

**Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin**

**Die Wirkung der Phosphodiesterase 4  
auf die endotheliale und epitheliale Barriere  
in der akuten pulmonalen Inflammation**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Kerber, geb. Bury, Annette Christina**

**2019**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Reutershan  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Müller

Tag der Disputation: 11.12.2019

## Inhalt

1 Einleitung.....	6
1.1 Akutes Lungenversagen .....	6
1.1.1 Definition Acute Lung Injury und Acute Respiratory Distress Syndrome .....	6
1.1.2 Ätiologie .....	7
1.1.3 Epidemiologie und Prognose .....	8
1.1.4 Pathogenese.....	10
1.1.5 Therapie.....	13
1.2 LPS-induziertes ALI/ARDS .....	14
1.3 Induktion der pulmonalen Inflammation .....	16
1.4 Zytokine und Chemokine .....	17
1.4.1 Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) .....	17
1.4.2 Interleukin-1 .....	18
1.4.3 Interleukin-6 .....	18
1.4.4 Interleukin-8 .....	19
1.5 Migration .....	20
1.6 Neutrophile Granulozyten und Respiratory Burst.....	23
1.7 cAMP .....	24
1.8 Phosphodiesterasen .....	26
1.9 cAMP und PDE in der Inflammation.....	27
1.10 PDE4-Inhibitoren.....	27
1.11 Fragestellung und Zielsetzung .....	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Materialien .....	29
2.1.1 Mäuse .....	29
2.1.2 Zellen .....	29
2.1.3 Geräte.....	29
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	31
2.1.5 Chemikalien, Medien, Enzyme .....	33
2.1.6 Antikörper und Primer .....	35

2.1.7	Medikamente .....	36
2.2	Methoden .....	37
2.2.1	Induktion der pulmonalen Inflammation – Inhalation von LPS .....	37
2.2.2	Behandlung mit Phosphodiesterase-4-Inhibitoren .....	38
2.2.3	Tierversuche .....	39
2.2.4	Migration Neutrophiler Granulozyten in vivo .....	40
2.2.5	Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität mittels Evans Blue. ....	45
2.2.6	ELISA.....	47
2.2.7	Real-time-PCR.....	49
2.2.8	Bestimmung der PDE-Aktivität.....	52
2.2.9	Immunhistochemie.....	53
2.2.10	Differentialblutbild .....	57
2.2.11	Migrationsverhalten Neutrophiler Granulozyten in vitro - Transmigrationsassay .....	58
2.2.12	Aktin-Färbung .....	61
2.2.13	Fluoreszenzfärbung PDE4B/D .....	62
2.2.14	Statistische Auswertung.....	63
3	Ergebnisse .....	63
3.1	Migration neutrophiler Granulozyten in vivo .....	63
3.1.1	Dosisermittlung Rolipram .....	63
3.1.2	Dosisermittlung Roflumilast .....	65
3.1.3	Applikation von Rolipram zu unterschiedlichen Zeitpunkten .....	66
3.1.4	Applikation von Roflumilast zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	67
3.1.5	Applikation von Rolipram oder Roflumilast 1h nach LPS-Inhalation . ....	69
3.1.6	Migrationsverhalten in Abhängigkeit von der Applikationsform .....	71
3.2	Mikrovaskuläre Permeabilität – Evans Blue .....	72
3.3	Zytokinkonzentration in BAL .....	74
3.4	Genexpression und Proteingehalt der PDE4B und PDE4D .....	75
3.5	PDE-Aktivität .....	77
3.6	PMN-Infiltration der Lunge im histologischen Bild .....	78
3.7	Differential-Blutbild .....	81
3.8	Migration in vitro.....	84

3.9 Zytoskelettaler Umbau - Aktin-Färbung.....	86
3.10 Expression der PDE4B und PDE4D in H441-Zellen .....	87
3.11 Verteilung der PDE4B und PDE4D in H441-Zellen .....	90
4 Diskussion .....	92
5 Zusammenfassung.....	103
6 Abkürzungsverzeichnis .....	105
7 Abbildungsverzeichnis.....	108
8 Tabellenverzeichnis.....	110
9 Literaturverzeichnis .....	111
10 Erklärung zum Eigenanteil.....	123
11 Veröffentlichung .....	124
12 Danksagung .....	125

## **1 Einleitung**

### **1.1 Akutes Lungenversagen**

#### **1.1.1 Definition Acute Lung Injury und Acute Respiratory Distress**

##### **Syndrome**

Das akute Lungenversagen ist gekennzeichnet durch eine generalisierte Entzündungsreaktion der Lunge. Es bildet sich ein Lungenödem aus, in dessen Folge es zu einer schweren Oxygenierungsstörung des Blutes kommt. Die Erstbeschreibung erfolgte 1967 durch Ashbaugh et al. Er beschrieb eine rasch einsetzende Tachypnoe mit Hypoxämie, eine Verminderung der Compliance und bilaterale Infiltrate im Röntgenbild [1]. Die Compliance beschreibt die Dehnbarkeit der Lunge und damit das Verhältnis von Volumenänderung und Druckänderung. Die American-European Consensus Conference (AECC) definierte 1992 die beiden Syndrome des akuten Lungenversagens: Acute Lung Injury (ALI) und Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) wobei ALI die mildere Form des akuten Lungenversagens darstellt. Anhand der AECC-Kriterien definierte sich das ARDS durch einen akuten Beginn, eine Hypoxämie mit einem Oxygenierungsindex ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ) von  $\leq 200$  mmHg, bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax sowie einen pulmonalarteriellen Verschlussdruck  $\leq 18$  mmHg ohne Anhalt für ein Linksherzversagen. Der Oxygenierungsindex, auch Horovitz-Quotient genannt, stellt den Quotienten aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) und der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration ( $\text{FiO}_2$ ) dar. Die Abgrenzung zwischen ARDS und ALI erfolgte lediglich über den Horovitz-Quotienten ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ), welcher beim ALI  $\leq 300$  mmHg beträgt [2]. Da die AECC-Kriterien jedoch nur relativ grobe Diagnosekriterien darstellen, erfolgte im Jahr 2012 eine Überarbeitung der Definition des ARDS. Die hieraus resultierende sogenannte Berlin-Definition differenziert anhand des Grades der Hypoxämie und unter Berücksichtigung des Positive End-Expiratory Pressure (PEEP) zwischen drei Schweregraden des ARDS. Die Unterteilung erfolgt in das milde Lungenversagen ( $200 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$  mmHg bei PEEP/Continuous Positive Airway Pressure (CPAP)  $\geq 5$  cmH<sub>2</sub>O), das moderate Lungenversagen ( $100 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$  mmHg bei PEEP  $\geq 5$  cmH<sub>2</sub>O) und das

schwere Lungenversagen ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$  bei  $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$ ). Teil der Berlin-Definition sind weiterhin ein akuter Beginn innerhalb von sieben Tagen und bilaterale Verdichtungen im Röntgen-Thorax oder in der Computertomographie (CT). Ein kardial bedingtes Lungenödem muss ausgeschlossen werden. Hierfür wird die echokardiografische Beurteilung der Herzfunktion empfohlen [3, 4].

### 1.1.2 Ätiologie

Ein akutes Lungenversagen kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, die in pulmonale und extrapulmonale Ursachen unterteilt werden. Pulmonale Ursachen werden auch als direkte Ursachen bezeichnet, da es hier zu einer direkten Schädigung des Lungengewebes kommt, während extrapulmonale Ursachen über eine systemische Entzündungsreaktion zur Schädigung der Lunge führen [2]. Der Anteil pulmonaler Ursachen wird zwischen 57 % und 75,8 % angegeben. Gefolgt von Aspiration und Lungenkontusion macht die Pneumonie den größten Anteil der pulmonalen Ursachen aus. Extrapulmonale Ursachen bedingen 24,2 % bis 43 % der Fälle des akuten Lungenversagens. Die häufigste extrapulmonale Ursache stellt die Sepsis dar. Bei 7 % der Patienten liegt eine Kombination aus direkten und indirekten Faktoren vor [5, 6]. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines ARDS aufgeführt.

**Tabelle 1.1: Risiken, die zu einem ARDS führen können [2, 3]**

direkte Ursachen	indirekte Ursachen
Pneumonie	Sepsis
Aspiration	Polytrauma
Inhalationstrauma	Schock
Lungenkontusion	akute Pankreatitis
Beinaheertrinken	kardiopulmonaler Bypass
	schwere Verbrennung
	multiple Transfusionen

### 1.1.3 Epidemiologie und Prognose

Das akute Lungenversagen ist eine seltene aber schwerwiegende Erkrankung, über deren Inzidenz und Mortalität es nur schwer möglich ist eine exakte Aussage zu treffen. Verschiedene Studien unterschiedlicher Staaten liefern stark variierende Daten, da häufig unterschiedliche Diagnosekriterien herangezogen wurden bzw. diese lange Zeit nicht eindeutig definiert waren. Eine finnische Studie berechnete die Inzidenz des ARDS auf 5/100.000 Einwohner/Jahr und des ALI auf 10,6/100.000 Einwohner/Jahr bei einer 90-Tages-Mortalität des ARDS von 47% [7]. Eine in Schweden, Dänemark und Island durchgeführte Studie ergab eine Inzidenz für ARDS von 13,5/100.000 und für ALI 17,9/100.000 Einwohner/Jahr bei einer 90-Tages-Mortalität von 41,2 % bei ARDS-Patienten und 42,2 % bei Patienten mit ALI [8]. Eine weitere groß angelegte Studie umfasste 6522 stationäre Aufnahmen auf 78 Intensivstationen zehn europäischer Länder. In dieser Studie ergab sich eine Inzidenz von 7,1 % für ALI und ARDS bei einer Mortalität von 54,7 % [9]. Für die USA wurden durch Rubenfeld et al. im Jahr 2005 eine Inzidenz von 58,7/100.000 Einwohner/Jahr bei einer Mortalität von 41,1 % für das ARDS und 78,9/100.000 Fälle von ALI mit einer Mortalität von 38,5 % angegeben [10]. Goss et al. gaben eine Inzidenz von 22,4/100.000 für das ALI an [11]. Eine von Zambon und Vincent durchgeführte Metaanalyse, welche Studien des Zeitraums 1994 bis 2006 einschließt, beschrieb bei Betrachtung aller eingeschlossenen Einzelstudien eine durchschnittliche Mortalitätsrate des ALI oder ARDS von 43 %. Dabei konnten sie eine durchschnittliche Reduktion der Mortalität von 1,1 % pro Jahr des Beobachtungszeitraums feststellen [12]. Auch MacCallum und Evans kamen zu dem Schluss, dass die Mortalität im Vergleich zum letzten Jahrzehnt gesunken sei [13]. Eine weitere Studie an 2451 Patienten mit ALI erzielte ein vergleichbares Ergebnis. Hier zeigte sich eine Reduktion der Mortalität von 35 % im Jahr 1996-1997 auf 26 % in den Jahren 2004-2005 [14]. Trotz der sinkenden Mortalitätsraten im letzten Jahrzehnt weist das akute Lungenversagen bis heute eine hohe Letalität auf. Aus diesem Grund sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen und deren

therapeutische Beeinflussung in der Forschungsarbeit nach wie vor von großem Interesse.

Die Mortalitätsrate des akuten Lungenversagens wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Patienten mit einer besonders schweren Hypoxämie, einer Erhöhung des Totraumvolumens, sowie Schock, Nierenversagen, Leberfunktionseinschränkung oder einem fortgeschrittenen Lebensalter weisen eine höhere Sterblichkeit auf [15-18]. So beträgt die Mortalitätsrate bei Patienten mit ALI, deren  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  zwischen 200 und 300 mmHg liegt, 28,6 %. Die Mortalitätsrate von Patienten mit einem Ausgangswert von  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  von 200 mmHg bis 300 mmHg, die eine Progression zu Werten  $< 200$  mmHg durchlaufen, liegt wie die der ARDS-Patienten bei 41 %. Patienten im Alter zwischen 15 und 19 Jahren weisen eine durchschnittliche Mortalitätsrate von 24 % auf, wohingegen es bei Patienten  $> 85$  Jahre 60 % sind. Auch die Ursache des ALI/ARDS ist bestimmend für die Prognose. So liegt die Sterblichkeit bei Patienten mit Polytrauma bei 24,1 %, pulmonal bedingter Sepsis 40,6 % und nach Aspiration bei 43,6 % [10]. Ely et al. beschreiben, dass Patienten  $\geq 70$  Jahre durchschnittlich 19 Tage maschineller Beatmung bedurften. Bei Patienten  $< 70$  Jahre waren es im Durchschnitt nur 10 Tage [19]. Auch die Verweildauer auf Intensivstationen variiert in Abhängigkeit vom Lebensalter. So beträgt die durchschnittliche Dauer intensivmedizinischer Behandlung des ARDS bei Patienten  $\geq 70$  Jahre 21 Tage. Patienten  $< 70$  Jahre verweilen im Durchschnitt 16 Tage auf einer Intensivstation. Die 28-Tages Überlebensrate wird für Patienten  $\geq 70$  Jahre mit 50,3 % und für Patienten  $\leq 70$  Jahre mit 74,6 % angegeben.

Eine Studie zur Langzeitprognose zeigte im Verlauf nach Entlassung aus der intensivmedizinischen Behandlung eine weitestgehende Normalisierung der Lungenfunktion innerhalb von 6 Monaten. Bei 6 % der Patienten zeigten sich jedoch auch nach 12 Monaten noch Einschränkungen in Form einer verminderten Sauerstoffsättigung unter körperlicher Belastung. Als Folgen des ALI und ARDS traten vor allem jedoch extrapulmonale Einschränkungen wie

Muskelschwäche und Fatigue auf. Darüber hinaus bestanden bei vielen Patienten kognitive Einschränkungen sowie neuropsychologische Spätfolgen wie Depression und Angstzustände, welche eine verzögerte Wiederaufnahme der Berufstätigkeit bedingten [20-22].

#### **1.1.4 Pathogenese**

Die Lunge dient zum einen der Oxygenierung des Blutes und zum anderen dem Abtransport von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) durch Abatmung. Dieser sogenannte Gasaustausch erfordert drei Teilfunktionen: die Belüftung des Alveolarraumes, die Perfusion der Lungengefäße sowie die Diffusion von Sauerstoff und Kohlendioxid über die alveolokapilläre Membran. Ist eine dieser Teilfunktionen eingeschränkt, kommt es zur respiratorischen Insuffizienz.

Die alveolokapilläre Membran, welche auch als Blut-Luft-Schranke bezeichnet wird und die Diffusion der Atemgase ermöglicht, setzt sich an ihrer dünnsten Stelle lediglich aus den Endothelzellen auf der kapillären Seite und den Zellkörpern der epithelialen Pneumozyten Typ I auf der alveolären Seite sowie dem Interstitium mit Basalmembran zusammen und ist lediglich 0,5-1µm dick.

Pneumozyten Typ I sind flache Zellen und bilden etwa 97 % der Oberfläche einer Alveole. Etwa drei Prozent der Alveolaroberfläche werden von Pneumozyten Typ II ausgekleidet. Diese sind kubische Zellen, welche Surfactant produzieren. Des Weiteren sind Typ II Pneumozyten bei einer Schädigung des Alveolarepithels in der Lage, sich zu Typ I Pneumozyten zu differenzieren [23].

Wirken wie bei der Entstehung des ARDS schädigende Faktoren auf Alveolarepithel oder Gefäßendothel ein, kommt es zur Schädigung dieser, für die Diffusion der Atemgase notwendigen, Einheit. Das morphologische Korrelat dieser Schädigung wird auch als diffuse alveoläre Schädigung bezeichnet und lässt sich histopathologisch in drei Stadien einteilen:

Im akuten Stadium, welches auch als exsudatives Stadium bezeichnet wird, kommt es zur Schädigung des kapillären Gefäßendothels und des Alveolarepithels. Die Schädigung des Gefäßendothels mit folgender Erhöhung der vaskulären Permeabilität auf der einen und die Schädigung des Alveolarepithels auf der anderen Seite, führen zum Verlust der Barrierefunktion der alveolokapillären Membran. Durch Übertritt von Blutbestandteilen in das Lungeninterstitium und später auch in den Alveolarraum kommt es zur Ausbildung eines proteinreichen interstitiellen und intraalveolären Ödems sowie zur Infiltration durch neutrophile Granulozyten und Erythrozyten [24, 25]. Eine Schädigung von epithelialen Pneumozyten Typ II führt durch eine verminderte Surfactant-Produktion zu Atelektasen [26]. Als weiteres Charakteristikum der exsudativen Phase wird die Ausbildung hyaliner Membranen entlang der Ductus alveolares beschrieben [27].

Nach ungefähr einer Woche schließt sich der exsudativen Phase die fibroproliferative Phase an. Durch Lücken in der Basalmembran kommt es zur Einwanderung von Myofibroblasten in den Alveolarraum und zur Ablagerung von Kollagen [24, 25]. In diesem Stadium kommt es im Rahmen von Reparaturvorgängen zu einer Proliferation von epithelialen Pneumozyten Typ II und damit zu einer Hyperplasie [24, 25, 28]. Diese dienen als Progenitorzellen und können sich im Rahmen einer Epithelschädigung zu Pneumozyten Typ I differenzieren [29]. Des Weiteren produzieren sie den Surfactant, welcher eine Reduktion der Oberflächenspannung der Alveolen bewirkt und diese offen hält [30]. Neben der Regeneration des Alveolarepithels kommt den Pneumozyten Typ II eine große Bedeutung für die alveoläre Clearance zu. Für die Wiederherstellung eines ausreichenden Gasaustausches ist die Fähigkeit der Lunge, Ödemflüssigkeit aus dem Alveolarraum zu entfernen, von großer Bedeutung [31]. Wang et al. stellten in ihrer Untersuchung eine Korrelation zwischen der Anzahl von Pneumozyten Typ II und einer gesteigerten alveolären Clearance fest. [32]. Eine verminderte alveoläre Clearance geht mit einer schlechteren Oxygenierung und einer höheren Mortalitätsrate einher [33].

Im Rahmen der Endothelschädigung kommt es nun zur fibrotischen Intimaproliferation [34]. Durch die fibröse Intimaproliferation kleiner Arterien und Kompression kleiner Gefäße durch die sich ausdehnende interstitielle Fibrose kommt es zur vaskulären Obstruktion und damit zu einer Verminderung der Mikrozirkulation [25]. Dies führt zu einem erhöhten Druck im Gefäßsystem, welcher zur Hypertrophie der Media muskulärer und teilmuskulärer Arterien führt [34, 35]. Diese Veränderungen gleichen denen, die bei der pulmonalen Hypertension in Folge eines thromboembolischen Ereignisses zu beobachten sind [35]. Eine fortschreitende Fibroproliferation führt zu Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der Alveolen mit einer Verminderung der Compliance, mangelnder Rekrutierung von Alveolen durch PEEP und zu einer Erhöhung der Totraumventilation. Diese Folgeerscheinungen führen zu Störungen des Gasaustausches [24, 36, 37]. Die begleitende Beeinträchtigung der Mikrozirkulation trägt zusätzlich zur Reduktion des Gasaustausches und zur Erhöhung des Totraumvolumens bei [25].

Liegt eine schwere Schädigung vor, oder gelingen die Reparationsversuche der Lunge nicht, schreitet die Fibrosierung fort und es kommt nach ca. 3 Wochen zum Übergang in die fibrotische Phase. Diese ist durch einen irreversiblen fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms sowie eine schlechte Prognose gekennzeichnet [24]. Es kommt zum ausgeprägten Umbau des Gefäßbettes. Durch fortschreitende fibrotische Proliferation der arteriellen Intima kommt es zur Verringerung des Innendurchmessers und dadurch zu einem verminderten Füllungsvolumen der pulmonalen Arterien. Die Anzahl der Kapillaren ist im fibrotischen Stadium vermindert und die Kapillaren meist dilatiert. Diese Gefäßveränderungen führen letztendlich zur pulmonalen Hypertension [34].

### 1.1.5 Therapie

In den letzten Jahren wurden intensive Forschungen zu medikamentösen Therapieoptionen des ARDS betrieben. Therapieversuche mit Beta-Agonisten, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), Methylprednisolon, N-Acetylcystein und Prostaglandin E<sub>1</sub> zeigten in Studien keinen Effekt auf die Reduktion der Mortalität [38]. Auch die intratracheale Gabe von Surfactant zeigte keine Reduktion der Mortalität [39]. Eine mögliche Verbesserung des Outcome scheint eventuell durch eine frühe Gabe von Cisatracurium für 48h erreicht werden zu können [40, 41]. Aufgrund bislang mangelnder zufriedenstellender medikamentöser Therapieoptionen beschränkt sich die Therapie hauptsächlich auf supportive Maßnahmen, die v.a. die Vermeidung einer weiteren Lungenschädigung durch die maschinelle Beatmung zum Ziel haben (Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2: Maßnahmen zur supportiven Therapie des ARDS**

Maßnahme	Wirkung	Ref.
Lungenprotektive Beatmung (Volumen- und drucklimitierte Beatmung, angepasster PEEP)	Verbesserung der Langzeitüberlebensraten	[42]
Bauchlagerung	Reduktion der Mortalitätsrate	[43] [44, 45]
Restriktives Flüssigkeitsmanagement	Verbesserung der Lungenfunktion Verkürzung der Dauer maschineller Beatmung	[46]

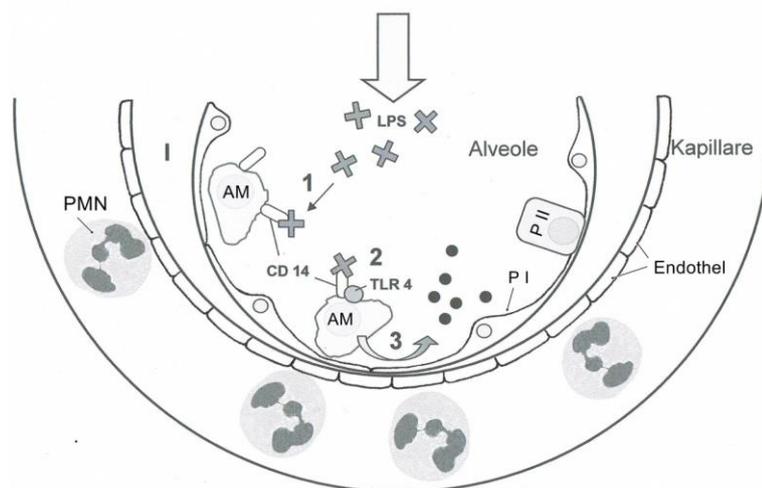
In besonders therapierefraktären Fällen mit persistierender schwerer Hypoxämie können als ultima ratio Lungenersatzverfahren wie die Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) zum Einsatz gebracht werden. Stickstoffmonoxid (NO) und Epoprostenol als inhalative Vasodilatoren können in schweren Fällen die Oxygenierung verbessern. Eine Reduktion der Gesamtmortalität scheinen sie jedoch nicht zu bewirken [47].

## 1.2 LPS-induziertes ALI/ARDS

Die äußere Membran der meisten gram-negativen Bakterien enthält Lipopolysaccharid (LPS). Dieses setzt sich aus einem Phospholipid, welches auch als Lipid-A bezeichnet wird, und einem angehängten Polysaccharid zusammen. Das sogenannte Lipid A bildet den Membrananker des LPS. Auf das Lipid A folgt der innere Kern welcher sich aus Ketodesoxyoctulusonsäure (KDO) und einer Heptose zusammensetzt. Lipid A und der innere Kern sind wenig variabel und für die pathophysiologischen Phänomene verantwortlich. Dieser Teil des LPS wird auch als Endotoxin bezeichnet. Die meisten Lipopolysaccharide enthalten zudem ein an den Kernbereich angehängtes sogenanntes O-Antigen, welches aus sich wiederholenden Oligosacchariden besteht. Die O-Antigene sind sehr variabel und je nach Bakterienstamm verschieden [48]. Die Gabe von LPS/Endotoxin löst eine lokale und systemische Entzündungsreaktion aus [49].

Maris et al. zeigten, dass die Inhalation von 100 µg LPS aus E.coli bei gesunden jungen Probanden eine Einwanderung Neutrophiler Granulozyten (Polymorphonuclear Leukocyte, PMN) in die Lunge, sowie eine Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen bewirkt [50]. Auch im Mausmodell konnte eine Migration neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum nach inhalativer Exposition gegenüber LPS beobachtet werden. [51-53]. Die Antwort auf bakterielles LPS durch das angeborene Immunsystem erfordert eine Erkennung desselben. Diese geschieht durch das Cluster of differentiation 14 (CD14). CD14 ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Protein, welches sich auf Monozyten, Makrophagen und aktivierten Polymorphkernigen Leukozyten (PMN) befindet [54-56]. Es existieren zwei Formen des CD14. Die membranständige Form des CD14, wie sie sich auf den genannten Zellen befindet, wird auch als mCD14 bezeichnet. Eine weitere Form ist das lösliche CD14 (sCD14), welches im Blutplasma zirkuliert [57, 58]. Dabei exprimieren Endothel- oder Epithelzellen kein CD14. Diese benötigen zur Erkennung von LPS lösliches CD14 [59, 60].

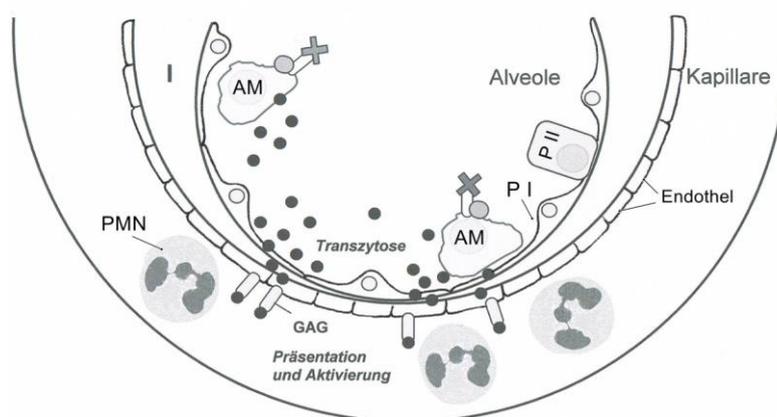
Erfolgt eine Bindung von LPS an CD14, so interagiert dieser Komplex mit dem TLR-4/MD-2-Komplex [61]. Der Toll-like receptor 4 (TLR4) gehört zu einer Gruppe von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, welche der Erkennung von Krankheitserregern dienen. TLR4 wird sowohl auf Pneumozyten Typ II [62] als auch auf Alveolarmakrophagen [63] exprimiert. Dies führt zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die letztendlich über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF $\kappa$ B) eine vermehrte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) zur Folge haben [53, 64]. Alveolarmakrophagen sezernieren v.a. TNF $\alpha$  und IL-1, Pneumozyten Typ II vorwiegend Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-6, Growth regulated oncogene-alpha (GRO $\alpha$ ) und IL-8. Der Chemokinrelease durch Pneumozyten Typ II wird durch TNF $\alpha$  und IL-1 aus Makrophagen weiter stimuliert [65]. Der Mechanismus der LPS-Erkennung ist in Abb.1.1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der LPS-Erkennung durch Makrophagen.** AM = Alveolarmakrophage, I = Interstitium, P I = Pneumozyt Typ I, P II = Pneumozyt Typ II, PMN = Polymorphonukleärer Leukozyt. 1: Bindung des LPS an membranständiges CD14. 2: Interaktion des LPS-CD-14-Komplexes mit TLR-4/MD-2. 3: Zytokinfreisetzung aus Alveolarmakrophagen.

### 1.3 Induktion der pulmonalen Inflammation

Den ersten Schritt der Induktion einer Inflammation stellt die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen durch Alveolarmakrophagen nach Bindung von LPS dar. Eine zentrale Bedeutung kommt der Rekrutierung von PMN aus dem Gefäßsystem in das betroffene Gewebe zu. Diese PMN-Rekrutierung wird durch von Alveolarmakrophagen sezernierte Zytokine und Chemokine initiiert. Hierfür werden die gebildeten Chemokine durch Endothelzellen von abluminal nach luminal transportiert und an der Endotheloberfläche präsentiert. Der Mechanismus der Chemokin-Transzytose ist bislang nicht vollständig geklärt. Das sogenannte Duffy Antigen oder Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC), ein Glykoprotein mit 7 Transmembrandomänen, welches sich auf Erythrozyten und Endothelzellen postkapillärer Venolen und Kapillaren zahlreicher Organe befindet und auch von Pneumozyten Typ I gebildet wird, könnte jedoch die Funktion der Chemokinendo- und Transzytose besitzen [66, 67]. An der endothelialen Zelloberfläche befinden sich Glykosaminoglykane (GAG), welche die nach luminal transportierten Chemokine binden und diese so den im Blut zirkulierenden Leukozyten präsentieren können [68, 69]. Eine schematische Darstellung der Transzytose und Chemokin-Präsentation stellt Abbildung 1.2. dar.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von Transzytose und Präsentation von Zytokinen auf endothelialen Zellen.** AM = Alveolarmakrophage, GAG = Glykosaminoglykan, I = Interstitium, P I = Pneumozyt Typ I, P II = Pneumozyt Typ II, PMN = Polymorphonukleärer Leukozyt. Transzytose der sezernierten Zytokine vom Alveolarraum auf die luminal Seite des Endothels und Präsentation der Zytokine auf Glykosaminoglykanen.

## 1.4 Zytokine und Chemokine

Zytokine sind kleine, sekretorische Proteine, welche als Antwort auf einen Stimulus wie beispielsweise LPS gebildet werden und als Mediatoren einer Inflammationsreaktion dienen. Chemokine gehören zur großen Gruppe der Zytokine, besitzen jedoch chemotaktische Eigenschaften und werden daher Chemokine oder auch chemotaktische Zytokine genannt. Sie werden anhand der Position ihres Cystein-Restes am Aminoterminus des Proteins in Gruppen eingeteilt. Neben weiteren Familien existieren zwei Hauptfamilien, die CXC- und die CC-Familie der Chemokine [70]. C-X-C motif ligand (CXCL) bezeichnet den Liganden, C-X-C motif receptor (CXCR) den zugehörigen Rezeptor. Wichtige Zytokine der frühen Phase sind TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6.

### 1.4.1 Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ist ein 17kDa Polypeptid [71], welches auf einen Stimulus hin von Makrophagen sezerniert wird [72]. TNF $\alpha$  löst sowohl an neutrophilen Granulozyten als auch an Endothelzellen eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen aus [73]. So kommt es durch Stimulation mit TNF $\alpha$  zu einer gesteigerten Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen [74].

Des Weiteren wirkt TNF $\alpha$  chemotaktisch auf im Blut zirkulierende Monozyten und PMN [75]. TNF $\alpha$  bewirkt weiterhin die Expression von IL-1 durch Makrophagen [76] und Endothelzellen [77] sowie die Sekretion chemotaktisch wirksamer Substanzen wie CXCL1 und IL-8 durch Epithelzellen [78]. Eine weitere Wirkung des TNF $\alpha$  liegt in der Verschiebung der hämostatischen Eigenschaften von Endothelzellen, was zu einer gesteigerten Koaguabilität führt [79]. Hohe Mengen an TNF $\alpha$  als Antwort auf Endotoxine vermitteln die Entstehung eines septischen Schocks [80, 81]. In der Leber bewirkt TNF $\alpha$  eine vermehrte Sekretion von Komplementfaktoren und eine verminderte Albumin- und Transferrinsynthese [82].

### **1.4.2 Interleukin-1**

Interleukin-1 (IL-1) wird von einer Vielzahl von Zelltypen produziert, hauptsächlich jedoch von Makrophagen. Aber auch Endothelzellen [77, 83] und glatte Muskelzellen der Gefäße [84] sezernieren nach Stimulation IL-1. IL-1 stimuliert B- und T-Lymphozyten und erzeugt Fieber. An Endothelzellen bewirkt IL-1 eine gesteigerte Expression des Gens für G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) [85]. IL-1 stimuliert Endothelzellen zur weiteren Sekretion von IL-1 [83]. Durch eine Steigerung der Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors und einer gleichzeitigen Senkung der Aktivität von Plasminogen-Aktivatoren führt IL-1 zu einer Reduktion der endothelialen Fibrinolyseaktivität [86]. Neben TNF und LPS stimuliert IL-1 Endothelzellen zur Expression des endothelial-leukocyte-adhesion molecule-1 (ELAM-1) [87], welches ein Adhäsionsmolekül aus der Gruppe der E-Selektine darstellt und der Adhäsion von Leukozyten am Endothel dient. Neben ELAM-1 führen IL-1 und TNF $\alpha$  zu einer gesteigerten Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen [74].

Weiterhin stimuliert IL-1 die Bildung von Interferon  $\beta$ 2 durch Fibroblasten [88], welches auch als IL-6 bezeichnet wird. Endotheliale Zellen reagieren auf Stimulation mit IL-1 mit der vermehrten Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) und Plättchenaktivierender Faktor (PAF), welche beide potente Vasodilatoren darstellen. [89, 90]. In der Leber wirkt IL-1 wie auch TNF hemmend auf die Synthese von Albumin und Transferrin und stimulierend auf die Synthese verschiedener Komplementfaktoren [82].

### **1.4.3 Interleukin-6**

In der frühen Phase der Inflammation wird neben TNF $\alpha$  und IL-1 auch Interleukin-6, welches auch als  $\beta$ 2-Interferon oder B-cell-stimulatory factor 2 (BSF-2) bezeichnet wird, gebildet. Es wird von T- und B-Lymphozyten, Endothelzellen, Monozyten, Fibroblasten und zahlreichen anderen Zelltypen produziert. LPS verursacht eine gesteigerte IL-6-Transkription durch Fibroblasten [91]. Auch TNF induziert die IL-6-Expression durch Fibroblasten und führt zu einer gesteigerten Expression von Humanen Leukozyten-

Antigenen (HLA) der Klasse 1 auf Fibroblasten [92]. Auch stimulierte T-Lymphozyten bilden in Anwesenheit von Makrophagen IL-6 [93]. Die Wirkungen von IL-6 sind vielfältig. Zum einen induziert IL-6 die Expression des IL-2 Rezeptors [94] und die Produktion von IL-2 durch T-Lymphozyten [95]. IL-6 bewirkt in Anwesenheit von IL-2 die Proliferation und Differenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten [96]. An B-Lymphozyten bewirkt IL-6 eine Differenzierung und Ausreifung zu Antikörper-produzierenden Zellen [97]. IL-6 und TNF $\alpha$  induzieren ausserdem die Neutrophilenadhäsion an das Endothel, indem sie die Anzahl der Adhäsionsmoleküle Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) und Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) hochregulieren [98]. In der Leber reguliert IL-6 unter anderem die Synthese von Akute-Phase-Proteinen. So führt IL-6 zu einer gesteigerten Synthese von Fibrinogen, CRP (C-reaktives Protein) und vielen anderen Akute-Phase-Proteinen, wohingegen die Synthese der sogenannten Anti-Akute-Phase-Proteine wie z.B. Albumin und Transferrin abnimmt [99].

