

CharitéCentrum für Innere Medizin und Dermatologie (CC12)
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
Direktor: Professor Dr. med. N. Suttorp

HABILITATIONSSCHRIFT

Phosphodiesterasen: Molekulare Regulation und therapeutisches Potential bei Lungenerkrankungen

zur Erlangung der venia legendi
für das Fach
Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Joachim Eberhard Seybold
aus Stuttgart-Sonnenberg

Eingereicht:	6. Juli 2009
Dekanin:	Professor Dr. med. A. Grütters-Kieslich
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. R. Buhl, Mainz
2. Gutachter	Prof. Dr. med. P. Zabel, Borstel

Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnis der Abkürzungen	3
2	Verzeichnis der zur kumulativen Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen	4
3	Einleitung	5
3.1	Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)..	5
3.2	Eosinophile Granulozyten und T-Lymphozyten beim Asthma bronchiale.....	6
3.3	Mikrobiologie von <i>Moraxella catarrhalis</i> und Bedeutung für die COPD	7
3.4	Phosphodiesterasen (PDE)	7
3.5	Lungenepithel.....	10
3.6	Gefäßendothel.....	11
3.7	Fragestellung.....	12
4	Ergebnisse	13
4.1	Eosinophilen und Lymphozytenfunktion unter Anti-IgE-Therapie	13
4.2	Pulmonale Epithelzellen und bakteriell vermittelte Entzündungsreaktion...	15
4.3	Phosphodiesterasen in Lymphozyten und pulmonalen Epithelzellen	19
4.4	Funktion und Regulation der Phosphodiesterase 2 (PDE2)	25
5	Diskussion	29
5.1	Anti-IgE-Therapie und Asthma bronchiale.....	29
5.2	Bedeutung von <i>Moraxella catarrhalis</i> für die COPD	29
5.3	Phosphodiesterasen und entzündliche Lungenveränderungen.....	30
5.4	Zusammenfassung.....	34
5.5	Ausblick.....	35
6	Literaturverzeichnis	36
7	Danksagung.....	41

1 Verzeichnis der Abkürzungen

COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
ERK	extracellular signal regulated kinase
FcεR1	Immunglobulin E-Rezeptor 1
GAF	cGMP-PDE PDE, Adenylylzyklasen, FhIA
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HDAC	Histon-Deacetylase
HUVEC	humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen
IgE	Immunglobulin E
IL-2, IL-8	Interleukin 2, Interleukin 8
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PDE	Phosphodiesterase
PDP	9-(6-Phenyl-2-oxohex-3-yl)-2-(3,4-dimethoxybenzyl)-purin-6-one (PDE2-Inhibitor)
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
UCR	upstream conserved regions
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

2 Verzeichnis der zur kumulativen Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen

Eosinophilen und Lymphozytenfunktion unter Anti-IgE-Therapie

Noga O., Hanf G., Brachmann I., Klucken A.C., Kleine-Tebbe J., Rosseau S., Kunkel G., Suttorp N., **Seybold J.**: Effect of omalizumab treatment on peripheral eosinophil and T-lymphocyte function in patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1493-1499, 2006

Pulmonale Epithelzellen und bakteriell vermittelte Entzündungsreaktion

Slevogt H., Tiwari K.N., Schmeck B., Hocke A., Opitz B., Suttorp N. **Seybold J.**: Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay. *Med Microbiol Immunol* 195: 73-83, 2005

Slevogt H., Schmeck B., Jonatat C., Zahlten J., Beermann W., van Laak V., Opitz B., Dietel S., Dje N'Guessan P., Hippenstiel S., Suttorp N., **Seybold J.**: *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L818-826, 2006

Phosphodiesterasen (PDE) in Lymphozyten und pulmonalen Epithelzellen

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

Seybold J., Newton R., Wright L., Finney P.A., Suttorp N., Barnes P.J., Adcock I.M., Giembycz M.A.: Induction of phosphodiesterases 3B, 4A4, 4D1, 4D2, and 4D3 in Jurkat T-cells and in human peripheral blood T-lymphocytes by 8-bromo-cAMP and G_s-coupled receptor agonists. Potential role in β_2 -adrenoreceptor desensitization. *J Biol Chem* 273: 20575-20588, 1998

Wright L.C., **Seybold J.**, Robichaud A., Adcock I.M., Barnes P.J.: Phosphodiesterase expression in human epithelial cells. *Am J Physiol* 275: L694-700, 1998

Funktion und Regulation der Phosphodiesterase 2

Seybold J., Thomas D., Witzenrath M., Boral S., Hocke A.C., Burger A., Hatzelmann A., Tenor H., Schudt C., Krull M., Schütte H., Hippenstiel S., Suttorp N.: Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood* 105: 3569-3576, 2005

Witzenrath M., Gutbier B., Schmeck B., Tenor H., **Seybold J.**, Kuelzer R., Grentzmann G., Hatzelmann A., van Laak V., Tschernig T., Mitchell T.J., Schudt C., Rosseau S, Suttorp, N., Schütte H.: Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury in murine pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 37: 584-90, 2009

3 Einleitung

3.1 Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

Das **Asthma bronchiale** ist mit einer Prävalenz von ca. 5% bei Erwachsenen und 10% bei Kindern in Deutschland eine weit verbreitete Atemwegserkrankung; weltweit leiden 300 Millionen Patienten an Asthma bronchiale [1]. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine reversible Atemwegsobstruktion mit bronchialer Hyperreaktivität auf dem Boden einer Entzündung der Atemwege mit Infiltration von eosinophilen Granulozyten, aktivierten Mastzellen und T-Lymphozyten [2]. Die häufigste Form ist das extrinsische Asthma bronchiale, welches mit einer Atopie einhergeht (positiver Haut[prick]test und Nachweis von Immunglobulin E (IgE) gegen bestimmte inhalative Allergene) [3]. Häufig manifestiert sich das Asthma bronchiale bereits im Kindesalter. Eine genetische Disposition ist unstrittig, allerdings ist die Zuordnung verschiedener asthmaassoziierter chromosomaler Genloci zum Krankheitsbild noch unklar [4].

An der **chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD)** leiden 3-7% der Bevölkerung - mit wachsender Tendenz. In den industrialisierten Ländern hat die COPD bereits den 5. Platz der Todesursachenstatistik erreicht (3,8% aller Todesfälle) [5;6]. Meist verursacht durch inhalative Noxen - vor allem Zigarettenrauch - findet sich in den Atemwegen eine chronische Entzündung mit Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und CD8+-T-Lymphozyten [2;7]. Die fortschreitende Destruktion der Alveolen und Bronchioli mit Verlust von elastischen Fasern führen zu einer meist irreversiblen Atemwegsobstruktion und einem Lungenemphysem [8].

Während die entzündlichen Veränderungen beim Asthma bronchiale tendenziell die größeren Atemwege betreffen, findet sich bei der COPD eine Betonung der kleineren Atemwege und des Parenchyms [9]. Weiterhin unterscheiden sich beide Erkrankungen hinsichtlich der Art und Anzahl der rekrutierten Entzündungszellen, der vorwiegend ausgeschütteten Mediatoren und dem unterschiedlichen therapeutischen Ansprechen [2].

Das medikamentöse Repertoire für die Behandlung des Asthma bronchiale und der COPD umfasst β_2 -Mimetika, Parasympatholytika, Kortikosteroide, Theophyllin, Leukotrienrezeptor-Antagonisten (nur beim Asthma bronchiale) und Anti-IgE-

Antikörper (nur beim allergischen Asthma bronchiale) [10-13]. Inhibitoren der Phosphodiesterase 4 befinden sich seit einigen Jahren in der klinischen Prüfung für die Therapie des Asthma bronchiale [14] und der COPD [15].

3.2 Eosinophile Granulozyten und T-Lymphozyten beim Asthma bronchiale

Charakteristische Befunde beim allergischen (extrinsischen) Asthma bronchiale sind entzündlich veränderte Atemwege und erhöhte Serum-IgE-Spiegel [2]. Die Sensibilisierung gegenüber einem bestimmten Allergen veranlasst B-Lymphozyten - nach Aktivierung von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten - zur Produktion von IgE welches über hochaffine Rezeptoren ($Fc\epsilon R1$) auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden wird.

Eine erneute Exposition mit einem definierten Allergen nach erfolgter Sensibilisierung bewirkt eine Quervernetzung der IgE-Antikörper auf der Mastzellmembran mit konsekutiver Ausschüttung von Histamin, Leukotrienen, Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren. Im weiteren Verlauf führen die chemotaktischen Eigenschaften dieser Mediatoren zur Einwanderung proinflammatorischer Zellen, darunter eosinophile Granulozyten und Lymphozyten [3;16].

Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz beim allergischen Asthma bronchiale besteht darin, die Allergen-vermittelte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zu unterdrücken, indem die Bindung von IgE an den hochaffinen IgE-Rezeptor $Fc\epsilon R1$ auf Mastzellen und basophilen Granulozyten durch den monoklonalen Antikörper Omalizumab blockiert wird [17]. Dieser verhindert das Andocken von IgE an den Rezeptor $Fc\epsilon R1$, indem die Domäne auf dem IgE-Molekül besetzt wird, die für die Bindung an $Fc\epsilon R1$ verantwortlich ist. Bei Patienten unter Omalizumab-Therapie ist eine Verminderung von zellgebundenem IgE und eine reduzierte Oberflächenexpression des $Fc\epsilon R1$ zu beobachten [18]. Zusätzlich kommt es zu einem Abfall der eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen und im Blut [19-21]. Als mögliche Ursache kommen niedrigere Spiegel von Wachstumsfaktoren für eosinophile Granulozyten in Betracht, insbesondere GM-CSF, ohne welchen die Überlebenszeit der eosinophilen Granulozyten vermindert ist. In unseren Untersuchungen konzentrierten wir uns daher auf die Untersuchung von T-Lymphozyten, die wesentlich zur Sekretion von GM-CSF bei der allergischen Entzündung beitragen.

3.3 Mikrobiologie von *Moraxella catarrhalis* und Bedeutung für die COPD

Die COPD ist mit zunehmender Schwere der Erkrankung durch rezidivierende Infektexazerbationen mit bakteriellen Erregern gekennzeichnet [22;23]. Unter den häufig nachzuweisenden Bakterien im Bronchialsekret finden sich in 10-15% die Gram-negativen Kokken von *Moraxella catarrhalis*, neben *Hämophilus influenzae* (20-30%) *Streptococcus pneumoniae* (10-15%) und *Pseudomonas aeruginosa* (5-10%) [24-26]. Die Bedeutung von *M. catarrhalis* wurde lange unterschätzt, da dieses Bakterium fälschlicherweise als saprophytärer, apathogener Besiedler der Atemwege angesehen wurde.

Bei Patienten mit COPD sammeln sich in den Atemwegen und im submukösem Gewebe vor allem neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten an, die über die chemotaktisch wirksamen Zytokine Interleukin-8 (IL-8) und Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF) in die Lunge rekrutiert und aktiviert werden [27;28]. Lange Zeit war unklar, ob *M. catarrhalis* an der Rekrutierung von Zellen des Immunsystems in die Lunge beteiligt ist. Wir untersuchten daher die Potenz von *M. catarrhalis*, an Epithelzellen zu adhären und sie zur Ausschüttung der chemotaktischen Zytokine IL-8 und GM-CSF zu aktivieren.

3.4 Phosphodiesterasen (PDE)

Phosphodiesterasen (PDE) katalysieren den Abbau der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP zu den biologisch inaktiven 5'-Monophosphaten AMP bzw. GMP. Bisher wurden 11 PDE-Familien beschrieben, die sich in ihrer dreidimensionalen Struktur, den kinetischen Eigenschaften, der intrazellulären Lokalisation, der Expression in unterschiedlichen Zellen, sowie der Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren unterscheiden. Von der Mehrzahl der 11 PDE-Isoenzymfamilien sind Isoforme und Spleißvarianten beschrieben worden [29;30].

Phosphodiesterasen finden sich in allen Körperzellen, jedoch mit unterschiedlichem Verteilungsmuster von Isoenzymen und Isoformen. Von allen PDEs ist die PDE4-Familie am besten untersucht [32;33], während der PDE2 lange Zeit wenig Aufmerksamkeit zuteil wurde.

PDE-Isoenzym	Anzahl Isoforme	Substrat	Km [nM] cAMP	Km [nM] cGMP	Inhibitoren
1	8	Ca ²⁺ /Calmodulin-stimuliert	1-30	3	KS-505a
2	-	cGMP-stimuliert	50	50	EHNA, PDP
3	4	cGMP-hemmbar	0,2	0,3	Cilostamide, Milrinon
4	20	cAMP-spezifisch	4		Rolipram, Roflumilast
5	3	cGMP-spezifisch	150	1	Sildenafil, Tadalafil
6	-	cGMP-spezifisch		60	Dipyridamol
7	3	cAMP-spezifisch	0,2		BRL-50481
8	-	cAMP-selektiv	0,06		
9	4	cGMP-spezifisch		0,17	BAY 73-6691
10	2	cGMP-empfindlich, cAMP-selektiv	0,05	3	
11	4	cGMP-empfindlich, dual-spezifisch	0,7	0,6	

Tab. 1: PDE-Isoenzyme und ihre Eigenschaften (nach [29-31])

Die **PDE2** besteht aus einem Homodimer, von denen jede Einheit (105 kDa) zwei GAF-Domänen enthält, die für die Dimerisierung und Bindung von cGMP erforderlich sind [34]. Die PDE2 katalysiert cGMP *und* cAMP mit ähnlicher Kinetik, wobei die katalytische Aktivität durch cGMP gesteigert wird. Im Gegensatz zu allen anderen PDE-Isoenzymfamilien existieren von der PDE2 keine weiteren Isoforme, jedoch drei Spleißvarianten.

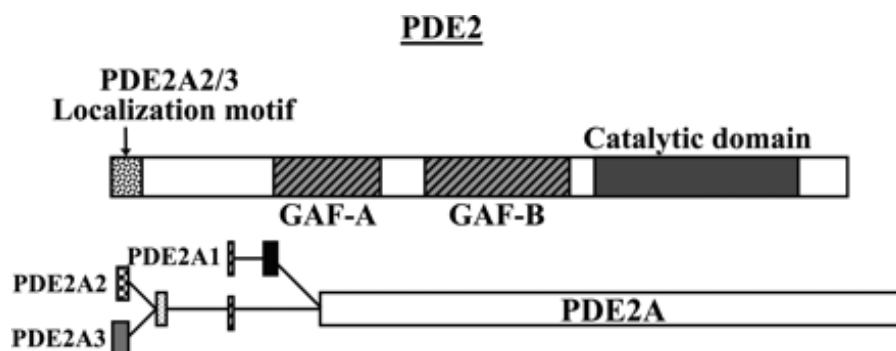


Abb. 1: Struktur der PDE2 (Aus [29])

Die PDE2 wird in den folgenden Zellen bzw. Organen exprimiert: Gefäßendothel, Nebennierenmark, Gehirn, Herz, Thrombozyten und in einigen Makrophagen-Populationen. Trotz der besonderen Stellung der PDE2, zwei Substrate, cAMP *und*

cGMP zu katalysieren (mit cGMP als allosterischen Aktivator), ist die PDE2 bisher nur unzureichend untersucht, was über lange Zeit auch mit der mangelnden Verfügbarkeit spezifischer Inhibitoren zusammenhing.

Zur **PDE4-Familie** zählen 4 Isoforme (PDE4A, 4B, 4C, 4D). Diese unterscheiden sich in der Anzahl der N-terminalen konservierten Regionen (upstream conserved regions, UCR), die regulatorische Einheiten für Phosphorylierungen und Protein-Protein-Interaktionen enthalten [Abb. 2].

Charakteristisch für die PDE4-Familie ist die hohe Zahl von 20 Spleißvarianten [Abb. 2], deren unterschiedliche Sequenzen am N-terminalen Ende die subzelluläre Verteilung bzw. die Wechselwirkung mit anderen Proteinen bestimmen. Dadurch kann die Amplitude und Dauer das cAMP-Signals in einzelnen subzellulären Kompartimenten unterschiedlich reguliert werden [35].

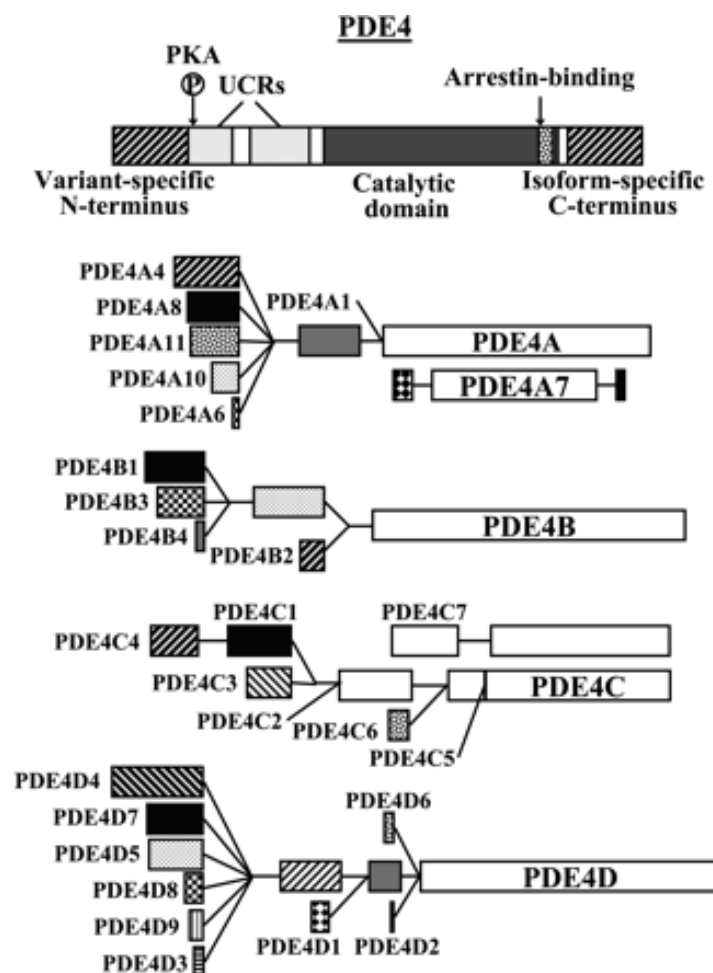


Abb. 2: Struktur der PDE4 (Aus [29])

Obwohl PDE4-Isoenzyme in nahezu allen Körperzellen beschrieben wurden, erhielten Zellen des Immunsystems mehr Aufmerksamkeit, weil die PDE4 in diesen Zellen die höchste Aktivität aller cAMP-katalysierenden PDEs aufweist und die Hemmung der PDE4 die Ausschüttung bestimmter Entzündungsmediatoren und die Einwanderung von inflammatorischen Zellen in das betroffene Gewebe supprimiert [36]. Neben den Zellen des Immunsystems finden sich auch in der Lunge, der Leber, dem Gehirn, der Niere und in Sertoli-Zellen signifikante PDE4-Aktivitäten [30;32].

