

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

in der

Medizinischen Klinik Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Wirkung der spezifischen Phosphodiesterase-Inhibitoren  
Roflumilast und Pumafentrine im Mausmodell  
der Dextran-Sodium-Sulfat-induzierten Kolitis**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Florian Rieder  
aus Dachau

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. T. Brocker  
PD Dr. med. H. M. Diepholder

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. B. Siegmund  
PD Dr. med. A. Eigler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2004

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Fragestellung.....	1
1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	2
1.2.1	Epidemiologie.....	2
1.2.2	Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.2.3	Klinischer Verlauf.....	5
1.2.4	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	7
1.2.5	Bisherige Therapiemöglichkeiten und Grenzen.....	9
1.3	Phosphodiesterase-Inhibition als antiinflammatorischer Therapieansatz....	11
1.3.1	Zyklisches Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat.....	11
1.3.2	Wirkungsmechanismen und Familie der Phosphodiesterasen.....	13
1.3.3	Phosphodiesterase Typ 3-Isoenzymfamilie.....	16
1.3.4	Phosphodiesterase Typ 4-Isoenzymfamilie.....	17
1.3.5	Prinzip der dualen Hemmung der Phosphodiesterasen Typ 3 und Typ 4...	20
1.4	Tiermodelle für chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1	Labormaterial und Geräte.....	24
2.2	Häufig verwendete Substanzen.....	24
2.3	Durchflusszytometrie.....	26
2.4	Zytokinmessung mit „Enzyme-linked immunosorbent assays“ .....	27
2.5	Bradford-Proteinbestimmung.....	28
2.6	Tiere und Tierhaltung.....	29
2.6.1	Tierversuchsantrag.....	29
2.6.2	Tierbeschaffung.....	29
2.6.3	Tierhaltung.....	29
2.6.4	Anästhesie und Euthanasie der Mäuse.....	30

---

2.7	Dextran-Natrium-Sulfat-Modell.....	30
2.8	Therapeutika.....	32
2.9	Quantifizierung der experimentellen Kolitis.....	33
2.9.1	Verlauf.....	33
2.9.2	Kolonlänge.....	35
2.9.3	Histologischer Score.....	36
2.9.4	Zytokinmessung im Kolonluat.....	37
2.9.5	Bestimmung des Milzgewichtes.....	37
2.9.6	Isolation der Splenozyten.....	37
2.9.7	Zellkultur der Splenozyten.....	38
2.9.8	Durchflusszytometrie-Analyse der Splenozyten.....	38
2.10	Software und Statistik.....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1	Therapeutische Wirkungen von Roflumilast.....	40
3.1.1	Versuchsaufbau.....	40
3.1.2	Klinischer Score.....	40
3.1.3	Kolonlänge.....	42
3.1.4	Histologischer Score.....	43
3.1.5	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe.....	44
3.1.6	Milzgewicht.....	45
3.2	Therapeutische Wirkungen von Pumafentrine.....	46
3.2.1	Versuchsaufbau.....	46
3.2.2	Klinischer Score.....	46
3.2.3	Kolonlänge.....	48
3.2.4	Histologischer Score.....	49
3.2.5	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe.....	50
3.2.6	Milzgewicht.....	51
3.2.7	Interferon- $\gamma$ -Synthese stimulierter Splenozyten.....	52
3.2.8	CD69-Expression stimulierter Splenozyten.....	55

---

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
4.1	Diskussion der Methoden und Endpunkte.....	57
4.1.1	Mausmodell der Dextran-Natrium-Sulfat-induzierten Kolitis.....	57
4.1.2	Endpunkte der Versuchsreihen.....	59
4.2	Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur.....	59
4.2.1	Hemmung der Phosphodiesterase zur Suppression von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ .....	59
4.2.2	Phosphodiesterase Typ 4-Inhibitoren und Roflumilast <i>in vivo</i> .....	60
4.2.3	Phosphodiesterase Typ 3/4-Inhibitoren und Pumafentrine <i>in vivo</i> .....	61
4.2.4	Hemmung der Phosphodiesterase und chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	61
4.2.5	Roflumilast im Modell der Dextran-Natrium-Sulfat-induzierten Kolitis.....	62
4.2.6	Pumafentrine im Modell der Dextran-Natrium-Sulfat-induzierten Kolitis.....	63
4.2.7	Andere Strategien zur Hemmung von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ bei der Dextran-Natrium-Sulfat-induzierten Kolitis.....	65
4.2.8	Nebenwirkungen der Phosphodiesterase-Inhibitoren.....	66
4.3	Limitierung der Ergebnisse.....	68
4.4	Klinische Relevanz.....	68
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>112</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Fragestellung