#### **1.4.4 Interleukin-8**

Interleukin-8 ist ein chemotaktisch wirksames Chemokin mit der systematischen Bezeichnung CXCL-8. Es wirkt stark chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Rekrutierung von Leukozyten in der akuten Inflammation [100, 101]. TNF $\alpha$  führt über eine Induktion der IL-8-Ausschüttung zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität [102]. IL-8 ist in der Lage, unabhängig von PMNs, mit Endothelzellen zu interagieren und so die endotheliale Durchlässigkeit zu fördern [103]. Neben der chemotaktischen Wirkung auf Neutrophile Granulozyten bewirkt IL-8 die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Exozytose von Granula durch neutrophile Granulozyten sowie eine Veränderung der Zellgestalt neutrophiler Granulozyten, welche für deren Fortbewegung notwendig ist [104]. Eine weitere Wirkung des IL-8 besteht in einer gesteigerten Expression von CD11/CD18 auf Neutrophilen Granulozyten, das zur Gruppe der Integrine gehört und zur Interaktion mit dem Endothel beiträgt [105].

IL-8 wird nach Stimulation durch IL-1, LPS oder TNF $\alpha$  von mononukleären Zellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildet [106]. Aber auch Endothelzellen und Epithelien sind in der Lage nach Stimulation IL-8 zu exprimieren [78, 107, 108]. IL-8 bindet an zwei Rezeptoren, CXCR-1 und CXCR-2, welche vorwiegend auf PMNs exprimiert sind. CXCR-2 besitzt neben IL-8 als weitere, ebenfalls chemotaktisch wirksame Liganden u.a. CXCL1 (GRO $\alpha$ ) und CXCL2 (GRO $\beta$ ). GRO $\alpha$  und GRO $\beta$  werden nach Stimulation durch LPS von Alveolarmakrophagen gebildet. Zudem können auch Epithelzellen nach Stimulation durch TNF $\alpha$  CXCL1 (GRO $\alpha$ ) exprimieren [78].

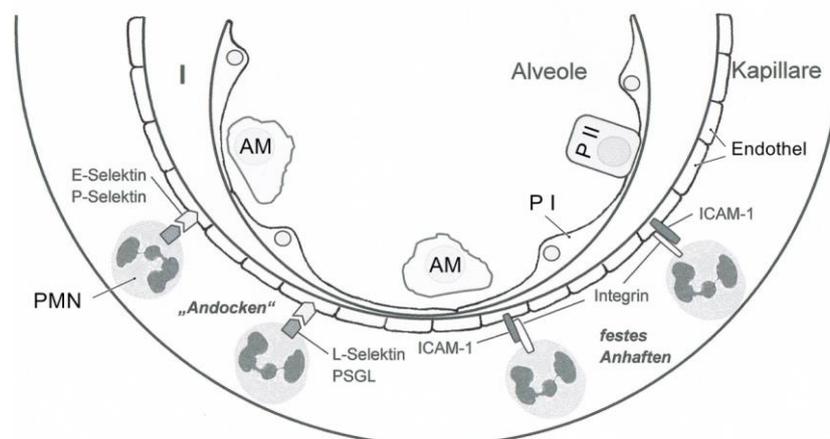
Im murinen Organismus existiert kein direktes Homolog zu IL-8. Eng verwandte Chemokine, die das funktionelle Korrelat des humanen IL-8 darstellen, sind CXCL1 und CXCL2/3, welche im murinen Organismus auch als Keratinocyte-derived chemokine (KC/CXCL1) und Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2/CXCL2/3) bezeichnet werden und an den murinen CXCR-2 Rezeptor binden [109, 110]. Neben Zellen des Immunsystems ist der CXCR-2-Rezeptor auch auf endothelialen und epithelialen Zellen exprimiert und spielt eine bedeutende Rolle im LPS-induzierten Recruitment von PMNs [111].

## **1.5 Migration**

Chemokine üben einen chemotaktischen Reiz auf PMN aus sodass diese aus den Kapillaren ins Lungeninterstitium und nachfolgend in den Alveolarraum migrieren. Als Migration wird die Einwanderung von Zellen aus dem Gefäßsystem in ein Gewebe bezeichnet. Bei der akuten pulmonalen Inflammation kommt es zur Einwanderung von PMN ins Lungeninterstitium und später in den Alveolarraum. Die Migration von PMN beginnt in den Kapillaren. Da der Durchmesser der PMN häufig größer ist als der Durchmesser der Lungenkapillaren, müssen sich die PMN verformen, um diese zu passieren [112]. Komplementfaktoren induzieren eine Umverteilung intrazellulären Aktins in PMN, was eine schlechtere Verformbarkeit der PMN zur Folge hat und die Transitzeiten der PMNs durch das Kapillarbett verlängert [113]. Dies ermöglicht

eine Akkumulation der PMN im Kapillarbett. Nach Akkumulation der PMN in den Kapillaren kommt es über sogenannte Selektine (Adhäsionsmoleküle) zur Anheftung an das Endothel. L-Selektine werden von Leukozyten exprimiert, E-Selektine von Endothelzellen und P-Selektine von Endothelzellen und Thrombozyten. Der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) wird sowohl von Leukozyten als auch von Endothelzellen exprimiert [114]. Durch Interaktion von P-Selektin und PSGL-1 wird das Andocken der PMN am Endothel ermöglicht [115]. Anschließend kommt es zur festen Anheftung der PMN am Endothel. Dieser Schritt wird durch  $\beta$ 2-Integrine wie Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) CD11/CD18 und Macrophage-1 antigen (Mac-1) vermittelt. Diese binden an ICAM-1 [116, 117], welches von Endothelzellen exprimiert wird. IL-1 und TNF $\alpha$  führen zu einer gesteigerten Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen. [74].

In Abb. 1.3 ist der Ablauf der Migration der PMN schematisch dargestellt.

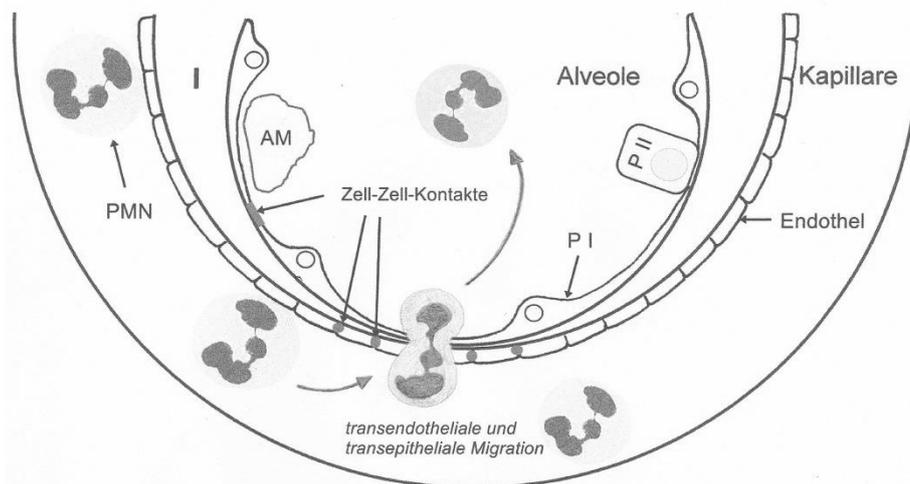


**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Neutrophilenadhäsion an das Kapillarendothel.** AM = Alveolarmakrophage, ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule-1, I = Interstitium, P I = Pneumozyt Typ I, P II = Pneumozyt Typ II, PMN = Polymorphonucleärer Leukozyt. Andocken der PMN über Selektine am Endothel und anschließend festes Anhaften über Integrine und ICAM-1.

Nach festem Anhaften am Endothel müssen die PMN die endotheliale und epitheliale Barriere überwinden. Dies kann auf zwei Arten geschehen: interzellulär oder transzellulär. Endothelzellen sind über Adherens junctions

miteinander verbunden. Diese bestehen aus einem Komplex von VE-Cadherin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin sowie Plakoglobin. Die Adhäsion von PMN an aktivierte Endothelzellen löst Signalkaskaden aus, welche zu einer Umorganisation der VE-Cadherin/Catenin-Komplexe führt und somit die endotheliale Permeabilität erhöht und den Durchtritt von PMN erleichtert [118]. Binden PMN über ICAM-1 an aktivierte Endothelzellen, kommt es zudem zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Endothelzellen. Dies führt zu zytoskeletalen Veränderungen der Endothelzellen und scheint ein weiterer Faktor zu sein, welcher den Durchtritt von PMN begünstigt [119].

Migrierende PMN sezernieren Elastase und Matrix Metalloproteinase (MMP). Elastase ist eine Protease und bewirkt ein Aufbrechen interzellulärer Verbindungen. Daraus resultiert eine Erhöhung der epithelialen Permeabilität durch welche PMN migrieren können [120]. Auch MMPs erleichtern durch Proteolyse der Extrazellulärmatrix (ECM) die Migration von PMN und somit die Entstehung des ALI/ARDS [121]. In Abb. 1.4 ist die Neutrophilenmigration durch Endothel und Epithel schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Neutrophilenmigration durch Endothel und Epithel in den Alveolarraum.** AM = Alveolarmakrophage, I = Interstitium, P I = Pneumozyt Typ I, P II = Pneumozyt Typ II, PMN = Polymorphonucleärer Leukozyt. Passage der PMN über die endotheliale und epitheliale Barriere nach Aufbrechen von endothelialen und epithelialen Zell-Zell-Kontakten.

Der unkontrollierte Durchtritt von PMN durch das Epithel führt zu Unterbrechungen der epithelialen Barriere, was einen Einstrom von Flüssigkeit und die Entstehung eines Lungenödems begünstigt. Nach Wegfall des chemotaktischen Gradienten und Stop der Migration kommt es innerhalb von 12-20 Stunden zur Erholung der epithelialen Barriere [122, 123].

## **1.6 Neutrophile Granulozyten und Respiratory Burst**

Neutrophile Granulozyten, auch als polymorphonukleäre Leukozyten bezeichnet, machen beim Menschen mit ca. 50 – 65 % den größten Anteil unter den Leukozyten aus und sind zur Phagozytose befähigt. Bei Mäusen stellen die Lymphozyten mit 75 – 90 % der Leukozyten den dominierenden Zelltyp dar. Die Gründe hierfür sind bislang nicht vollständig geklärt [124]. PMN sind Teil des angeborenen Immunsystems, sowie der unspezifischen Abwehr und werden im Knochenmark gebildet. Nach ihrer Ausreifung werden sie ins Blut sezerniert und verbleiben dort einige Stunden bis sie ins Gewebe einwandern. PMNs enthalten zahlreiche verschiedene Granula, welche mikrobielle Substanzen enthalten, und sind zur Bildung von ROS befähigt. Aufgrund dieser Funktionen sind sie die ersten Zellen, welche auf einen inflammatorischen Stimulus hin zum Ort des Geschehens rekrutiert werden. Ein Hauptproblem stellt die beim ARDS überschießende Einwanderung von PMN in die Lunge dar. Eine Reduktion dieses ausgeprägten PMN-Einstromes ist Ziel der Therapie.

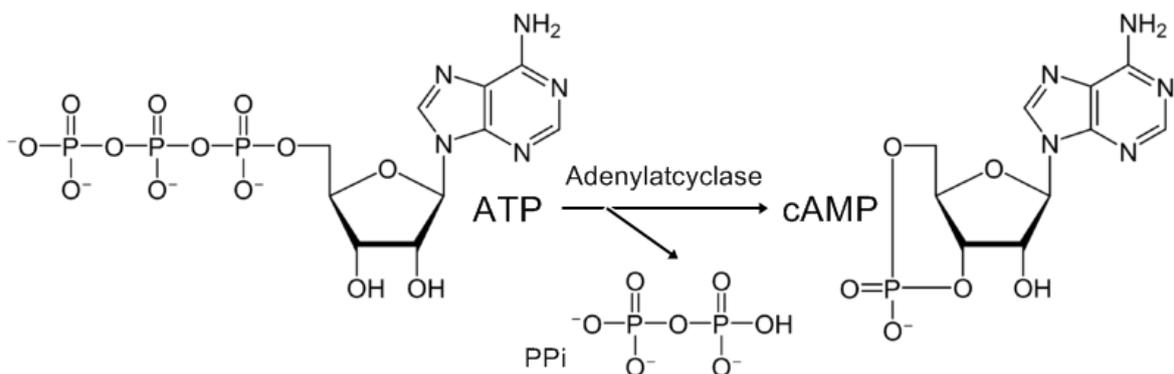
Als Respiratory Burst bezeichnet man die Freisetzung von ROS aus aktivierten PMN. Nach Interaktion eines Liganden mit einem membranständigen Rezeptor auf dem PMN kommt es zur Veränderung des Membranpotentials, welche den Trigger für den Respiratory Burst darstellt und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies einleitet [125, 126]. Ein weiterer Effekt der Stimulation ist die Erhöhung des intrazellulären Calciums [127], welche für die Degranulation der PMN notwendig ist [128]. Die Phagozytose erfolgt zum einen durch Freisetzung von ROS, welche toxisch auf den zu phagozytierenden Erreger wirken, und zum andern durch verschiedene Enzyme, welche sich in den Granula befinden.

Im Regelfall fusionieren die Granula mit Einstülpungen der Plasmamembran und formen ein sogenanntes Phago lysosom, in welchem die Phagozytose stattfindet und ein Austritt der antimikrobiellen Substanzen nach extrazellulär verhindert. Ist das zu phagozytierende Ziel zu groß, läuft die Phagozytose extrazellulär ab, ROS und Granulainhalt gelangen in den Extrazellulärraum und können dort das umliegende Gewebe schädigen [129].

## 1.7 cAMP

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein sogenannter Second messenger, der vielfältige regulatorische Eigenschaften in Körperzellen besitzt. cAMP wird durch Abspaltung eines Pyrophosphatrestes (PPi) aus Adenosin triphosphat (ATP) gebildet. Dies ist in Abb.1.5 dargestellt.

Die Abspaltung des Pyrophosphatrestes von cAMP wird durch die Adenylatcyclase (AC) katalysiert. Es existieren verschiedene Formen der AC. Die membrangebundene AC wird durch den G-Protein-Signalweg aktiviert [130]. Eine weitere Form, die lösliche AC (sAC), wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  und Bicarbonat aktiviert [131].



**Abbildung 1.5: Synthese von cAMP aus ATP unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes.** ATP = Adenosin triphosphat; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; PPi = Pyrophosphatrest.

cAMP besitzt vielfältige Wirkungen, unter anderem aktiviert es die Proteinkinase A (PKA) [132], welche die Aktivität von Stoffwechselezymen und Ionenkanälen sowie die Transkription cAMP-abhängiger Gene reguliert. So phosphoryliert die PKA beispielsweise den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) [133]. CFTR ist ein Membranprotein welches als Chloridkanal fungiert, und wird für den cAMP-gesteuerten Flüssigkeitstransport benötigt [134]. So kann die alveoläre Flüssigkeitsclearance durch cAMP-Agonisten bzw.  $\beta$ -adrenerge Stimulation hochreguliert werden [135].

Weiterhin phosphoryliert die PKA das cAMP response element binding protein (CREB) [136]. CREB ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription bestimmter Gene als Antwort auf einen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel reguliert. CREB-gesteuerte Gene sind beispielsweise TNF $\alpha$ , Interleukin-10 (IL-10) [137] und Cyclooxygenase-2 (COX-2) [138].

cAMP hat neben der Aktivierung von CREB auch Auswirkungen auf den NF $\kappa$ B Signalweg. Ein hoher intrazellulärer cAMP-Spiegel hemmt die Bindungsaktivität von NF $\kappa$ B [139, 140]. cAMP selbst kann an durch cyclische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG, cyclic nucleotide-gated ion channels) binden und dadurch deren Offenwahrscheinlichkeit regulieren [141]. Eine weitere Funktion des cAMP liegt in der Aktivierung von exchange protein directly activated by cAMP (Epac). Durch cAMP-Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung von Epac, welche die Bindung von Ras-related protein 1 (Rap 1) ermöglicht [142]. Epac ist ein guanine nucleotide exchange factor (GEF) für Rap 1 und führt durch Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) zu dessen Aktivierung [143]. Rap 1 stellt ein potentes Aktivierungssignal für LFA-1 dar und steigert so die zelluläre Adhäsion über LFA-1 an ICAM-1 [144].

## 1.8 Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDE) sind Enzyme, welche die Second messenger cAMP sowie cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP) abbauen. Es sind 11 Familien von Phosphodiesterasen bekannt (PDE 1 bis PDE 11), innerhalb derer weitere Isoformen existieren. In der Lunge ist neben der PDE 2 besonders die PDE 4 von Bedeutung, welche auch von Zellen des Immunsystems exprimiert wird [145]. Den größten Anteil an der Hydrolyse von cAMP in der Lunge leisten PDE 2 und PDE 4. Im Lungenparenchym stellt die PDE 4 40% und in den terminalen Bronchien 56 % der gesamten cAMP-hydrolytischen Aktivität dar. Alle 4 Isoenzyme der PDE 4 sind im Lungengewebe vertreten [146]. Die PDE 4 ist die dominierende PDE in Leukozyten und dient daher auch als mögliches Ziel antiinflammatorischer Therapien mit selektiven PDE-Inhibitoren (siehe Tabelle 1.3).

**Tabelle 1.3: Vorrangig exprimierte PDE-Isoenzyme einzelner Leukozytenspezies**

	PDE-Isoenzyme	Ref.
Neutrophile Granulozyten	4	[147]
Makrophagen	1, 3, 4, 5	[148]
Monozyten	4	[148]
T-Lymphozyten	3, 4	[149]

In PMN macht das Isoenzym PDE4B2 nahezu 100 % der gesamten PDE4 mRNA aus. In Monozyten stellt die PDE4B2 80 % und nach Stimulation mit LPS 96 % der gesamten PDE4 mRNA dar [150]. Daher könnte die PDE4B2 als spezifisches Ziel zur Entwicklung antiinflammatorischer Medikamente dienen.

## 1.9 cAMP und PDE in der Inflammation

Zahlreiche Funktionen der Leukozyten sind vom intrazellulären cAMP-Spiegel abhängig. So supprimiert ein hoher cAMP-Spiegel die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Monozyten und PMN [151]. Die Ausschüttung von IL-8 durch PMN wird durch cAMP gehemmt [152]. Auch phagozytotische Aktivitäten werden durch einen hohen cAMP-Spiegel gehemmt [151]. Die Expression von CD11/CD18 auf der Oberfläche ist ebenfalls vermindert [153], genauso wie die Chemotaxis [154]. In T-Lymphozyten führt die Stimulation des T-Zell-Rezeptors zu einer Steigerung des cAMP-Spiegels [155]. Ein erhöhter cAMP-Spiegel in T-Lymphozyten hemmt jedoch deren Proliferation und Funktion [156]. Diese inhibitorischen cAMP-Signale werden durch Rekrutierung von PDE4 gehemmt und eine Aktivierung der Zellen ermöglicht [157]. Die Stimulation von Monozyten und zirkulierenden Leukozyten mit LPS führt zu einer deutlich gesteigerten Expression von PDE4B mRNA und somit zu einer gesteigerten Aktivität der PDE4. Der daraus resultierende vermehrte Abbau von cAMP ist essenziell für die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und damit für die inflammatorische Antwort [158]. Auch in Studien mit Knock-Out-Mäusen, welche defizient für PDE4B, PDE4D oder beide Isoformen waren, konnte gezeigt werden, dass sowohl PDE4B als auch PDE4D essenziell für Chemotaxis und Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation sind [159].

## 1.10 PDE4-Inhibitoren

PDE-Inhibitoren hemmen die Hydrolyse von cAMP und / oder cGMP und steigern so den intrazellulären Spiegel cyclischer Nukleotide. Zellen des Immunsystems exprimieren hauptsächlich die cAMP-spezifischen PDE4-Isoformen. Eine Hemmung der PDE4 führt zum Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels und somit zur Hemmung vieler inflammatorischer Zellfunktionen. Die PDE4 ist daher ein mögliches Ziel in der antiinflammatorischen Therapie. Es gibt zahlreiche PDE4-Inhibitoren, welche

jedoch starke Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen mit sich bringen. Daher ist ihr therapeutischer Einsatz bislang begrenzt. Man vermutet, dass die emetischen Nebeneffekte von PDE4-Inhibitoren auf die Hemmung des PDE4D-Isoenzym im Gehirn zurückzuführen sind [160].

### **1.11 Fragestellung und Zielsetzung**

Das ARDS stellt aufgrund seiner nach wie vor hohen Mortalität ein großes intensivmedizinisches Problem dar. Obwohl in diesem Themengebiet jahrzehntelang Forschung betrieben wurde, ist der genaue Pathomechanismus bislang nicht vollständig verstanden. Dies ist unter anderem ein Grund für die nur unzureichend vorhandenen Therapieoptionen. Dem Second messenger cAMP kommt eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Prozessen zu. cAMP wird von Phosphodiesterasen abgebaut und so eine Inflammationsreaktion begünstigt. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, welche Rolle die in Lunge und Zellen des Immunsystems vorherrschende Phosphodiesterase 4 in der akuten pulmonalen Inflammation spielt. Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

- Welchen Einfluss hat die PDE4 auf die LPS-induzierte PMN-Migration in die Lunge und das Capillary leak?
- Welchen Einfluss hat die PDE4 auf die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen in der pulmonalen Inflammation?
- Welchen Einfluss hat die PDE4 auf die epitheliale und endotheliale Barriere?
- Besitzen PDE4-Inhibitoren eine rein prophylaktische Wirkung, oder können sie auch postexpositionell eingesetzt werden?
- Gibt es andere wirksame Applikationsformen, als die systemische Gabe mittels intraperitonealer Injektion?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Mäuse

Verwendet wurden C57BL/6-Mäuse, welche von den Charles River Laboratories (Sulzbach) bezogen wurden. Die Versuchstiere waren zwischen acht und zwölf Wochen alt und männlich. Die Tierversuche waren durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Genehmigungsnummer TV A7/13). Die Tierhaltung erfolgte in 4er Käfigen bei einer RT von 23 bis 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 45 bis 55 %. Es wurde ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden eingehalten. Die Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser.

#### 2.1.2 Zellen

Die In-vitro-Transmigrationsversuche erfolgten mit isolierten humanen PMNs über einen Monolayer humaner respiratorischer NCI-H441 Zellen (ATCC, USA). Auch die epitheliale PDE-Expression wurde an H441-Zellen untersucht.

#### 2.1.3 Geräte

Vernebler	Pocket Nebuliser MicroAIR	Omron, Mannheim
Thermoschüttler	AK 82	Infors AG, Bottmingen (CH)
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Leica DM IRB	Leica Biosystems, Wetzlar
Konfokalmikroskop	LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Oberkochen
Durchflusszytometer	BD FACS CANTO II	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Sprockhoevel
Waage	HR-120	A&D Instruments Ltd. Ahrensburg
Waage	Scout II	Ohaus, Kirchheim
Waage	PK 4800 Delta Range	Mettler, Gießen
Homogenisator	Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Heizplatte	Ikamag RCT	Janke&Kunkel, Staufen
Brutschrank	Heraeus Oven T6	Heraeus, Hanau

Zentrifuge	5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Perfect Spin P	Peqlab, Erlangen
Photometer	GENios	Tecan, Crailsheim
Spectrophotometer	NanoDrop2000	Peqlab, Erlangen
Thermocycler	MyCycler	Bio-Rad Laboratories, München
Thermal Cycler	C1000 CFX96 Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, München
HPLC Pumpe	HPLC Pump P680	Dionex, Sunnyvale (USA)
Probeninjektor	ASI-100	Dionex, Sunnyvale (USA)
Säulenofen		Optilab, Berlin
UV-Detektor	UVD 1705	Dionex Sunnyvale (USA)
Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1020	Leica Biosystems, Wetzlar
Wasserbad	HI 1210	Leica Biosystems, Nussloch
Heizplatte	HI 1220	Leica Biosystems, Nussloch
Rotationsmikrotom	RM 2235	Leica Biosystems, Nussloch
Mikrowelle	Cookmate	Daewoo, Butzbach
Einbettautomat	Histoembedder EG 1160	Leica Biosystems, Nussloch
Labor-pH-Meter	526	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Pinzetten	BD312R, BD311R	Aesculap, Tuttlingen
Scheren	BC590R, BC060R	Aesculap, Tuttlingen
Absaugpumpe	Vario BVC 210	Vacuubrand, Wertheim
Ultraschall	Sonoplus GM 70	Bandelin Electronic, Berlin
Vortex	K-55-GE	Bender und Hobein AG, Zürich (CH)
Magnetrührer	Ikamag RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
ELISA Microplate Washer	Hydroflex ELISA	Tecan, Grödig (AT)
ELISA Plate Reader	Infinite M200 Pro	Tecan, Grödig (AT)

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Zählkammer	C-Chip DHC-N01	Digital Bio, Seoul (ROK)
Gefäßkatheter	BD Insyte 22GA 381223	Becton Dickinson, Heidelberg
Insulinspritzen	BD Plastipak 1ml 300013	Becton Dickinson, Heidelberg
Polypropylenröhrchen, 50ml	352070	Becton Dickinson, Heidelberg
Polypropylenröhrchen, 15ml	188271	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen	Cellstar 628160	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe	CellStrainer 70µm 352350	Becton Dickinson, Heidelberg
Rundbodenröhrchen 5ml	352052	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäß 1,5ml	616201	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäß 1,5ml	Multi TapTop Tubes E518.1	Carl Roth, Karlsruhe
Precellys Deckel	91-PCS-TC	Peqlab, Erlangen
Precellys 2ml Homogenisationsröhrchen	91-PCS-TV	Peqlab, Erlangen
Precellys Ceramic Beads 1,4mm	91-PCS-CK14P	Peqlab, Erlangen
Mikrotiterplatte	Microplate 96 Well 655101	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatte	Nunc-Immuno 96-Well 442404	ThermoScientific, Bonn
Plattenversiegelung	Seal Plate S90519	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5ml RNSase-frei	Multi SafeSeal Tubes 7080.1	Carl Roth, Karlsruhe
96-Well PCR-Platte	Multiplate MLL9601	Bio-Rad Laboratories, München
Folie	Microseal B MSB 1001	Bio-Rad Laboratories, München
Objektträger	SuperFrost Plus 03- 0060	R.Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger	ISO 8037/1	R.Langenbrinck, Emmendingen

Deckgläser	01-2460/1	R.Langenbrinck, Emmendingen
PapPen	H-4000	Vector Labs, Peterborough (UK)
Gazin Mullkompressen	18501	Lohmann&Rauscher, Neuwied
Transwell Plate 3µm, 6,5mm	3472	Corning Incorporated, Wiesbaden
Einbettkassetten	Rotilabo K.113.1	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	90076	TPP, Trasadingen (CH)
Handschuhe	Peha-soft nitrile 942206	Hartmann, Heidenheim
Mundschutz	1826	3M, Neuss
Atemschutzmaske	Aura 1862+	3M, Neuss
Kanülen Microlance 30G ½'' 0,3x13mm	304000	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 27G ¾'' 0,4x19mm	302200	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 24G 1'' 0,55x25mm	304100	Becton Dickinson, Heidelberg
OP-Haube	84000	Farstar medical, Barsbüttel
Pasteurpipetten	3,2ml	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen 2ml	Injekt 4606027	B Braun, Melsungen
Einmalspritzen 5ml	Injekt 4606051	B Braun, Melsungen
Einmalspritzen 10ml	Injekt 4606108	B Braun, Melsungen
HPLC-Röhrchen	PP Vials, 0,3ml 702809	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Stripetten 1ml	356521	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten 5ml	356343	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten 10ml	356551	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten 25ml	356525	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotomklinge	R35 207500005	FeatherSafety Razor, Osaka (JPN)
Chamber Slides	µ-Slide VI 0,4 80606	Ibidi, Martinsried
ReproSil-Pur	C18-AQ 5µ 20x3mm	Dr.Maisch, Ammerbuch

ReproSil-Pur	Basic C19 1,8µ 100x3mm	Dr.Maisch, Ammerbuch
ReproSil-Pur	C18-AQ 1,9µ 100x3mm	Dr.Maisch, Ammerbuch
Pipettenspitzen 10 µl	70.1115	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 1000 µl	686290	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 200 µl	0030.000.870	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 200 µl	70760002	Sarstedt, Nürnberg

### 2.1.5 Chemikalien, Medien, Enzyme

cAMP	851205	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	S3264	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4873	Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub>	233-140-8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KCl	4936	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	M0250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl	106404	Merck, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl	A0988	AppliChem, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	K10720529	Merck, Darmstadt
EDTA	ED4S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Evans Blue	206334	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	A2156	AppliChem, Darmstadt
LPS	L6011	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl 0,9%	10ml	Braun, Melsungen
DBPS without Mg/Ca	D8537	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	A7906	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium-Acid	S-8032	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PFA	P6148	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Türks Lösung	109277	Merck, Darmstadt
DMSO	D5879	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNAse Away	7002	Molecular BioProducts, San Diego (USA)
peqGold Trifast	30-2020	Peqlab, Erlangen
Chloroform	C2432	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	I9516	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol absolut	A3678	AppliChem, Darmstadt
NFW	A7398	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd 4%	A3697	AppliChem, Darmstadt

Paraplast Plus	39502004	McCormick Scientific, St.Louis (USA)
Xylol	9713.3	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	106009	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 %	108597	Merck, Darmstadt
Unmasking Solution	H-3300	Vector Labs, Peterborough (UK)
Avidin Blocking Kit	SP-2001	Vector Labs, Peterborough (UK)
FSGO Gelatin	G7765	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAB Peroxidase Substrate Tablet Set	D4168	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin	H3401	Vector Labs, Peterborough (UK)
Bluing Reagent	7301	Thermo Scientific, Bonn
Eukitt	03989	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diff-Quik Färbeset	130832	Medion Diagnostics, Düringen (CH)
Immersionsöl	115577	Merck, Darmstadt
Fluorescein Phalloidin	F432	Invitrogen, Darmstadt
ProLong antifade reagent with DAPI	P 36931	Invitrogen, Darmstadt
Acetonitril	83639.320	VWR Prolabo, Darmstadt
Trifluoressigsäure	34957	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	A4974	AppliChem, Darmstadt
Stop Solution	80-1804	Enzo Life Sciences, Lausen (CH)
Substrate Solution	DY 999	R&D Systems, Wiesbaden
Reagent Diluent	DY 995	R&D Systems, Wiesbaden
Triton X-100	A4975	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser für die Molekularbiologie	A7398	AppliChem, Darmstadt
HEPES 1M	(15630-056)	Gibco, Paisley (UK)
HBSS+	14025050	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Percoll Plus	17-0891-01	GE Healthcare, München
Collagenase	C7657	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNAse	D4527	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyaluronidase	H3506	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CXCL2/3	200ng/ml	PeptoTech, Hamburg

### 2.1.6 Antikörper und Primer

Biotinylated rabbit anti rat	BA-4001	Vector Labs, Peterborough (UK)
Rat anti mouse neutrophils (7/4)	MCA771GA	AbD Serotec, Düsseldorf
CD45 PerCP	557235	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG 2a FITC	553929	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG 2b APC	553991	Becton Dickinson, Heidelberg
Gr-1	RB6-8C5	Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville (USA)
Sybr-Green Supermix	170-8880	Bio-Rad Laboratories, München
iScript cDNA Synthesis Kit	170-8891	Bio-Rad Laboratories, München
Vectastain ABC-Kit (Rat IgG)	PK-4004	Vector Labs, Peterborough (UK)
7/4 FITC	MCA771F	AbD Serotec, Düsseldorf
Rabbit polyclonal anti-PDE4B IgG	sc-25812	Santa Cruz, Heidelberg
Alexa 488 goat anti-rabbit IgG	A11008	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
Goat polyclonal anti-PDE4D IgG	sc-25100	Santa Cruz, Heidelberg
Alexa 488 donkey anti-goat IgG	A11055	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
Alexa 594 goat anti-rabbit IgG	A11037	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)

DuoSet ELISA Mouse IL-6	DY 406	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse TNF $\alpha$	DY 410	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse CXCL1/KC	DY 453	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse CXCL2/MIP-2	DY 452	R&D Systems, Wiesbaden
mus-PDE4D_forward	5'-caa gtt tca ggc tgg ctt tc-3'	Biomers.net, Ulm
mus-PDE4D_reverse	5'-gtc cca tgt gtg aca agc ac-3'	Biomers.net, Ulm
mus-PDE4B_forward	5'-atc acc ttg ctg tgg gat tc-3'	Biomers.net, Ulm
mus-PDE4B_reverse	5'-aac caa cct ggg att ttt cc-3'	Biomers.net, Ulm
h/m-18S forward	5'-gta acc cgt tga acc cca tt-3'	Biomers.net, Ulm
h/m-18S reverse	5'-cca tcc aat cgg tag cg-3'	Biomers.net, Ulm
Sheep polyclonal to van-Willbrandt-Faktor IgG	ab11713	Abcam, Cambridge (UK)
Alexa 647 donkey anti-sheep IgG	A21448	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)

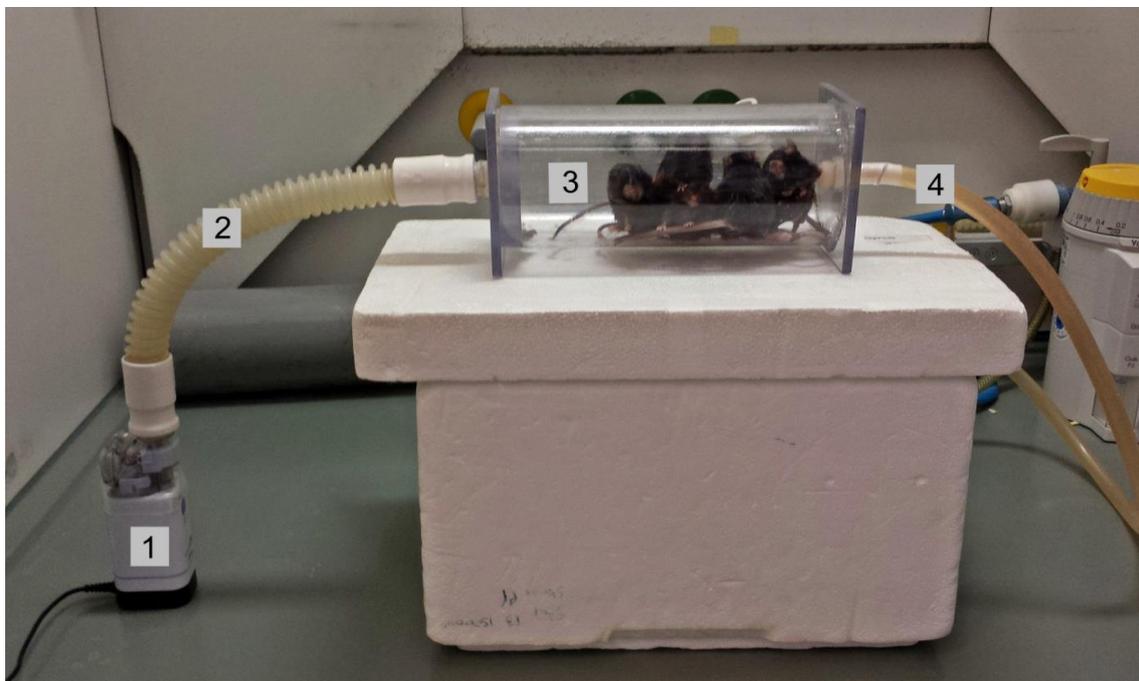
### 2.1.7 Medikamente

Softasept	3887138	B Braun, Melsungen
Rolipram	R6520	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roflumilast	162401-32-3	LGM Pharma, Nashville (USA)
Rompun 2 %	25ml	Bayer, Leverkusen
Ketamin	50mg/ml	Ratiopharm, Ulm
Heparin-Natrium	25000I.E./5ml	Ratiopharm, Ulm

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Induktion der pulmonalen Inflammation – Inhalation von LPS

Zur Induktion einer pulmonalen Inflammation wurde LPS aus *Salmonella enteritidis* verwendet. Das LPS lag in 0,9 % NaCl gelöst vor. Es wurden jeweils 7 ml LPS-Lösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml für 4-8 Tiere verwendet. 4-8 Mäuse wurden in eine durchsichtige Vernebelungskammer (3) gesetzt und diese dann verschlossen. Nach Befüllen des Verneblers (1) mit 7 ml LPS-Lösung wurde dieser über einen Gummischlauch (2) mit der Vernebelungskammer verbunden. Ein Absaugschlauch (4) am anderen Ende der Kammer sorgte für die Absaugung des Aerosols aus der Kammer. Die Inhalation wurde begonnen und bis zum vollständigen Verbrauch der LPS-Lösung fortgeführt. Dieser Vorgang nahm zwischen 30 und 40 min in Anspruch. Die gleichmäßige Füllung der Kammer mit Aerosol wurde regelmäßig überprüft. Tiere der Kontrollgruppen, die nicht gegenüber LPS exponiert wurden, inhalierten auf dieselbe Weise mit 7 ml NaCl 0,9 %.