PDE4-Inhibitoren wurden bereits für zahlreiche therapeutische Anwendungen getestet, darunter die Indikationen Depression, Gelenk-, Haut- und obstruktive Lungenerkrankungen [37-41]. Limitierend für den therapeutischen Einsatz waren - insbesondere für die erste Generation selektiver PDE4-Inhibitoren - nicht selten Übelkeit und Erbrechen. Dies gilt vor allem für den prototypischen PDE4-Inhibitor Rolipram, der nicht zuletzt aus diesem Grund nie zugelassen wurde [38]. Zwei weitere PDE4-Inhibitoren, Roflumilast und Cilomilast, befinden sich in der fortgeschrittenen klinischen Prüfung und werden gegenwärtig nicht nur für die COPD sondern auch für die Indikationen Asthma bronchiale, Arthritis und Psoriasis untersucht [36;39;40].

Seit den 1930er Jahren wird beim Asthma bronchiale und der COPD das antiobstruktiv wirksame Theophyllin eingesetzt, welches sich später als ein unselektiver PDE-Inhibitor offenbarte. Mit der Einführung potenter β_2 -Sympathomimetika hat das Theophyllin zwar im klinischen Alltag an Bedeutung verloren, erhält jedoch hinsichtlich seiner nicht-bronchiendilatierenden, antiinflammatorischen Wirkungen wieder zunehmend Aufmerksamkeit [42-44].

3.5 Lungenepithel

Das Lungenepithel bildet die Grenze zwischen Organismus und Umwelt und spielt daher bei der Erkennung von Allergenen (extrinsisches Asthma bronchiale) und mikrobiellen Erregern (COPD, Pneumonie) eine wichtige Rolle [45].

Das tracheobronchiale Epithel ist mehrreihig und setzt sich aus zilientragenden, sekretorischen (Becher)- und Mikrovilli-tragenden Zellen zusammen. In der Alveole repräsentieren die Typ I-Zellen die epitheliale Seite der Gasaustauschfläche, durch die Basalmembran getrennt von den pulmonalen Endothelzellen. Ebenfalls auf der

alveolären Seite lokalisiert, gewährleisten die Typ II-Zellen die Produktion des oberflächenaktiven Surfactant [46].

Beim Asthma bronchiale und der COPD ist das Epithel verdickt und weist eine Becherzellhyperplasie auf. Der epitheliale Zellumsatz ist erhöht, zusätzlich lassen sich bei der COPD häufig metaplastische Zellen nachweisen. Bei beiden Erkrankungen spielt das Epithel eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf exogene Faktoren, indem Epithelzellen Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren sezernieren und dadurch die Reaktion des Organismus auf externe Entzündungsreize anstoßen. Es ist daher von großer Bedeutung, die Regulationsmechanismen zu kennen, die zur Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren aus der Epithelzelle als „erster Verteidigungslinie“ führen, um in geeigneter Weise die Entzündung zu begrenzen und den Umbau der Lunge mit Funktionseinschränkung zu verhindern [45].

Obwohl bei der COPD nicht selten auch bakterielle Erreger in den Atemwegen anzutreffen sind, ist die Kenntnis der Interaktion zwischen Bakterium und Epithelzelle noch sehr lückenhaft. So können Bakterien bei chronischer Besiedlung der Atemwege entweder die Immunantwort unterdrücken, um die Persistenz der Bakterien zu fördern oder aber durch (Hyper)inflammation die pulmonale Destruktion der Lunge beschleunigen [26].

3.6 Gefäßendothel

In den Alveolen der Lunge bildet das Gefäßendothel, zusammen mit dem einschichtigen Epithel und der dazwischen liegenden Basalmembran, eine funktionelle Einheit über die der Gasaustausch realisiert wird. Diese alveolo-endotheliale Grenze stellt zugleich die entscheidende Barriere dar, die den Übertritt von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem verhindert. Eine pulmonalvaskuläre Schrankenstörung kann das Ergebnis einer pulmonalen Infektion oder im Rahmen einer schweren Allgemeinerkrankung auftreten, die oft eine Beatmungstherapie erfordert und durch eine hohe Letalität gekennzeichnet ist [47].

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass hohe cAMP-Spiegel die endotheliale Barriere stabilisieren [48;49], systematische Untersuchungen der PDE-Funktion unter inflammatorischen Bedingungen fehlten jedoch. Unbeantwortet war auch die Frage, inwieweit PDEs in Endothelzellen selbst einer Regulation durch

Entzündungsmediatoren unterliegen, welche möglicherweise zur Folge hätte, dass eine erhöhte PDE-Aktivität über abfallende cAMP-Spiegel eine pulmonalvaskuläre Schrankenstörung verstärken würde. Es lag daher auf der Hand, die genauen Regulationsmechanismen der PDEs näher zu untersuchen, die zur Homöostase der zyklischen Nukleotide in Endothelzellen beitragen.

3.7 Fragestellung

Im Mittelpunkt der vorgelegten Arbeiten stehen die entzündlichen Veränderungen in der Lunge beim Asthma bronchiale und der COPD. Neben dem Verständnis der Entzündungsreaktion auf zellulärer Ebene sollten neue Erkenntnisse zum therapeutischen Potential der PDE-Inhibitoren und der Anti-IgE-Therapie erarbeitet werden.

Die Untersuchungen gliedern sich in die folgenden Teilaspekte:

- Wie verändert sich unter beim Asthma bronchiale unter Anti-IgE-Therapie die proinflammatorische Aktivierung von T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten?
- Werden Atemwegsepithelzellen bei der COPD durch das Bakterium *Moraxella catarrhalis* zur Sekretion chemotaktischer Zytokine veranlasst und welche Signaltransduktionswege in Epithelzellen werden dabei aktiviert?
- Welche Phosphodiesterasen (PDE) sind in T-Lymphozyten und Atemwegsepithelzellen nachweisbar? Lassen sich die T-Zell-Aktivierung oder die Zytokinsekretion von Epithelzellen durch spezifische PDE-Inhibitoren hemmen?
- Welche Funktion erfüllt die PDE2 in entzündlich veränderten Endothelzellen und wie wird die PDE2-Aktivität reguliert?

4 Ergebnisse

4.1 Eosinophilen- und Lymphozytenfunktion unter Anti-IgE-Therapie

Noga O., Hanf G., Brachmann I., Klucken A.C., Kleine-Tebbe J., Rosseau S., Kunkel G., Suttorp N., **Seybold J.**:

Effect of omalizumab treatment on peripheral eosinophil and T-lymphocyte function in patients with allergic asthma.

J Allergy Clin Immun 117: 1493-1499, 2006

Beim allergischen Asthma bronchiale findet sich in der Bronchialschleimhaut eine Entzündungsreaktion mit Zellinfiltration (eosinophile Granulozyten und T-Lymphozyten) kombiniert mit einem erhöhten Serum-IgE-Spiegel. Werden Patienten mit dem monoklonalen Antikörper Omalizumab behandelt, kommt es zur Verminderung von zellgebundenem IgE und einer verminderten Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc ϵ R1.

Mit der Fragestellung, weshalb es zusätzlich zu einer verminderten Anzahl eosinophiler Granulozyten in Blut und Atemwegen kommt, gingen wir von der Arbeitshypothese aus, wonach eine verminderte Sekretion proinflammatorischer Zytokine aus T-Lymphozyten zu einer gesteigerten Apoptose eosinophiler Granulozyten führt.

Im Rahmen einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie wurden auf eosinophilen Granulozyten durchflusszytometrisch Marker für Apoptose (Annexin V) bzw. Zellaktivierung (CD69 und CD95) und in T-Lymphozyten intrazellulär die Zytokine GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-13, IFN- γ und TNF- α gemessen.

Wir konnten zeigen, dass sich unter Omalizumab-Therapie der Anteil apoptotischer eosinophiler Granulozyten erhöhte und die Anzahl der GM-CSF-, IL-2- und IL-13-positiven Zellen abfiel.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die verminderte Expression von GM-CSF in T-Lymphozyten die Apoptose eosinophiler Granulozyten fördert.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass Omalizumab neben der Reduktion zellulär gebundenen IgEs und des Fc ϵ R1-Rezeptors auch über indirekte Mechanismen zur Abnahme der allergischen Entzündung beitragen kann.