In dieser Dissertation werden die Wirkungen des dualselektiven Phosphodiesterase (PDE) Typ 3/4-Inhibitors Pumafentrine und des spezifischen Typ 4-Inhibitors Roflumilast im Mausmodell der Dextran-Natriumsulfat (DSS)-induzierten Kolitis untersucht.

Die beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind häufige und schwere Erkrankungen des Menschen. Die Ätiologie dieser Krankheiten ist noch immer unbekannt, in der Pathogenese scheint jedoch ein Ungleichgewicht von entzündungshemmenden und -fördernden Mediatoren eine Rolle zu spielen. Die bestehenden Therapieschemata können eine Remission der Erkrankung erreichen, zeigen aber in vielen Fällen häufige Rezidive bzw. zu starke Nebenwirkungen. Dies begründet die Notwendigkeit der Erforschung neuer Therapieansätze.

In der Pathogenese des Morbus Crohn hat Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) eine Schlüsselrolle im Entzündungsgeschehen. Die Suppression von TNF- $\alpha$  durch monoklonale Antikörper führte in klinischen Studien zu einer Besserung der Krankheitsaktivität und ist inzwischen für die Therapieindikation Morbus Crohn zugelassen (Stange et al. 2003). Die spezifischen Phosphodiesterase Typ 3/4- und Typ 4-Inhibitoren Pumafentrine und Roflumilast wählen einen anderen therapeutischen Ansatz und hemmen die Synthese von TNF- $\alpha$  über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat (cAMP).

Bisher konnte in der Abteilung für Klinische Pharmakologie die Wirksamkeit der spezifischen Phosphodiesterase Typ 4-Inhibitoren Rolipram, Mesopram und des Adenosin-Kinase-Inhibitors GP515 im Modell der DSS-induzierten Kolitis gezeigt werden (Hartmann et al. 2000; Siegmund et al. 2001; Loher et al. 2002). Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich nach unserer Kenntnis um die erste

Testung von Roflumilast und Pumafentrine in einem Kolutismodell und die erste Studie mit einem Phosphodiesterase Typ 3/4-Inhibitor in einem Kolutismodell überhaupt.

## **1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

### **1.2.1 Epidemiologie**

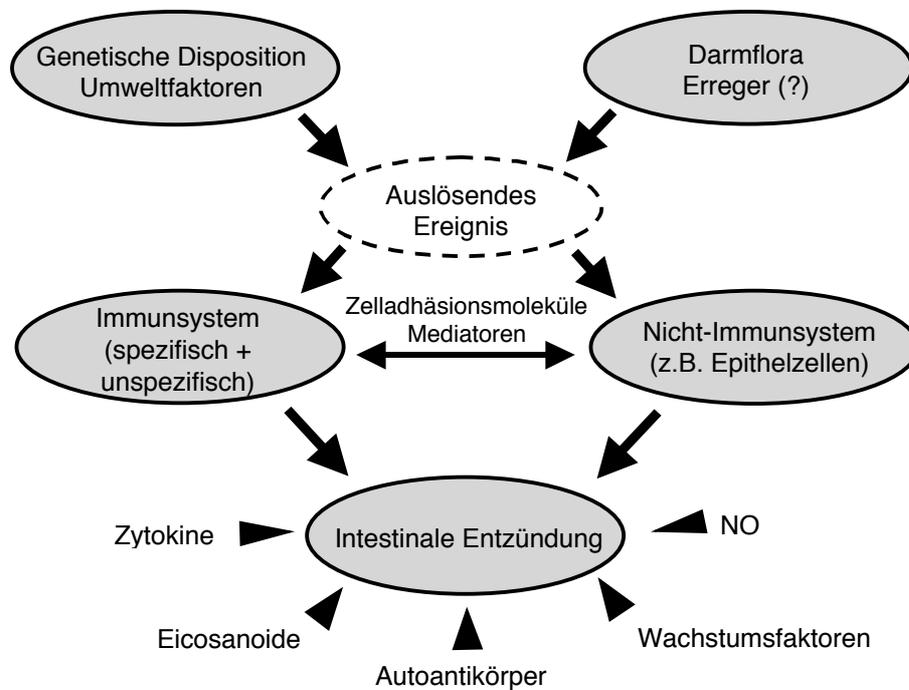
Der *Morbus Crohn* (MC) tritt in Deutschland mit einer Inzidenz von 5 bis 6 pro 100.000 Einwohnern auf. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr mit einer zweiten Häufung um das 60. Lebensjahr. Die Krankheitsverteilung ist bei Frauen und Männern gleich. Die jährliche Inzidenz der *Colitis ulcerosa* (CU) hingegen liegt in Deutschland bei 3 bis 4 pro 100.000 Einwohner (Daiss et al. 1989; Timmer und Goebell 1999). Diese Erkrankung kommt in jeder Altersgruppe vor und auch hier sind Männer und Frauen im gleichen Verhältnis betroffen (Ghosh et al. 2000).