**Abbildung 2.1: Vernebelungskammer zur Inhalation von LPS bzw. NaCl 0,9%.** Inhalationskammer (3) mit Vernebler (1), zuführendem (2) und abführendem (4) Schlauch.

### **2.2.2 Behandlung mit Phosphodiesterase-4-Inhibitoren**

Es existieren zahlreiche Arbeiten, in welchen Rolipram und Roflumilast in unterschiedlichen Dosierungen verwendet wurden [161-163]. In Anlehnung an diese Arbeiten, kam in unserer Arbeit zur Ermittlung der in unserem Setting wirksamsten Dosierung Rolipram zunächst in einer Dosierung von 1 mg/kg, 5 mg/kg und 10 mg/kg zum Einsatz. Roflumilast applizierten wir in einer Dosierung von 0,25 mg/kg und 0,5 mg/kg i.p.

#### **Rolipram**

10 mg Rolipram Trockensubstanz wurden in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Mit 0,9 % NaCl wurden die Aliquots auf Konzentrationen von 0,1 µg/µl (2 % DMSO), 0,5 µg/µl (10 % DMSO) und 1 µg/µl (20 % DMSO) verdünnt.

#### **Roflumilast**

4,2 mg Roflumilast Trockensubstanz wurden in 1,68 ml DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Mit NaCl 0,9 % wurde auf Konzentrationen von 0,05 µg/µl (2 % DMSO) und 0,025 µg/µl (1 % DMSO) weiterverdünnt.

#### **Intraperitoneale Applikation**

Zur intraperitonealen Injektion wurden die Tiere gewogen und anschließend pro Gramm Körpergewicht 10 µl des verdünnten Wirkstoffes intraperitoneal injiziert. Kontrolltiere erhielten ebenfalls 10 µl/g Körpergewicht i.p. Hierfür wurde lediglich DMSO in der analogen Konzentration in NaCl 0,9 % gelöst appliziert.

#### **Inhalative Applikation**

Die inhalative Gabe der PDE4-Inhibitoren Rolipram und Roflumilast erfolgte analog zur LPS-Inhalation in einer Vernebelungskammer. Rolipram wurde mit NaCl 0,9 % auf eine Konzentration von 20 µg/ml und Roflumilast auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Analog zur LPS-Inhalation wurden für 4-8

Tiere jeweils 7 ml Lösung verwendet. Kontrolltiere erhielten eine Inhalation mit der entsprechenden Konzentration an DMSO in NaCl 0,9 %.

### **Behandlungszeitpunkt**

Zur Ermittlung der wirksamsten Dosis der PDE4-Inhibitoren wurden diese zunächst eine Stunde vor LPS-Inhalation verabreicht. Um das Zeitoptimum einer Therapie mit Rolipram oder Roflumilast zu ermitteln, erfolgte die Applikation zudem eine Stunde, drei Stunden und sechs Stunden nach LPS-Inhalation. Mit dem Applikationszeitpunkt von DMSO bei Kontrolltieren wurde in gleicher Weise verfahren.

### **2.2.3 Tierversuche**

#### **Anästhesie**

200 µl Ketamin

50 µl Rompun

750 µl NaCl 0,9%

Zur Anästhesie wurde den Tieren 300-400 µl der Lösung intraperitoneal injiziert und bis zur vollen Entfaltung der Wirkung 6 min abgewartet.

#### **Bronchoalveoläre Lavage (BAL)**

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion anästhesiert. Nach 6 min wurde die Maus auf einem OP-Tisch fixiert und das Fell gründlich desinfiziert. Über einen kleinen Schnitt im Halsbereich wurde das Fell zum Bauch hin abpräpariert. Anschließend wurde die Trachea im Halsbereich freipräpariert, mit einem Venenkatheter kanüliert und der Tubus fixiert. Mit einer 1 ml-Spritze wurde die Lunge über den in der Trachea liegenden Katheter mit Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline (DPBS-) gespült und die gewonnene BAL in einem Falcon gesammelt.

## Lungenentnahme

Nach Anästhesie und Fixierung der Maus auf dem OP-Tisch wurde das Abdomen eröffnet und zum Ausbluten der Maus die großen Bauchgefäße durchtrennt. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Thorax. Um die Lungengefäße von frei zirkulierenden PMN zu befreien wurde das schlagende rechte Herz mit 3 ml Phosphate-Buffered Saline (PBS-) perfundiert. Herz und Lunge wurden im Paket entnommen und die Lungenlappen hilusnah von den übrigen Strukturen abgetrennt.

### 2.2.4 Migration Neutrophiler Granulozyten in vivo

Der Mechanismus der Neutrophilenmigration in der pulmonalen Inflammation ist unter Punkt 1.5 bereits ausführlich dargestellt. Der folgende Versuchsaufbau beinhaltet die Zellzahlbestimmung in Lunge und BAL. Antikörper-Färbungen und Fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse der gewonnenen Zellen ermöglichten eine Differenzierung zwischen PMNs und anderen Zelltypen sowie eine genaue Zuordnung der PMNs zu den einzelnen Lungenkompartimenten Intravasalraum, Interstitium und Alveolarraum.

#### *Rezepturen und Antikörper*

Färbepuffer	5 g	BSA
	2,5 ml	Sodium Acid
	500 ml	PBS-
Enzymcocktail (pro Maus)	5 µl	Collagenase
	5 µl	Hyaluronidase
	5 µl	DNase
	100 µl	Gr-1-AK (ungefärbt)
	5 ml	PBS-

Lysepuffer	10,3 g	NH <sub>4</sub> Cl
	1,05 g	NaHCO <sub>3</sub>
	0,465 g	disodium EDTA
	125 ml	Aqua bidest
Fixierung (pro Maus)	400 µl	PFA (4%)
	400 µl	Färbepuffer

### *Durchführung*

24 h nach LPS-Inhalation wurden die Tiere zur Erweiterung der Schwanzvenen für einige Minuten unter Rotlicht verbracht. Nach gründlicher Desinfektion des Schwanzes wurde den Tieren 10 µl gefärbter, fluoreszenzmarkierter Antikörper (GR1-Antikörper) gelöst in 290 µl NaCl 0,9 % in eine Schwanzvene injiziert. Die Bindung des Allophycocyanin (APC)-markierten GR1-Antikörpers an frei zirkulierende und dem Gefäßendothel anhaftende PMNs ermöglicht die spätere Zuordnung dieser PMNs zum intravasalen Kompartiment. Anschließend wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion anästhesiert, 5 ml BAL entnommen und auf Eis gelagert (vgl. 2.2.3 BAL). Herz und Lunge wurden im Paket entnommen und die Lungenlappen nach Perfusion des rechten Herzens hilusnah von den übrigen Strukturen abgetrennt (vgl. 2.2.3 Lungenentnahme). Durch Perfusion des schlagenden Herzens wurden frei zirkulierende PMNs ausgespült, sodass lediglich dem Endothel anhaftende GR-1-markierte PMNs in den Lungengefäßen verblieben. Die Lungenlappen wurden in eine Petrischale gegeben und in 5 ml Enzymcocktail fein zerkleinert und zum Schutz des fluoreszenzmarkierten Antikörpers in eine dunkle Kammer verbracht. Um optimale Reaktionsbedingungen für die Enzyme zu schaffen, wurden die Lungenproben für 30 min bei 100 rpm und 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert.

Währenddessen wurde die BAL für 10 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wurde mit 1 ml Färbepuffer resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in 90 µl Türks Lösung pipettiert. 10 µl davon wurden zur Auszählung der Zellen in eine

Neubauer Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit der Lungenproben wurden diese durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt und mit 20 ml PBS- nachgespült. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Um in den Proben vorhandene Erythrozyten zu lysieren wurden die Proben mit 5 ml Lysepuffer versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT folgte ein Stoppen der Lyse mit 20 ml Färbepuffer. Die lysierten Proben wurden erneut für 10 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml Färbepuffer resuspendiert, 10 µl der Zellsuspension in 90 µl Türks Lösung pipettiert und davon 10 µl zur Zellzählung in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Um eine Endkonzentration von 2000 Zellen/µl zu erhalten, wurden die Zellsuspensionen nach Zählung der Zellen in den BAL- und Lungenproben mit Färbepuffer verdünnt oder durch erneute Zentrifugation und Resuspension konzentriert.

### *Färbung*

Von allen Proben wurden jeweils 100 µl in ein Rundbodenröhrchen pipettiert. Anschließend wurden nach folgendem Schema jeweils 1 µl der Antikörperlösungen hinzupipettiert. CD45 ist ein Oberflächenmarker, welcher auf allen Leukozyten exprimiert ist, GR-1 und 7/4 sind PMN-spezifische Antigene.

Antikörper	BAL	Lunge	Isotypenkontrolle
GR-1 633 (0,05 mg/ml)	+		
CD45 PerCP (0,02 mg/ml)	+	+	+
7/4 FITC (0,02 mg/ml)	+	+	
IgG2a FITC (0,02 mg/ml)			+
IgG2b APC (0,05 mg/ml)			+

Zur Färbung der Proben folgte eine 20-minütige Inkubation der Proben bei 4 °C unter Lichtausschluss. Um ungebundene Antikörper auszuwaschen, wurde zu jeder Probe 2 ml Färbepuffer pipettiert und der Überstand nach 5 min

Zentrifugation bei 1300 rpm und 4 °C abgekippt. Nach zweimaligem Waschen wurde das Pellet mit 400 µl Fixierung versetzt und die Proben bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

#### *Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence activated cell sorting)*

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine quantitative Vermessung sowie eine molekulare Charakterisierung von Zellen. Für die Durchführung einer Durchflusszytometrie müssen die zu messenden Zellen in einer Suspension vorliegen. Der Messpunkt befindet sich am Kreuzungspunkt des Probenstroms mit einer Lichtquelle, welche genau rechtwinklig zum Probenstrom ausgerichtet ist. Als Lichtquelle dient meist ein Laser. Die Messung erfolgt in dem Moment, in dem die Zelle den Laserstrahl passiert. Trifft das Anregungslicht genau im rechten Winkel auf eine Zelle, wird das Anregungslicht gestreut und diese Lichtstreuung detektiert und für jede einzelne Zelle abgespeichert. Durch verschiedene Sensoren können sowohl physikalische als auch molekulare Messgrößen detektiert werden. Um in der großen Menge an Signalen die den einzelnen Zellen zuzuordnenden Signale identifizieren zu können, wird ein Triggerparameter verwendet. Die Messung kann über verschiedene Parameter getriggert werden. Wird beispielsweise über Forward scatter (FSC) als Maß der Zellgröße getriggert, werden alle Zellen die einen zuvor definierten Schwellenwert überschreiten, aufgenommen und abgespeichert.

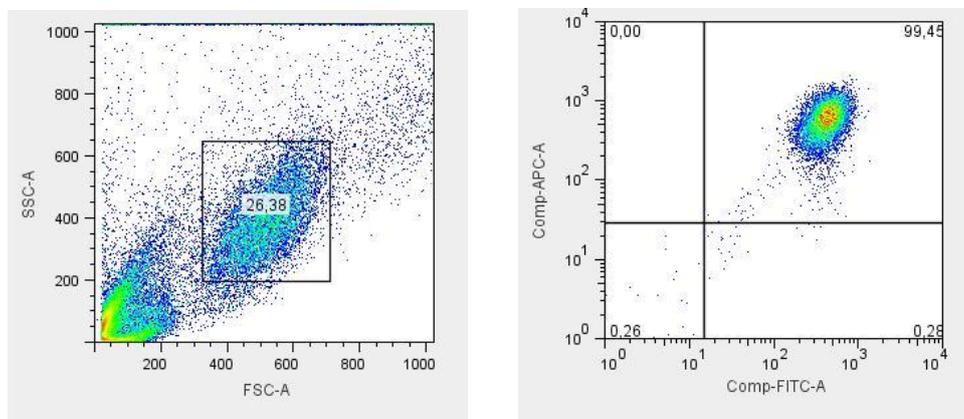
#### Physikalische Messgrößen

FSC bezeichnet die sogenannte Vorwärtslichtstreuung. Streuung des Anregungslichts in einem kleinen Winkel zum Anregungslicht. Diese Messgröße dient als grobes Maß für die Zellgröße. Side scatter (SSC) bezeichnet die Seitwärtsstreuung, also die Streuung des Anregungslichts im rechten Winkel zum Anregungslicht. Die Seitwärtsstreuung dient als Maß für die Granularität einer Zelle. Auch molekulare Eigenschaften einer Zelle können detektiert werden. Dies erfordert eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die am Messpunkt ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden ebenfalls detektiert und

abgespeichert. Für die FACS-Analyse eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe weisen häufig Überlappungen in ihren Emissionsspektren auf. Daher kommt es auch bei nur mit einem Farbstoff markierten Zellen häufig zu Mischsignalen auf zwei Detektoren. Aus diesem Grund ist eine entweder rechnerische oder manuelle Korrektur der Messdaten erforderlich (Kompensation). Bei der manuellen Kompensation erfolgt die Abspeicherung der originalen Messdaten und die anschließende Kompensation mithilfe von Software. [164]

### Auswertung

Am FACS (BD FACS CANTO II, FACS Diva Version 6.1.3) wurden je Probe 10.000 Zellen analysiert und die Daten mithilfe des Programms Flowjo (Flowjo, Version 7.2.5) ausgewertet. Die Auswahl eines bestimmten Analysebereichs (sog. Gating, hier: Leukozytenpopulation) bei der Auswertung sowie die Darstellung nach Kompensation der Daten sind in Abbildung 2.2 am Beispiel einer BAL-Analyse dargestellt.



**Abbildung 2.2: Auswahl und Auswertung einer Zellpopulation in der Durchflusszytometrie.** A: Auswahl der auszuwertenden Zellpopulation (Gating). B: Darstellung FITC- und GR-1 positiver PMNs nach durchgeführter Kompensation.

Die Zellen, welche in der Analyse der im Gating ausgewählten Zellpopulation als FITC- und CD45 positiv detektiert wurden, entsprachen den PMNs. In der BAL waren aufgrund der Zugabe von gefärbtem GR-1 Antikörper bei der Färbung alle PMNs GR-1 positiv. In Lungenproben konnte anhand von GR-1 zwischen interstitiellen und intravasalen PMNs differenziert werden. Durch i.v.-

Injektion des gefärbten GR-1 Antikörpers zu Beginn des Experiments, wurden nur intravasal befindliche PMNs in der Lunge gefärbt. PMNs, welche in Lungenproben für GR-1 negativ waren, entsprachen interstitiellen PMNs.

### **2.2.5 Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität mittels Evans Blue**

In der pulmonalen Inflammation kommt es zu einer Schädigung des Endothels und damit zu einer Permeabilitätssteigerung der Lungengefäße. Der Übertritt von Blutbestandteilen ins Lungeninterstitium kann als Maß für die Schädigung der endothelialen Barriere betrachtet werden. Evans Blue ist ein Farbstoff, welcher eine hohe Bindungsaffinität zu Serumalbumin besitzt. Wird er intravenös verabreicht, bindet er fest an Serumalbumin. Aufgrund seiner Molekülgröße kann Albumin das Gefäßendothel nicht durchdringen. Kommt es jedoch zur Schädigung des Endothels, kann Albumin, und somit das daran gebundene Evans Blue, ins Lungeninterstitium übertreten und dort nachgewiesen werden.

#### *Durchführung*

Evans Blue wurde abgewogen und in NaCl 0,9 % gelöst. Pro mg Evans Blue wurde 1 ml NaCl 0,9 % eingesetzt, sodass die Endkonzentration 1 mg/ml betrug. 5,5 h nach LPS-Inhalation wurde den Mäusen nach Erweiterung der Schwanzvenen unter Rotlicht und Desinfektion des Schwanzes 20 µl/g KG Evans Blue Lösung langsam intravenös injiziert, was einer Dosis von 20 µg/g entspricht. Die Zirkulationszeit des Evans Blue lag bei exakt 30 min. 6 min vor Ablauf der Zirkulationszeit wurden die Tiere anästhesiert. Nach Ende der Zirkulationszeit wurden die Tiere thorakotomiert und aus der schlagenden rechten Herzkammer 250-500 µl Blut in eine heparinisierte 1 ml-Spritze entnommen. Das gewonnene Blut wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und auf Eis gelagert. Um das Evans Blue-haltige Blut aus den Lungengefäßen zu spülen, wurde anschließend die Vena cava inferior durchtrennt und die noch schlagende rechte Herzkammer solange mit DPBS- perfundiert, bis sich die Lunge hell und annähernd blutleer darstellte. Herz und Lunge wurden zügig im

Paket entnommen. Da Evans Blue verstärkt von den großen Atemwegen aufgenommen wird, wurden die Lungenlappen hilusnah von den umliegenden Strukturen abgetrennt. Die Lungenlappen wurden in einer Petrischale gewogen und in ein Homogenisationsröhrchen gegeben. Je mg Lungengewicht wurden 3,5 µl PBS- zugegeben und die Lunge auf Eis gelagert.

Die Blutproben wurden für 10 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Plasma in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die mit PBS- versetzten Lungen wurden mit dem Precellys24 homogenisiert. Um Evans Blue aus der Proteinbindung im Gewebe zu lösen, wurden je 450 µl des Homogenisats in ein Rundbodenröhrchen pipettiert, mit 900 µl Formamid versetzt und die Proben für 12-18 h bei 60 °C und 50-80 rpm inkubiert. Nach Inkubation der Lungenproben wurden diese 30 min bei 5000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 200 µl als Triplikate in eine 96-Well Platte pipettiert. Das Plasma wurde 1:5 mit PBS- verdünnt und ebenfalls jeweils 200 µl als Triplikate in die Platte pipettiert.

Aus der am Vortag zur i.v.-Injektion angesetzten Evans Blue-Lösung wurde durch Verdünnung mit PBS- eine Standardreihe erstellt und alle 6 Konzentrationen der Standardreihe, wie die Plasma- und Lungenproben als Triplikate zu je 200 µl, in die Platte pipettiert.

#### Standard

- 1) 0 µg/µl
- 2) 0,00625 µg/µl
- 3) 0,0125 µg/µl
- 4) 0,025 µg/µl
- 5) 0,05 µg/µl
- 6) 0,1 µg/µl

Die Absorption der Proben wurde am Photometer (Photometer GENios, Tecan) bei 620 nm und 740 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von Evans Blue befindet sich bei 620 nm. Nach folgender Gleichung errechnet sich die korrekte Absorption von Evans Blue im Gewebe oder Plasma:

Korrekte Absorption bei 620 nm = gemessene Absorption (620 nm) – [1,426 x (Absorption bei 740 nm) + 0,03].

Zur Auswertung wurde die Software Magellan verwendet. Hieraus konnte der relative Evans Blue-Gehalt der Lungenproben in µg Evans Blue/ g Lungengewebe errechnet werden.

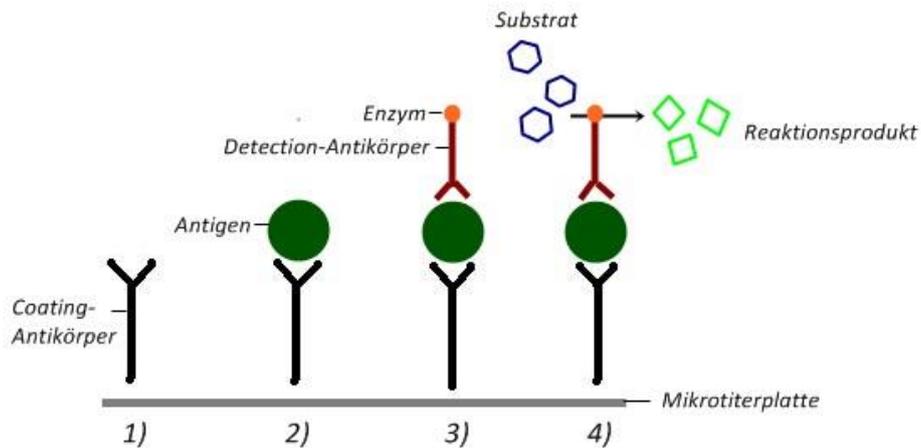
## **2.2.6 ELISA**

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient dem Nachweis eines gesuchten Antigens. Durch Markierung eines Antikörpers mit einem Enzym, wird bei Bindung des Antikörpers an das gesuchte Antigen eine Reaktion ausgelöst, welche sich meist in einem Farbumschlag zeigt. Die Intensität des Farbumschlags ist abhängig von der vorliegenden Antigenmenge und lässt sich photometrisch quantifizieren.

### Double-Antibody-Sandwich ELISA

Der Double-Antibody-Sandwich ELISA ist ein spezielles ELISA-Verfahren, bei welchem das gesuchte Antigen an verschiedenen Stellen von zwei unterschiedlichen Antikörpern gebunden wird. Der erste Antikörper wird als Coating-Antikörper bezeichnet und wird an eine feste Phase, meist die Mikrotiterplatte gebunden. Durch Zugabe der Probe kommt es zur Bindung des darin enthaltenen Antigens an den Coating-Antikörper. Ein Waschen der Platte nach Ablauf der Inkubationszeit dient der Entfernung des ungebundenen Antigens. Der sogenannte Detection-Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt und wird anschließend der Platte zugegeben. Dies führt zur Bindung des Detection-Antikörpers an den Komplex aus Coating-Antikörper und Antigen. Nun befindet sich das gesuchte Antigen gebunden zwischen Coating- und

Detection-Antikörper. Nach erneutem Waschen der Platte wird ein Substrat zugegeben, welches durch das gekoppelte Enzym umgesetzt und photometrisch gemessen wird. Die Messung gegen eine Standardreihe ermöglicht eine genaue quantitative Messung.



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Double-Antibody-Sandwich ELISA.** 1) auf Mikrotiterplatte gebundener Coating-Antikörper 2) Bindung des Antigens an den Coating-Antikörper 3) Bindung des Detection-Antikörpers an den Coating-Antikörper-Antigen-Komplex 4) enzymatische Umsetzung des Substrats

Bestimmung von TNF- $\alpha$ , KC, IL-6, MIP-2 in BAL

Die Entnahme der BAL erfolgte analog zum Vorgehen unter Punkt 2.2.3. Für die Zytokin-Bestimmung mittels ELISA wurden unter Verwendung von eiskaltem PBS- exakt 2 ml BAL entnommen. Die entnommenen BAL wurden sofort auf Eis gelagert, für 10 min bei 4 °C mit 1300 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend in bei -20 °C vorgekühlte Eppendorf-Cups pipettiert. Bis zur Durchführung des ELISA wurden die Proben bei -80 °C eingefroren. Zur quantitativen Bestimmung von TNF $\alpha$ , KC, IL-6 und MIP-2 mittels ELISA wurden die BAL-Proben ohne LPS-Inhalation unverdünnt eingesetzt, die Proben nach LPS-Inhalation 1 : 8 verdünnt und der ELISA (DuoSet ELISA Development System) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Magellan.

### 2.2.7 Real-time-PCR

Wie unter 1.9 beschrieben, wird während einer akuten Inflammation die Transkription von PDE-Genen hochreguliert. Rolipram und Roflumilast wirken beide inhibierend auf die PDE4. Um neben der direkten Hemmung einen möglichen Einfluss beider Medikamente auf die Transkription der PDE4-Gene zu ermitteln, wurde eine Real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Die RT-PCR ist ein Verfahren, mit dem Nukleinsäuren vervielfältigt werden können. Die RT-PCR nutzt das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ermöglicht weiterhin eine quantitative Bestimmung der vervielfältigten Desoxyribonukleinsäure (DNA).

#### *Probengewinnung*

Die Entnahme der Lungen erfolgte analog zu Kapitel 2.2.3. Die Lungenlappen wurden hilusnah abgetrennt und zusammen mit 1 ml Trifast in ein Homogenisationsröhrchen gegeben. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Analyse bei -80 °C.

#### *RNA-Isolation*

Die bei -80 °C in je 1 ml Trifast gelagerten Lungenproben wurden bei Zimmertemperatur angetaut. Anschließend wurden die Proben mit dem Precellys 24 (6800-2x15s-30s) homogenisiert und 5 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Zur Phasentrennung wurden zu jeder Probe 200 µl Chloroform pipettiert und die Proben für 15 s kräftig geschüttelt. Nach 3-10 min Inkubationszeit bei RT wurden die Proben für 5 min bei 12.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die in der oberen wässrigen Phase befindliche Ribonukleinsäure (RNA) wurde in ein frisches, RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß abpipettiert. Zur Ausfällung der RNA wurden in jedes Reaktionsgefäß 500 µl Isopropanol pipettiert, die Proben gründlich gemischt und für 5-15 min auf Eis inkubiert. Durch erneute Zentrifugation für 10 min bei

12.000 g und 4 °C entstand am Boden des Reaktionsgefäßes ein RNA-Pellet. Das Waschen der RNA erfolgte durch Abpipettieren des Isopropanol-überstandes und Resuspension des Pellets mit 1 ml Ethanol 75 %. Dieser Vorgang wurde nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und 4 °C wiederholt. Nach zweimaligem Waschen wurde der Ethanolüberstand abpipettiert und das RNA-Pellet für ca. 15-20 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet mit 40 µl nukleotidfreiem Wasser (NFW) resuspendiert.

#### *Messung des RNA-Gehalts und Umschrieb in cDNA*

Zur Messung des RNA-Gehalts wurden 2 µl der isolierten RNA-Lösung zur Konzentrations-Messung am Nanodrop verwendet. Dieser Vorgang wurde zur Kontrolle wiederholt. Für den Umschrieb der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde für jede Probe exakt 1 µg RNA benötigt. Anhand der gemessenen RNA-Konzentration der Probe wurde das benötigte Probenvolumen errechnet und in ein 0,2 ml Eppendorf-Cup vorgelegt. Anschließend wurden 15 µl NFW abzüglich des Probenvolumens hinzupipettiert, sodass das Volumen in jedem Reaktionsgefäß exakt 15 µl und die Menge an RNA exakt 1 µg betrug. Die verdünnten Proben wurden zur Kontrolle erneut gemessen.

Zum Umschrieb in cDNA wurde das iScript cDNA Synthesis Kit, welches den iScript Reaction Mix und die iScript Reverse Transkriptase beinhaltet, verwendet. Zu jeder Probe wurden 4 µl iScript Reaction Mix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase pipettiert und die Proben anschließend zum Umschrieb in cDNA in den Thermocycler gegeben. Nach Beendigung des Umschriebs wurde zu jeder Probe 140 µl NFW pipettiert. Dies ergab eine cDNA-Konzentration von 1 µg in 160 µl.

## RT-PCR

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte in einer 96-Well-Platte. Für die hier gesuchten Gene PDE4B und PDE4D wurden pro Maus jeweils Triplikate pipettiert und gemessen, für das Kontrollgen 18S jeweils Duplikate. In jedes Well wurden auf Eis 4 µl cDNA (1 µg/160 µl) pipettiert. Anschließend wurden pro Well 12,5 µl SybrGreen, 7,5 µl NFW und 1 µl des entsprechenden Primer-Mixes hinzupipettiert, sodass das Volumen in allen Wells jeweils exakt 25 µl betrug.

### Primer-Mix 18S:

- 160 µl NFW
- 20 µl Vorwärtsprimer h/m-18S forward mit der Sequenz  
5'-gta acc cgt tga acc cca tt-3'
- 20 µl Rückwärtsprimer h/m-18S reverse mit der Sequenz  
5'-cca tcc aat cgg tag cg-3'

### Primer-Mix PDE4B:

- 160 µl NFW
- 20 µl Vorwärtsprimer mus-PDE4B forward mit der Sequenz  
5'-atc accttg ctg tgg gat tc-3'
- 20 µl Rückwärtsprimer mus-PDE4B reverse mit der Sequenz  
5'-aac caa cct ggg att ttt cc-3'

### Primer-Mix PDE4D:

- 160 µl NFW
- 20 µl Vorwärtsprimer mus-PDE4D forward mit der Sequenz  
5'-caa gtt tca ggc tgg ctt tc-3'
- 20 µl Rückwärtsprimer mus-PDE4D reverse mit der Sequenz  
5'-gtc cca tgt gtg aca agc ac-3'

Anschließend wurde die Platte mit einer Folie abgedichtet und in der Zentrifuge Perfect Spin P kurz zentrifugiert. Die RT-PCR wurde im Thermocycler durchgeführt und ausgewertet (Gene Expression Analysis for iCycler iQ Real-time-PCR Detection System, BioRad).

## 2.2.8 Bestimmung der PDE-Aktivität

PDE hydrolysieren cAMP. Daher können durch den cAMP-Gehalt eines Gewebes Rückschlüsse auf die Aktivität der PDE gezogen werden. In diesem Versuchsaufbau diente die Messung des cAMP-Gehalts im Lungengewebe der Abschätzung der PDE4-Aktivität in Lungen unbehandelter Tiere sowie Lungen mit Rolipram oder Roflumilast behandelte Tiere mit und ohne Inhalation von LPS.

Homogenisationslösung (pH 7,4)	30	mM	HEPES
	0,1	%	Triton X-100
Reaktionsgemisch (pH 7,4)	137	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	8,8	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1	mM	CaCl <sub>2</sub>
	1	mM	MgCl <sub>2</sub>
	1	µM	cAMP

### *Probenentnahme*

Die Entnahme der Lungen erfolgte analog zu Kapitel 2.2.3.: Präparation der Lungen 6,5 h nach LPS-Inhalation. Da Blutbestandteile erhebliche Störeinflüsse für die Messung am Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) darstellen, wurde zur Herzperfusion mindestens 5 ml PBS- verwendet. Die Lungenlappen wurden hilusnah abgetrennt und sofort in ein Homogenisationsgefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### *Durchführung*

Zur Messung der PDE-Aktivität wurden die gefrorenen Lungen aufgetaut, gewogen, in ein Homogenisationsgefäß gegeben und sofort wieder auf Eis verbracht. Pro mg Lungengewicht wurden 4 µl einer 30 mM Ethansulfonsäure (HEPES)-Lösung zugegeben und das Lungengewebe im Precellys24 homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend für 10 min bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert und 10 µl des Überstands in den Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes pipettiert. In den Korpus des Reaktionsgefäßes wurden 190 µl des Reaktionsgemischs pipettiert. Die Deckel der Reaktionsgefäße wurden geschlossen und das Reaktionsgemisch sowie das Lungenhomogenat durch kurze Zentrifugation bei 4 °C zusammengeführt. Zum Starten des enzymatischen Abbaus des cAMP wurden die Proben für exakt 10 min bei 37 °C im Brutschrank gelagert und die Reaktion anschließend durch 3-minütiges Kochen im Wasserbad gestoppt. Nach Stoppen der Reaktion wurden die Proben für 30 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand zur Messung an der HPLC verwendet.

### **2.2.9 Immunhistochemie**

#### *Organentnahme*

24 Stunden nach Inhalation von LPS wurden die Tiere anästhesiert und thorakotomiert. Nach Durchtrennung der großen Bauchgefäße und Perfusion des rechten Herzens wurde die Trachea freipräpariert und kanüliert. Eine Perfusorspritze wurde an einem Stativ fixiert und mit 30 ml Formalin 4 % befüllt. Über einen Verbindungsschlauch wurde nun das Formalin für 10-15 min passiv über hydrostatischen Druck in die Lungen eingeleitet. Der Thorax wurde während dieser Zeit mit Formalin 4 % feucht gehalten. Der Tubus wurde entfernt und Lunge und Herz im Paket entnommen. Die linke Lunge wurde hilusnah abgetrennt und in eine Einbettkassette überführt. Die rechte Lunge wurde samt umgebender Strukturen wie Trachea, Hauptbronchien und

Ösophagus ebenfalls in eine Einbettkassette gegeben. Die Einbettkassetten wurden in einem Behälter gesammelt und dieser zur weiteren Formalinfixierung mit Formalin 4 % befüllt. Die Kassetten wurden für 18-24 h in Formalin belassen.

### *Paraffinierung*

Am Folgetag wurden die Einbettkassetten kurz mit 70 % Ethanol gespült und in den Gewebeeinfiltrationsautomat gegeben. Dieser bewirkt durch Schwenken der Präparate in Alkoholreihen aufsteigender Konzentrationen eine Entwässerung des Gewebes. Schließlich werden die Organe durch ein Paraffinbad paraffiniert.