Aus urheberrechtlichen Gründen kann die folgende Publikation in dieser Habilitationsschrift nicht veröffentlicht werden:

Noga O., Hanf G., Brachmann I., Klucken A.C., Kleine-Tebbe J., Rosseau S., Kunkel G., Suttorp N., **Seybold J.**: Effect of omalizumab treatment on peripheral eosinophil and T-lymphocyte function in patients with allergic asthma.
J Allergy Clin Immun 117: 1493-1499, 2006

4.2 Pulmonale Epithelzellen und bakteriell vermittelte Entzündungsreaktion

Slevogt H., Tiwari K.N., Schmeck B., Hocke A., Opitz B., Suttorp N., **Seybold J.:**

Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay.

Med Microbiol Immunol 195: 73-83, 2005

Moraxella catarrhalis ist ein häufiger Verursacher bakterieller Exazerbationen bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Zum besseren Verständnis der Wechselwirkung zwischen Erreger und Wirtszelle wurde die Fähigkeit von *M. catarrhalis* untersucht, an unterschiedliche Epithelzellen zu adhären.

Auf drei epithelialen Zelllinien, BEAS-2B, A549 und HEp-2 wurden die Anzahl der adhärenenden Bakterien der Stämme O35E und ATCC25238 gemessen. Für diesen Zweck entwickelten wir einen fluoreszenzbasierten Assay und verglichen diesen mit konventionellen Adhäsionsassays, die auf der mikroskopischer Auszählung bzw. auf dem Nachweis koloniebildender Einheiten basieren. Ergänzt wurde die Studie durch konfokalmikroskopische Untersuchungen.

Der neu entwickelte, fluoreszenzbasierte Assay detektierte adhärenende Bakterien mit einer unteren Empfindlichkeitsschwelle von 1 Bakterium/Epithelzelle und stellt damit eine sensitive, schnelle und einfache Alternative zu den bisher verfügbaren Adhäsionsassays dar.

Aus urheberrechtlichen Gründen kann die folgende Publikation in dieser Habilitationsschrift nicht veröffentlicht werden:

Slevogt H., Tiwari K.N., Schmeck B., Hocke A., Opitz B., Suttorp N. **Seybold J.:** Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay. *Med Microbiol Immunol* 195: 73-83, 2005

Slevogt H., Schmeck B., Jonatat C., Zahlten J., Beermann W., van Laak V., Opitz B., Dietel S., Dje N'Guessan P., Hippenstiel S., Suttorp N., **Seybold J.**:

Moraxella catarrhalis induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L818-826, 2006

Epithelzellen in Atemwegen sind bei Exazerbationen oder bei chronischer Besiedlung im Rahmen einer COPD in 10-15% dem Bakterium *Moraxella catarrhalis* ausgesetzt. Wir haben daher untersucht, inwieweit *M. catarrhalis* in bronchialen Epithelzellen einen proinflammatorischen Phänotyp induzieren kann.

Dazu wurden die Freisetzung von GM-CSF und Interleukin-8 (IL-8) in Gegenwart von *M. catarrhalis* gemessen und die beteiligten Signaltransduktionswege in der bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B untersucht.

Die GM-CSF- und IL-8-Sekretion zeigte einen zeit- und dosisabhängigen Verlauf unter Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38.

Als Folge der Epithelzellaktivierung kam es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zu einer verstärkten Acetylierung der Histone H3 und H4, die exemplarisch auch am Promotor des *il8*-Gens gezeigt werden konnte.

Die Ergebnisse belegen die Bedeutung von *M. catarrhalis* als potenten Stimulus proinflammatorischer Signaltransduktionswege und epigenetischer Veränderungen in Epithelzellen, die in der Folge zur Sekretion der chemotaktischen Entzündungsmediatoren IL-8 und GM-CSF führten.

Aus urheberrechtlichen Gründen kann die folgende Publikation in dieser Habilitationsschrift nicht veröffentlicht werden:

Slevogt H., Schmeck B., Jonatat C., Zahlten J., Beermann W., van Laak V., Opitz B., Dietel S., Dje N'Guessan P., Hippenstiel S., Suttorp N., **Seybold J.**: *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L818-826, 2006

4.3 Phosphodiesterasen in Lymphozyten und pulmonalen Epithelzellen

Giembycz M.A., Corrigan C.J., **Seybold J.**, Newton R., Barnes P.J.:

Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4⁺ and CD8⁺-T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2.

Brit J Pharmacol 118: 1945-1958, 1996

T-Lymphozyten steuern beim Asthma bronchiale und der COPD die Immunantwort u.a. durch die Sekretion von Zytokinen. Mit dieser Studie wird die Hypothese überprüft, wonach die T-Zell-Aktivierung durch PDE-Inhibitoren supprimiert werden kann.

Wir haben an aufgereinigten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten das PDE-Isoenzymmuster untersucht und den Einfluss von Isoenzym-spezifischen PDE-Inhibitoren auf die Proliferation und Interleukin 2-(IL-2)-Sekretion von T-Lymphozyten getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass die gemessenen PDE-Aktivitäten für cAMP in T-Lymphozyten - ohne signifikante Differenz zwischen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen - vor allem durch PDE3 und PDE4 repräsentiert wurden. Die nach Hemmung der PDE3 und PDE4 verbleibende, signifikante Restaktivität für cAMP-Hydrolyse wurde mittels RT-PCR als PDE7 identifiziert.

Der PDE4-Inhibitor Rolipram unterdrückte die Phytohämagglutinin- bzw. anti-CD3-induzierte IL-2-Sekretion bzw. Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, während der PDE3-Inhibitor SK&F 95654 alleine keinen Effekt zeigte, jedoch in Kombination mit Rolipram die IL-2-Suppression und Proliferationshemmung weiter verstärkte.

Wurden als mitogener Stimulus die Kombination aus Phorbol-myristat-acetat und Ionomycin eingesetzt, unterdrückte der PDE4-Inhibitor Rolipram zwar die IL-2-Sekretion, nicht jedoch die Proliferation der T-Lymphozyten.

Zusammengefasst konnten wir mit dieser Arbeit die Bedeutung der cAMP-vermittelten Wirkungen auf die Proliferation und IL-2-Sekretion darstellen und die PDE4 als mögliches pharmakologisches Zielmolekül für die T-Lymphozytenfunktion identifizieren. Die Bedeutung der erstmals in T-Lymphozyten beschriebenen PDE7 konnte in Ermangelung eines spezifischen Inhibitors nicht weiter verfolgt werden.

Aus urheberrechtlichen Gründen kann die folgende Publikation in dieser Habilitationsschrift nicht veröffentlicht werden:

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

Seybold J., Newton R., Wright L., Finney P.A., Suttorp N., Barnes P.J., Adcock I.M., Giembycz M.A.:

Induction of phosphodiesterases 3B, 4A4, 4D1, 4D2, and 4D3 in Jurkat T-cells and in human peripheral blood T-lymphocytes by 8-bromo-cAMP and G_s-coupled receptor agonists. Potential role in β_2 -adrenoreceptor desensitization.

J Biol Chem 273: 20575-20588, 1998

Mit dieser Studie wurde untersucht, inwieweit Phosphodiesterasen in Lymphozyten durch anhaltende Erhöhung des Substrats cAMP vermehrt exprimiert werden und dadurch zu einer Desensibilisierung nach β_2 -Rezeptoren-Stimulation beitragen können.

Als zelluläres System wurden humane T-Lymphozyten sowie die lymphozytäre Jurkat-Zelllinie verwendet. In beiden Zelltypen konnte die Gesamt-PDE-Aktivität für cAMP durch das Substratanalogon 8-Br-cAMP gesteigert werden (hemmbar durch Actinomycin D und Cycloheximid). Der PDE-Aktivitätsanstieg war das Ergebnis einer erhöhten PDE3- und PDE4-Expression (PDE4>PDE3), welche mittels PCR- und Western-Analysen auf die PDE-Isoforme PDE3B-, PDE4A- und PDE4D-Isoforme eingegrenzt wurde. Die PDE4D-Spleißvarianten PDE4D1, PDE4D2 zeigten einen schnellen Anstieg innerhalb von 2 bis 6 Stunden, die Steigerung der PDE4D3-Expression (nach 24 Stunden) verlief im Gegensatz zu PDE4D1 und PDE4D2 verzögert.

Die Erhöhung der Gesamt-PDE-Aktivität führte nach Stimulation mit dem β -Agonisten Isoproterenol zu einem reduzierten zellulären cAMP-Anstieg, welcher auf eine PDE-vermittelte Desensibilisierung gegenüber dem β -Rezeptoren-vermittelten cAMP-Signal hindeutet.

Die mit dieser Studie gezeigte Induktion der PDE-Aktivität durch anhaltend erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel repräsentiert einen Mechanismus, der zu einem verminderten Ansprechen auf β -Rezeptoren-Simulation führt und bietet - neben anderen bekannten Kompensationsmechanismen - eine mögliche Erklärung, weshalb unter lang dauernder Therapie mit β_2 -Agonisten eine Toleranzentwicklung auftreten kann.