Die Behandlung der Patienten ist kostenintensiv, da der variable Verlauf der Erkrankungen eine komplexe Diagnostik und Therapie erfordert. In den USA wurden die gesamten medizinischen Kosten der *Colitis ulcerosa* für das Jahr 1990 auf 500 Millionen US-Dollar geschätzt, die Gesamtkosten für beide entzündlichen Erkrankungen zusammen auf bis zu 2,6 Milliarden Dollar (Hay und Hay 1992).

### **1.2.2 Ätiologie und Pathogenese**

Die Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist unklar. Bei der Krankheitsentstehung spielt eine gemeinsame Wirkung verschiedener Faktoren eine Rolle. Es konnte eine genetische Disposition belegt werden (McLeod et al. 1997). In betroffenen Familien treten CED sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Richtung vermehrt auf. Bei bis zu 40 % der Verwandten ersten Grades von betroffenen Patienten kommt es zu einer Krankheitsmanifestation

(Farmer 1989). In bestimmten Populationen wie z. B. Ashkenazi-Juden wird eine erhöhte Inzidenz beobachtet (Bennett et al. 1991). Den verschiedenen Formen der CED konnten Assoziationen mit humanen Leukozyten-Antigenen (HLA)-Allelen zugeordnet werden (Biernacki et al. 1986). Ebenso wurde eine genetische Variante des NOD2-Gens mit Assoziation zum Morbus Crohn identifiziert (Hugot et al. 2001). Zusätzlich spielen endogene Faktoren wie die Darmflora und exogene Umweltfaktoren wie Ernährung, Medikamente, Beruf, klimatische Bedingungen, Stress, Rauchen und Umweltverschmutzung eine Rolle. Auch ein bakterieller oder viraler Erreger als Ursache der Entzündung kann nicht ausgeschlossen werden (Fiocchi 1998; Abbildung 1).



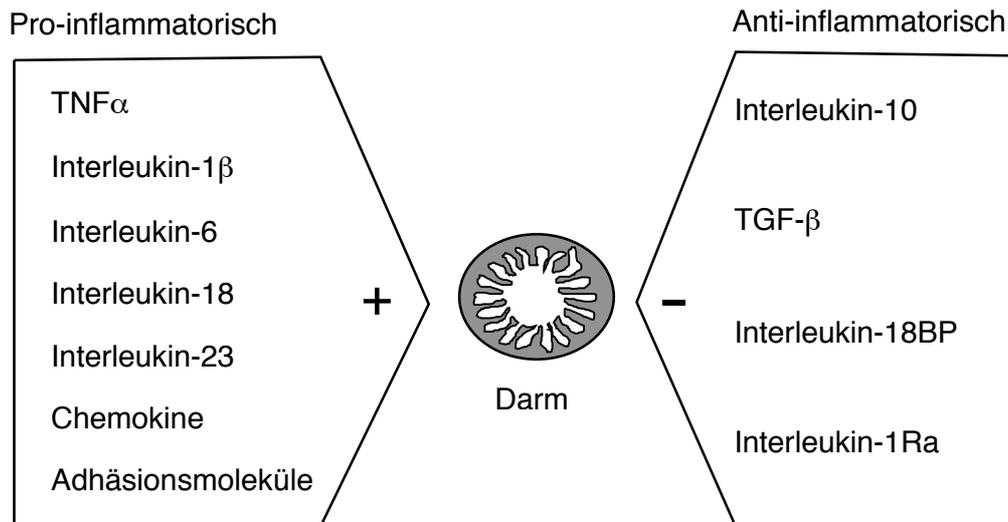
**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der Ätiopathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (nach Fiocchi 1998).