Station 1: 70 % Ethanol	1:30 h	Station 7: 100 % Ethanol	1:00 h
Station 2: 70 % Ethanol	1:00 h	Station 8: Xylol	1:30 h
Station 3: 96 % Ethanol	1:30 h	Station 9: Xylol	1:30 h
Station 4: 96 % Ethanol	1:00 h	Station 10: Xylol	1:00 h
Station 5: 100 % Ethanol	1:30 h		
Station 6: 100 % Ethanol	1:00 h	Paraffin	3 x 1:30 h

### *Einbettung und Anfertigung der Schnitte*

Am Folgetag wurden die paraffinierten Lungen zum späteren Schneiden am Einbettautomat in Blöcke gegossen. Um das Schneiden der Paraffinblöcke zu erleichtern, wurden diese bis zum Schnitt auf Eis gelagert. Am Mikrotom wurden jeweils von den linken Lungen Schnitte mit einer Schnittdicke von 4 µm angefertigt, die jeweils von basal angeschnitten wurden. Die gewonnenen Schnittserien wurden zur Trennung in Einzelschnitte für wenige Minuten in ein Wasserbad gelegt und anschließend mit einem Objektträger zur Entfaltung in 37 °C Aqua dest überführt. Nach Entfaltung der Schnitte wurden jeweils 3 Schnitte auf einen Objektträger gezogen und für 24 h auf einer Wärmeplatte bei 42 °C getrocknet.

## *Immunhistochemische Färbung*

### Entparaffinierung und Rehydratation

Die Paraffinschnitte wurden nach folgendem Schema in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert:

- 3 x 5 min Xylol
- 2 x 5 min 100 % Ethanol
- 2 x 5 min 95 % Ethanol
- 1 x 5 min 70 % Ethanol
- 1 x 5 min 50 % Ethanol
- 2 x 5 min Aqua dest.

Um die endogene Peroxidase zu blocken, wurden die Schnitte für 30 min in einer Lösung von 200 ml Methanol und 3 ml 30 % Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min in Aqua dest gespült. In einem temperaturbeständigen Behälter wurden die Schnitte mit Unmasking Solution bedeckt und für 20 min in der Mikrowelle gekocht. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurde der Flüssigkeitsstand im Behälter alle 4-5 min überprüft und bei Bedarf aufgefüllt. Anschließend wurden die Schnitte in der Unmasking Solution für 1 h zum Abkühlen stehen gelassen. Nach dem vollständigen Erkalten der Schnitte auf Raumtemperatur (RT) wurden diese bei RT für 5 min in PBS- gespült. Mit dem PapPen wurden Fettkreise um die Schnitte gezogen, um ein späteres Ineinanderlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Die Schnitte wurden in eine feuchte Kammer gelegt und innerhalb der Fettkreise mit jeweils ca. 100 µl Avidin Blocking Solution bedeckt und für 1 h bei RT inkubiert.

#### Avidin Blocking Solution

- 4 ml FSGO 0,5 % in PBS-
- 400 µl NRS
- 16 Tr. Avidin Blocking Solution

Nach 1 h Inkubation wurde die Avidin Blocking Solution abgekippt und die Schnitte 5 min bei RT in PBS- gespült.

Anschließend wurde der Primär-Antikörper in Biotin-Blocking Solution zugegeben und die Schnitte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

#### Biotin Blocking Solution

- 4 ml FSGO 0,5 % in PBS-
- 400 µl NRS
- 16 Tr. Biotin Blocking Solution
- 4 µl Primär-AK

Am Folgetag wurde der Primär-AK abgekippt und die Schnitte 5 min in 0,5 % Fish Skin Gelatin Oil (FSGO) gespült.

Nach Spülung der Schnitte wurden die Objektträger wieder in eine feuchte Kammer gelegt, der Sekundär-AK aufgetragen und 1 h bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Avidin-Biotin-Complex (ABC) -Solution nach Herstellerangabe angesetzt und zur Bildung des AB-Komplexes für 30min bei RT im Überkopfmischer inkubiert.

#### Sekundär-AK Lösung

- 40 µl Sekundär-AK
- 4 ml FSGO 0,5 %
- 400 µl NRS

#### ABC-Solution

- 4 ml PBS-
- 80 µl Solution A
- 80 µl Solution B

Der Sekundär-AK wurde abgekippt, die Schnitte erneut für 5 min in 0,5 % FSGO gespült und anschließend die ABC-Solution auf die Präparate aufgetragen und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die ABC-Solution wieder abgekippt und die Präparate 5 min in PBS-gespült. Schließlich wurde die Diaminobenzidin (DAB) -Solution auf die Präparate aufgetragen

#### DAB-Solution

- 4 ml NFW
- 4 Tbl. DAB
- 4 Tbl. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Nach 5min Inkubation wurde die DAB-Solution abgekippt, die Schnitte 5 min in Aqua dest gespült und schließlich 15 s in Hämatoxylin gegengefärbt. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte 4-5 min gespült und anschließend 1 min in Bluing Reagent gebläut. Die Schnitte wurden erneut für 3 min unter fließendem Leitungswasser gespült und schließlich in aufsteigenden Alkoholreihen und Xylol wieder entwässert. Noch im feuchten Zustand wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

#### **2.2.10 Differentialblutbild**

Die Anfertigung der Differentialblutbilder erfolgte bei allen Gruppen direkt vor Inhalation des LPS sowie eine, zwei, sechs, zwölf und vierundzwanzig Stunden danach. Zur Erweiterung der Schwanzvenen wurden die Tiere für einige Minuten unter Rotlicht verbracht. Nach gründlicher Desinfektion des Schwanzes wurden 2-3 mm des Schwanzendes abgetrennt. Der erste Blutstropfen wurde verworfen. Anschließend wurden 10 µl Blut in 90 µl Türks Lösung pipettiert und zur Auszählung der Leukozyten verwendet. Ein weiterer Blutstropfen wurde zur Anfertigung eines Blutausstrichs verwendet. Nach Trocknung der Blutausstriche wurden diese mit dem Diff-Quik Färbeset nach Herstellerangaben gefärbt, luftgetrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

### *Leukozytenzählung*

10 µl der 1:10 mit Türks Lösung versetzten Blutprobe wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Leukozytenzahl in 4 Eckquadraten unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Berechnung der Leukozytenzahl pro Mikroliter erfolgte nach folgender Formel:

Fläche eines Eckquadrats: 1,0 mm<sup>2</sup>

Höhe eines Eckquadrats: 0,1 mm

Volumen eines Eckquadrats: 0,1 mm<sup>3</sup> = 0,1 µl

Volumen 4 Eckquadrats: 0,4 µl

Zellzahl in 4 Eckquadraten (n) x Verdünnung x 2,5 = Zellzahl / µl Blut

### *Differenzierung*

Die Differenzierung der Blutausrüche erfolgte mit Immersionsöl unter dem Mikroskop. Es wurden jeweils 100 Leukozyten differenziert.

### **2.2.11 Migrationsverhalten Neutrophiler Granulozyten in vitro - Transmigrationsassay**

Messung der Migration humaner PMNs entlang eines chemotaktischen Gradienten über einen Monolayer humaner Pulmonalepithelzellen. Die verwendeten H441-Zellen sind Epithelzellen eines humanen Adenokarzinoms der Lunge, welche als in-vitro-Modell für Alveolarepithel dienen. Als Chemotaktischer Faktor wurde CXCL-2/3 (MIP-2) verwendet.

### *Isolation humaner PMNs*

20-30 ml venösen Vollbluts wurden in Citratmonovetten entnommen. Zur anschließenden Dichtentrennung der Blutbestandteile wurden in sterilen 12 ml-Zellkultur-Röhrchen 4 ml 72 % Percoll, 4 ml 63 % Percoll und schließlich 4 ml

Vollblut übereinandergeschichtet. Um eine PMN-Aktivierung zu verhindern, wurde dies sehr langsam und vorsichtig vorgenommen. Anschließend folgte eine Dichtezentrifugation für 30 min bei RT mit 1.700 rpm. Nach Zentrifugation befanden sich die Erythrozyten auf dem Boden des Zentrifugationsröhrchens und die PMNs zwischen den Percoll-Phasen. Zwischen oberer Percoll-Phase und Serum sammelten sich Lymphozyten und Monozyten. Serum und obere Percoll-Phase wurden abgesaugt und die darunter liegenden PMNs abgenommen und mittels Glaspipette in ein 50 ml Falcon gegeben. Zur Lyse verbliebener Erythrozyten wurde das Falcon mit eiskalter Lyse-Lösung befüllt und für 10-15 min lysiert.

Lyse-Lösung:

- NH<sub>4</sub>CL 4,0 g
- NaHCO<sub>3</sub> 420,0 mg
- EDTA 18,5 mg
- Aqua dest. 500,0 ml

Nach der Lysierung folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 4 °C mit 1.100 rpm. Das entstandene PMN-Pellet wurde mit 5ml HBSS+ resuspendiert und die Zellzahl mittels Zählkammer ausgezählt. Durch Zugabe von HBSS+ oder erneute Zentrifugation und Resuspension wurde die Zellzahl auf  $10 \times 10^6$  /ml eingestellt.

### *Versuchsbedingungen*

Der Transmigrationsversuch wurde mit folgenden Versuchsbedingungen durchgeführt:

- 1) Behandlung der PMNs mit Rolipram oder Roflumilast
- 2) Behandlung des Epithels mit Rolipram oder Roflumilast
- 3) Behandlung von PMNs und Epithel mit Rolipram oder Roflumilast

### *Behandlung von Epithelzellen und PMNs*

Zur Behandlung der Zellen wurden verschiedene Konzentrationen der PDE4-Inhibitoren Rolipram und Roflumilast verwendet (100; 10; 1; 0,1). Rolipram und Roflumilast lagen in DMSO gelöst vor. Die Einstellung der jeweils benötigten Konzentration erfolgte mit HBSS+.

Zur Behandlung der PMNs wurden je 500 µl der PMN-Zellsuspension in Eppendorf-Cups pipettiert und für 6 min bei Raumtemperatur mit 1.100 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml der Behandlungslösung resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und das Pellet wieder im Ausgangsvolumen von 500 µl HBSS+ resuspendiert.

Zur Behandlung des Epithels wurde das Medium aus den Wells der Transwellplatten abpipettiert und die jeweilige Behandlungslösung auf die Epithelzellen pipettiert. Analog zur Behandlung der PMNs betrug die Inkubationszeit 30 min bei 37 °C.

### *Transmigrationsassay*

In die Transwellplatten wurden je 900 µl MIP-2 oder als Negativkontrolle HBSS+ pipettiert. Die Inserts wurden aus den Transwellplatten entfernt und vorsichtig mit 37 °C warmem HBSS+ gewaschen. Anschließend wurden die Inserts wieder in die Transwellplatte eingesetzt und 100 µl der PMN-Suspension auf die Epithelzellen pipettiert. Die Migration der PMN über die Epithelzellschicht erfolgte über eine Stunde bei 37 °C auf dem Thermoschüttler. Nach einer Stunde wurden die Inserts wieder aus den Transwellplatten entfernt und die Zellen vereinzelt. Dies erfolgte durch Zugabe von je 50 µl Citrat und Triton X-100 in die Wells. Die Transwellplatte wurde mit Parafilm verschlossen und die enthaltenen Zellen mittels Ultraschall lysiert. Nach Lyse der Zellen wurden aus jedem Well 50 µl als Triplikate auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Proben der Standardreihe wurden mit gleichem Volumen jeweils als Duplikate pipettiert.

Standardreihe

Standard 1: 850 µl HBSS+

50 µl PMN-Zellsuspension

50 µl Citrat

50 µl Triton x-100

Lyse der Standard 1-Lösung mittels Ultraschall

Für die Proben des Standard zwei bis elf wurden jeweils 500 µl HBSS+ vorgelegt und anschließend 500 µl des Standards der vorherigen Probe hinzupipettiert. Die Messung der Proben erfolgte bei 405 nm am Photometer. Hierfür wurden direkt vor der Messung in jedes Well 75 µl des ABTS-Entwicklungsreagenz hinzupipettiert. Migrierte PMNs wurden anhand der Myeloperoxidase detektiert.

ABTS-Entwicklungsreagenz:	ABTS	28 mg
	Citrat	5 ml
	A.dest	45 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µl

### 2.2.12 Aktin-Färbung

Um den Effekt der PDE4-Inhibitoren auf die zytoskelettalen Umbauvorgänge während einer pulmonalen Inflammationsreaktion darstellen zu können, wurde eine Färbung der Aktinfilamente an humanen pulmonalen Epithelzellen durchgeführt. Humane H441-Zellen wurden mit Rolipram bzw. Roflumilast und nachfolgend mit LPS inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen in Formaldehyd-Lösung. Nach erneutem Waschen und Permeabilisieren mit Triton X-100 und wiederholtem Waschen erfolgte die Färbung mit Fluorescein Phalloidin zur Anfärbung der Aktinfilamente über 20 min bei RT. Die Inkubation erfolgte zur Vermeidung einer Austrocknung in einer geschlossenen Kammer. Nach Ende der

Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit PBS gespült. Zur Färbung der Zellkerne und gleichzeitigem Eindecken der Präparate, wurde der Überstand aus allen Reservoirien abpipettiert, 3 mal mit HBSS gewaschen und mit ProLong antifade reagent with DAPI eingedeckt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

### **2.2.13 Fluoreszenzfärbung PDE4B/D**

Zur Darstellung der Expression der PDE4B und PDE4D in humanen Pulmonalepithelzellen wurden H441-Zellen mit 100  $\mu$ M Rolipram oder 10  $\mu$ M Roflumilast für 1 h inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Inkubationslösung abgesaugt und die Zellen für 30 min mit LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml stimuliert. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit wurde die LPS-Lösung abgesaugt und die Zellschichten gewaschen. Nach Fixierung und Blocken erfolgte die Färbung der Zellen. Als Primär-Antikörper wurden Rabbit polyclonal anti-PDE4B und Goat polyclonal anti-PDE4D verwendet. Nach Ende der Inkubationszeit, Abpipettieren des Überstandes und mehrmaligem Waschen erfolgte die Zugabe des Sekundär-AKs. Als Sekundär-AK dienten Alexa 488 (grün) goat anti rabbit IgG (PDE4B) und Alexa 488 (grün) donkey anti goat IgG (PDE4D). Zur Färbung des Zytoskelettes wurde als Primär-AK Sheep polyclonal to von-Willebrandt-Faktor und als Sekundär-AK Alexa 647 donkey anti-sheep IgG verwendet. Bei simultaner Färbung beider PDE4-Isoenzyme kam bei gleichbleibenden Primär-AK als Sekundär-AK für die PDE4B Alexa 594 (rot) goat anti-rabbit IgG zum Einsatz. Zur Kernfärbung und zum gleichzeitigen Eindecken wurde ProLong antifade reagent with DAPI verwendet, die Zellen anschließend unter dem Konfokalmikroskop mikroskopiert und die Bilder mittels ZEN-Software ausgewertet.

## 2.2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Graph Pad Prism 5.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Zur statistischen Analyse wurde ein One-Way ANOVA-Test sowie ein Bonferroni post-hoc Test durchgeführt. Ein Wert von  $p < 0,05$  galt als statistisch signifikant. Die Angabe der Daten erfolgte als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

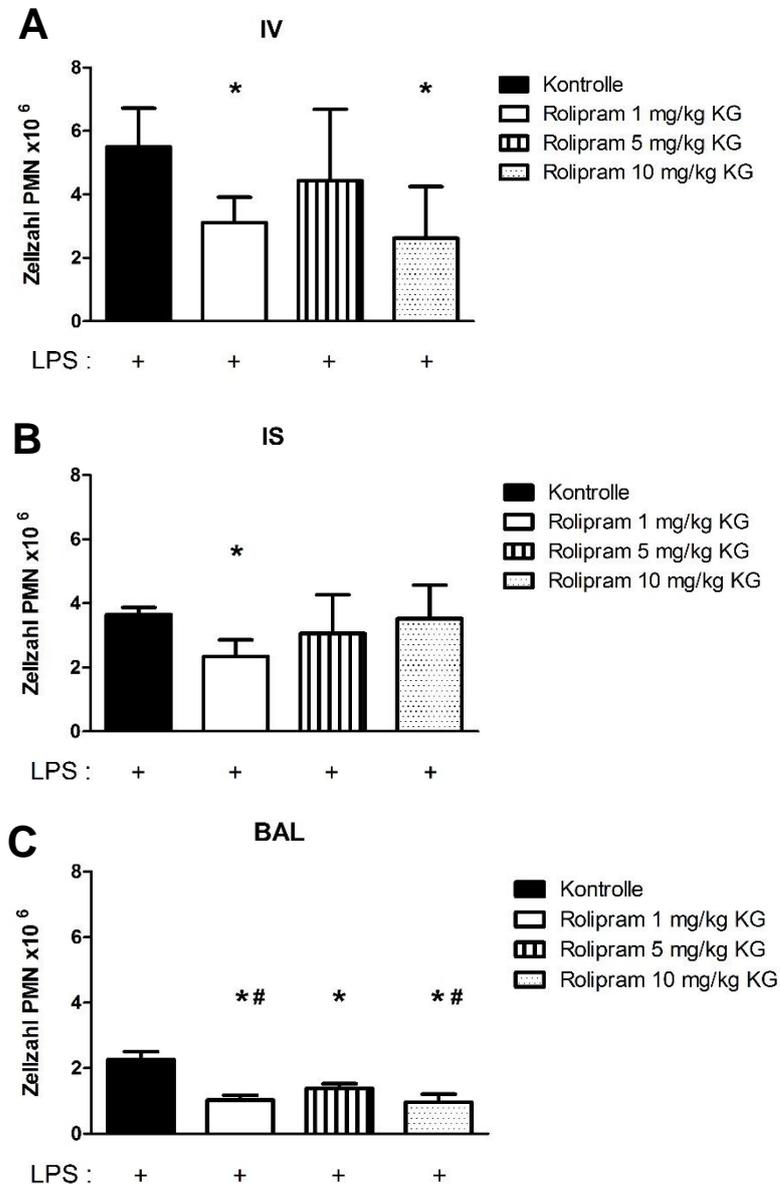
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Migration neutrophiler Granulozyten in vivo

#### 3.1.1 Dosisermittlung Rolipram

Zur Ermittlung der optimalen Dosierung von Rolipram in unserem Versuchsaufbau wurde dieses zunächst entsprechend der bekannten Literatur (vgl. 2.2.2) in verschiedenen Dosierungen appliziert und die PMN-Migration in Intravasalraum, Interstitium und Alveolarraum untersucht. Die intraperitoneale Injektion erfolgte 1 h vor LPS-Inhalation. Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse unter Verwendung von 1 mg/kg KG, 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG Rolipram. Die Anzahl der PMNs im Intravasalraum (Abb.3.1, A) ist bei Verwendung von 1 mg/kg KG und 10 mg/kg KG gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert (Kontrolle:  $5,5 \pm 1,2 \times 10^6$ ; Rolipram 1 mg/kg KG:  $3,1 \pm 0,8 \times 10^6$ ; Rolipram 10 mg/kg KG:  $2,6 \pm 1,6 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ). Interstitiell (Abb.3.1, B) zeigt sich in der mit 1 mg/kg KG Rolipram behandelten Gruppe eine signifikant geringere Zellzahl als in der Kontrollgruppe. 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG zeigen hier keinen Effekt. (Kontrolle:  $3,7 \pm 0,2 \times 10^6$  vs. Rolipram 1 mg/kg KG:  $2,3 \pm 0,5 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ). Die PMN-Migration in den Alveolarraum (Abb.3.1, C) wird durch alle verwendeten Dosierungen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich gehemmt, wobei sich die Zellzahl nach Applikation von 1 mg/kg KG und 10 mg/kg KG als am niedrigsten darstellt (Kontrolle:  $2,3 \pm 0,2 \times 10^6$ ; Rolipram 1 mg/kg KG:  $1,0 \pm 0,2 \times 10^6$ ; Rolipram 5 mg/kg KG:  $1,4 \pm 0,1 \times 10^6$ ; Rolipram 10 mg/kg KG:  $1,0 \pm 0,2 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). Aufgrund dieser Ergebnisse

wurde Rolipram für alle weiteren Experimente in einer Dosierung von 1 mg/kg KG verwendet.

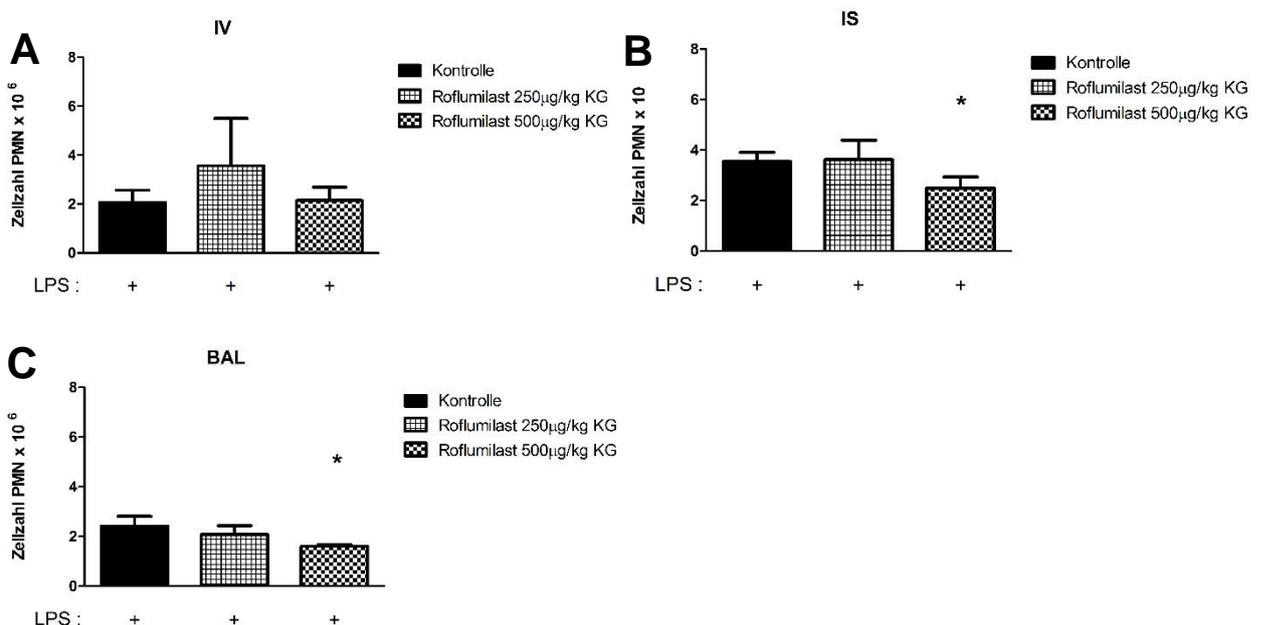


**Abbildung 3.1: Migration neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Rolipram-Dosierung**

Anreicherung neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach LPS-Inhalation. Rolipram wurde 1h vor LPS-Inhalation appliziert. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n =4-6). \* p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe. # p < 0,05 gegenüber Rolipram 5mg/kg.

### 3.1.2 Dosisermittlung Roflumilast

Zur Ermittlung der für unseren Versuchsaufbau optimalen Dosierung wurde Roflumilast entsprechend der unter 2.2.2 aufgeführten Literatur in den Dosierungen 250 µg/kg KG und 500 µg/kg KG 1 h vor LPS-Inhalation intraperitoneal appliziert (vgl. 2.2.2). Abb.3.2 zeigt die Ergebnisse. Im Intravasalraum (Abb.3.2, A) lassen sich keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und den mit Roflumilast behandelten Tieren ausmachen. Im Interstitium (Abb.3.2, B) lässt sich nach Gabe von 500 µg/kg KG Roflumilast eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedrigere Anzahl an PMNs beobachten (Kontrolle:  $3,6 \pm 0,4 \times 10^6$  vs. Roflumilast 500 µg/kg KG:  $2,5 \pm 0,4 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). Auch in der BAL (Abb.3.2, C) zeigt sich nach Applikation von 500 µg/kg KG eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigte Zellzahl. (Kontrolle:  $2,4 \pm 0,4 \times 10^6$  vs. Roflumilast 500 µg/kg KG:  $1,6 \pm 0,07 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). Für alle folgenden Experimente wurde Roflumilast in einer Dosierung von 500 µg/kg KG verwendet.

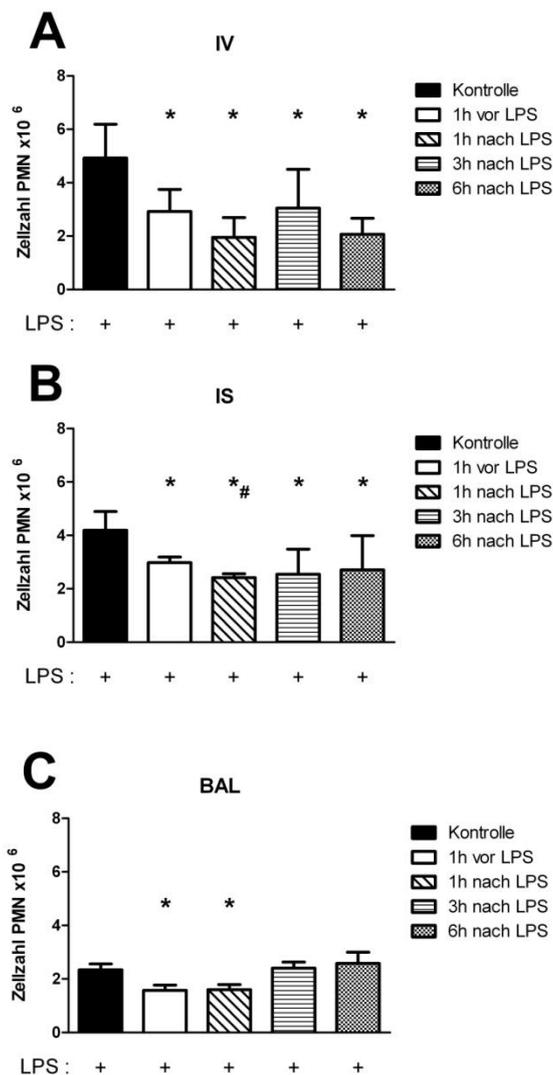


**Abbildung 3.2: Migration neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Roflumilast-Dosierung**

Anreicherung neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach LPS-Inhalation. Roflumilast wurde 1h vor LPS-Inhalation appliziert. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n =5). \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe.

### 3.1.3 Applikation von Rolipram zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Bislang wurden sowohl Rolipram, als auch Roflumilast eine Stunde vor LPS-Inhalation appliziert. Um weitere mögliche wirksame Behandlungszeitpunkte zu untersuchen, wurde Rolipram zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach LPS-Inhalation appliziert (Abbildung 3.3). Im Intraavasalraum (Abb.3.3, A) zeigt sich, dass es zu jedem Zeitpunkt der Rolipram-Applikation verglichen mit der Kontrollgruppe, zu einer signifikant verminderten Anheftung von PMNs am Endothel kommt (Kontrolle:  $4,9 \pm 1,3 \times 10^6$ ; 1 h vor LPS:  $2,9 \pm 0,8 \times 10^6$ ; 1 h nach LPS:  $2,0 \pm 0,7 \times 10^6$ ; 3 h nach LPS:  $3,0 \pm 1,5 \times 10^6$ ; 6 h nach LPS:  $2,1 \pm 0,6 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). Auch im Interstitium (Abb.3.3, B) ist zu allen Applikationszeitpunkten die Zellzahl geringer als in der Kontrollgruppe, wobei eine Stunde nach LPS-Inhalation behandelte Tiere die geringste interstitielle Zellzahl aufweisen (Kontrolle:  $4,2 \pm 0,7 \times 10^6$ ; 1 h vor LPS:  $3,0 \pm 0,2 \times 10^6$ ; 1 h nach LPS:  $2,4 \pm 0,1 \times 10^6$ ; 3 h nach LPS:  $2,5 \pm 0,9 \times 10^6$ ; 6 h nach LPS:  $2,7 \pm 1,3 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). In der BAL (Abb.3.3, C) zeigen nur eine Stunde vor und eine Stunde nach LPS-Inhalation behandelte Tiere signifikant geringere Zellzahlen als Tiere der Kontrollgruppe. Zwischen einer Applikation eine Stunde vor und eine Stunde nach LPS zeigt sich kein wesentlicher Unterschied. (Kontrolle:  $2,3 \pm 0,2 \times 10^6$ ; 1 h vor LPS:  $1,6 \pm 0,2 \times 10^6$ ; 1 h nach LPS:  $1,6 \pm 0,2 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). Da die Zellzahl im Interstitium zum Zeitpunkt eine Stunde nach LPS am geringsten ist, wurden im Hinblick auf eine größere klinische Relevanz einer postexpositionellen Therapie alle weiteren Versuche mit dem Applikationszeitpunkt eine Stunde nach LPS durchgeführt.



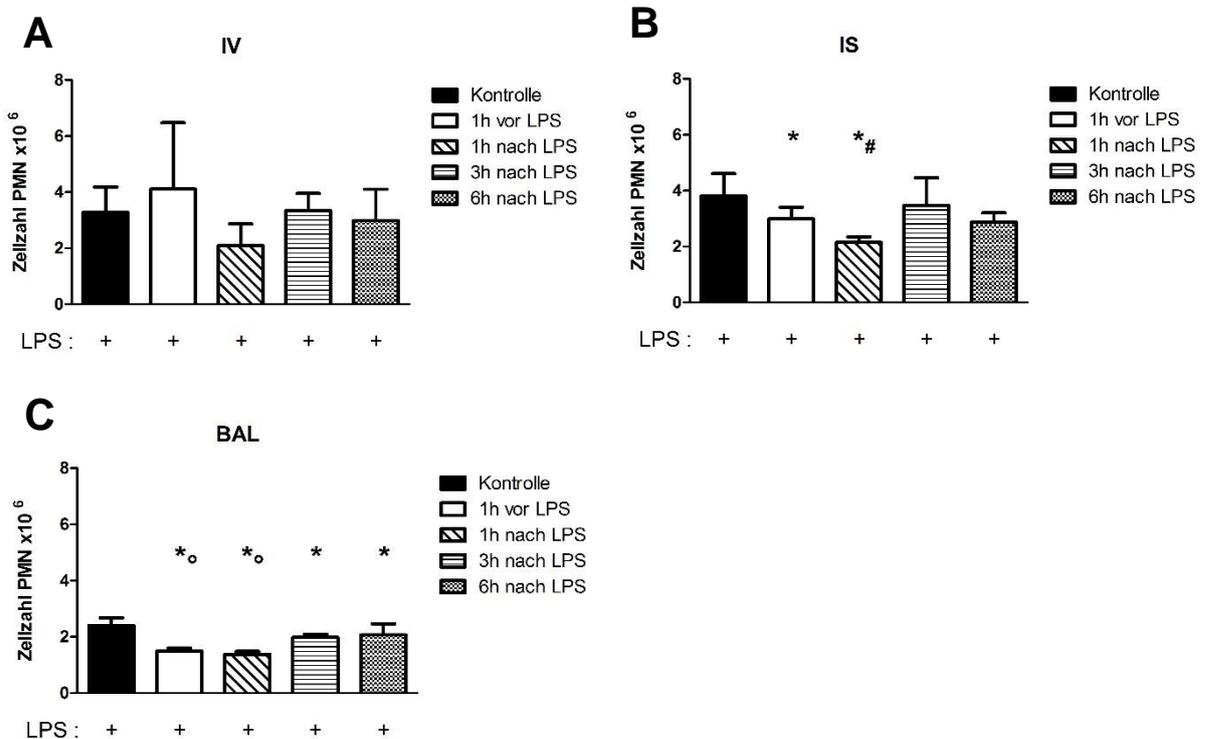
### Abbildung 3.3: Optimaler Applikationszeitpunkt von Rolipram

Ansammlung von PMN in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach LPS-Inhalation. Rolipram wurde eine Stunde vor, eine, drei und sechs Stunden nach LPS-Inhalation appliziert. A: PMN im Intravasalraum (IV), B: PMN im Interstitium (IS) und C: PMN im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 6 Experimenten. \* p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe. # p < 0,05 gegenüber 1h vor LPS. Modifiziert nach [165].

### 3.1.4 Applikation von Roflumilast zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Analog zur Applikation von Rolipram wurde auch Roflumilast zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert und das Ausmaß der Neutrophilenmigration bestimmt (Abb.3.4) Im Intravasalraum (Abb.3.4, A) lassen sich zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede feststellen. Im Interstitium (Abb.3.4, B) zeigt sich die Zahl an PMNs bei Behandlung eine Stunde vor und eine Stunde nach LPS-Inhalation im Vergleich zur

Kontrollgruppe signifikant erniedrigt, wobei die Reduktion eine Stunde nach LPS-Inhalation noch einmal signifikant niedriger ist (Kontrolle:  $3,8 \pm 0,8 \times 10^6$ ; 1 h vor LPS:  $3,0 \pm 0,4 \times 10^6$ ; 1 h nach LPS:  $2,1 \pm 0,2 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). In der BAL (Abb.3.4, C) ist die Zellzahl bei allen behandelten Tieren signifikant niedriger als bei denen der Kontrollgruppe. Eine Stunde vor und eine Stunde nach LPS-Inhalation behandelte Tiere weisen jedoch die geringsten Zellzahlen auf. (Kontrolle:  $2,4 \pm 0,3 \times 10^6$ ; 1 h vor LPS:  $1,5 \pm 0,1 \times 10^6$ ; 1 h nach LPS:  $1,4 \pm 0,1 \times 10^6$ ; 3 h nach LPS:  $2,0 \pm 0,1 \times 10^6$ ; 6 h nach LPS:  $2,0 \pm 0,4 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). Da die Zellzahl im Interstitium bei Behandlung eine Stunde nach LPS am geringsten ist, wurde auch Roflumilast für alle weiteren Versuche eine Stunde nach LPS appliziert.