Aus urheberrechtlichen Gründen kann die folgende Publikation in dieser Habilitationsschrift nicht veröffentlicht werden:

Seybold J., Newton R., Wright L., Finney P.A., Suttorp N., Barnes P.J., Adcock I.M., Giembycz M.A.: Induction of phosphodiesterases 3B, 4A4, 4D1, 4D2, and 4D3 in Jurkat T-cells and in human peripheral blood T-lymphocytes by 8-bromo-cAMP and Gs-coupled receptor agonists. Potential role in β_2 -adrenoreceptor desensitization. *J Biol Chem* 273: 20575-20588, 1998

Wright L.C., **Seybold J.**, Robichaud A., Adcock I.M., Barnes P.J.:

Phosphodiesterase expression in human epithelial cells.

Am J Physiol 275: L694-700, 1998

Epithelzellen sind in den Atemwegen einerseits Entzündungsreizen, andererseits auch inhalierten Medikamenten ausgesetzt (z.B. β_2 -Sympathomimetika, Glukokortikoide).

Wir untersuchten in Atemwegsepithelzellen die vorhandenen Aktivitäten an Phosphodiesterasen (PDE) und die Wirkung von PDE-Inhibitoren auf die Sekretion des Entzündungsmediators GM-CSF.

In humanen, primären Atemwegsepithelzellen und in der Alveolarepithelzelllinie A549 konnten wir vor allem PDE4 nachweisen, daneben PDE1, PDE3 und PDE5.

Der PDE3-Inhibitor Org-9935 supprimierte die IL-1-induzierte GM-CSF-Sekretion nahezu komplett, während der PDE4-Inhibitor Rolipram die GM-CSF-Freisetzung nur partiell unterdrückte.

Mit dieser Studie konnten wir belegen, dass die PDE3- bzw. PDE4-Hemmung die GM-CSF-Sekretion aus Epithelzellen reduzierte.

Aus urheberrechtlichen Gründen kann die folgende Publikation in dieser Habilitationsschrift nicht veröffentlicht werden:

Wright L.C., **Seybold J.**, Robichaud A., Adcock I.M., Barnes P.J.: Phosphodiesterase expression in human epithelial cells. *Am J Physiol* 275: L694-700, 1998

4.4 Funktion und Regulation der Phosphodiesterase 2 (PDE2)

Seybold J., Thomas D., Witzenrath M., Boral S., Hocke A.C., Bürger A., Hatzelmann A., Tenor H., Schudt C., Krüll M., Schütte H., Hippenstiel S., Suttorp N.:

Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability.

Blood 105: 3569-3576, 2005

Mit der vorliegenden Studie sollte die Frage beantwortet werden, welche Funktion der Phosphodiesterase 2 (PDE2) bei der Entzündungsreaktion im Endothel zukommt. Neben der zellbiologischen Charakterisierung der PDE2 in primären, humanen Endothelzellen (Nabelschnurendothel, HUVEC) wählten wir das Tiermodell der isoliert perfundierten und ventilierten Mäuselunge, um die Effekte der PDE2-Hemmung auf die pulmonalvaskuläre Schrankenstörung zu untersuchen.

Wir konnten zunächst nachweisen, dass die Expression der PDE2 in Gegenwart von Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) dramatisch ansteigt, während sich die Aktivität der PDE3 und PDE4 nicht änderte. Die Aktivitätserhöhung war p38 MAP Kinase-vermittelt, was durch Transfektions- und Inhibitor-Studien belegt werden konnte.

Gezeigt werden konnte ferner, dass Endothelzellen mit hoher PDE2-Aktivität empfindlicher auf den permeabilitätserhöhenden Stimulus Thrombin reagierten. Hierzu steigerten wir die PDE2-Aktivität in Endothelzellen, ohne TNF- α einzusetzen, was mit der Transfektion von PDE2 in kultivierte endotheliale Monolayer gelang.

An der isolierten Mäuselunge konnte schließlich der Nachweis geführt werden, dass der PDE2-Inhibitor PDP eine signifikante Reduktion des Thrombin-induzierten Lungenödems bewirkte, während die PDE4-Hemmung einen nur geringen Effekt zeigte. Diese Beobachtung ist auch deshalb bemerkenswert, da die PDE2 in isolierten Endothelzellen zwar eine sehr viel geringere Aktivität als PDE3 oder PDE4 aufweist, nach unseren Ergebnissen jedoch für die Aufrechterhaltung der pulmonalvaskulären Barrierefunktion von größerer Bedeutung als die PDE4 ist.

Aus urheberrechtlichen Gründen kann die folgende Publikation in dieser Habilitationsschrift nicht veröffentlicht werden:

Seybold J., Thomas D., Witzenrath M., Boral S., Hocke A.C., Burger A., Hatzelmann A., Tenor H., Schudt C., Krull M., Schutte H., Hippenstiel S., Suttorp N.: Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood* 105: 3569-3576, 2005

Witzenrath M., Gutbier B., Schmeck B., Tenor H., **Seybold J.**, Kuelzer R., Grentzmann G., Hatzelmann A., van Laak V., Tschernig T., Mitchell T.J., Schudt C., Rosseau S., Suttorp, N., Schütte H.:

Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury in murine pneumococcal pneumonia.

Crit Care Med. 37: 584-90, 2009

Die protektive Eigenschaft der PDE2-Hemmung auf die pulmonale Schrankenstörung wurde an einer weiteren Lungenerkrankung, der Pneumonie, untersucht, die ebenfalls zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität führen kann.

Streptococcus pneumoniae, ein häufiger Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, führte bei Mäusen zu einer endothelialen Hyperpermeabilität mit Übertritt von Plasmabestandteilen in den Alveolarraum. Die erhöhte Permeabilität, verursacht durch die bakterielle Pneumonie, war unter PDE2-Hemmung mit dem Wirkstoff PDP signifikant reduziert.

Pneumolysin - ein Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* - führte in der isolierten Mäuselunge und im endothelialen Monolayer zur Permeabilitätserhöhung. Bei beiden experimentellen Ansätzen zeigte der PDE2-Inhibitor PDP eine Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion.

Zusätzlich konnte mittels quantitativen Real-time-PCR-Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Infektion von Mäusen mit *S. pneumoniae* zu einer signifikanten Erhöhung der PDE2-Expression führte (PDE4B-Zunahme nicht signifikant), während andere PDE-Isoenzyme vermindert exprimiert wurden (3A, 4A, 4D, 5A), bzw. sich unverändert zeigten (3B, 4C, 7A).

Zusammenfassend verspricht die PDE2-Hemmung auch bei der bakteriell ausgelösten Pneumonie einen aussichtsreichen therapeutischen Ansatz, der zur Reduktion des Lungenödems beitragen kann.

Aus urheberrechtlichen Gründen kann die folgende Publikation in dieser Habilitationsschrift nicht veröffentlicht werden:

Witzenrath M., Gutbier B., Schmeck B., Tenor H., **Seybold J.**, Kuelzer R., Greutzmann G., Hatzelmann A., van Laak V., Tschernig T., Mitchell T.J., Schudt C., Rosseau S, Suttorp, N., Schütte H.: Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury in murine pneumococcal pneumonia.
Crit Care Med 37: 584-90, 2009

5 Diskussion

5.1 Anti-IgE-Therapie und Asthma bronchiale

Bei schweren Verlaufsformen des allergischen Asthma bronchiale hat die Anti-IgE-Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Omalizumab ihre klinische Wirksamkeit überzeugend bewiesen [12;50;51]. Wir untersuchten auf zellulärer Ebene die Effekte von Omalizumab auf das Überleben von eosinophilen Granulozyten und die Zytokinsekretion von T-Lymphozyten, da wir in früheren Untersuchungen eine Verminderung von eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen beobachtet hatten, die durch eine direkte Wirkung von Omalizumab nicht erklärt war [21].

Wir konnten unter Omalizumab-Therapie im Blut eine gesteigerte Apoptose von eosinophilen Granulozyten feststellen. Gleichzeitig fanden sich eine Reduktion von GM-CSF-, IL-2- und IL-13-produzierenden T-Lymphozyten. Es ist anzunehmen, dass die reduzierte Expression des für eosinophile Granulozyten relevanten Wachstumsfaktors GM-CSF die Apoptose begünstigte, wenngleich die Klärung des genauen Mechanismus weiterer Untersuchungen bedarf. Möglich ist auch ein direkter proapoptotischer Effekt auf eosinophile Granulozyten durch abgesenkte IgE-Spiegel oder eine niedrigere Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεR1 auf T-Lymphozyten, wie es beispielsweise von basophilen Granulozyten [18] oder dendritischen Zellen [52] berichtet wurde. Hierzu sind weitere Untersuchungen der Omalizumab-Wirkungen erforderlich, die gleichzeitig auch zum Verständnis der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale beitragen werden.

5.2 Bedeutung von *Moraxella catarrhalis* für die COPD

Exazerbationen treten bei Patienten mit einer COPD - in Abhängigkeit vom Schweregrad - im Mittel zweimal im Jahr auf [23]. Diese sind überwiegend bakteriell bedingt und gehen mit einer Entzündung der Atemwege, meist aber auch mit Zeichen einer systemischen entzündlichen Reaktion einher [23].

