentation auf dem 112. Kongress der DGIM (Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin) 2006 in Wiesbaden

- **Rolle der Phosphodiesterasen in der Hyperoxie-induzierten chronischen Lungen-reifungsstörung der Maus**
  Vortrag auf dem 47. Kongress der DGP (Deutsche Gesellschaft für Pneumologie) 2006 in Nürnberg

WEITERE PUBLIKATIONEN

- **Inhaled iloprost reverses vascular remodeling in chronic experimental pulmonary hypertension.**
  Schermuly RT, Yilmaz H, Ghofrani HA, Woyda K, Pullamsetti S, Schulz A, Gessler T, Dumitrascu R, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W.

  Am J Respir Crit Care Med. 2005 Aug 1;172(3):358-63.

- **Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in Bacillus subtilis.**
  Heinrich A, Woyda K, Brauburger K, Meiss G, Detsch C, Stülke J, Forchhammer K.

  J Biol Chem. 2006 Nov 17;281(46):34909-17.

STIPENDIUM

- Promotionsstipendium durch das internationale Graduiertenkolleg „Molecular Biology and Medicine of the Lung“ (MBML) der Justus-Liebig-Universität Giessen