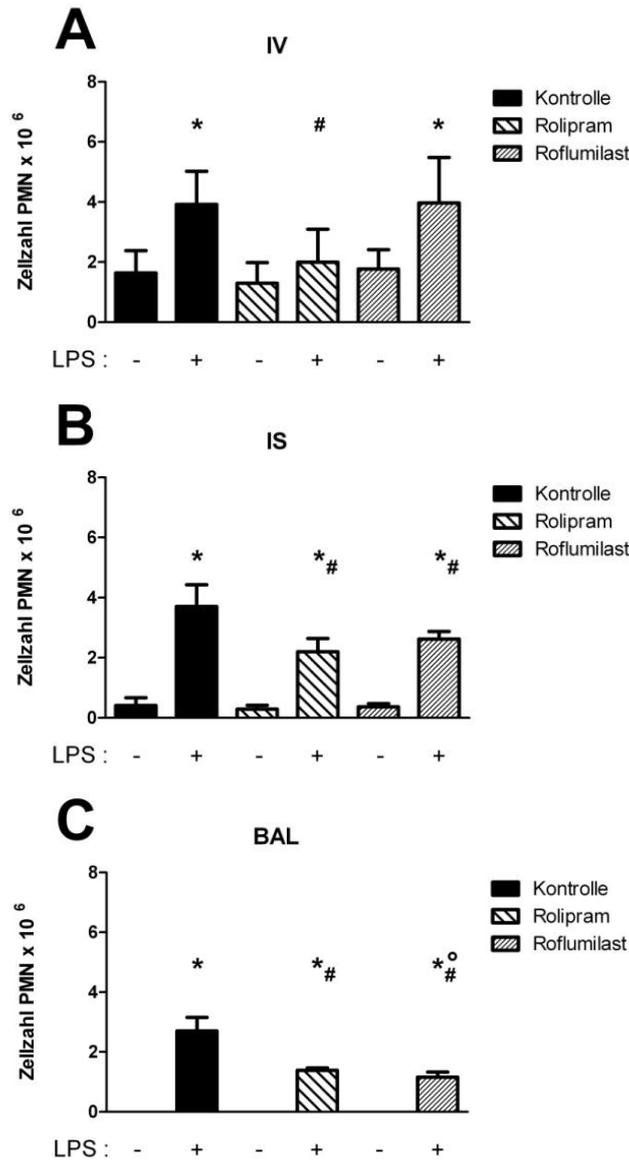
### Abbildung 3.4: Optimaler Applikationszeitpunkt von Roflumilast

Ansammlung von PMN in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach LPS-Inhalation. Roflumilast wurde eine Stunde vor, eine, drei und sechs Stunden nach LPS-Inhalation appliziert. A: PMN im Intravasalraum (IV), B: PMN im Interstitium (IS), C: PMN im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von  $n = 6$  Experimenten. \*  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe. #  $p < 0,05$  gegenüber 1h vor LPS. °  $p < 0,05$  gegenüber 3h und 6h nach LPS. Modifiziert nach [165].

### 3.1.5 Applikation von Rolipram oder Roflumilast 1h nach LPS-Inhalation

Um einen Vergleich zwischen beiden PDE4-Inhibitoren zum optimalen Behandlungszeitpunkt anstellen zu können, wurden die Lungenkompartimente nach Gabe von Rolipram bzw. Roflumilast vergleichend untersucht (Abbildung 3.5). Ohne inflammatorischen Stimulus kam es durch Rolipram und Roflumilast zu keiner Veränderung der PMN-Zahl in keinem der drei Lungekompartimente. Intravasal (Abb.3.5, A) führt die LPS-Inhalation zu einem signifikanten Anstieg der PMN-Zahl, welcher durch die Gabe von Rolipram signifikant reduziert wird (Kontrolle – LPS:  $1,6 \pm 0,7 \times 10^6$ ; Kontrolle + LPS:  $3,9 \pm 1,1 \times 10^6$ ; Rolipram – LPS:  $1,3 \pm 0,7 \times 10^6$ ; Rolipram + LPS:  $2,0 \pm 1,1 \times 10^6$ ; Roflumilast – LPS:  $1,8 \pm 0,6 \times 10^6$ ; Roflumilast + LPS:  $4,0 \pm 1,5 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ). Auch im interstitiellen Kompartiment (Abb.3.5, B) führt die LPS-Inhalation in allen Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl verglichen mit der jeweils zugehörigen Kontrolle ohne LPS, wobei die Zellzahl durch Gabe von Rolipram oder Roflumilast im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert wird. (Kontrolle – LPS:  $0,4 \pm 0,3 \times 10^6$ ; Kontrolle + LPS:  $3,7 \pm 0,7 \times 10^6$ ; Rolipram – LPS:  $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$ ; Rolipram + LPS:  $2,2 \pm 0,4 \times 10^6$ ; Roflumilast – LPS:  $0,4 \pm 0,1 \times 10^6$ ; Roflumilast + LPS:  $2,6 \pm 0,3 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ).

In der BAL (Abb.3.5, C) ist zu sehen, dass es auch hier in allen Gruppen durch LPS-Inhalation zu einer deutlichen Einwanderung von Zellen in den Alveolarraum kommt. Die Zellzahl ist hier bei behandelten Tieren deutlich niedriger, als bei Tieren der Kontrollgruppe mit LPS. Mit Roflumilast behandelte Tiere weisen eine signifikant geringere Zellzahl auf, als mit Rolipram behandelte Tiere. (Kontrolle – LPS:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$ ; Kontrolle + LPS:  $2,7 \pm 0,5 \times 10^6$ ; Rolipram – LPS:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$ ; Rolipram + LPS:  $1,4 \pm 0,1 \times 10^6$ ; Roflumilast – LPS:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$ ; Roflumilast + LPS:  $1,2 \pm 0,2 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ).

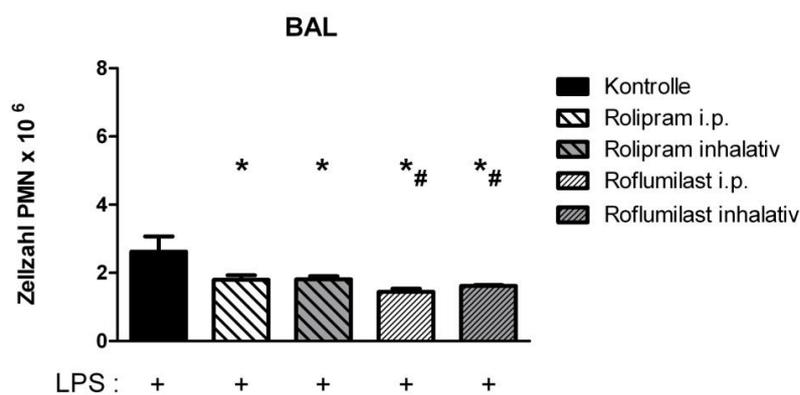


**Abbildung 3.5: Einfluss von Rolipram und Roflumilast auf die PMN-Migration**  
 Anreicherung von PMN in den Lungenkompartimenten jeweils 24h nach LPS. Rolipram und Roflumilast wurden 1h nach LPS-Inhalation appliziert. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (ohne LPS n =4, +LPS n $\geq$ 6). \* p < 0,05 gegenüber der Kontrolle ohne LPS. # p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. °p<0,05 gegenüber Rolipram mit LPS. Modifiziert nach [165].

### 3.1.6 Migrationsverhalten in Abhängigkeit von der Applikationsform

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Reduktion der Zellzahl in Interstitium und Alveolarraum durch die Gabe von Rolipram und Roflumilast. Um zudem eine mögliche Wirksamkeit der PDE4-Inhibitoren bei inhalativer Applikation zu untersuchen, wurden Rolipram und Roflumilast sowohl intraperitoneal als auch inhalativ verabreicht und die Neutrophilenmigration vergleichend untersucht. Auf die Darstellung des intravasalen und interstitiellen Kompartiments wurde hier verzichtet. Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse.

In der BAL wird deutlich, dass es, analog zu den bisherigen Ergebnissen, bei intraperitoneal mit Rolipram oder Roflumilast behandelten Tieren zu einer deutlich verminderten Migration Neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum kommt. Auch die Tiere der inhalativ mit Rolipram oder Roflumilast behandelten Gruppen weisen signifikant niedrigere Zellzahlen als Tiere der Kontrollgruppe auf. Übereinstimmend mit unseren vorherigen Ergebnissen, wird mit der Behandlung mit Roflumilast eine stärkere Reduktion der Zellzahl erreicht als mit Rolipram. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Applikationsformen untereinander nicht. (Kontrolle:  $2,6 \pm 0,4 \times 10^6$ ; Rolipram i.p.:  $1,8 \pm 0,1 \times 10^6$ , Rolipram inhalativ:  $1,8 \pm 0,1 \times 10^6$ ; Roflumilast i.p.:  $1,4 \pm 0,1 \times 10^6$ ; Roflumilast inhalativ:  $1,6 \pm 0,03 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ).



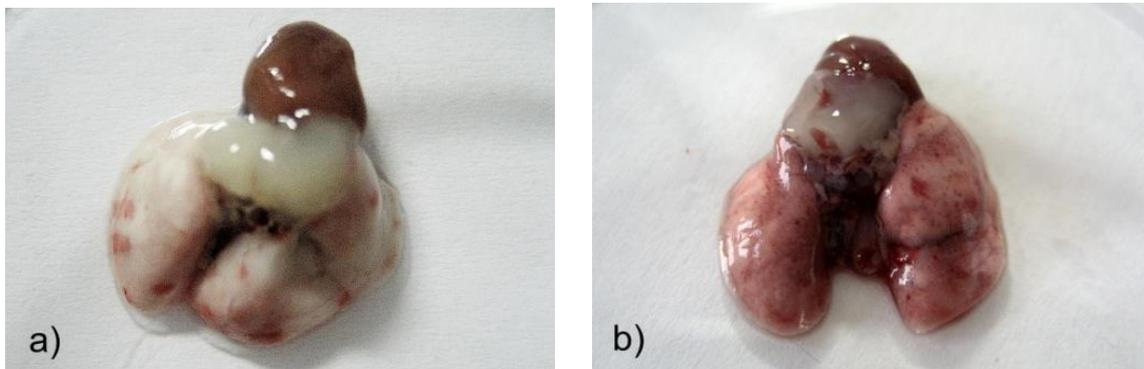
**Abbildung 3.6: PMN-Migration in die Lunge unter Verwendung verschiedener Applikationsformen von Rolipram und Roflumilast**

Rolipram und Roflumilast wurden eine Stunde nach LPS-Inhalation intraperitoneal (i.p.) oder inhalativ appliziert und 24 später die PMN-Migration in den Alveolarraum (BAL) untersucht. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 5$ ). \*  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe. #  $p < 0,05$  gegenüber Rolipram i.p. und inhalativ. Modifiziert nach [165]

### 3.2 Mikrovaskuläre Permeabilität – Evans Blue

Ein wesentliches Merkmal der Inflammationsreaktion ist eine Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität, welche auch als Capillary leak bezeichnet wird. Diese erhöhte Durchlässigkeit des Endothels kann anhand der Extravasation des Farbstoffes Evans Blue ins Lungenparenchym quantifiziert werden.

Abbildung 3.7 zeigt am Beispiel zweier Lungen von negativen und positiven Kontrolltieren den makroskopisch sichtbaren Unterschied zwischen einer gesunden und einer entzündlich veränderten Lunge. In Abbildung 3.7 a) ist die native Lunge einer Maus der Kontrollgruppe 6 h nach Inhalation von NaCl 0,9 % zu sehen. Die Lunge ist nach Perfusion des rechten Herzens mit PBS- nahezu blutleer und fast weiß. Abbildung 3.7 b) zeigt die Lunge einer Maus der Kontrollgruppe 6 h nach Inhalation von LPS. Diese ist, trotz Perfusion des Herzens, deutlich rot gefärbt, was den stattgefundenen Übertritt von Blutbestandteilen über die alveolokapilläre Barriere ins Lungeninterstitium verdeutlicht.

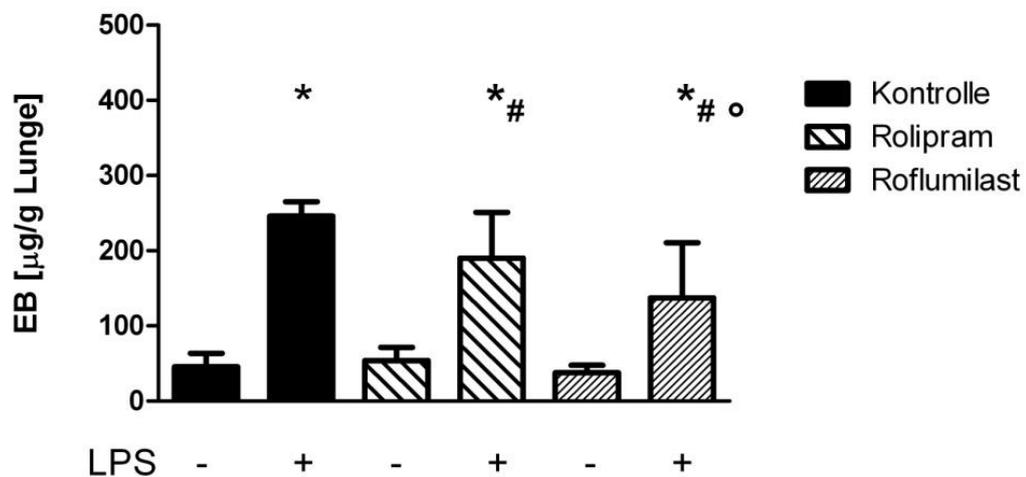


**Abbildung 3.7: Native Lungen 30min nach intravenöser Injektion des Farbstoffs Evans Blue.** a) Lunge einer Maus der Kontrollgruppe 6h nach Inhalation von NaCl 0,9%. b) Lunge einer Maus der Kontrollgruppe 6h nach Inhalation von LPS.

Die quantitative Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität durch Messung des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

Ohne inflammatorischen Stimulus führten Rolipram und Roflumilast zu keiner Veränderung des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe.

Nach LPS-Inhalation steigt der Gehalt des Lungengewebes an Evans Blue in allen Gruppen signifikant an. Die Lungen behandelter Tiere zeigen nach LPS-Inhalation einen signifikant niedrigeren Gehalt an Evans Blue im Lungengewebe als Tiere der Kontrollgruppe, wobei die Extravasation von Evans Blue ins Lungengewebe durch Applikation von Roflumilast signifikant stärker gehemmt wird als durch Rolipram. Auch hier zeigt sich also, wie bei der PMN-Migration, ein höheres anti-inflammatorisches Potential von Roflumilast (Kontrolle – LPS: 45,8 ± 17,6 µg/g; Kontrolle + LPS: 246,1 ± 19,0 µg/g; Rolipram – LPS: 54,1 ± 17,1 µg/g; Rolipram + LPS: 190,1 ± 61,1 µg/g; Roflumilast – LPS: 37,9 ± 10,0 µg/g; Roflumilast + LPS: 137,4 ± 73,4 µg/g, p<0,05).

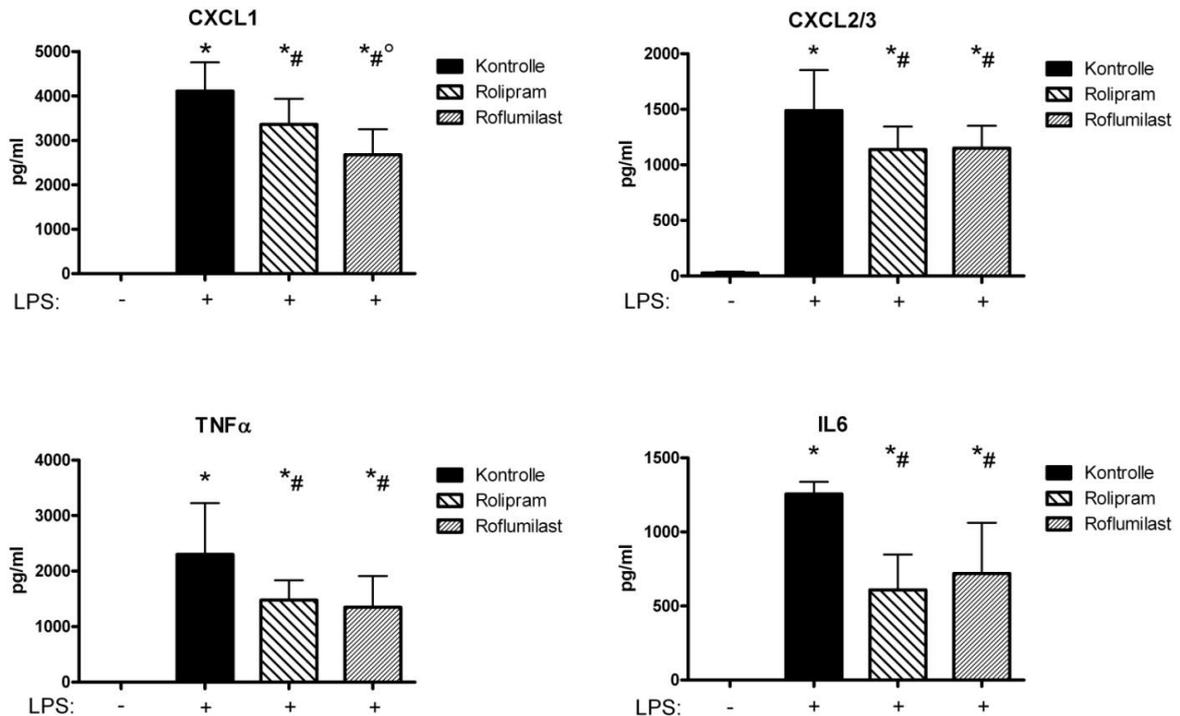


**Abbildung 3.8: Einfluss von Rolipram und Roflumilast auf die mikrovaskuläre Permeabilität.** Evans Blue-Gehalt der Lungen mit Rolipram oder Roflumilast behandelter Tiere, sowie von Tieren der Kontrollgruppe 6h nach LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von je n = 6 Experimenten. \*p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. #p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. °p<0,05 gegenüber Rolipram mit LPS. Modifiziert nach [165].

### 3.3 Zytokinkonzentration in BAL

Die Messung der Zytokinkonzentrationen wurde in BAL-Proben von Kontrolltieren mit und ohne LPS-Inhalation sowie behandelten Tieren drei Stunden nach LPS-Inhalation durchgeführt (Abb.3.9).

In der BAL der Kontrolltiere ohne LPS-Inhalation sind geringe Mengen an CXCL2/3 vorhanden, wohingegen CXCL1, TNF $\alpha$  und IL-6 ohne LPS-Inhalation nicht nachweisbar sind. Ohne LPS-Inhalation wurden die Zytokinkonzentrationen durch Rolipram und Roflumilast im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst, sodass die Darstellung in einem Balken erfolgt. Die Inhalation von LPS führt in allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg aller gemessenen Zytokine in der BAL ( $p < 0,05$ ). Hier zeigt sich für alle vier Zytokine die jeweils höchste Zytokinkonzentration in der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit Rolipram und Roflumilast führte, im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe, zu einer signifikanten Reduktion aller bestimmten Zytokine (CXCL1: Kontrolle + LPS:  $4107 \pm 647,4$  pg/ml; Rolipram + LPS:  $3357 \pm 575,9$  pg/ml; Roflumilast + LPS:  $2676 \pm 571,3$  pg/ml. CXCL2/3: Kontrolle + LPS:  $1488 \pm 366,2$  pg/ml; Rolipram + LPS:  $1138 \pm 205,9$  pg/ml; Roflumilast + LPS:  $1151 \pm 200,8$  pg/ml. TNF $\alpha$ : Kontrolle + LPS:  $2301 \pm 924,8$  pg/ml; Rolipram + LPS:  $1477 \pm 357,3$  pg/ml, Roflumilast + LPS:  $1347 \pm 565,3$  pg/ml. IL6: Kontrolle + LPS:  $1256 \pm 82,4$  pg/ml; Rolipram + LPS:  $608,4 \pm 238,5$  pg/ml; Roflumilast + LPS:  $719,2 \pm 342,5$  pg/ml,  $p < 0,05$ ). Zwischen der Behandlung mit Rolipram und Roflumilast ließ sich bezüglich der Konzentrationen von CXCL2/3, TNF $\alpha$  und IL-6 kein wesentlicher Unterschied ausmachen. Die Konzentration von CXCL1, welches hauptsächlich vom Epithel gebildet wird, war jedoch nach Gabe von Roflumilast signifikant geringer als nach Gabe von Rolipram. (Rolipram + LPS:  $3357 \pm 575,9$  pg/ml vs. Roflumilast + LPS:  $2676 \pm 571,3$  pg/ml,  $p < 0,05$ ). Dies bestätigt unsere Ergebnisse des Migrationsversuches, in dem Roflumilast ebenfalls einen stärkeren Effekt bezüglich der PMN-Migration aufweist.

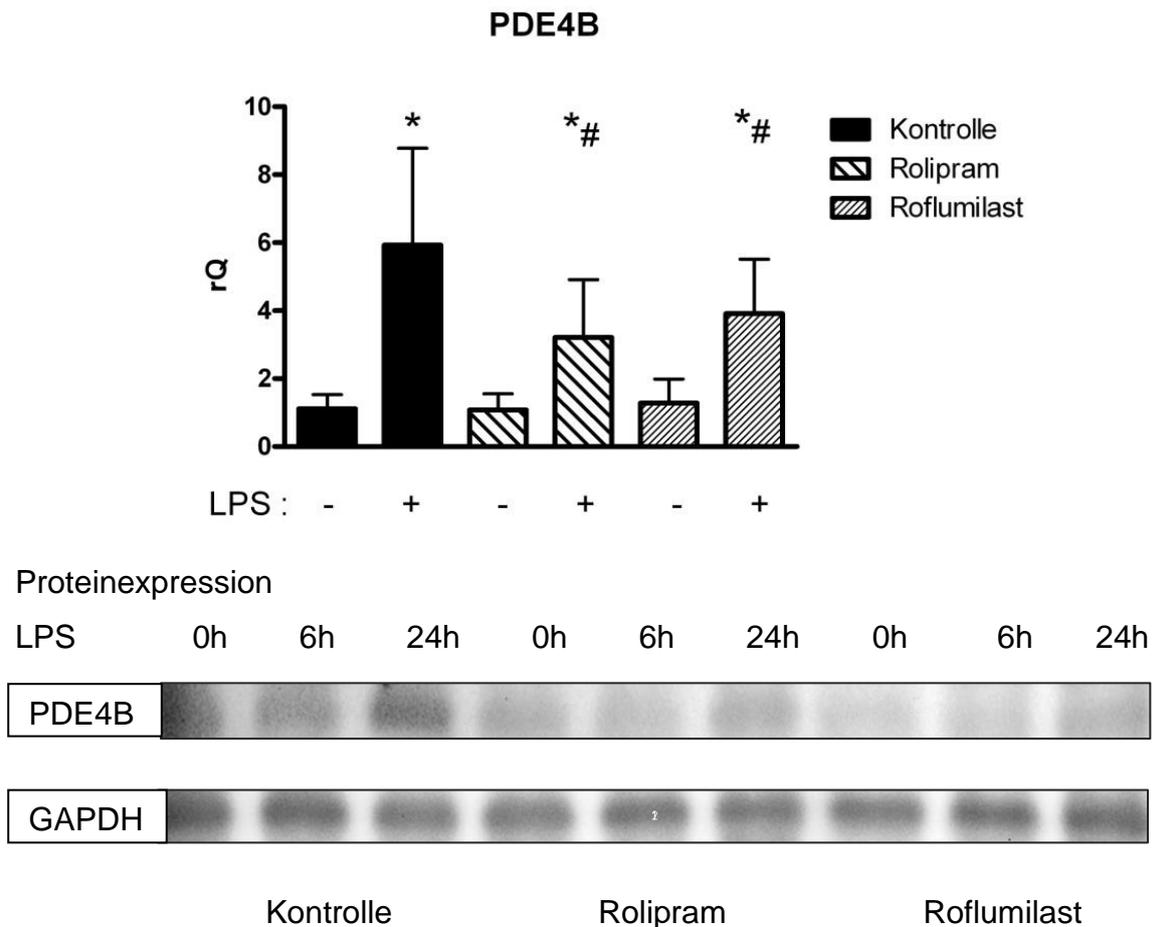


**Abbildung 3.9: Reduktion der Zytokinkonzentration in BAL durch Rolipram und Roflumilast**

Konzentration der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  sowie der Chemokine CXCL1 (KC) und CXCL2/3 (MIP-2) in der BAL 3h nach LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (ohne LPS n=4, +LPS n $\geq$ 6). \*p<0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS, #p<0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS, °p<0,05 gegenüber Rolipram + LPS. Modifiziert nach [165].

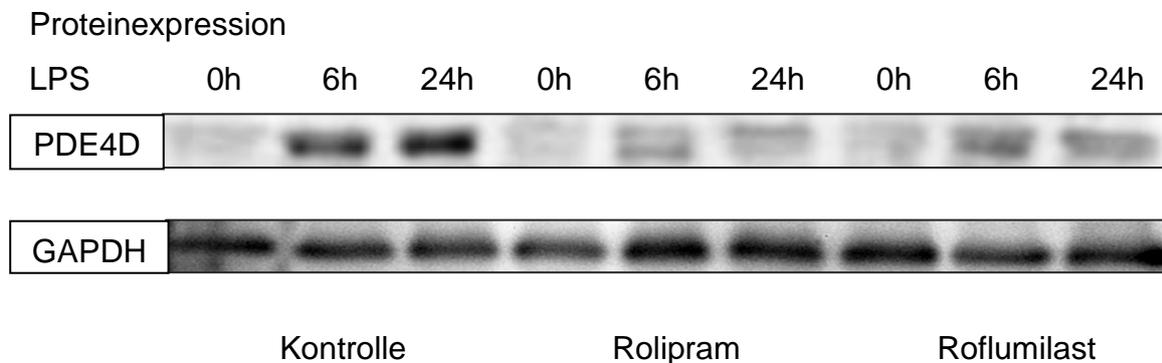
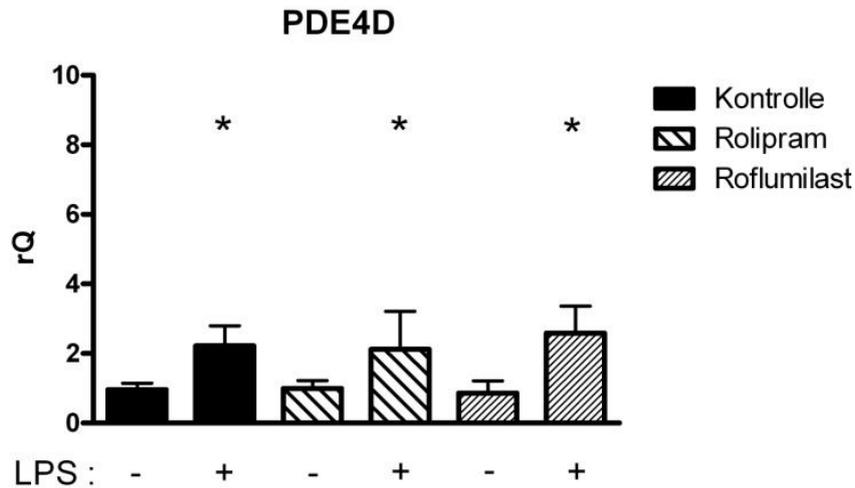
### 3.4 Genexpression und Proteingehalt der PDE4B und PDE4D

Drei Stunden nach LPS-Inhalation wurde mittels PCR die Genexpression der PDE4B und PDE4D im Lungengewebe ermittelt und durch Western Blot die Translation untersucht (Abb. 3.10). Ohne Inhalation von LPS zeigten Rolipram und Roflumilast keinen Effekt auf die PDE4B-Genexpression. Die LPS-Inhalation führte zunächst zu einer deutlich gesteigerten Expression des PDE4B-Gens (Kontrolle + LPS:  $5,9 \pm 2,9$  vs. Kontrolle - LPS:  $1,1 \pm 0,4$ , p<0,05). Mit Rolipram und Roflumilast behandelte Tiere zeigten eine im Vergleich zur Kontrolle mit LPS signifikant geringere Genexpression, was deren antiinflammatorischen Effekt verdeutlicht. (Rolipram + LPS:  $3,2 \pm 1,7$ , Roflumilast + LPS:  $3,9 \pm 1,6$ ; p<0,05). Auf Ebene der Proteintranslation wurde dieses Ergebnis bestätigt. Im Western Blot zeigte sich eine deutliche Reduktion des PDE4B-Proteingehalts durch Applikation von Rolipram oder Roflumilast.



**Abbildung 3.10: Genexpression und Proteingehalt der PDE4B in Lungen behandelter und un behandelter Tiere.** Die Werte sind MW  $\pm$  SD von n=6 Experimenten ohne LPS, n $\geq$ 7 mit LPS. \*p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Kontrolle ohne LPS. #p<0,05 gegenüber der Kontrolle + LPS. Darstellung eines repräsentativen Western Blot aus n=4 unabhängigen Experimenten. Modifiziert nach [165].

Wie die Expression der PDE4B wurde auch die Expression der PDE4D durch Inhalation von LPS signifikant gesteigert (Kontrolle + LPS:  $2,2 \pm 0,6$  vs. Kontrolle – LPS:  $1,0 \pm 0,2$ , p<0,05) (Abb. 3.11), jedoch war die Steigerung der Genexpression deutlich geringer ausgeprägt als die der PDE4B. Auch bei der PDE4D hatten Rolipram und Roflumilast ohne Stimulation durch LPS keinen Effekt auf die Genexpression. Selbst nach LPS-Stimulation zeigten Rolipram und Roflumilast hinsichtlich der Genexpression keinen Effekt auf die PDE4D. Auf Proteinebene hingegen reduzierten Rolipram und Roflumilast etwas weniger als Rolipram den PDE4D-Proteingehalt, was vermutlich einen temporären Effekt darstellt.

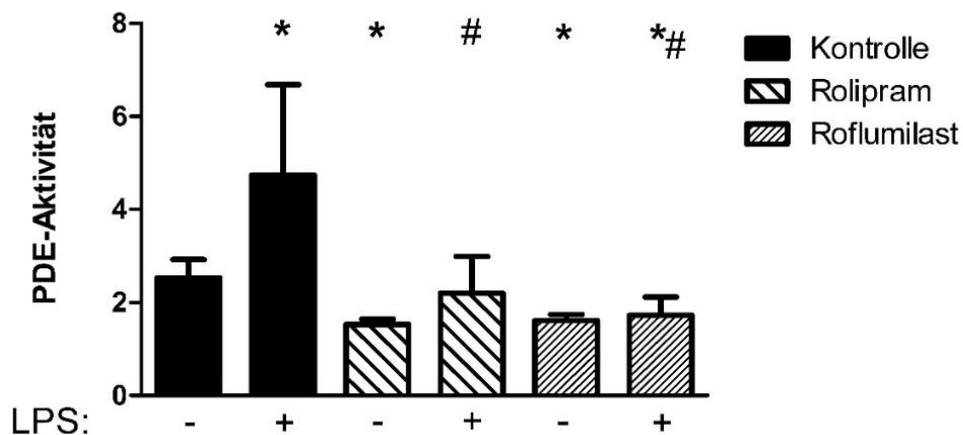


**Abbildung 3.11: Genexpression und Proteingehalt der PDE4D in Lungen behandelter und un behandelter Tiere.** Die Werte sind MW  $\pm$  SD von n=6 Experimenten ohne LPS, n $\geq$ 7 mit LPS. \*p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Kontrolle ohne LPS. Darstellung eines repräsentativen Western Blot aus n=4 unabhängigen Experimenten. Modifiziert nach [165].

### 3.5 PDE-Aktivität

Abb.3.12 zeigt die PDE-Aktivität als negativ reziproken Wert des cAMP-Gehalts im Lungengewebe. Bereits ohne Inhalation von LPS bewirken Rolipram und Roflumilast eine signifikante Abnahme der PDE-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle:  $2,5 \pm 0,4$  vs. Rolipram:  $1,5 \pm 0,1$ , Roflumilast:  $1,6 \pm 0,1$ ; p<0,05). Nach Inhalation von LPS kommt es bei Tieren der Kontrollgruppe zu einer signifikanten Zunahme der PDE-Aktivität (Kontrolle – LPS:  $2,5 \pm 0,4$  vs. Kontrolle + LPS:  $4,7 \pm 1,9$ ; p<0,05). Dieser Effekt ist bei den mit Rolipram oder Roflumilast behandelten Tieren nicht zu beobachten. Die PDE-Aktivität nach

LPS-Inhalation wird durch Rolipram und Roflumilast im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert (Rolipram + LPS:  $2,2 \pm 0,8$ , Roflumilast + LPS:  $1,7 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ), wobei die PDE-Aktivität durch Roflumilast stärker gehemmt wurde. Tiere, welche nach LPS-Inhalation Roflumilast erhalten hatten, weisen sogar eine geringere PDE-Aktivität auf, als Tiere der Kontrollgruppe ohne Inhalation von LPS. ( $2,5 \pm 0,4$  vs.  $1,7 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Dies verdeutlicht erneut das gegenüber Rolipram höhere antiinflammatorische Potential von Roflumilast.



**Abbildung 3.12: Einfluss von Rolipram und Roflumilast auf die PDE-Aktivität in murinem Lungengewebe mit und ohne inflammatorischen Stimulus**

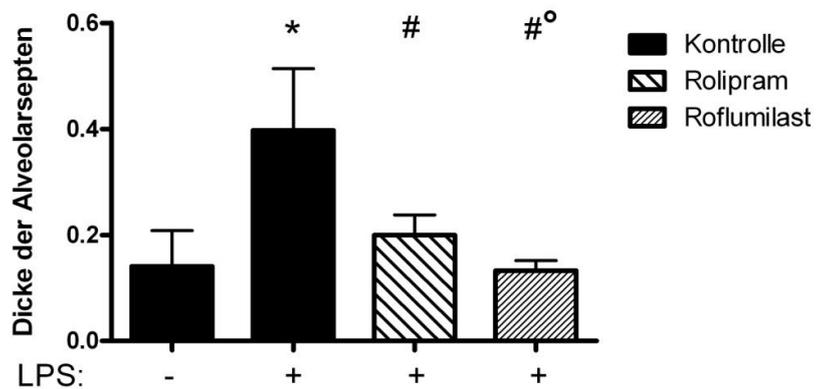
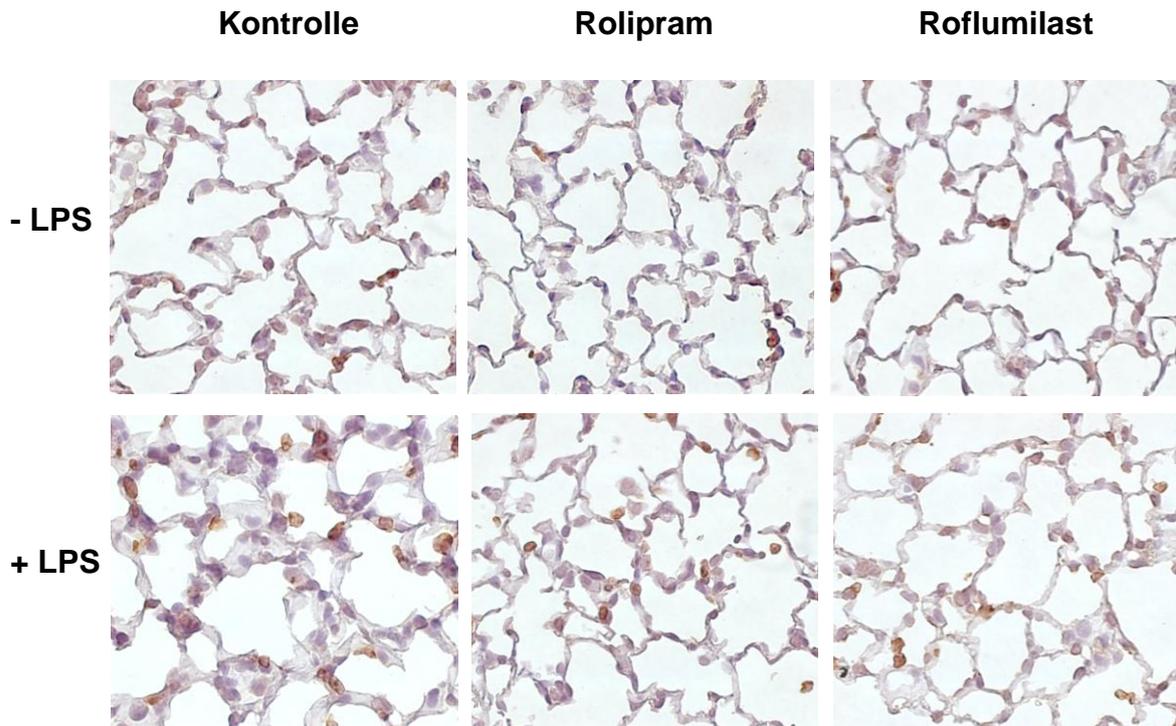
Messung des cAMP-Gehalts in homogenisiertem murinem Lungengewebe nach Inhalation von LPS. Die PDE-Aktivität ergibt sich aus der reziproken Darstellung des cAMP-Gehalts der Proben. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (ohne LPS:  $n \geq 4$ ; mit LPS:  $n=6$ ). \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. # $p < 0,05$  gegenüber der mit LPS behandelten Gruppe. Modifiziert nach [165].