Moraxella catarrhalis, der dritthäufigste Verursacher bakteriell bedingter Exazerbationen bei der COPD [23;25], erwies sich in unseren Untersuchungen als potenter Auslöser einer Entzündungsreaktion in bronchialen Epithelzellen, welche zur Ausschüttung der chemotaktischen Zytokine IL-8 und GM-CSF führte. Die Signaltransduktion wurde über MAP-Kinasen und NF-κB vermittelt und schloss

epigenetische Modifikationen durch reduzierte Aktivitäten von Histondeacetylasen (HDAC) mit ein, die exemplarisch am *il8*-Gen nachweisbar waren.

Unsere Untersuchungen an Kulturen von Epithelzellen reflektieren damit einen klinisch relevanten Mechanismus, da an Schleimhautbiopsien von COPD-Patienten ebenfalls verminderte Aktivitäten von Histondeacetylasen (HDAC) nachgewiesen werden konnten, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten [53]. Weitere Faktoren, die zu einer Abnahme der HDAC-Aktivität im Atemwegsepithel führen können, sind oxidativer Stress und Zigarettenrauch [54]. Bisher wurde nicht untersucht, ob andere Verursacher bakterieller Exazerbationen bei der COPD, wie beispielsweise *S. pneumoniae* und *H. influenzae* im Bronchialepithel ebenfalls die HDAC-Expression vermindern.

Die Auslösung einer Entzündung in Epithelzellen durch *M. catarrhalis* oder andere Erreger ist nicht allein auf Exazerbationen beschränkt. Bei 25-50% der Patienten mit stabiler COPD findet sich eine Besiedlung der ansonsten sterilen Atemwege [22;24;26]. In Abwesenheit klinischer Symptome wird der Nachweis von Bakterien in den Atemwegen als Kolonisation bezeichnet, obwohl davon auszugehen ist, dass dennoch eine anhaltende Entzündungsreaktion unterhalten wird, die sich in erhöhten IL-8-Konzentrationen und neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage manifestiert [28] und mit dem fortschreitenden emphysematischen Umbau der Lunge und Zunahme der bronchialen Obstruktion in Zusammenhang gebracht wird [7;55]. Zusammenfassend kann angenommen werden, dass auch die asymptomatische, bakterielle Besiedelungen der Atemwege über die beschriebenen inflammatorischen Veränderungen bis hin zur verminderten HDAC-Expression die Progredienz der COPD unterhalten.

5.3 Phosphodiesterasen und entzündliche Lungenveränderungen

Beim Asthma bronchiale und der COPD stehen entzündliche Veränderungen der Atemwege im Mittelpunkt. T-Lymphozyten orchestrieren die späte asthmatische Reaktion, die durch die Infiltration von Entzündungszellen in den Atemwegen mit erneuter Bronchokonstriktion gekennzeichnet ist. Sie stehen aber auch bei der COPD an zentraler Stelle bei der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in die Lunge. Wir haben daher zunächst das Isoenzymprofil von T-Lymphozyten und das

antiinflammatorische Potential von PDE-Inhibitoren auf T-Lymphozyten und Atemwegsepithelzellen untersucht.

Bei beiden Zelltypen konnten eine hohe Aktivität von PDE3 und vor allem von PDE4 nachgewiesen werden, in Epithelzellen auch geringere Aktivitäten für PDE1 und PDE5, in T-Lymphozyten zusätzlich Hinweise auf PDE7. Von T-Lymphozyten ist bekannt, dass hohe intrazelluläre cAMP-Spiegel die T-Zell-Aktivierung hemmen [56]. Unsere Untersuchungen zeigten, dass vor allem die Hemmung der PDE4 den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhte und die IL-2-Sekretion und Proliferation von T-Lymphozyten reduzierte. In einer späteren Arbeit wurde dieses Ergebnis bestätigt und außerdem nachgewiesen, dass vor allem die Hemmung der PDE4D-Isoform die T-Zell-Aktivierung drosselt [57]. Auch die Inhibition der von uns erstmals in T-Lymphozyten nachgewiesenen PDE7 [58] reduzierte – in geringerem Umfang als die PDE4-Hemmung – die lymphozytäre Zytokinsekretion [59;60].

In Atemwegsepithelzellen ließ sich ebenfalls eine Verminderung der Zytokinsekretion von GM-CSF in Gegenwart eines PDE4-Inhibitors nachweisen. Interessanterweise zeigte sich mit einem PDE3-Inhibitor ein stärkerer Effekt, obwohl gesamtzellulär weniger PDE3- als PDE4-Aktivität vorlag, was auf eine intrazelluläre Kompartimentalisierung von PDE-Isoenzymen hinweisen kann [61].

Da PDE4 in signifikanter Aktivität in T-Lymphozyten und anderen Zelltypen des Immunsystems nachweisbar ist, wurden große Anstrengungen unternommen, PDE4-Inhibitoren als antiinflammatorische Therapie bei obstruktiven Atemwegserkrankungen zu entwickeln, nicht zuletzt auch deshalb, weil von Isoenzym-spezifischen PDE4-Inhibitoren ein günstigeres Nutzen-Risiko-Profil für den Einsatz bei obstruktiven Lungenerkrankungen erwartet wurde. Neuere klinische Untersuchungen bei Asthma bronchiale [14] und COPD [15] scheinen diese Erwartung zu bestätigen, der Stellenwert nach einer evt. klinischen Zulassung lässt sich heute nur schwer abschätzen.

Die Frage liegt auf der Hand, welche der 4 PDE4-Isoforme (PDE4A – PDE4D), die durch 4 unterschiedliche Gene kodiert werden, funktionell für die T-Zell-Aktivierung relevant sind. Da uns keine geeigneten Isoform-spezifischen Inhibitoren zur Verfügung standen, konnte erst später mit Hilfe von siRNA gegen PDE4A – 4D an T-Lymphozyten gezeigt werden, dass die Suppression der PDE4D-mRNA den größten Effekt auf die lymphozytäre Zytokinsekretion ausübte [57]. Inwieweit die größere Selektivität für bestimmte PDE4-Isoforme einen therapeutischen Vorteil

bietet, kann derzeit nicht beantwortet werden. Interessant wäre jedoch ein selektiver Ansatz, spezifische PDE-Hemmer gegen PDE Isoenzyme oder Isoforme zu richten, die nur unter Entzündungsbedingungen signifikant exprimiert werden bzw. deren Expression signifikant gesteigert wird. Bis heute wurde dieser Nachweis bei Patienten mit Asthma bronchiale nicht erbracht [62]. Dagegen konnte in Makrophagen von Patienten mit COPD eine erhöhte Expression der PDE4A4 nachgewiesen werden [63]. Ob in dieser Situation die selektive PDE4A4-Inhibition der weniger selektiven PDE4-Hemmung überlegen wäre, kann gegenwärtig nicht abschließend beurteilt werden.

Im Gegensatz zu T-Lymphozyten und Epithelzellen fanden wir in humanen Endothelzellen ein PDE Isoenzym vor, PDE2, welches unter inflammatorischen Bedingungen (TNF- α -Stimulation) die Aktivität, cAMP und cGMP zu hydrolysieren, bereits nach 6 Stunden vervielfachte, während die Aktivität für PDE3 und PDE4 sich nicht signifikant änderte [64]. Die rasche Neusynthese von PDE2-Protein nach TNF- α -Stimulation wurde über die Aktivierung der p38 MAPK vermittelt. Die PDE2 ist damit das einzige bekannte Isoenzym innerhalb der großen PDE-Familie, welches durch TNF- α reguliert wird. In bisher unveröffentlichten Untersuchungen konnten wir zeigen, dass auch VEGF (vascular endothelial growth factor) zu einer raschen Neusynthese von PDE2 führt, die der Aktivierung der MAP Kinasen-Pfades über ERK1/2 folgt [eigene, nicht publizierte Ergebnisse, Manuskript im Anhang der Habilitationsschrift]. Die Regulation der PDE2 durch TNF- α über p38 MAPK bzw. durch VEGF über ERK1/2 MAPK unterstreicht die zentrale Bedeutung der PDE2 im Endothel für die Regulation der Permeabilität unter Entzündungsbedingungen bzw. bei der Migration oder Proliferation von Endothelzellen [Abb. 3].

Ausgehend von unseren *in vitro*-Messungen, die eine Destabilisierung der endothelialen Barriere durch Aktivitätserhöhung der PDE2 zeigten, gelang es uns, diese Beobachtung auch in *ex vivo*-Experimenten mit isolierten, perfundierten und ventilerten Mäuselungen zu bestätigen [64]. Die Hemmung der PDE2 reduzierte das Ausmaß des Lungenödems signifikant und in stärkerem Maße als die Hemmung der PDE4.