### 3.6 PMN-Infiltration der Lunge im histologischen Bild

Die Schädigung der alveolokapillären Barriere in der akuten pulmonalen Inflammation zeigt sich unter anderem in einer Zunahme der Dicke der Alveolarsepten als Zeichen eines interstitiellen Ödems sowie an einer Einwanderung von PMNs in die Lunge. Diese Vorgänge können mittels Histologie dargestellt werden. Dieses Verfahren ist jedoch, bezüglich einer genauen Zuordnung der PMNs zu den jeweiligen Kompartimenten Interstitium

und Alveolarraum, allenfalls qualitativ beurteilbar. Eine quantitative Zuordnung der migrierten PMNs erfolgte bereits durch das Durchflusszytometrische Verfahren im Migrationsversuch.

Abb. 3.13 zeigt Lungenpräparate nach Anfärbung der PMN (braun) und die Dicke der Alveolarsepten. Sowohl die Lungen der Kontroll- als auch der behandelten Tiere ohne Inhalation von LPS zeigen zarte, schmale Alveolarsepten und lediglich vereinzelte PMNs. Ohne LPS-Inhalation ist keine Veränderung durch Gabe von Rolipram oder Roflumilast auszumachen. Die Inhalation von LPS führt bei den Kontrolltieren zu einer qualitativen Zunahme der PMN-Anzahl in der Lunge sowie zu einer signifikanten Verdickung der Alveolarsepten ( $0,14 \pm 0,07$  mm vs.  $0,4 \pm 0,11$  mm;  $p < 0,05$ ). Die Gabe von Rolipram führte zu einer weniger ausgeprägten Infiltration durch PMNs, die Alveolarsepten waren signifikant schmaler ( $0,2 \pm 0,04$  mm;  $p < 0,05$ ). Noch ausgeprägter war der Effekt von Roflumilast, hier zeigen sich geringe PMN-Zahlen sowie eine nahezu normale Lungenarchitektur mit schmalen Alveolarsepten ( $0,13 \pm 0,02$  mm;  $p < 0,05$ ).



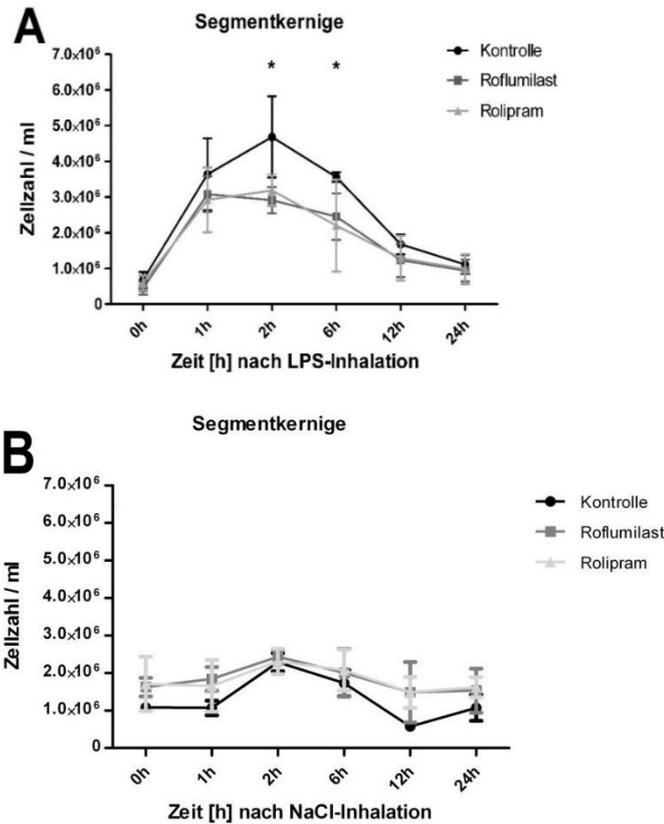
**Abbildung 3.13: Immunhistochemische Darstellung der PMN-Infiltration der Lunge nach Gabe von PDE4-Inhibitoren und Dicke der Alveolarsepten**

Immunhistochemische Färbung von PMNs (braun) mit rat anti-mouse neutrophils 7/4. Die Bilder sind repräsentative Bilder aus n=4 Experimenten in 63-facher Vergrößerung. Die Messung der Alveolarseptendicke erfolgte an 6 Stellen pro Präparat. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD von n=4 Experimenten. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle ohne LPS; # $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle mit LPS; ° $p < 0,05$  gegenüber Rolipram. Modifiziert nach [165].

### 3.7 Differential-Blutbild

Zur Beurteilung möglicher Veränderungen des weißen Blutbilds durch Inhalation von LPS wurden direkt vor LPS-Inhalation, eine Stunde, zwei Stunden, sechs, zwölf und 24 Stunden danach Zellzählungen und Blutaussstriche zur Leukozyten-Differenzierung angefertigt. Das Augenmerk lag dabei auf stabkernigen und segmentkernigen Neutrophilen Granulozyten, im Folgenden als Stabkernige und Segmentkernige bezeichnet.

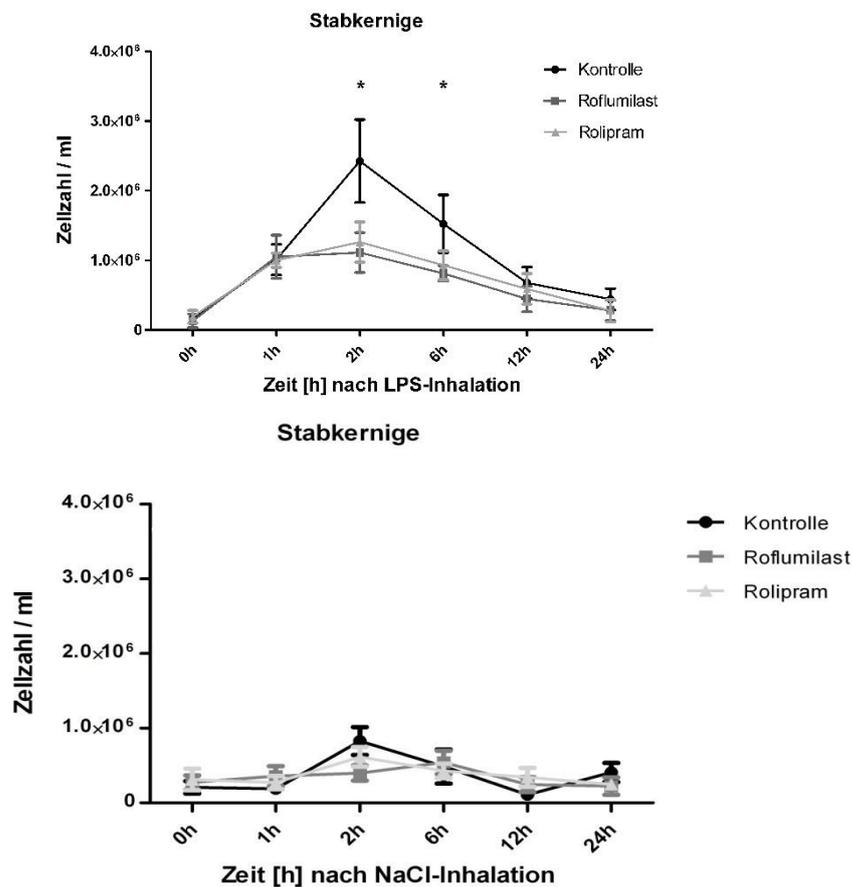
Abb. 3.14 zeigt den Verlauf des Gehalts Segmentkerniger im peripheren Blut von Mäusen nach LPS-Inhalation bzw. Inhalation von NaCl 0,9%. Ohne Inhalation von LPS zeigten Rolipram oder Roflumilast zu keinem der Zeitpunkte einen Einfluss auf die Zahl Segmentkerniger im peripheren Blut. Zu Beginn ist die Zahl Segmentkerniger bei allen Tieren nahezu identisch. Die nachfolgende Inhalation von LPS bewirkt in allen Gruppen einen signifikanten Anstieg Segmentkerniger im peripheren Blut (Kontrolle:  $1,1 \pm 0,2 \times 10^6$  vs.  $3,6 \pm 1,0 \times 10^6$ ; Roflumilast:  $1,85 \pm 0,3 \times 10^6$  vs.  $3,1 \pm 0,5 \times 10^6$ ; Rolipram:  $1,7 \pm 0,7 \times 10^6$  vs.  $2,9 \pm 0,9 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ), was 1 h nach LPS-Inhalation zu sehen ist (Abb. 3.14; A). Nun erfolgte die Behandlung der Tiere mit Rolipram bzw. Roflumilast. 2 h nach LPS kann man nun in der Kontrollgruppe einen weiteren Anstieg der Zahl Segmentkerniger beobachten, wohingegen der Wert bei behandelten Tieren nahezu konstant bleibt und nun signifikant niedriger ist, als bei Tieren der Kontrollgruppe (Kontrolle:  $4,7 \pm 1,1 \times 10^6$  vs. Roflumilast:  $2,9 \pm 0,4 \times 10^6$ ; Rolipram:  $3,2 \pm 0,4 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ). Im Folgenden beginnt in allen Gruppen die Zahl Segmentkerniger wieder abzufallen, wobei deren Zahl 6 h nach LPS bei behandelten Tieren noch signifikant geringer ist als bei Kontrolltieren (Kontrolle:  $3,6 \pm 0,1 \times 10^6$ ; Roflumilast:  $2,5 \pm 0,7 \times 10^6$ ; Rolipram:  $2,2 \pm 1,3 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ). 12 h nach LPS ist bereits kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen auszumachen, bis nach 24 h wieder in allen Gruppen nahezu der Ausgangswert erreicht ist.



**Abbildung 3.14: zeitlicher Verlauf des Gehalts Segmentkerniger neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut behandelter und unbehandelter Tiere zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 6h, 12h und 24h nach Inhalation von LPS bzw. NaCl 0,9%.** A: Segmentkernige nach LPS-Inhalation. B: Segmentkernige nach Inhalation von NaCl. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von je n=4 Experimenten. \*p< 0,05 Rolipram und Roflumilast gegenüber der Kontrolle + LPS.

Auch der Gehalt Stabkerniger wurde durch Zellzählung und Differenzierung im Blutaussstrich quantifiziert. Abb.3.15 zeigt den Verlauf des Gehalts Stabkerniger im peripheren Blut von Mäusen nach LPS-Inhalation und nach Inhalation von NaCl. Wie auch bei den Segmentkernigen zeigten ohne LPS-Inhalation weder Rolipram noch Roflumilast einen Einfluss auf die Zahl Stabkerniger. Zu Beginn ist die Zahl Stabkerniger bei allen Tieren nahezu identisch. Analog zu der Dynamik, welche sich bei den Segmentkernigen zeigte, kommt es auch hier nach LPS-Inhalation in allen Gruppen zu einer signifikanten Zunahme Stabkerniger im peripheren Blut (Kontrolle:  $0,2 \pm 0,01 \times 10^6$  vs.  $1,0 \pm 0,2 \times 10^6$ ; Roflumilast:  $0,4 \pm 0,1 \times 10^6$  vs.  $1,1 \pm 0,3 \times 10^6$ ; Rolipram:  $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$  vs.  $1,0 \pm 0,1 \times 10^6$ ; p<0,05), was 1 h nach LPS zu sehen ist (Abb 3.15; A). Es folgte die Behandlung der Tiere mit Rolipram bzw. Roflumilast. 2 h nach LPS kann man auch hier in der Kontrollgruppe einen weiteren Anstieg der Zahl Stabkerniger

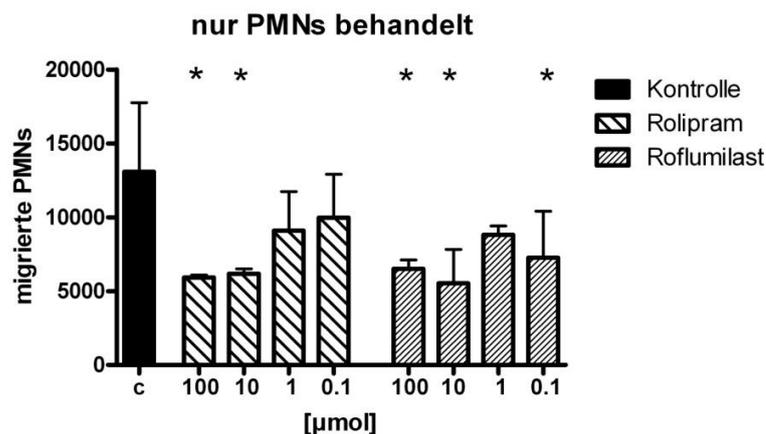
beobachten, wohingegen der Wert bei behandelten Tieren nahezu konstant bleibt und nun signifikant niedriger ist, als bei Tieren der Kontrollgruppe (Kontrolle:  $2,4 \pm 0,6 \times 10^6$ ; Roflumilast:  $1,1 \pm 0,3 \times 10^6$ ; Rolipram:  $1,3 \pm 0,3 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ). Danach beginnt in allen Gruppen die Zahl Stabkerniger wieder abzufallen, wobei deren Zahl 6 h nach LPS bei behandelten Tieren noch signifikant geringer ist, als bei Kontrolltieren (Kontrolle:  $1,5 \pm 0,4 \times 10^6$ ; Roflumilast:  $0,8 \pm 0,1 \times 10^6$ ; Rolipram:  $0,9 \pm 0,2 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ). 12 h nach LPS ist bereits kein Unterschied mehr zwischen behandelten und unbehandelten Tieren auszumachen, bis nach 24 h wieder in allen Gruppen nahezu der Ausgangswert erreicht ist.



**Abbildung 3.15: zeitlicher Verlauf des Gehalts Stabkerniger neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut behandelter und unbehandelter Tiere zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 6h, 12h und 24h nach Inhalation von LPS bzw. NaCl 0,9%.** A: Segmentkernige nach LPS-Inhalation. B: Segmentkernige nach Inhalation von NaCl. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von je n=4 Experimenten. \* $p < 0,05$  Rolipram und Roflumilast gegenüber der Kontrolle + LPS.

### 3.8 Migration in vitro

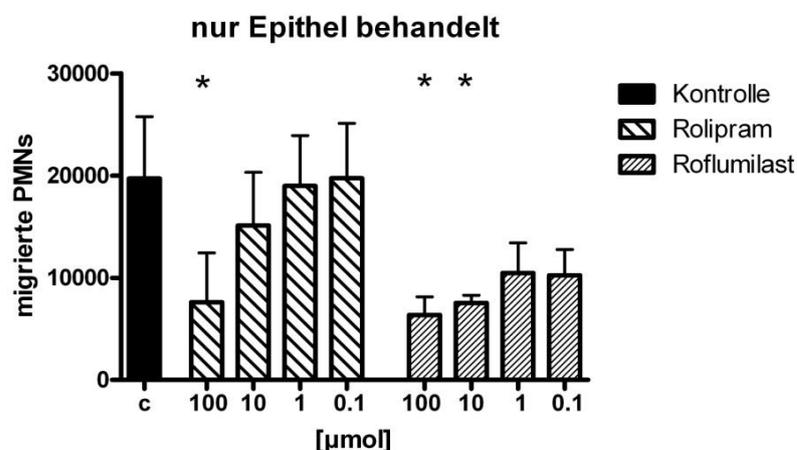
Zusätzlich zur murinen in vivo Migration wurde die Migration über einen Monolayer humaner H441-Zellen untersucht. Hierbei wurden entweder die zu migrierenden humanen PMNs, der H441-Monolayer oder beide Komponenten mit den PDE4-Inhibitoren Rolipram oder Roflumilast behandelt und die PMN-Migration entlang eines chemotaktischen Gradienten untersucht. Bei alleiniger Behandlung der PMNs (Abb.3.16) zeigt sich, dass Rolipram in einer Dosierung von 100  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$  und Roflumilast in einer Dosierung von 100  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 0,1  $\mu\text{mol/l}$  die Migration über den H441-Monolayer signifikant vermindern. Rolipram in niedrigerer Dosierung zeigte hier keine Wirksamkeit (Kontrolle:  $13079 \pm 4686$ ; Rolipram 100 $\mu\text{mol}$ :  $5917 \pm 168,7$ ; Rolipram 10  $\mu\text{mol}$ :  $6174 \pm 329,9$ ; Roflumilast 100  $\mu\text{mol}$ :  $6516 \pm 599,9$ ; Roflumilast 10 $\mu\text{mol}$ :  $5533 \pm 2292$ ; Roflumilast 0,1 $\mu\text{mol}$ :  $7257 \pm 3155$ ,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3.16: PMN-Migration über einen H441-Monolayer nach Vorbehandlung der PMNs mit Rolipram oder Roflumilast.** Die Werte sind MW  $\pm$  SD von  $n \geq 4$  Experimenten. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle. Vgl. [165].

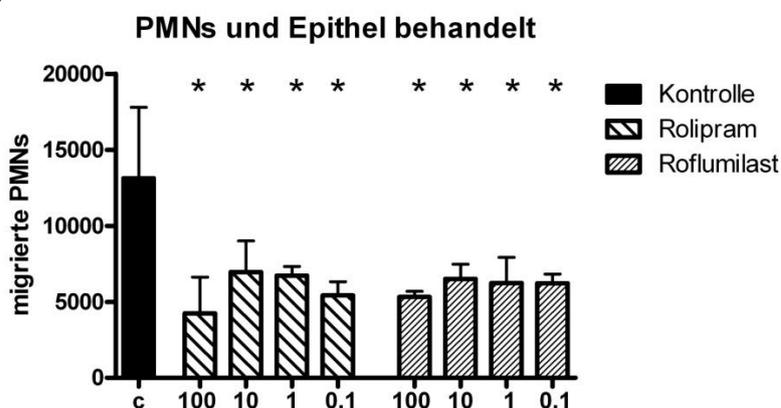
Abb. 3.17 zeigt die Migration über einen H441-Monolayer nach Behandlung der H441-Zellen. Werden nur die H441-Zellen behandelt, so zeigt sich für Rolipram in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  eine signifikante Reduktion der PMN-Migration über die Epithelzellschicht. Roflumilast konnte neben 100 $\mu\text{mol}$  auch in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol}$  die PMN-Migration signifikant hemmen (Kontrolle:  $19712 \pm 6062$ ; Rolipram 100:  $7602 \pm 4837$ ; Roflumilast 100:  $6355 \pm$

1774; Roflumilast 10: 7531 ± 762,7; p<0,05). Dies verdeutlicht den direkten Effekt der PDE4-Inhibitoren auf Epithelien.



**Abbildung 3.17: PMN-Migration über einen H441-Monolayer nach Vorbehandlung des Epithels mit Rolipram oder Roflumilast.** Die Werte sind MW ± SD von n = 2-6 Experimenten. \*p < 0,05 gegenüber der Kontrolle. Vgl. [165].

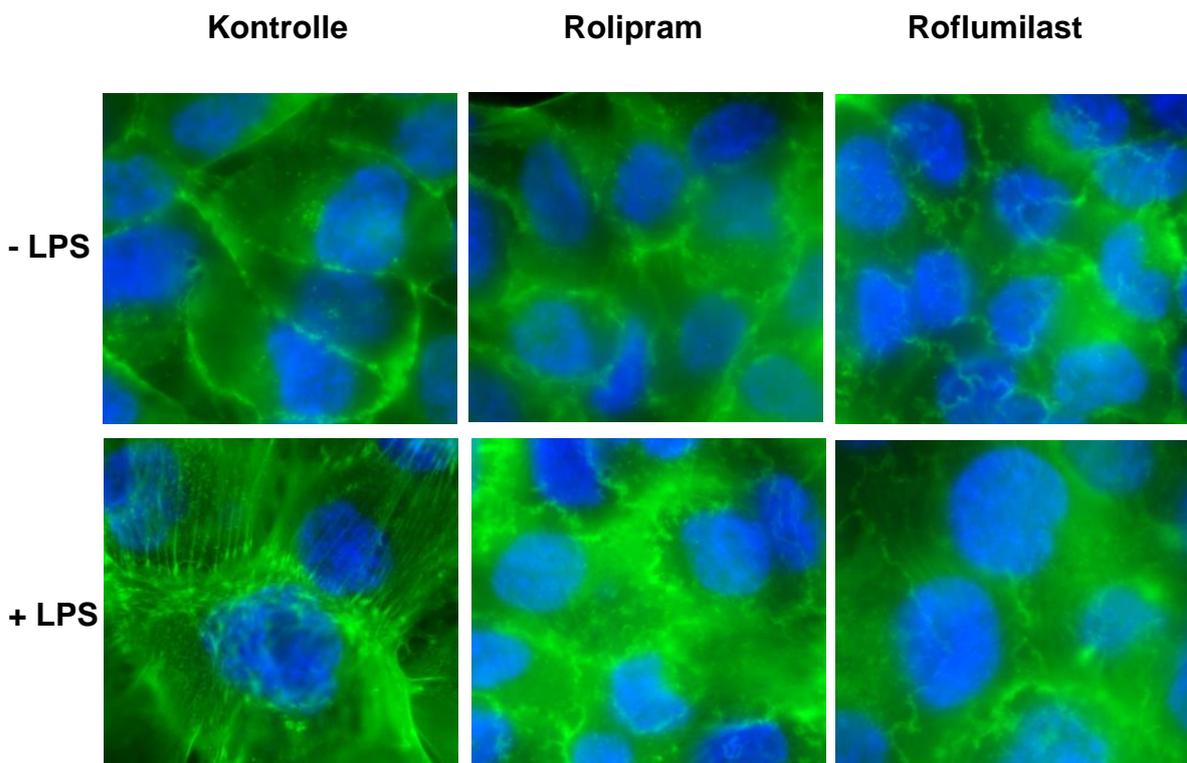
Werden Epithelzellen und PMNs behandelt, so zeigt sich für alle eingesetzten Konzentrationen von Rolipram sowie von Roflumilast, eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich verminderte Migration über den H441-Monolayer (Abb. 3.18). Zwischen den einzelnen Dosierungen der PDE4-Inhibitoren zeigen sich keine Unterschiede (Kontrolle: 13131 ± 4662; Rolipram 100 μmol: 4247 ± 2380; Rolipram 10μmol: 6961 ± 2044; Rolipram 1μmol: 6730 ± 600,4; Rolipram 0,1μmol: 5420 ± 897,6; Roflumilast 100μmol: 5318 ± 381,8; Roflumilast 10μmol: 6513 ± 958,2; Roflumilast 1μmol: 6249 ± 1671; Roflumilast 0,1μmol: 6229 ± 592,8; p<0,05).



**Abbildung 3.18: PMN-Migration über einen H441-Monolayer nach Vorbehandlung von PMNs und Epithel mit Rolipram oder Roflumilast.** Die Werte sind MW ± SD von n = 3-7 Experimenten. \*p < 0,05 gegenüber der Kontrolle.

### 3.9 Zytoskelettaler Umbau - Aktin-Färbung

Im Rahmen inflammatorischer Prozesse kommt es unter anderem zu zytoskelettalen Umbauvorgängen, welche die Barrierefunktion von Epithelien beeinträchtigen und die Migration von PMNs ermöglichen. Zur Untersuchung möglicher Effekte von PDE4-Inhibitoren auf diese Umbauvorgänge erfolgte eine F-Aktin-Färbung an LPS-stimulierten und unstimulierten humanen H441-Epithelzellen (Abb. 3.19). Ohne inflammatorische Stimulation ist die Verteilung des F-Aktins in allen Gruppen eher homogen. Ein direkter Effekt der PDE4-Inhibitoren auf unstimulierte Zellen ist nicht zu beobachten. Durch Stimulation mit LPS ist in der Kontrollgruppe eine deutliche Ausbildung von Aktinfasern zu sehen. Dieser Effekt ist bei Vorbehandlung mit Rolipram oder Roflumilast nicht zu beobachten.



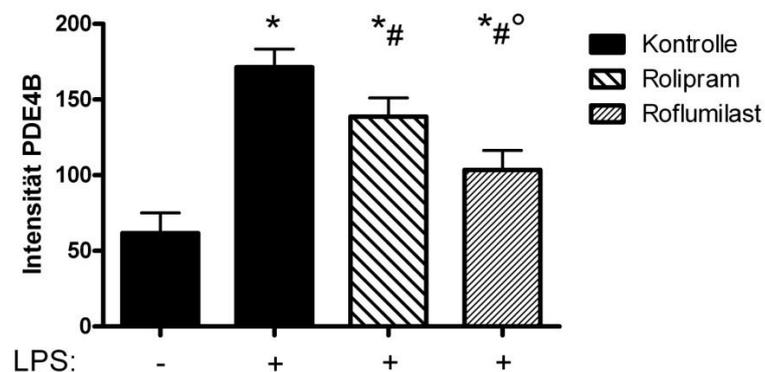
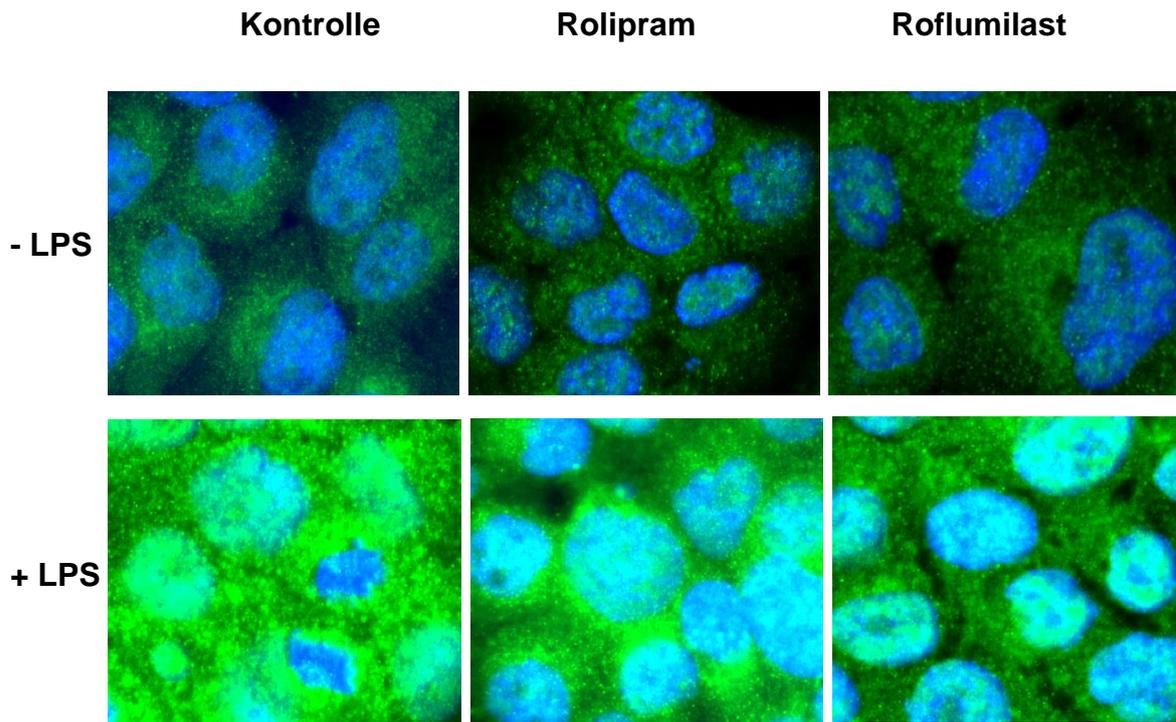
**Abbildung 3.19: Wirkung der PDE4-Inhibitoren auf den zytoskelettalen Umbau von H441-Zellen.** LPS-induzierte Organisation von Aktinfilamenten in unbehandelten und mit PDE4-Inhibitoren vorbehandelten humanen H441-Zellen. Blau: Zellkerne. Grün: F-Aktin-Filamente. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus n=3 Experimenten in 63-facher Vergrößerung. Vgl. [165].

### 3.10 Expression der PDE4B und PDE4D in H441-Zellen

#### PDE4B

Nach Anfärbung der PDE4B in humanen H441-Zellen wurden diese mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 3.20). In den Präparaten ohne inflammatorischen Stimulus ist deutlich zu sehen, dass die PDE4B (grün) in allen Gruppen ungefähr in gleichem Ausmaß exprimiert ist. Durch Stimulation mit LPS kommt es vor allem in der Kontrollgruppe zu einer deutlichen Zunahme der PDE4B. Auch mit Rolipram oder Roflumilast vorbehandelte Zellen zeigen eine Zunahme der PDE4B durch LPS-Stimulation, diese ist jedoch weniger ausgeprägt als in der Kontrollgruppe.

Zur Quantifizierung der PDE4B-Expression wurde die Fluoreszenzintensität der PDE4B gemessen. Die Stimulation mit LPS führt in allen Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der PDE4B-Expression. Mit Rolipram oder Roflumilast behandelte Zellen zeigen eine geringere PDE4B-Expression als unbehandelte Zellen. Dabei wird die Steigerung der PDE4B-Expression durch Vorbehandlung mit Roflumilast signifikant stärker gehemmt als durch Rolipram (Kontrolle - LPS:  $61,74 \pm 13,35$ ; Kontrolle + LPS:  $171,4 \pm 12,00$ ; Rolipram:  $138,7 \pm 12,43$ ; Roflumilast:  $103,6 \pm 12,77$ ;  $p < 0,05$ ).



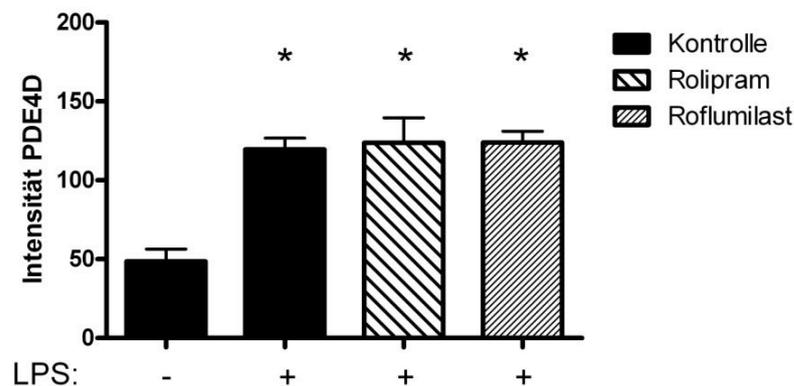
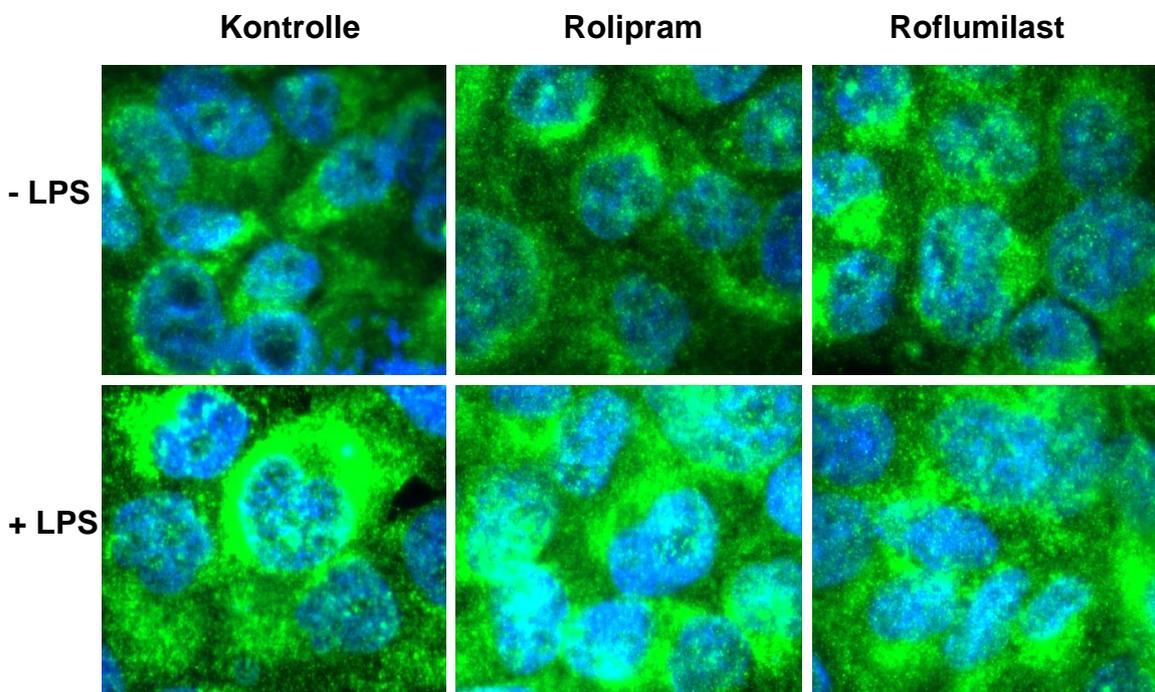
**Abbildung 3.20: Einfluss der PDE4-Inhibitoren auf den PDE4B-Gehalt humaner H441-Zellen nach inflammatorischer Stimulation.** Die Daten sind MW  $\pm$  SD von n=4 Experimenten. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle ohne LPS. # $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle + LPS. ° $p < 0,05$  gegenüber Rolipram. Vgl. [165].

## PDE4D

Abb.3.21 zeigt die Ergebnisse nach Anfärbung der PDE4D. In den Präparaten ohne inflammatorischen Stimulus ist deutlich zu sehen, dass die PDE4D (grün) in allen Gruppen ungefähr in gleichem Ausmaß exprimiert ist. Durch Stimulation mit LPS kommt es in allen Gruppen zu einer deutlichen Zunahme der PDE4D.

Zwischen behandelten und unbehandelten Zellen lässt sich hier kein eindeutiger Unterschied in der PDE4D-Intensität erkennen.

Analog zum Vorgehen bei der PDE4B wurde zur Quantifizierung der PDE4D-Expression die Fluoreszenzintensität der PDE4D gemessen. Die Stimulation mit LPS führt in allen Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der PDE4D-Expression. Zwischen behandelten und unbehandelten Zellen findet sich hier jedoch kein Unterschied (Kontrolle – LPS:  $48,67 \pm 7,756$ ; Kontrolle + LPS:  $119,7 \pm 7,116$ ; Rolipram:  $123,7 \pm 15,91$ ; Roflumilast:  $123,9 \pm 7,079$ ).

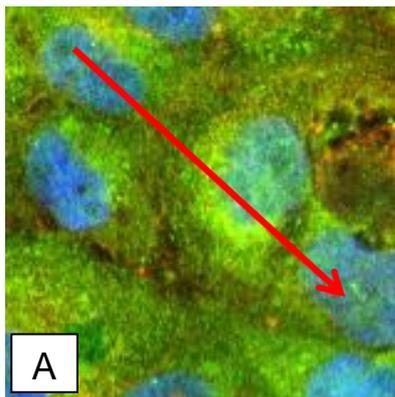


**Abbildung 3.21: Einfluss der PDE4-Inhibitoren auf den PDE4D-Gehalt humaner H441-Zellen nach inflammatorischer Stimulation.** Die Daten sind MW  $\pm$  SD von n=4 Experimenten. \*p<0,05 gegenüber der Kontrolle ohne LPS. #p<0,05 gegenüber der Kontrolle + LPS. °p<0,05 gegenüber Rolipram. Vgl. [165].

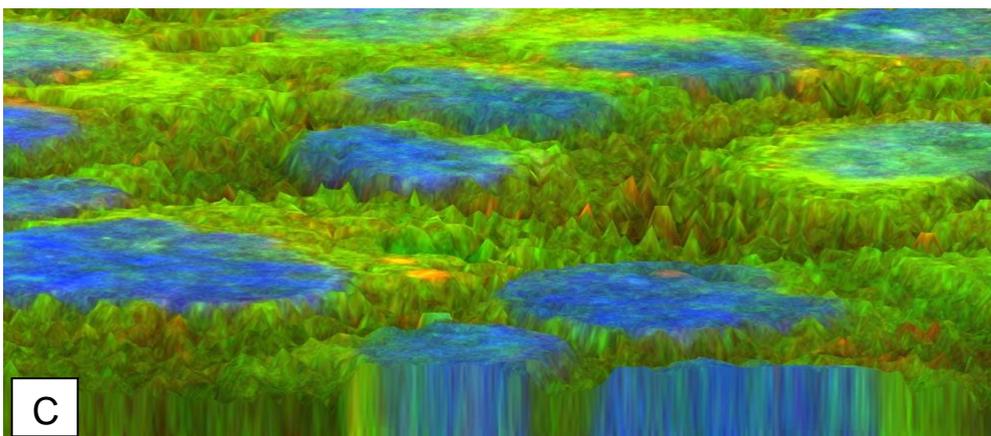
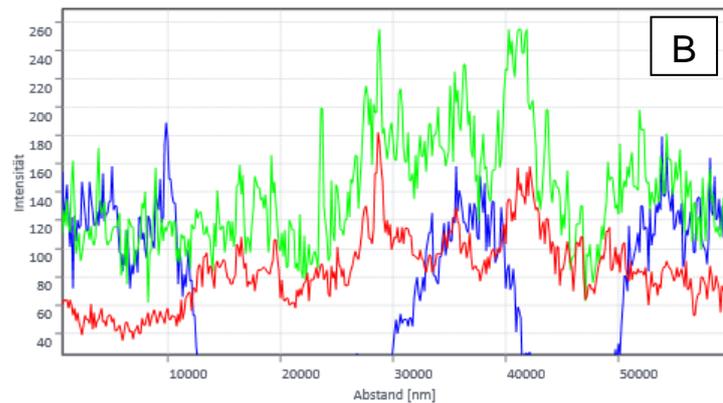
### 3.11 Verteilung der PDE4B und PDE4D in H441-Zellen

Die Fluoreszenzmikroskopischen Bilder der PDE4B und PDE4D zeigen die Veränderungen der Expression der PDE4-Isotypen durch LPS als inflammatorischen Stimulus. Um eine Aussage zum Verhältnis beider Isotypen zueinander treffen zu können, wurden parallel beide Isotypen angefärbt und konfokalmikroskopisch untersucht. Abb.3.22 zeigt die Verteilung der PDE4B und PDE4D ohne LPS als inflammatorischen Stimulus. Betrachtet man Abb.3.22 A, erkennt man ein deutliches Überwiegen der PDE4D (grün). Bei Betrachtung von Abb.3.22 B wird deutlich, dass ohne inflammatorischen Stimulus sowohl im Bereich des Zellkerns als auch im Bereich des Zytoplasmas beide Isotypen exprimiert werden, die PDE4D jedoch überwiegt.

ohne LPS



Profil entlang des Pfeils

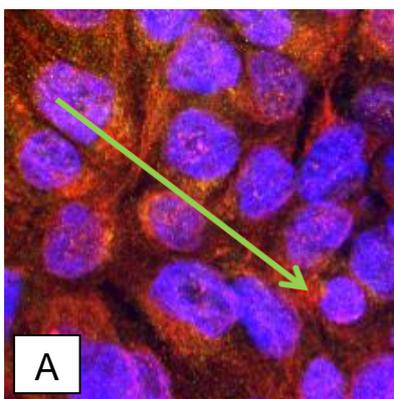


■ DAPI  
■ PDE4B  
■ PDE4D

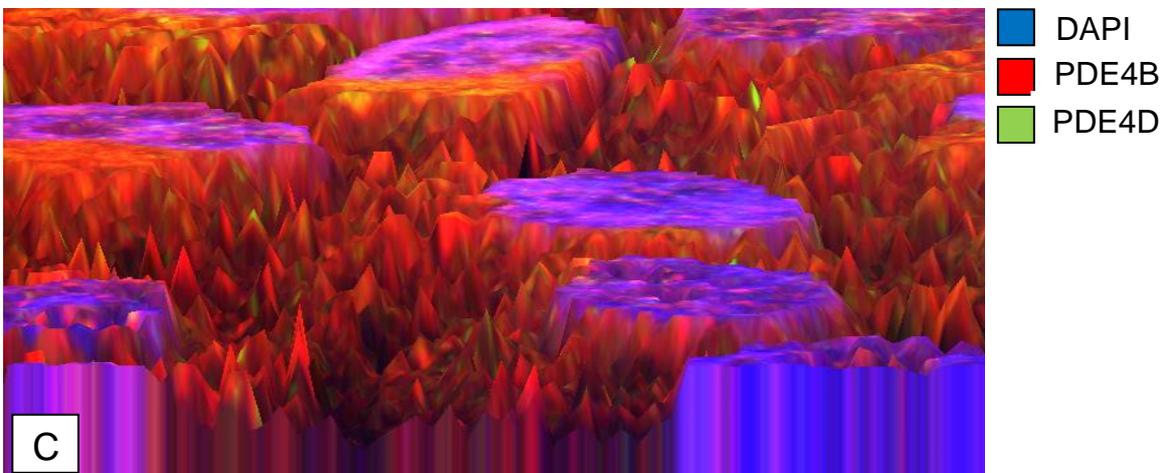
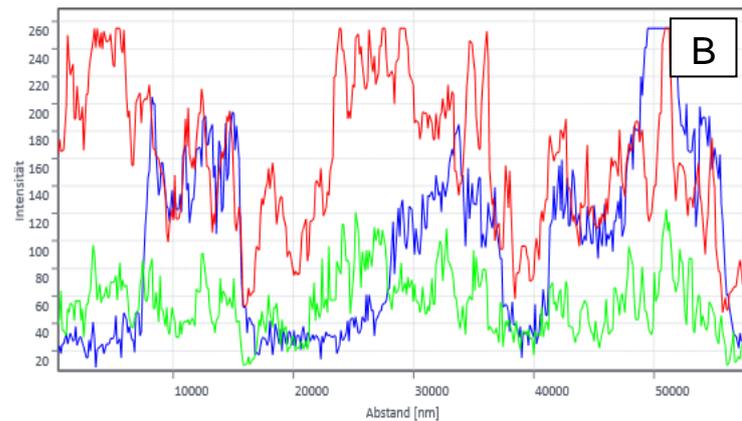
**Abbildung 3.22 Verteilung der PDE4B und PDE4D in humanen H441-Zellen.** Zellkerne (blau), PDE4B (rot) und PDE4D (grün). A: zweidimensionales Bild des Monolayers. B: Fluoreszenzintensität der einzelnen gefärbten Bestandteile entlang des Pfeils im Bild A. C: dreidimensionale Ansicht des Monolayers. Vgl. [165].

Zum Vergleich wurden die H441-Zellen mit LPS stimuliert und nachfolgend die Verteilung der zwei PDE4-Isotypen erneut untersucht (Abb.3.23). Betrachtet man Abb.3.23 A, erkennt man nun ein deutliches Überwiegen der PDE4B (rot). Bei Betrachtung von Abb.3.23 B wird deutlich, dass nach Stimulation durch LPS weiterhin beide Isotypen, sowohl im Bereich des Zellkerns als auch im Bereich des Zytoplasmas exprimiert werden, die PDE4B nun jedoch deutlich überwiegt.

nach Stimulation mit LPS



Profil entlang des Pfeils



**Abbildung 3.23 Effekt der Inflammation auf die Verteilung der PDE4-Isotypen in humanen H441-Zellen.** Zellkerne (blau), PDE4B (rot) und PDE4D (grün).

A: zweidimensionales Bild des Monolayers. B: Fluoreszenzintensität der einzelnen gefärbten Bestandteile entlang des Pfeils im Bild A. C: dreidimensionale Ansicht des Monolayers. Vgl. [165].

## 4 Diskussion

Ein entscheidendes Merkmal der akuten pulmonalen Inflammation ist die Einwanderung Neutrophiler Granulozyten in die Lunge. Voraussetzung hierfür ist zunächst die Erkennung eines pathogenen Agens durch Zellen des Immunsystems. Es folgt deren Aktivierung mit einer daraus resultierenden Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen sowie die Anlockung und Migration Neutrophiler Granulozyten über die endotheliale und anschließend über die epitheliale Barriere in die Lunge. Diese Vorgänge sind Folge einer durch ein pathogenes Agens induzierten Regulation der Transkription und Translation von Zytokinen und Chemokinen sowie Veränderungen der Expression von Rezeptor- und Oberflächenmolekülen auf Zellen des Immunsystems, Endothel- und Epithelzellen. Neben zahlreichen weiteren Faktoren spielt bei diesen Vorgängen der intrazelluläre cAMP-Spiegel eine bedeutende Rolle. Dieser wird unter anderem durch den Abbau durch PDEs reguliert. PDEs sind Enzyme, welche intrazelluläres cAMP bzw. cGMP zu AMP bzw. GMP hydrolysieren. Sie sind ubiquitär in unterschiedlichsten Zelltypen und Geweben verbreitet. Es existieren 11 Isoenzyme (PDE1-11), welche sich hinsichtlich ihrer Substrate und ihrer Verbreitung in unterschiedlichen Geweben unterscheiden. Die einzelnen Isoenzyme besitzen teils mehrere Isotypen, welche mit der Nummer des Isoenzym sowie eines Buchstabens für den jeweiligen Isotypen bezeichnet werden. Das dominante Isoenzym in Zellen des Immunsystems stellt die PDE4 dar, von der die 4 Isotypen A bis D bekannt sind. Auch im Lungengewebe ist die PDE4 ein verbreitetes Isoenzym und stellt somit häufig ein Ziel bei der Erforschung möglicher antiinflammatorischer Therapien der pulmonalen Inflammation dar. Der Abbau von intrazellulärem cAMP kann durch Hemmung der PDEs reduziert werden. Es existieren sowohl nicht-selektive Hemmstoffe, welche unspezifisch mehrere Phosphodiesterasen hemmen, als auch selektive Hemmstoffe für einzelne PDEs. Ein relevantes Problem einer Therapie mit PDE4-Inhibitoren stellen unerwünschte Arzneimittelwirkungen dar. Diese umfassen hauptsächlich gastrointestinale Nebenwirkungen wie Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen. Deren Entstehung wird von einigen Autoren

hauptsächlich der Hemmung des Isotyps D der PDE4 zugeschrieben [160, 166]. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren in der Literatur häufig über die Notwendigkeit der Erforschung selektiver PDE4B-Inhibitoren mit günstigerem Nebenwirkungsprofil diskutiert [167, 168]. Mit Compound A steht mittlerweile solch ein selektiver Inhibitor der PDE4B zur Verfügung. Compound A besitzt eine 29- bis 80-fache Selektivität für die PDE4B gegenüber der PDE4D [169].

Die Bedeutung der Hemmung der PDE4 bzw. die Rolle ihrer einzelnen Isotypen hinsichtlich ihrer antiinflammatorischen Wirkung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse einiger Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass auch der Isotyp D der PDE4 eine entscheidende Rolle im inflammatorischen Geschehen spielt. Vor dem Hintergrund dieser Annahme kamen in dieser Arbeit Rolipram und Roflumilast zur Anwendung. Diese stellen zwei Vertreter der selektiven PDE4-Inhibitoren dar, welche in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Wirkung auf die endotheliale und epitheliale Barriere in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation untersucht wurden. Beide Substanzen sind selektiv für die PDE4, jedoch nicht-selektiv für einzelne Isotypen der PDE4. Während für Rolipram aktuell keine Zulassung für die klinische Anwendung existiert, findet Roflumilast bereits seit einigen Jahren klinische Anwendung in der Behandlung der COPD. Neben der Quantifizierung der Neutrophilenmigration und der Bestimmung von Zytokinkonzentrationen und mikrovaskulären Permeabilität, als Zeichen der Inflammation, wurden in dieser Arbeit auch die Auswirkungen eines inflammatorischen Stimulus auf die Expression der Isoenzyme B und D der PDE4 untersucht. Vor dem Hintergrund der Annahme, dass neben der PDE4B auch die PDE4D eine wichtige Rolle im Inflammationsgeschehen spielt, wurde neben der Genexpression in murinen Lungen auch die Verteilung der beiden Isoenzyme in humanen pulmonalen Epithelzellen untersucht.

Zytokine spielen durch verschiedenste Wirkungsmechanismen, eine wichtige Rolle bei der Auslösung einer Inflammationsreaktion. Sie führen zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen [73, 98] sowie von CD11/CD18 auf PMNs [105]. Des Weiteren steigern sie die Produktion reaktiver

Sauerstoffspezies [104] sowie Akuter-Phase-Proteine [99] und erhöhen die vaskuläre Permeabilität [102, 103]. Ein weiterer Effekt ist die chemotaktische Wirkung einiger Zytokine auf PMNs.

Zu einer gesteigerten Ausschüttung von Zytokinen kommt es beispielsweise infolge eines inflammatorischen Stimulus. Wang et al. stimulierten in ihrer Arbeit RAW 264.7 Makrophagen mit LPS [170]. Dies führte neben einem deutlichen Anstieg der TNF $\alpha$ -Ausschüttung auch zu einer vermehrten Sekretion von cAMP und NO sowie zu einer deutlich gesteigerten IL-6-Sekretion. Darüber hinaus konnten sie eine vermehrte Transkription von NF $\kappa$ B feststellen. Die Auswirkung von LPS auf die Sekretion von MIP-2/CXCL2 konnten Schmal et al. in ihrer Arbeit zeigen [171]. Nach LPS-Instillation an Rattenlungen kam es in deren Arbeit zu einer deutlichen Zunahme des MIP-2-Spiegels sowie der MIP-2-mRNA-Expression in der BAL. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in der murinen BAL nach LPS-Exposition ein deutlicher Anstieg der Zytokinspiegel beobachtet werden. Sowohl die Sekretion von TNF $\alpha$ , als auch von IL-6, KC (CXCL1) und MIP-2 (CXCL2) wurde durch LPS-Stimulation signifikant gesteigert. Während TNF $\alpha$  und IL-6 hauptsächlich die Neutrophilenadhäsion an das Endothel induzieren, indem sie die Anzahl der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 hochregulieren [98], fungieren CXCL1 (KC) und CXCL2/3 (MIP-2) überwiegend als potente Lockstoffe für PMNs [171, 172].

Durch genetische Ablation oder selektive Inhibition der Isoenzyme A, B, und D der PDE4 untersuchten Jin et al. [173] an murinen peritonealen Makrophagen, welches der Isoenzyme für die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion verantwortlich ist. Da sich durch genetische Ablation der PDE4B eine Reduktion der TNF $\alpha$ -Ausschüttung erzielen ließ, postulierten sie in ihrer Arbeit, dass an der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -Produktion lediglich die PDE4B beteiligt sei. Die IL-6-Sekretion blieb von der PDE4B unbeeinflusst. Mit dieser Thematik beschäftigten sich auch Suzuki et al. [169]. Sie verglichen Roflumilast als unselektiven PDE4-Inhibitor mit Compound A, einem selektiven PDE4B-Inhibitor, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf Neutrophilenmigration, TNF $\alpha$ -

Spiegel und gastrale Nebenwirkungen. Eine verzögerte Magenentleerung im Sinne gastraler Nebenwirkungen trat durch Roflumilast etwas ausgeprägter auf. Die Erhöhung der TNF $\alpha$ -Expression durch LPS-stimulierte murine Splenozyten wurde durch beide Substanzen effektiv gehemmt. Auch die Erhöhung des murinen Plasma-TNF $\alpha$ -Spiegels durch intravenöse Injektion von LPS konnte durch beide PDE-Inhibitoren reduziert werden. Anhand der hohen Selektivität des Compound A für die PDE4B kamen sie zu dem Ergebnis, dass die PDE4B und nicht die PDE4D für die LPS-stimulierte TNF $\alpha$ -Produktion verantwortlich sei. Die pulmonale Neutrophilie, gemessen anhand der Zellzahl in der BAL, konnte durch beide Substanzen reduziert werden. Dabei zeigte sich Roflumilast dem Compound A jedoch deutlich überlegen. Dass durch Compound A keine maximale Suppression der Neutrophilenmobilisation erreicht werden konnte, deutet darauf hin, dass nicht ausschließlich die PDE4B allein für den Prozess der Neutrophileninfiltration entscheidend ist. Demnach muss es ausser TNF $\alpha$  weitere Mediatoren geben, welche am komplexen Vorgang der Neutrophilenmigration beteiligt sind. Gestützt wird diese Vermutung durch eine weitere Arbeit von Suzuki [174]. Hier zeigte sich, dass eine durch IL8 induzierte chemotaktische Antwort Neutrophiler Granulozyten durch unselektive Inhibition der PDE4 gehemmt, durch selektive Hemmung der PDE4B jedoch nahezu nicht beeinflusst wird. Daraus schloss er, dass die PDE4B bei der chemotaktischen Antwort Neutrophiler Granulozyten eine untergeordnete Rolle spiele. Weder die Hemmung der PDE4B noch der PDE4D alleine scheinen also ausreichend zu sein, um eine effektive Unterdrückung der Inflammationsreaktion zu erreichen. Vielmehr scheinen beide Isotypen eigene, sich jedoch ergänzende wichtige Rollen im komplexen Vorgang der akuten Inflammationsreaktion zu besitzen.

Neben der Wirkung von Rolipram und Roflumilast auf die TNF $\alpha$ -Sekretion, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit auch mit dem Einfluss der beiden PDE4-Inhibitoren auf die Sekretion von CXCL1 (KC), CXCL2/3 (MIP-2) und IL-6. Sowohl der TNF $\alpha$ -Spiegel als auch die IL-6-Sekretion konnte durch Rolipram und Roflumilast signifikant gesenkt werden. Ein Unterschied zwischen den beiden PDE4-Inhibitoren ließ sich nicht ausmachen. Dies könnte eine mögliche

Erklärung für die fehlenden Unterschiede bezüglich der interstitiellen PMN-Zahlen im in vivo Migrationsversuch sein. Die Spiegel der vorwiegend chemotaktisch wirksamen CXCL1 (KC) und CXCL2/3 (MIP-2) konnten durch Rolipram und Roflumilast ebenfalls deutlich gesenkt werden. Im Hinblick auf den CXCL1-Spiegel (KC) zeigte sich Roflumilast in seiner Wirkung dem Rolipram jedoch überlegen. Während CXCL2/3 (MIP-2) und TNF $\alpha$  überwiegend von Alveolarmakrophagen [72, 175] und IL-6 überwiegend von Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert werden [91, 93, 176, 177], wird CXCL1 (KC) nicht nur von Neutrophilen, sondern auch von Epithelien gebildet [78, 172], was die entscheidende Rolle von PDE-Inhibitoren auf Epithelien verdeutlicht. Diese offensichtlich ausgeprägtere Wirkung des Roflumilast auf das Epithel zeigt sich zum einen in den niedrigeren CXCL1-Spiegeln der mit Roflumilast behandelten Tiere und erklärt zum anderen den im Vergleich zu Rolipram stärkeren Effekt auf die transepitheliale PMN-Migration im in vivo und in vitro Migrationsversuch. In der vorliegenden Arbeit ließ sich der IL-6-Spiegel sowohl durch Roflumilast, als auch durch Rolipram signifikant senken. Dieses Ergebnis steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den Ergebnissen von Jin et al. [173]. In deren Arbeit wurde jedoch lediglich die PDE4B durch Inhibition oder genetische Ablation gehemmt, wobei sich kein Einfluss auf die IL-6-Sekretion zeigte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die IL-6-Sekretion nicht, wie die TNF $\alpha$ -Sekretion, ausschließlich durch die PDE4B gesteuert wird, sondern einer Regulation durch den Isotyp D der PDE4 unterliegt.

Eine weitere entscheidende Rolle für die Funktion der epithelialen Barriere spielen zytoskelettale Umbauvorgänge. Durch Stimulation mit LPS kommt es zu einer Induktion von Stressfasern, welche die Migration Neutrophiler Granulozyten ermöglichen. Welche entscheidende Rolle der Reorganisation von Aktinfasern bei der pulmonalen Inflammation zukommt, zeigten Du et al in ihrer Arbeit [178]. Die F-Aktin-Reorganisation durch LPS-Stimulation von Monozyten führte zu einer vermehrten Sekretion von TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-8. Auch die Adhäsion Neutrophiler an endotheliale Zellen nahm nach Stimulation mit TNF $\alpha$  ebenfalls infolge einer F-Aktin-Reorganisation signifikant zu. Diese

Effekte konnten durch Cytochalasin B, einen Hemmstoff der Aktinfilament-synthese, gehemmt werden. Neben der Reduktion der Zytokin-Spiegel scheint ein weiterer möglicher Wirkmechanismus der PDE4-Inhibitoren also die Hemmung zytoskeletaler Umbauvorgänge zu sein. Zytoskeletale Umbauvorgänge finden jedoch nicht nur in Zellen des Immunsystems statt, wie Meliton et al. in ihrer Arbeit feststellten [179]. Pulmonale Endothelzellen wurden mit „heat killed gram positive“ Staph.aureus (HKSA) stimuliert, was zu einer Ausbildung von Aktin-Stressfasern und parazellulären Spalten führte. In der durchgeführten F-Aktin-Färbung an LPS-stimulierten humanen pulmonalen Epithelzellen zeigte sich ebenfalls eine deutliche Induktion der F-Aktin-Fasern durch Stimulation mit LPS. Die Behandlung mit Rolipram - und mit deutlich ausgeprägterem Effekt Roflumilast - führte zu einer signifikanten Reduktion der F-Aktin-Ausbildung. Dies verdeutlicht den entscheidenden stabilisierenden Effekt der PDE4-Inhibitoren auf die epitheliale Barriere. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls in der Histologie: Die Inhalation von LPS führte zu einer deutlichen Zunahme der Neutrophilenzahl im Lungengewebe sowie zu einer deutlichen Verdickung der Alveolarsepten mit Destruktion der Lungenarchitektur. Dieser Effekt konnte durch Rolipram und Roflumilast deutlich gehemmt werden. Zu diesem Ergebnis kamen auch Ma et al.[180]. Hier führte die medikamentöse oder genetische Blockade der PDE4B zu einer signifikanten Abnahme der Leukozyten-Infiltration und alveolären Destruktion nach intratrachealer LPS-Instillation.

Sowohl in vivo am Mausmodell als auch in vitro an humanen Pulmonal-epithelzellen, wurde eine deutliche Reduktion der Neutrophilenmigration über die alveolokapilläre Barriere durch Gabe von Rolipram oder Roflumilast erreicht. Diese setzt sich zum einen aus der endothelialen und zum anderen aus der epithelialen Barriere zusammen. Die Integrität der endothelialen Barriere, welche im Rahmen einer Inflammationsreaktion im Sinne eines Capillary leak geschädigt wird, wurde in unserem Setting durch die Extravasation des Farbstoffes Evans Blue repräsentiert.

Ein gesteigertes Capillary leak mit Übertritt von Blutbestandteilen in das pulmonale Interstitium durch Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität ist neben der Migration Neutrophiler Granulozyten ein weiteres Kennzeichen der pulmonalen Inflammation. Dies zeigten auch Reutershan et al. [51]. Hier führte die Inhalation von LPS zu einer signifikant gesteigerten Extravasation von Evans Blue ins Lungenparenchym. Auch im vorliegenden Setting führte die Inhalation von LPS zu einer deutlichen Zunahme des Evans-Blue-Übertritts ins Lungengewebe, was die Destruktion der endothelialen Barriere verdeutlicht. Durch die Gabe von Rolipram oder Roflumilast konnte die Extravasation von Evans Blue deutlich reduziert werden, wobei sich auch hier Roflumilast dem Rolipram in seiner Wirkung überlegen zeigte, was auf einen etwas stärkeren protektiven Effekt von Roflumilast auf die endotheliale Barriere schließen lässt. Ma et al. applizierten LPS intravasal und bestimmten, ebenfalls mittels Evans-Blue-markierten Albumins, die pulmonale mikrovaskuläre Permeabilität an C57BL/6-Mäusen [180]. Analog zu unseren Erkenntnissen führte die Applikation von LPS zu einer deutlich gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität. Dieser Effekt konnte durch gezieltes Knock-Out der PDE4B wirksam vermindert werden. Ein gezieltes Knock-Out der PDE4D wurde hier hinsichtlich seiner Wirkung auf die endotheliale Barriere nicht untersucht. Die Literatur deutet jedoch darauf hin, dass die PDE4B in Endothelzellen die entscheidende Rolle spielt, wohingegen der Isotyp D kaum vertreten ist. Zu dieser Erkenntnis kamen Thompson und Zhu in ihren Untersuchungen an „rat pulmonary microvascular endothelial cells“ RPMVECs [181, 182]. Die endotheliale Dysfunktion und die Neutrophilenmigration stellen beides Faktoren der pulmonalen Inflammation dar. Die Regulation dieser beiden Faktoren ist unterschiedlichen Mechanismen unterworfen, welche bislang nicht gänzlich verstanden sind.

Durch Inhalation von LPS kommt es zur zunehmenden Migration von PMN in Lungeninterstitium und Alveolarraum. Während die Anheftung Neutrophiler im Intravasalraum nach 4h ihr Maximum erreicht, zeigt sich bis zu 12h nach LPS-Inhalation eine Migration Neutrophiler Granulozyten in das Lungeninterstitium und über 24h eine konstante Migration Neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum, der Höchstwert an PMN in der BAL wird nach 24 Stunden

erreicht [51]. Analog zu diesem Modell von Reutershan et al. wurde in dieser Arbeit die Zellzahlbestimmung in Lungeninterstitium und Alveolarraum 24 Stunden nach LPS-Inhalation durchgeführt. Hierbei zeigte sich nach Applikation von Rolipram und Roflumilast eine deutlich verringerte Neutrophilenmigration in Interstitium und Alveolarraum. Zu diesem Ergebnis kamen auch Ariga et al. [159]. Hier wurden Mäuse, welche defizient für PDE4B oder -D waren, einer LPS-Inhalation ausgesetzt und die Zellzahlen in der BAL bestimmt. Sowohl die Defizienz für PDE4B als auch für PDE4D resultierte in einer reduzierten Zellzahl in der BAL. Die Applikation von Rolipram jedoch hatte einen stärkeren Effekt auf die Hemmung der PMN-Migration in den Alveolarraum als die Defizienz für den Isotypen PDE4B oder PDE4D allein, was Ariga zu der Annahme führt, dass die PDE4B und -D komplementäre Rollen bei der Kontrolle des PMN-Recruitments besitzen.

Zur Beurteilung der epithelialen Barriere wurde die Migration isolierter humaner PMNs entlang eines chemotaktischen Gradienten über einen Monolayer humaner pulmonaler Epithelzellen untersucht. Die Behandlung der PMNs mit Rolipram und Roflumilast konnte die Zahl migrierender PMNs vermindern. Eine alleinige Behandlung der Epithelzellen erwies sich ebenfalls als wirksam, die Neutrophilenmigration signifikant zu vermindern. Hierbei zeigte sich Roflumilast in niedrigeren Dosierungen als Rolipram wirksam. Die kombinierte Behandlung beider Komponenten, sowohl der PMNs als auch der Epithelzellen, zeigte den größten Effekt. Mit einer kombinierten Behandlung konnte durch alle Dosierungen eine signifikante Verminderung der Neutrophilenmigration erreicht werden. Betrachtet man die PMN-Zahlen im Differenzialblutbild, fällt nach Inhalation von LPS ein deutlicher Anstieg der Zellzahlen, sowohl der stabkernigen als auch der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, im peripheren Blut auf. Die Inhalation von LPS scheint also schon innerhalb kurzer Zeit zu einer Mobilisierung Neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark zu führen. Der steile Anstieg der Zahl unreifer stabkerniger Neutrophiler deutet auf einen erhöhten Verbrauch reifer Neutrophiler Granulozyten hin.

Die Behandlung mit Rolipram und Roflumilast eine Stunde nach LPS-Inhalation scheint eine weitere Neutrophilen-Mobilisation wirksam zu unterdrücken. Zwei Stunden nach LPS-Inhalation erreichten die Zellzahlen stabkerniger und segmentkerniger Neutrophiler im peripheren Blut der Kontrollgruppe ihren Maximalwert, danach kam es in allen Gruppen zu einem stetigen Abfall der Zellzahl, bis nach 24 Stunden in allen Gruppen nahezu wieder der Ausgangswert erreicht war. Dies spricht für einen über Stunden anhaltenden kontinuierlichen Verbrauch von PMNs. Die sofort nach LPS-Inhalation einsetzende Mobilisation von Granulozyten aus dem Knochenmark ins periphere Blut könnte die fehlende Verringerung der intravasalen Neutrophilenakkumulation durch PDE4-Inhibition im in vivo Migrationsversuch erklären. Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit der Literatur ist schwierig. Unser Setting basiert auf der Auslösung einer lokalen Inflammationsreaktion durch Inhalation von bakteriellem LPS, wohingegen in anderen Versuchsaufbauten die Neutrophilen-Zahlen im peripheren Blut von Mäusen unter der Voraussetzung einer systemischen Entzündungsreaktion getestet wurden. Arnardottir et al. beispielsweise untersuchten die Zellzahlen Neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut nach systemischer, intraperitonealer Applikation von LPS [183]. Dort zeigte sich, im Gegensatz zu den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit, eine Abnahme der zirkulierenden Neutrophilen.

Die entscheidende Rolle, welche die PDE4 und der intrazelluläre cAMP-Spiegel bei der Entstehung der akuten pulmonalen Inflammation spielen, konnte in dieser Arbeit anhand des Transkriptionslevels und der Phosphodiesterase-Aktivität demonstriert werden. Die Stimulation mit LPS führte zu einer signifikanten Zunahme der Transkription beider PDE4-Isoenzyme B und D in murinen Lungen. Auf die Transkription der PDE4D hatte die Behandlung mit PDE4-Inhibitoren keinen Einfluss, die Transkription der PDE4B nach Stimulation mit LPS konnte jedoch durch Rolipram und stärker noch durch Roflumilast signifikant reduziert werden. Des Weiteren konnten die Verteilung der Isotypen B und D in humanen pulmonalen Epithelzellen in vitro veranschaulicht werden. Auch hier kam es in diesem Setting durch Stimulation

mit LPS zu einer deutlichen Zunahme der PDE4B und D. Wie im in vivo Versuch an der Maus, hatte auch in humanem Pulmonalepithel die Applikation der PDE4-Inhibitoren lediglich eine inhibitorische Wirkung auf die Expression der PDE4B, wohingegen die PDE4D-Expression unbeeinflusst blieb. Nachdem sich die PDE4D-Expression unbehandelter Tiere bzw. Epithelzellen nach LPS-Stimulation nicht von der behandelten Tiere/Epithelzellen unterscheidet, wird vermutet, dass der stärkere stabilisierende Effekt, den Roflumilast verglichen mit Rolipram auf pulmonales Epithel zeigte, möglicherweise auf eine stärkere Inhibition der PDE4B zurückzuführen sein könnte. Diese Ergebnisse zeigten eine Transkriptionssteigerung für beide untersuchten PDE4-Isotypen B und D. Im Gegensatz hierzu führte eine in einer Arbeit von Komatsu durchgeführte durch nontypeable haemophilus influenzae (NTHi) stimulierte Inflammationsreaktion lediglich zu einer gesteigerten Expression der PDE4B in murinen Lungen [184]. Die PDE4D-Expression blieb hier unbeeinflusst. Allerdings wirkt LPS über den TLR4-Signalweg, NTHi über den TLR2-Signalweg, was eine mögliche Erklärung für die fehlende Transkriptionssteigerung der PDE4D in der Arbeit von Komatsu sein könnte. Gobejishvili et al. stimulierten Kupffer-Zellen, welche spezialisierte Makrophagen des Lebergewebes darstellen, mit LPS [185]. Dabei stellten sie eine gesteigerte Expression der PDE4B fest. Die Expression der PDE4D blieb unverändert. Die Stimulation hepatischer Sternzellen, auch Ito-Zellen genannt, welche nicht-parenchymatöse Zellen des Lebergewebes sind, führte jedoch zu einer Hochregulation der Transkription der PDE4-Isotypen A, B und D. Die Unterschiede, welche sich hinsichtlich der Beeinflussung der PDE4D-Expression zeigen, können vielfältige Ursachen haben. Zum einen sei der auslösende Signalweg als möglicher Faktor genannt, welcher zur Inflammation und in deren Folge zur Transkriptionssteigerung der PDE-Isoenzyme führt. Verschiedene Stimuli agieren über verschiedene Signalwege: LPS beispielsweise, wie oben erwähnt, über den TLR4-Signalweg, NTHi hingegen über den TLR2-Signalweg. Einen weiteren Faktor stellt der Zelltyp dar, der dem inflammatorischen Stimulus ausgesetzt wird. In diesem Setting konnte eine Transkriptionssteigerung an homogenisiertem murinem Lungengewebe festgestellt werden, welches eine Vielzahl unterschiedlicher

Zelltypen, wie parenchymatöse sowie Zellen des Immunsystems enthält. Hansen postulierte in seiner Arbeit, in welcher er die PDE-Aktivität in murinem Lungengewebe bestimmte, dass die PDE4D den dominanten Isotypen im Lungengewebe darstellt [186]. Auch in humanen pulmonalen Epithelzellen scheint die PDE4D der dominierende Isotyp zu sein [187]. In Neutrophilen Granulozyten hingegen, so fanden Wang et al. heraus, ist nahezu ausschließlich der Isotyp B der PDE4 exprimiert [150]. Dieser kann weder durch LPS-Stimulation induziert, noch durch Transkriptioninhibitoren supprimiert werden. In Monozyten hingegen verhält sich die PDE4B als typisches induzierbares Gen. Demnach scheint die inflammatorische Induktion der Phosphodiesterasen von mehreren Faktoren, wie unter anderem der Art des inflammatorischen Stimulus und des Zelltyps, abhängig zu sein.