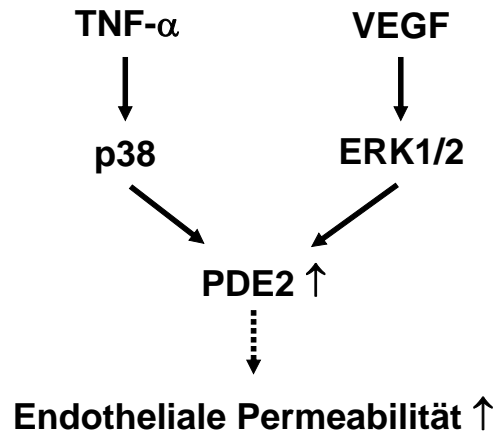


Abb. 3: Modell der permeabilitätserhöhenden Wirkung nach PDE2-Aktivierung durch TNF- α [64] bzw. VEGF (vascular endothelial growth factor) [eigene, nicht publizierte Ergebnisse]

Die Hemmung der PDE2 reduzierte das Ausmaß des Lungenödems signifikant und in stärkerem Maße als die Hemmung der PDE4.

Die protektiven Effekte der PDE2-Hemmung auf die endotheliale Schrankenstörung zeigten sich auch bei der durch *Streptococcus pneumoniae* ausgelösten Lungenentzündung [65]. Die quantitative Analyse der PDE-Expression der mit *S. pneumoniae* infizierten Lungen bestätigte die nahezu exklusive Zunahme der PDE2 Expression, während alle anderen untersuchten PDE keinen signifikanten Expressionsanstieg zeigten.

Eine gezielte Inhibition der unter Entzündungsbedingungen gesteigerten PDE2 könnte durchaus auch in anderen Organen günstige Effekte erwarten lassen, da bei der Sepsis mit Multiorganversagen die Permeabilitätserhöhung auch in anderen Organen von großer pathophysiologischer Relevanz ist [66].

5.4 Zusammenfassung

Unspezifische PDE-Inhibitoren werden seit langem bei Patienten mit Lungenerkrankungen eingesetzt, da sie eine direkte, relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der Bronchien ausüben. In zahlreichen Zelltypen des Immunsystems entfalten Isoenzym-spezifische PDE-Inhibitoren zusätzlich antiinflammatorische Eigenschaften.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die antiinflammatorischen Wirkungen von PDE-Inhibitoren im Hinblick auf die pathophysiologischen Mechanismen beim Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) zu untersuchen und die Funktion der bisher kaum charakterisierten PDE2 zu klären.

In humanen T-Lymphozyten konnten wir eine deutlich reduzierte Zellproliferation und Interleukin 2-Sekretion durch Hemmung der PDE3 bzw. PDE4 zeigen, in Atemwegsepithelzellen wurde die GM-CSF-Sekretion durch PDE-Hemmer (PDE3>PDE4) supprimiert. Erstmals konnte in T-Lymphozyten die PDE7 nachgewiesen werden.

Die Hemmung der PDE2 reduzierte an isolierten Lungen die Ödembildung bei der bakteriell induzierten Lungenentzündung. Als pathogenetisch bedeutsamen Mechanismus konnten wir an humanen Endothelzellen unter Entzündungsbedingungen einen ausgeprägten Anstieg der PDE2-Expression identifizieren, welcher mit einer Destabilisierung der endothelialen Barrierefunktion einherging und damit erstmals die Regulation einer PDE durch TNF- α belegte.

Weitere Arbeiten hatten zum Ziel, die pathophysiologische Rolle des Bakteriums *Moraxella catarrhalis* bei der COPD zu untersuchen und die antiinflammatorischen Eigenschaften einer Anti-Immunglobulin E-Therapie beim allergischen Asthma bronchiale zu charakterisieren. Hierbei konnten wir die Aktivierung der Atemwegsepithelzellen durch *Moraxella catarrhalis* bis hin zu epigenetischen Veränderungen belegen und die antiinflammatorische Wirkung der Anti-IgE-Therapie auf T-Lymphozyten zeigen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PDE-Inhibitoren für die Therapie von Lungenerkrankungen ein relevantes therapeutisches Potential erkennen lassen, welches über die bekannten, antiobstruktiven Eigenschaften hinausreicht.

5.5 Ausblick

Die biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der mehr als 100 Mitglieder der PDE-Familie konnte in den letzten Jahren große Fortschritte verzeichnen, während die funktionelle Bedeutung einzelner PDEs im jeweiligen zellulären Kontext sich noch als lückenhaft darstellt.

Die zukünftigen Anstrengungen werden vor allem darin liegen, einzelne PDE Isoforme oder deren Spleißvarianten, den unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten, sowie den dort lokalisierten, oftmals eng umschriebenen zellulären Funktionen zuzuordnen. Die Messung subzellulärer cAMP- und cGMP-Spiegel und die Aktivität einzelner, subzellulär lokalisierter PDEs werden zunehmend den Einsatz anspruchsvoller Techniken, wie z.B. Echtzeit-Untersuchungen an intakten Zellen notwendig machen. Mit Hilfe dieser Methoden wird es vermutlich gelingen, grundlegende zellbiologische Fragen zur Funktion zyklischer Nukleotide zu beantworten. So könnte beispielsweise die Hypothese überprüft werden, wonach die PDE2 an den subkortikalen Aktinfilamenten der Zellperipherie zu finden ist und dort an umschriebener Stelle an der Regulation der parazellulären Permeabilität eingreift, dagegen in anderen subzellulären Kompartimenten die cAMP- bzw. cGMP-Homöostase vermutlich komplett anderen PDE Isoenzymen überlässt.

Diese zell- und molekularbiologischen Arbeiten werden dazu beitragen, zahlreiche Fragen zur Funktion einzelner PDE Familien und deren Isoformen zu beantworten, jedoch aus klinischer Sicht die Frage offen lassen, ob mit der Entwicklung Isoenzym- und Isoform-selektiver PDE Inhibitoren evt. auch eine Abnahme der therapeutischen Wirksamkeit einhergehen könnte. Es ist damit zu rechnen, dass die absehbare Zulassung und breitere Verwendung eines PDE4-Inhibitors zur Beantwortung dieser Frage beitragen wird. Inwieweit eines Tages PDE Isoform-spezifische Therapieansätze den Weg in die Klinik finden werden, lässt sich noch nicht absehen. In jedem Fall darf man noch auf manches überraschende Forschungsergebnis aus dem Mikrokosmos der PDEs gespannt sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallo J, Keil U, Mitchell E, and Robertson C, Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 62: 758-766, 2007.
2. Barnes PJ, Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat.Rev.Immunol*. 8: 183-192, 2008.
3. Galli SJ, Tsai M, and Piliponsky AM, The development of allergic inflammation. *Nature*. 454: 445-454, 2008.
4. Holloway JW and Koppelman GH, Identifying novel genes contributing to asthma pathogenesis. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol*. 7: 69-74, 2007.
5. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, and Buist S, Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur.Respir.J*. 27: 397-412, 2006.
6. Mannino DM and Buist AS, Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet*. 370: 765-773, 2007.
7. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, Pierrou S, Lund J, Holgate ST, Davies DE, Delany DJ, Wilson SJ, and Djukanovic R, Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax*. 59: 837-842, 2004.
8. Taraseviciene-Stewart L and Voelkel NF, Molecular pathogenesis of emphysema. *J.Clin.Invest*. 118: 394-402, 2008.
9. Jeffery PK, Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. Giles F. Filley Lecture. *Chest*. 117: 251S-260S, 2000.
10. Buhl R and Farmer SG, Future directions in the pharmacologic therapy of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2: 83-93, 2005.
11. Calverley PM and Walker P, Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 362: 1053-1061, 2003.
12. Fanta CH, Asthma. *N.Engl.J.Med*. 360: 1002-1014, 2009.
13. Vogelmeier C, Buhl R, Crie CP, Gillissen A, Kardos P, Kohler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Petro W, Rabe K, Schultz K, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R, and Worth H, [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie*. 61: e1-40, 2007.
14. van Schalkwyk E, Strydom K, Williams Z, Venter L, Leichtl S, Schmid-Wirlitsch C, Bredenbroeker D, and Bardin PG, Roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates allergen-induced asthmatic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 116: 292-298, 2005.
15. Calverley PM, Sanchez-Toril F, Mclvor A, Teichmann P, Bredenbroeker D, and Fabbri LM, Effect of 1-year treatment with roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 176: 154-161, 2007.

16. Walsh ER and August A, Eosinophils and allergic airway disease: there is more to the story. *Trends Immunol.* 31: 39-44, 2010.
17. Milgrom H, Fick RB, Jr., Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, and Metzger WJ, Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group. *N.Engl.J.Med.* 341: 1966-1973, 1999.
18. Saini SS, MacGlashan DW, Jr., Sterbinsky SA, Togias A, Adelman DC, Lichtenstein LM, and Bochner BS, Down-regulation of human basophil IgE and FC epsilon RI alpha surface densities and mediator release by anti-IgE-infusions is reversible in vitro and in vivo. *J.Immunol.* 162: 5624-5630, 1999.
19. Djukanovic R, Wilson SJ, Kraft M, Jarjour NN, Steel M, Chung KF, Bao W, Fowler-Taylor A, Matthews J, Busse WW, Holgate ST, and Fahy JV, Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 170: 583-593, 2004.
20. Massanari M, Holgate ST, Busse WW, Jimenez P, Kianifard F, and Zeldin R, Effect of omalizumab on peripheral blood eosinophilia in allergic asthma. *Respir Med.* 104: 188-196, 2010.
21. Noga O, Hanf G, and Kunkel G, Immunological and clinical changes in allergic asthmatics following treatment with omalizumab. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 131: 46-52, 2003.
22. Rosell A, Monso E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, Zalacain R, Morera J, and Torres A, Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch.Intern.Med.* 165: 891-897, 2005.
23. Sethi S and Murphy TF, Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J.Med.* 359: 2355-2365, 2008.
24. Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, and Sethi S, Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 170: 266-272, 2004.
25. Murphy TF, Brauer AL, Grant BJ, and Sethi S, *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172: 195-199, 2005.
26. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, and Berenson CS, Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 173: 991-998, 2006.
27. Barnes PJ, Shapiro SD, and Pauwels RA, Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur.Respir.J.* 22: 672-688, 2003.
28. Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, and Zaubet A, Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur.Respir.J.* 14: 1015-1022, 1999.
29. Bender AT and Beavo JA, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol.Rev.* 58: 488-520, 2006.
30. Omori K and Kotera J, Overview of PDEs and their regulation. *Circ.Res.* 100: 309-327, 2007.

31. Boswell-Smith V, Spina D, and Page CP, Phosphodiesterase inhibitors. *Br.J.Pharmacol.* 147 Suppl 1:S252-7.: S252-S257, 2006.
32. Houslay MD and Adams DR, PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem.J.* 370: 1-18, 2003.
33. Spina D, PDE4 inhibitors: current status. *Br.J.Pharmacol.* 155: 308-315, 2008.
34. Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG, and Beavo JA, The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99: 13260-13265, 2002.
35. Houslay MD, Baillie GS, and Maurice DH, cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ.Res.* 100: 950-966, 2007.
36. Sanz MJ, Cortijo J, and Morcillo EJ, PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacol.Ther.* 106: 269-297, 2005.
37. Baumer W, Hoppmann J, Rundfeldt C, and Kietzmann M, Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis. *Inflamm.Allergy Drug Targets.* 6: 17-26, 2007.
38. Esposito K, Reiersen GW, Luo HR, Wu GS, Licinio J, and Wong ML, Phosphodiesterase genes and antidepressant treatment response: a review. *Ann.Med.* 41: 177-185, 2009.
39. Fan CK, Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur.J.Pharmacol.* 533: 110-117, 2006.
40. Lipworth BJ, Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 365: 167-175, 2005.
41. Tenor H, Hedbom E, Hauselmann HJ, Schudt C, and Hatzelmann A, Phosphodiesterase isoenzyme families in human osteoarthritis chondrocytes--functional importance of phosphodiesterase 4. *Br.J.Pharmacol.* 135: 609-618, 2002.
42. Barnes PJ, Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med.* 167: 813-818, 2003.
43. Hirano T, Yamagata T, Gohda M, Yamagata Y, Ichikawa T, Yanagisawa S, Ueshima K, Akamatsu K, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, and Ichinose M, Inhibition of reactive nitrogen species production in COPD airways: comparison of inhaled corticosteroid and oral theophylline. *Thorax.* 61: 761-766, 2006.
44. Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, and Barnes PJ, A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 8921-8926, 2002.
45. James AL and Wenzel S, Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur.Respir.J.* 30: 134-155, 2007.
46. Matthay MA, Folkesson HG, and Clerici C, Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev.* 82: 569-600, 2002.

47. Goodman RB, Pugin J, Lee JS, and Matthay MA, Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 523-535, 2003.
48. Suttorp N, Weber U, Welsch T, and Schudt C, Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J Clin. Invest* 91: 1421-1428, 1993.
49. Suttorp N, Ehreiser P, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krull M, Tenor H, and Schudt C, Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4. *Lung* 174: 181-194, 1996.
50. Holgate S, Buhl R, Bousquet J, Smith N, Panahloo Z, and Jimenez P, The use of omalizumab in the treatment of severe allergic asthma: A clinical experience update. *Respir Med.*, 2009.
51. Korn S, Thielen A, Seyfried S, Taube C, Kornmann O, and Buhl R, Omalizumab in patients with severe persistent allergic asthma in a real-life setting in Germany. *Respir Med.*, 2009.
52. Prussin C, Griffith DT, Boesel KM, Lin H, Foster B, and Casale TB, Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcepsilonRI expression. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112: 1147-1154, 2003.
53. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, and Barnes PJ, Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J.Med.* 352: 1967-1976, 2005.
54. Moodie FM, Marwick JA, Anderson CS, Szulakowski P, Biswas SK, Bauter MR, Kilty I, and Rahman I, Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J.* 18: 1897-1899, 2004.
55. Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Morikawa T, Katoh H, and Nishimura M, Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 31: 405-412, 2004.
56. Veillette A, Latour S, and Davidson D, Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annu.Rev.Immunol.* 20:669-707. Epub@2001 Oct 4.: 669-707, 2002.
57. Peter D, Jin SL, Conti M, Hatzelmann A, and Zitt C, Differential expression and function of phosphodiesterase 4 (PDE4) subtypes in human primary CD4+ T cells: predominant role of PDE4D. *J.Immunol.* 178: 4820-4831, 2007.
58. Giembycz MA, Corrigan CJ, Seybold J, Newton R, and Barnes PJ, Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2. *Br.J.Pharmacol.* 118: 1945-1958, 1996.
59. Kadoshima-Yamaoka K, Murakawa M, Goto M, Tanaka Y, Inoue H, Murafuji H, Nagahira A, Hayashi Y, Nagahira K, Miura K, Nakatsuka T, Chamoto K, Fukuda Y, and Nishimura T, ASB16165, a novel inhibitor for phosphodiesterase 7A (PDE7A), suppresses IL-12-induced IFN-gamma production by mouse activated T lymphocytes. *Immunol.Lett.* 122: 193-197, 2009.

60. Smith SJ, Cieslinski LB, Newton R, Donnelly LE, Fenwick PS, Nicholson AG, Barnes PJ, Barnette MS, and Giembycz MA, Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes. *Mol.Pharmacol.* 66: 1679-1689, 2004.
61. Shakur Y, Takeda K, Kenan Y, Yu ZX, Rena G, Brandt D, Houslay MD, Degerman E, Ferrans VJ, and Manganiello VC, Membrane localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3). Two N-terminal domains are required for the efficient targeting to, and association of, PDE3 with endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 275: 38749-38761, 2000.
62. Landells LJ, Szilagy CM, Jones NA, Banner KH, Allen JM, Doherty A, O'Connor BJ, Spina D, and Page CP, Identification and quantification of phosphodiesterase 4 subtypes in CD4 and CD8 lymphocytes from healthy and asthmatic subjects. *Br J Pharmacol.* 133: 722-729, 2001.
63. Barber R, Baillie GS, Bergmann R, Shepherd MC, Sepper R, Houslay MD, and Heeke GV, Differential expression of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in inflammatory cells of smokers with COPD, smokers without COPD, and nonsmokers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287: L332-L343, 2004.
64. Seybold J, Thomas D, Witzenrath M, Boral S, Hocke AC, Burger A, Hatzelmann A, Tenor H, Schudt C, Krull M, Schutte H, Hippenstiel S, and Suttorp N, Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood.* 105: 3569-3576, 2005.
65. Witzenrath M, Gutbier B, Schmeck B, Tenor H, Seybold J, Kuelzer R, Grentzmann G, Hatzelmann A, van L, V, Tschernig T, Mitchell TJ, Schudt C, Rosseau S, Suttorp N, and Schutte H, Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury in murine pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 37: 584-590, 2009.
66. Aird WC, The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 101: 3765-3777, 2003.

7 Danksagung

Herzlich danken möchte ich allen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Norbert Suttorp. Er hat durch seine langjährige, freundschaftliche Unterstützung diese Arbeit ermöglicht. Eine offene, sachbezogene und kontinuierliche Diskussionskultur sowie die uneingeschränkte Unterstützung sind mit seiner Person verknüpft.

Der Arbeitsgruppe an der Charité gilt mein herzlichster Dank, allen voran meinen langjährigen Kollegen und Weggefährten seit Gießener Zeiten, Prof. Stefan Hippenstiel und PD Dr. Matthias Krüll. Ohne ihr Engagement und ihre konstruktiven Anregungen wären viele der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich gewesen.

Danken möchte ich allen Kollegen vom National Heart and Lung Institute in London, insbesondere Dr. Robert Newton, Dr. Mark A. Giembycz, Dr. Louise E. Donnelly, Prof. Ian M. Adcock und Prof. Peter J. Barnes.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Kooperationspartnern, die mit konstruktiven Diskussionen und fruchtbaren Ideen zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben. Besonders erwähnen möchte ich Dr. H. Tenor, Dr. A. Hatzelmann und Dr. C. Schudt.

Denjenigen Mitarbeitern und Kollegen der Medizinischen Klinik für Infektiologie und Pneumologie der Charité, die mich mit ihrer Diskussionsbereitschaft oder praktischer Hilfe bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt haben und die ich nicht namentlich erwähnt habe, möchte ich ebenfalls danken.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Nycomed GmbH (ehemals Byk Gulden GmbH bzw. Altana AG), sowie der universitären Forschungsförderung der Charité.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie, Élia und Lukas, die mich mit ihrem immerwährenden Verständnis seit vielen Jahren begleiten, sowie meinen Eltern und Agnes Seybold.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 30.6.2009