Ein weiterer Punkt scheint die räumliche Verteilung der Phosphodiesterasen innerhalb einzelner Zellen zu sein. Mit dieser Thematik beschäftigte sich Barnes in seiner Arbeit [187]. Er untersuchte neben dem Anteil der PDE4D an der Gesamtaktivität der PDE die räumliche Verteilung der PDE4D in humanen Epithelzellen. Die genaue Lokalisierung der einzelnen PDEs innerhalb einer Zelle scheint eine Zelle in funktionelle Einheiten zu unterteilen und individuelle zelluläre Funktionen zu ermöglichen. Letztendlich ist der Mechanismus dieser subzellulären Organisation jedoch bisher nicht gänzlich verstanden. Die Regulation des intrazellulären cAMP-Haushaltes durch Phosphodiesterasen unterliegt scheinbar einer fein regulierten, komplexen Steuerung, welche sowohl von der Art der Inflammation als auch vom Zelltyp und der subzellulären Organisation funktioneller Einheiten innerhalb einer Zelle abhängig zu sein scheint [150, 187, 188]. Die genauere Erforschung dieser Regulationsmechanismen könnte als Gegenstand weiterer Forschungen dienen, um die zugrundeliegenden Mechanismen und daraus resultierende Möglichkeiten medizinischen Eingreifens besser zu verstehen.

## 5 Zusammenfassung

Diese Arbeit verdeutlicht anhand eines LPS-induzierten Modells der akuten pulmonalen Inflammation die entscheidende Rolle der Phosphodiesterase 4 auf die endotheliale und epitheliale Barriere in der akuten pulmonalen Inflammation. Während inflammatorischer Prozesse kommt es zu einer gesteigerten Expression von Phosphodiesterasen und damit zur hydrolytischen Spaltung von cAMP mit einem konsekutiven Absinken des intrazellulären cAMP-Spiegels. Diese gesteigerte Expression der Phosphodiesterasen konnte für die PDE4-Isotypen B und D durch Stimulation mit LPS im Mausmodell mittels PCR gezeigt werden. Auch an LPS-stimulierten humanen pulmonalen Epithelzellen ließ sich fluoreszenzmikroskopisch dieser Effekt darstellen. Die Inhibition der Phosphodiesterase 4 durch Rolipram und Roflumilast zeigte im vorliegenden Setting einen stabilisierenden Effekt auf die endotheliale und epitheliale Barriere mit einer Reduktion der Migration Neutrophiler Granulozyten über die alveolokapilläre Barriere in vivo und in vitro. Auch die für die Inflamationsreaktion typische Erhöhung der Mikrovaskulären Permeabilität im Sinne eines Capillary leak konnte in diesem Setting durch Inhibition der PDE4 signifikant vermindert werden. Die Expression der proinflammatorisch wirksamen PDE4B konnte durch Rolipram und Roflumilast deutlich reduziert werden, wohingegen der Effekt der beiden PDE4-Inhibitoren auf die Expression der hauptsächlich emetisch wirksamen PDE4D gering war. Da der antiinflammatorische Effekt der PDE4-Inhibitoren sowohl im in-vivo-Versuch an der Maus als auch im in-vitro-Versuch an humanen Pulmonalepithelzellen induziert werden konnte, scheint eine Übertragbarkeit unserer Erkenntnisse auf den Menschen gegeben zu sein. Für klinisch besonders bedeutsam kann die Tatsache erachtet werden, dass sich die Applikation der PDE4-Inhibitoren im vorliegenden Setting selbst nach Induktion der Inflammation mittels LPS als wirksam erwies. Auch die topische Applikation in Form einer inhalativen Gabe von Rolipram und Roflumilast erwies sich im Mausmodell als gleichermaßen wirksam wie die systemische Applikation. Dies stellt möglicherweise eine alternative Applikationsform mit der Chance, systemische Nebenwirkungen zu

reduzieren, dar. Die Inhibition der PDE4 bietet somit neue mögliche Ansatzpunkte für die Erforschung von Therapieoptionen des ARDS.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AC	Adenylatcyclase
AECC	American-European Consensus Conference
ALI	Acute Lung Injury
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF-2	B-cell stimulating factor 2
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	C-C motiv ligand
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA, Komplementäre DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	Cyklisches Guanosinmonophosphat
CNG	Cyclic nucleotide-gated Ion-channels
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	C-X-C-Motiv Ligand
CXCR	C-X-C Motiv Receptor, Chemokin-Rezeptor
DAB	Diaminobenzidine
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline
ECM	Extrazellulärmatrix

ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ELAM	Endothelial-Leukocyte-Adhesion Molecule
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Epac	Exchange Protein Directly Activated by cAMP
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
FSGO	Fish Skin Gelatine Oil
GAG	Glykosaminoglykane
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating Factor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte-colony-stimulating factor
GMP	Guanosinmonophosphat
GRO	Growth Regulated Oncogene
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, 2-Ethansulfonsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
IL	Interleukin
KC	Keratinocyte-derived Protein
KDO	Ketodesoxyoctulusonsäure
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	Macrophage-1 Antigen
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MDNCF	Monocyte-derived Neutrophil Chemotactic Factor

MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2
MMP	Matrixmetalloproteinase
MONAP	Monocyte-derived Neutrophil Activating Peptide
NAF	Neutrophil-activating Factor
NAP-1	Neutrophil-activating Protein 1
NFW	Nukleotidfreies Wasser
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Normal Rabbit Serum
PAF	Platelet Activating Factor, Plättchenaktivierender Faktor
PaO <sub>2</sub>	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate-Buffered Saline, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PEEP	Positive End-Expiratory Pressure
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PGE	Prostaglandin E
PKA	Proteinkinase A
PMN	Polymorphonuclear Leukocyte, Neutrophile Granulozyten
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphatrest
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
Rap1	Ras-related Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction, Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
SSC	Side Scatter
TLR	Toll-like Receptor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der LPS-Erkennung durch Makrophagen
- Abbildung 1.2 Schematische Darstellung von Transzytose und Präsentation von Zytokinen auf endothelialen Zellen
- Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Neutrophilenadhäsion an das Kapillarendothel
- Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Neutrophilenmigration durch Endothel und Epithel in den Alveolarraum
- Abbildung 1.5. Synthese von cAMP aus ATP unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes
- Abbildung 2.1 Vernebelungskammer zur Inhalation von LPS bzw. NaCl 0,9%
- Abbildung 2.2 Auswahl und Auswertung einer Zellpopulation in der Durchflusszytometrie
- Abbildung 2.3 Schematische Darstellung eines Double-Antibody-Sandwich ELISA
- Abbildung 3.1 Migration neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Rolipram-Dosierung
- Abbildung 3.2 Migration neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Roflumilast-Dosierung
- Abbildung 3.3 Optimaler Applikationszeitpunkt von Rolipram
- Abbildung 3.4 Optimaler Applikationszeitpunkt von Roflumilast
- Abbildung 3.5 Einfluss von Rolipram und Roflumilast auf die PMN-Migration
- Abbildung 3.6 PMN-Migration in die Lunge unter Verwendung verschiedener Applikationsformen von Rolipram und Roflumilast
- Abbildung 3.7 Native Lungen 30min nach intravenöser Injektion des Farbstoffs Evans Blue

- Abbildung 3.8 Einfluss von Rolipram und Roflumilast auf die mikrovaskuläre Permeabilität
- Abbildung 3.9 Reduktion der Zytokinkonzentration in BAL durch Rolipram und Roflumilast
- Abbildung 3.10 Genexpression und Proteingehalt der PDE4B in Lungen behandelte und unbehandelte Tiere
- Abbildung 3.11 Genexpression und Proteingehalt der PDE4D in Lungen behandelte und unbehandelte Tiere
- Abbildung 3.12 Einfluss von Rolipram und Roflumilast auf die PDE-Aktivität in murinem Lungengewebe mit und ohne inflammatorischen Stimulus
- Abbildung 3.13 Immunhistochemische Darstellung der PMN-Infiltration der Lunge nach Gabe von PDE4-Inhibitoren
- Abbildung 3.14 zeitlicher Verlauf des Gehalts Segmentkerniger neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut behandelte und unbehandelte Tiere zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 6h, 12h und 24h nach Inhalation von LPS bzw. NaCl 0,9%
- Abbildung 3.15 zeitlicher Verlauf des Gehalts Stabkerniger neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut behandelte und unbehandelte Tiere zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 6h, 12h und 24h nach Inhalation von LPS bzw. NaCl 0,9%
- Abbildung 3.16 PMN-Migration über einen H441-Monolayer nach Vorbehandlung der PMNs mit Rolipram oder Roflumilast
- Abbildung 3.17 PMN-Migration über einen H441-Monolayer nach Vorbehandlung des Epithels mit Rolipram oder Roflumilast
- Abbildung 3.18 PMN-Migration über einen H441-Monolayer nach Vorbehandlung von PMNs und Epithel mit Rolipram oder Roflumilast
- Abbildung 3.19 Wirkung der PDE4-Inhibitoren auf den zytoskelettalen Umbau von H441-Zellen
- Abbildung 3.20 Einfluss der PDE4-Inhibitoren auf den PDE4B-Gehalt humaner H441-Zellen nach inflammatorischer Stimulation
- Abbildung 3.21 Einfluss der PDE4-Inhibitoren auf den PDE4D-Gehalt humaner H441-Zellen nach inflammatorischer Stimulation

Abbildung 3.22 Verteilung der PDE4B und PDE4D in humanen H441-Zellen

Abbildung 3.23 Effekt der Inflammation auf die Verteilung der PDE4-Isotypen in humanen H441-Zellen

## **8 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1 Risiken, die zu einem ARDS führen können

Tabelle 1.2 Maßnahmen zur supportiven Therapie des ARDS

Tabelle 1.3 Vorrangig exprimierte PDE-Isoenzyme einzelner Leukozytenspezies

## 9 Literaturverzeichnis

1. Ashbaugh, D.G., et al., *Acute respiratory distress in adults*. Lancet, 1967. **2**(7511): p. 319-23.
2. Bernard, G.R., et al., *Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination*. The Consensus Committee. Intensive Care Med, 1994. **20**(3): p. 225-32.
3. Force, A.D.T., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. JAMA, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
4. Ferguson, N.D., et al., *The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material*. Intensive Care Med, 2012. **38**(10): p. 1573-82.
5. Bersten, A.D., et al., *Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(4): p. 443-8.
6. Arroliga, A.C., et al., *Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio*. Chest, 2002. **121**(6): p. 1972-6.
7. Linko, R., et al., *Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALI: a prospective cohort study*. Intensive Care Med, 2009. **35**(8): p. 1352-61.
8. Luhr, O.R., et al., *Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(6): p. 1849-61.
9. Brun-Buisson, C., et al., *Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study*. Intensive Care Med, 2004. **30**(1): p. 51-61.
10. Rubenfeld, G.D., et al., *Incidence and outcomes of acute lung injury*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1685-93.
11. Goss, C.H., et al., *Incidence of acute lung injury in the United States*. Crit Care Med, 2003. **31**(6): p. 1607-11.
12. Zambon, M. and J.L. Vincent, *Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time*. Chest, 2008. **133**(5): p. 1120-7.
13. MacCallum, N.S. and T.W. Evans, *Epidemiology of acute lung injury*. Curr Opin Crit Care, 2005. **11**(1): p. 43-9.
14. Erickson, S.E., et al., *Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005*. Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1574-9.
15. Nuckton, T.J., et al., *Pulmonary dead-space fraction as a risk factor for death in the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2002. **346**(17): p. 1281-6.
16. Liu, K.D., et al., *Predictive and pathogenetic value of plasma biomarkers for acute kidney injury in patients with acute lung injury*. Crit Care Med, 2007. **35**(12): p. 2755-61.
17. Cooke, C.R., et al., *Predictors of hospital mortality in a population-based cohort of patients with acute lung injury*. Crit Care Med, 2008. **36**(5): p. 1412-20.
18. Brown, L.M., et al., *A simple classification model for hospital mortality in patients with acute lung injury managed with lung protective ventilation*. Crit Care Med, 2011. **39**(12): p. 2645-51.

19. Ely, E.W., et al., *Recovery rate and prognosis in older persons who develop acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. *Ann Intern Med*, 2002. **136**(1): p. 25-36.
20. Herridge, M.S., et al., *One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(8): p. 683-93.
21. Hopkins, R.O., et al., *Two-year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(4): p. 340-7.
22. Adhikari, N.K., et al., *Self-reported symptoms of depression and memory dysfunction in survivors of ARDS*. *Chest*, 2009. **135**(3): p. 678-87.
23. W. Böcker, H.D., P.U. Heitz, H. Moch, *Pathologie 4.Auflage*. 2008, München: Urban & Fischer bei Elsevier.
24. Meduri, G.U., *The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment*. *Eur Respir J*, 1996. **9**(12): p. 2650-70.
25. Bachofen, M. and E.R. Weibel, *Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia*. *Am Rev Respir Dis*, 1977. **116**(4): p. 589-615.
26. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
27. Pratt, P.C., et al., *Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. I. Light microscopy*. *Am J Pathol*, 1979. **95**(1): p. 191-214.
28. Folkesson, H.G., et al., *Upregulation of alveolar epithelial fluid transport after subacute lung injury in rats from bleomycin*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(3 Pt 1): p. L478-90.
29. Uhal, B.D., *Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(6 Pt 1): p. L1031-45.
30. Dobbs, L.G., et al., *Secretion of surfactant by primary cultures of alveolar type II cells isolated from rats*. *Biochim Biophys Acta*, 1982. **713**(1): p. 118-27.
31. Matthay, M.A. and J.P. Wiener-Kronish, *Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans*. *Am Rev Respir Dis*, 1990. **142**(6 Pt 1): p. 1250-7.
32. Wang, Y., et al., *Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy*. *J Appl Physiol* (1985), 1999. **87**(5): p. 1852-60.
33. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**(6): p. 1376-83.
34. Tomashefski, J.F., Jr., et al., *The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome*. *Am J Pathol*, 1983. **112**(1): p. 112-26.
35. Snow, R.L., et al., *Pulmonary vascular remodeling in adult respiratory distress syndrome*. *Am Rev Respir Dis*, 1982. **126**(5): p. 887-92.
36. Klose, R. and P.M. Osswald, *Effects of PEEP on pulmonary mechanics and oxygen transport in the late stages of acute pulmonary failure*. *Intensive Care Med*, 1981. **7**(4): p. 165-70.

37. Matamis, D., et al., *Total respiratory pressure-volume curves in the adult respiratory distress syndrome*. Chest, 1984. **86**(1): p. 58-66.
38. Duggal, A., et al., *Pharmacological treatments for acute respiratory distress syndrome: systematic review*. Minerva Anestesiol, 2015. **81**(5): p. 567-88.
39. Spragg, R.G., et al., *Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2004. **351**(9): p. 884-92.
40. Papazian, L., et al., *Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2010. **363**(12): p. 1107-16.
41. Needham, C.J. and P.G. Brindley, *Best evidence in critical care medicine: The role of neuromuscular blocking drugs in early severe acute respiratory distress syndrome*. Can J Anaesth, 2012. **59**(1): p. 105-8.
42. Needham, D.M., et al., *Lung protective mechanical ventilation and two year survival in patients with acute lung injury: prospective cohort study*. BMJ, 2012. **344**: p. e2124.
43. Park, S.Y., et al., *The efficacy and safety of prone positioning in adults patients with acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials*. J Thorac Dis, 2015. **7**(3): p. 356-67.
44. Sud, S., et al., *Effect of prone positioning during mechanical ventilation on mortality among patients with acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis*. CMAJ, 2014. **186**(10): p. E381-90.
45. Guerin, C., et al., *Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2013. **368**(23): p. 2159-68.
46. National Heart, L., et al., *Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury*. N Engl J Med, 2006. **354**(24): p. 2564-75.
47. Dzierba, A.L., et al., *A review of inhaled nitric oxide and aerosolized epoprostenol in acute lung injury or acute respiratory distress syndrome*. Pharmacotherapy, 2014. **34**(3): p. 279-90.
48. Raetz, C.R., *Biochemistry of endotoxins*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 129-70.
49. Thorn, J., *The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review*. Inflamm Res, 2001. **50**(5): p. 254-61.
50. Maris, N.A., et al., *Antiinflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(7): p. 878-84.
51. Reutershan, J., et al., *Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(5): p. L807-15.
52. Basit, A., et al., *ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(2): p. L200-7.
53. Jeyaseelan, S., et al., *Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 7247-56.
54. Haziot, A., et al., *The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage*. J Immunol, 1988. **141**(2): p. 547-52.

55. Haziot, A., B.Z. Tsuberi, and S.M. Goyert, *Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5556-65.
56. Simmons, D.L., et al., *Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein*. Blood, 1989. **73**(1): p. 284-9.
57. Bazil, V., et al., *Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen*. Eur J Immunol, 1986. **16**(12): p. 1583-9.
58. Bazil, V., et al., *Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14*. Mol Immunol, 1989. **26**(7): p. 657-62.
59. Frey, E.A., et al., *Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1665-71.
60. Hailman, E., et al., *Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 269-77.
61. Akashi, S., et al., *Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3471-5.
62. Armstrong, L., et al., *Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(2): p. 241-5.
63. Droemann, D., et al., *Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients*. Respir Res, 2005. **6**: p. 68.
64. Palsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. Immunology, 2004. **113**(2): p. 153-62.
65. Thorley, A.J., et al., *Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 463-73.
66. Chaudhuri, A., et al., *Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs*. Blood, 1997. **89**(2): p. 701-12.
67. Neote, K., et al., *Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor*. Blood, 1994. **84**(1): p. 44-52.
68. Kuschert, G.S., et al., *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. Biochemistry, 1999. **38**(39): p. 12959-68.
69. Hoogewerf, A.J., et al., *Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines*. Biochemistry, 1997. **36**(44): p. 13570-8.
70. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.
71. Aggarwal, B.B., et al., *Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization*. J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2345-54.
72. Bachwich, P.R., et al., *Tumor necrosis factor production by human sarcoid alveolar macrophages*. Am J Pathol, 1986. **125**(3): p. 421-5.

73. Gamble, J.R., et al., *Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8667-71.
74. Detmar, M., et al., *Cytokine regulation of proliferation and ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro*. J Invest Dermatol, 1992. **98**(2): p. 147-53.
75. Ming, W.J., L. Bersani, and A. Mantovani, *Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes*. J Immunol, 1987. **138**(5): p. 1469-74.
76. Bachwich, P.R., et al., *Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **136**(1): p. 94-101.
77. Libby, P., et al., *Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells*. Am J Pathol, 1986. **124**(2): p. 179-85.
78. Becker, S., et al., *Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. L278-86.
79. Nawroth, P.P. and D.M. Stern, *Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1986. **163**(3): p. 740-5.
80. Tracey, K.J., et al., *Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia*. Nature, 1987. **330**(6149): p. 662-4.
81. Tracey, K.J., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog*. Surg Gynecol Obstet, 1987. **164**(5): p. 415-22.
82. Perlmutter, D.H., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression*. J Clin Invest, 1986. **78**(5): p. 1349-54.
83. Warner, S.J., K.R. Auger, and P. Libby, *Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells*. J Immunol, 1987. **139**(6): p. 1911-7.
84. Warner, S.J., K.R. Auger, and P. Libby, *Human interleukin 1 induces interleukin 1 gene expression in human vascular smooth muscle cells*. J Exp Med, 1987. **165**(5): p. 1316-31.
85. Seelentag, W.K., et al., *Additive effects of interleukin 1 and tumour necrosis factor-alpha on the accumulation of the three granulocyte and macrophage colony-stimulating factor mRNAs in human endothelial cells*. EMBO J, 1987. **6**(8): p. 2261-5.
86. Schleef, R.R., et al., *Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor*. J Biol Chem, 1988. **263**(12): p. 5797-803.
87. Bevilacqua, M.P., et al., *Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9238-42.
88. Van Damme, J., et al., *Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma*

- growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor.* J Exp Med, 1987. **165**(3): p. 914-9.
89. Dejana, E., et al., *Modulation of endothelial cell functions by different molecular species of interleukin 1.* Blood, 1987. **69**(2): p. 695-9.
  90. Bussolino, F., et al., *Interleukin 1 stimulates platelet-activating factor production in cultured human endothelial cells.* J Clin Invest, 1986. **77**(6): p. 2027-33.
  91. Helfgott, D.C., et al., *Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts.* J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1300-9.
  92. May, L.T., D.C. Helfgott, and P.B. Sehgal, *Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(23): p. 8957-61.
  93. Horii, Y., et al., *Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells.* J Immunol, 1988. **141**(5): p. 1529-35.
  94. Noma, T., et al., *Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines.* Immunol Lett, 1987. **15**(3): p. 249-53.
  95. Garman, R.D., et al., *B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7629-33.
  96. Okada, M., et al., *IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells.* J Immunol, 1988. **141**(5): p. 1543-9.
  97. Hirano, T., et al., *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.* Nature, 1986. **324**(6092): p. 73-6.
  98. Zhang, J., et al., *Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils.* PLoS One, 2011. **6**(1): p. e14525.
  99. Castell, J.V., et al., *Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes.* FEBS Lett, 1988. **232**(2): p. 347-50.
  100. Yoshimura, T., et al., *Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9233-7.
  101. Larsen, C.G., et al., *The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes.* Science, 1989. **243**(4897): p. 1464-6.
  102. Fukumoto, T., et al., *IL-8 is an essential mediator of the increased delayed-phase vascular permeability in LPS-induced rabbit pleurisy.* J Leukoc Biol, 1998. **63**(5): p. 584-90.
  103. Biffl, W.L., et al., *Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils.* J Trauma, 1995. **39**(1): p. 98-102; discussion 102-3.
  104. Thelen, M., et al., *Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist.* FASEB J, 1988. **2**(11): p. 2702-6.

105. Detmers, P.A., et al., *Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils*. J Exp Med, 1990. **171**(4): p. 1155-62.
106. Matsushima, K., et al., *Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1988. **167**(6): p. 1883-93.
107. Schroder, J.M. and E. Christophers, *Secretion of novel and homologous neutrophil-activating peptides by LPS-stimulated human endothelial cells*. J Immunol, 1989. **142**(1): p. 244-51.
108. Strieter, R.M., et al., *Monokine-induced gene expression of a human endothelial cell-derived neutrophil chemotactic factor*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **156**(3): p. 1340-5.
109. Koelink, P.J., et al., *Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review*. Pharmacol Ther, 2012. **133**(1): p. 1-18.
110. Bozic, C.R., et al., *The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29355-8.
111. Reutershan, J., et al., *Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 695-702.
112. Doerschuk, C.M., et al., *Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung*. J Appl Physiol (1985), 1993. **74**(6): p. 3040-5.
113. Motosugi, H., et al., *Changes in neutrophil actin and shape during sequestration induced by complement fragments in rabbits*. Am J Pathol, 1996. **149**(3): p. 963-73.
114. Laszik, Z., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells*. Blood, 1996. **88**(8): p. 3010-21.
115. Norman, K.E., et al., *Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1*. Blood, 1995. **86**(12): p. 4417-21.
116. Furie, M.B., M.C. Tancinco, and C.W. Smith, *Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro*. Blood, 1991. **78**(8): p. 2089-97.
117. Marlin, S.D. and T.A. Springer, *Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)*. Cell, 1987. **51**(5): p. 813-9.
118. Del Maschio, A., et al., *Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions*. J Cell Biol, 1996. **135**(2): p. 497-510.
119. Wang, Q. and C.M. Doerschuk, *Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6487-94.

120. Ginzberg, H.H., et al., *Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(3): p. G705-17.
121. Steinberg, J., et al., *Metalloproteinase inhibition reduces lung injury and improves survival after cecal ligation and puncture in rats*. J Surg Res, 2003. **111**(2): p. 185-95.
122. Nusrat, A., et al., *Neutrophil migration across model intestinal epithelia: monolayer disruption and subsequent events in epithelial repair*. Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1489-500.
123. Nash, S., J. Stafford, and J.L. Madara, *Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers*. J Clin Invest, 1987. **80**(4): p. 1104-13.
124. Doeing, D.C., J.L. Borowicz, and E.T. Crockett, *Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods*. BMC Clin Pathol, 2003. **3**(1): p. 3.
125. Korchak, H.M. and G. Weissmann, *Changes in membrane potential of human granulocytes antecede the metabolic responses to surface stimulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(8): p. 3818-22.
126. Whitin, J.C., et al., *Correlation between membrane potential changes and superoxide production in human granulocytes stimulated by phorbol myristate acetate. Evidence for defective activation in chronic granulomatous disease*. J Biol Chem, 1980. **255**(5): p. 1874-8.
127. Lazzari, K.G., P.J. Proto, and E.R. Simons, *Simultaneous measurement of stimulus-induced changes in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and in membrane potential of human neutrophils*. J Biol Chem, 1986. **261**(21): p. 9710-3.
128. Korchak, H.M., et al., *Stimulus response coupling in the human neutrophil. Differential requirements for receptor occupancy in neutrophil responses to a chemoattractant*. J Biol Chem, 1984. **259**(12): p. 7439-45.
129. Smith, J.A., *Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(6): p. 672-86.
130. Selinger, Z., *Discovery of G protein signaling*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 1-13.
131. Litvin, T.N., et al., *Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 15922-6.
132. Rubin, C.S., *A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1224**(3): p. 467-79.
133. Bear, C.E., et al., *Cl<sup>-</sup> channel activity in Xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19142-5.
134. Fang, X., et al., *Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung*. J Gen Physiol, 2002. **119**(2): p. 199-207.
135. Sakuma, T., et al., *Alveolar fluid clearance in the resected human lung*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(2): p. 305-10.
136. Gonzalez, G.A. and M.R. Montminy, *Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133*. Cell, 1989. **59**(4): p. 675-80.

137. Avni, D., et al., *Role of CREB in modulation of TNFalpha and IL-10 expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages*. Mol Immunol, 2010. **47**(7-8): p. 1396-403.
138. Eliopoulos, A.G., et al., *Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals*. EMBO J, 2002. **21**(18): p. 4831-40.
139. Chen, D. and E.V. Rothenberg, *Interleukin 2 transcription factors as molecular targets of cAMP inhibition: delayed inhibition kinetics and combinatorial transcription roles*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 931-42.
140. Neumann, M., et al., *RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A*. EMBO J, 1995. **14**(9): p. 1991-2004.
141. Kaupp, U.B. and R. Seifert, *Cyclic nucleotide-gated ion channels*. Physiol Rev, 2002. **82**(3): p. 769-824.
142. Ponsioen, B., et al., *Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator*. EMBO Rep, 2004. **5**(12): p. 1176-80.
143. de Rooij, J., et al., *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP*. Nature, 1998. **396**(6710): p. 474-7.
144. Katagiri, K., et al., *Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 1956-69.
145. Bender, A.T. and J.A. Beavo, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 488-520.
146. Yougbare, I., et al., *NCS 613, a potent and specific PDE4 inhibitor, displays anti-inflammatory effects on human lung tissues*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(4): p. L441-50.
147. Nielson, C.P., et al., *Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst*. J Allergy Clin Immunol, 1990. **86**(5): p. 801-8.
148. Tenor, H., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme activities in human alveolar macrophages*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(7): p. 625-33.
149. Tenor, H., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases from purified human CD4+ and CD8+ T lymphocytes*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(7): p. 616-24.
150. Wang, P., et al., *Phosphodiesterase 4B2 is the predominant phosphodiesterase species and undergoes differential regulation of gene expression in human monocytes and neutrophils*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(1): p. 170-4.
151. Bessler, H., et al., *Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells*. J Leukoc Biol, 1986. **40**(6): p. 747-54.
152. Au, B.T., et al., *Effect of PDE4 inhibitors on zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils: synergism with prostanoids and salbutamol*. Br J Pharmacol, 1998. **123**(6): p. 1260-6.

153. Derian, C.K., et al., *Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 308-17.
154. Harvath, L., et al., *cAMP and human neutrophil chemotaxis. Elevation of cAMP differentially affects chemotactic responsiveness*. J Immunol, 1991. **146**(1): p. 224-32.
155. Ledbetter, J.A., et al., *Antibody binding to CD5 (Tp67) and Tp44 T cell surface molecules: effects on cyclic nucleotides, cytoplasmic free calcium, and cAMP-mediated suppression*. J Immunol, 1986. **137**(10): p. 3299-305.
156. Skalhegg, B.S., et al., *Cyclic AMP-dependent protein kinase type I mediates the inhibitory effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on cell replication in human T lymphocytes*. J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 15707-14.
157. Abrahamsen, H., et al., *TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 4847-58.
158. Jin, S.L. and M. Conti, *Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7628-33.
159. Ariga, M., et al., *Nonredundant function of phosphodiesterases 4D and 4B in neutrophil recruitment to the site of inflammation*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7531-8.
160. Robichaud, A., et al., *Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha(2)-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioral correlate of emesis*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 1045-52.
161. Schick, M.A., et al., *Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 11): p. 2693-708.
162. Atkins, C.M., et al., *Effects of early rolipram treatment on histopathological outcome after controlled cortical impact injury in mice*. Neurosci Lett, 2013. **532**: p. 1-6.
163. Miotla, J.M., M.M. Teixeira, and P.G. Hellewell, *Suppression of acute lung injury in mice by an inhibitor of phosphodiesterase type 4*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(3): p. 411-20.
164. Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G. Editor. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Karger, pp 27-70. 2007.
165. Konrad, F.M., et al., *The unrecognized effects of phosphodiesterase 4 on epithelial cells in pulmonary inflammation*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0121725.
166. Lipworth, B.J., *Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2005. **365**(9454): p. 167-75.
167. Michalski, J.M., et al., *PDE4: a novel target in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **91**(1): p. 134-42.

168. Kranz, M., et al., *Identification of PDE4B Over 4D subtype-selective inhibitors revealing an unprecedented binding mode*. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(14): p. 5336-41.
169. Suzuki, O., et al., *Evaluation of the therapeutic index of a novel phosphodiesterase 4B-selective inhibitor over phosphodiesterase 4D in mice*. *J Pharmacol Sci*, 2013. **123**(3): p. 219-26.
170. Wang, Z., et al., *Immunomodulatory effect of APS and PSP is mediated by Ca<sup>2+</sup>-cAMP and TLR4/NF-kappaB signaling pathway in macrophage*. *Int J Biol Macromol*, 2017. **94**(Pt A): p. 283-289.
171. Schmal, H., et al., *Role for macrophage inflammatory protein-2 in lipopolysaccharide-induced lung injury in rats*. *J Immunol*, 1996. **156**(5): p. 1963-72.
172. Schumacher, C., et al., *High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(21): p. 10542-6.
173. Jin, S.L., et al., *Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages*. *J Immunol*, 2005. **175**(3): p. 1523-31.
174. Suzuki, O., et al., *The role of phosphodiesterase 4B in IL-8/LTB4-induced human neutrophil chemotaxis evaluated with a phosphodiesterase 4B inhibitor*. *Acta Pharm*, 2015. **65**(2): p. 191-7.
175. Wolpe, S.D., et al., *Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(2): p. 612-6.
176. Zhang, Y., J.X. Lin, and J. Vilcek, *Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(13): p. 6177-82.
177. Kishimoto, T., *The biology of interleukin-6*. *Blood*, 1989. **74**(1): p. 1-10.
178. Du, L., et al., *Actin filament reorganization is a key step in lung inflammation induced by systemic inflammatory response syndrome*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. **47**(5): p. 597-603.
179. Meliton, A.Y., et al., *Oxidized phospholipids protect against lung injury and endothelial barrier dysfunction caused by heat-inactivated Staphylococcus aureus*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015. **308**(6): p. L550-62.
180. Ma, H., et al., *Blockade of PDE4B limits lung vascular permeability and lung inflammation in LPS-induced acute lung injury*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **450**(4): p. 1560-7.
181. Zhu, B., et al., *Activation and induction of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE4) in rat pulmonary microvascular endothelial cells*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(3): p. 479-91.
182. Thompson, W.J., et al., *Regulation of cyclic AMP in rat pulmonary microvascular endothelial cells by rolipram-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase (PDE4)*. *Biochem Pharmacol*, 2002. **63**(4): p. 797-807.
183. Arnardottir, H.H., J. Freysdottir, and I. Hardardottir, *Two circulating neutrophil populations in acute inflammation in mice*. *Inflamm Res*, 2012. **61**(9): p. 931-9.

184. Komatsu, K., et al., *Inhibition of PDE4B suppresses inflammation by increasing expression of the deubiquitinase CYLD*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1684.
185. Gobejishvili, L., et al., *Rolipram attenuates bile duct ligation-induced liver injury in rats: a potential pathogenic role of PDE4*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **347**(1): p. 80-90.
186. Hansen, G., et al., *Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6751-6.
187. Barnes, A.P., et al., *Phosphodiesterase 4D forms a cAMP diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7997-8003.
188. Beavo, J.A. and L.L. Brunton, *Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 710-8.

## **10 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Jörg Reutershan und Frau Dr. med. Franziska Konrad.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Irene Vollmer von mir mit Unterstützung durch Frau Dr. med. Franziska Konrad durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Dr. med. Franziska Konrad durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Annette Christina Kerber, Stuttgart, den 13.02.2019

## **11 Veröffentlichung**

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Konrad, F.M., Bury, A., Schick, M.A., Ngamsri, K.C., Reutershan, J. The unrecognized effects of phosphodiesterase 4 on epithelial cells in pulmonary inflammation. PLoS One, 2015.

Alle Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit, die in der obengenannten Publikation bereits veröffentlicht wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

## **12 Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Professor Reutershan und Franziska Konrad für die Konzeption der Arbeit und die freundliche Betreuung während der gesamten Zeit der Versuchsdurchführung und schriftlichen Ausarbeitung.

Herzlichen Dank an Franziska Konrad für zahlreiche ermutigende Worte, Anregungen und fachliche sowie technische Hilfestellungen.

Auch bei Irene Vollmer möchte ich mich für ihre hervorragende Einarbeitung in die Versuche und ihre immer freundliche und geduldige Unterstützung bei jeglicher Frage danken.