Durch ein Zusammenspiel dieser Faktoren wird eine zellvermittelte Entzündungsreaktion ausgelöst, die zu einer Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und anderen Leukozyten sowie weiteren Zelltypen der Darmwand, wie z.B. Epi- und Endothelzellen oder Mesenchymzellen, führt. Durch Sekretion von Zytokinen wie etwa

Interleukin (IL-)1, IL-6, IL-8 oder TNF- $\alpha$  und durch eine erhöhte Expression der Zelladhäsionsmoleküle - „Intercellular adhesion molecule“(ICAM)-1, „Endothelial leukocyte adhesion molecule“(ELAM)-1, „Leukocyte function-associated antigen“(LFA)-1 oder E-selectin - kommt es zur Infiltration der Mukosa durch Immunzellen (Burgio et al. 1995) und zur Synthese und Sekretion von weiteren Zytokinen, Eicosanoiden, Wachstumsfaktoren und Stickstoffmonoxid (NO). Es folgt eine kontinuierliche Zellaktivierung, die die Entzündung unterhält und in der Folge zu Gewebeschäden und Regenerationsvorgängen führt.

Betrachtet man die sezernierten Botenstoffe genauer (Abbildung 2), so stehen sich antiinflammatorische Mediatoren wie z. B. IL-1-Rezeptorantagonist, IL-10 und der Wachstumsfaktor „Transforming growth factor“(TGF)- $\beta$  und die bei diesem Krankheitsbild überwiegenden proinflammatorischen Mediatoren wie z. B. IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-23, „Monocyte chemoattractant protein“(MCP)-1 und TNF- $\alpha$  gegenüber. Wie bereits erwähnt, sind auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, LFA-1 und E-Selectin in erhöhten Konzentrationen nachweisbar (Casini-Raggi et al. 1995; Reinecker et al. 1995; Fiocchi 1998; Pizarro et al. 1999).

Beim Morbus Crohn überwiegen Th-1-Zytokine wie IL-12, während bei der Colitis ulcerosa die Th-2-Zytokine wie IL-4 und IL-5 dominieren (Monteleone et al. 1997; Fuss et al. 1996).



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der pro- und anti-inflammatorischen Botenstoffe bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

### 1.2.3 Klinischer Verlauf

Generell lassen sich die beiden Vertreter der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch die Symptome, die Laborwerte, den klinischen Verlauf und die Histologie meist unterscheiden. Jedoch ist eine Differenzierung der Krankheitsbilder in 10 % der Fälle nicht zu erreichen (Colitis indeterminata).

Beim Morbus Crohn handelt es sich um eine transmurale Entzündung (Podolsky 1991). Die Entzündungsausbreitung erfolgt diskontinuierlich segmental. Meist sind das terminale Ileum (87 %) oder Kolon (69 %) und Rektum (21 %) betroffen, jedoch kann sich der Morbus Crohn im gesamten Verdauungstrakt manifestieren (Scully et al. 1982). In ungefähr 40 % der Fälle ist nur der Dünndarm, in 30 % der Fälle nur der Dickdarm und in weiteren 30 % der Dick- und Dünndarm gemeinsam befallen. Tiefe fissurähnliche Ulzerationen treten in fortgeschrittenen Stadien auf und geben der Schleimhaut ein so genanntes pflastersteinähnliches Relief. Der Entzündungsprozess kann sich durch Bildung von Fisteln außerhalb des Verdauungskanals ausdehnen. Bei 50 % der Patienten lassen sich pathognomonische nicht verkäsende Granulome nachweisen. Die Patienten klagen meist über Durchfälle und

Schmerzen im rechten Unterbauch. Ein komplizierender Ileus hat entweder die ödematöse Schwellung der Darmwand oder eine narbige Striktur aufgrund einer Fibrose zur Ursache. Blut im Stuhl kann auftreten, ist aber im Vergleich zur Colitis ulcerosa seltener. Ebenso kommen systemische Auswirkungen wie Ernährungsstörungen (Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel bei Beteiligung des terminalen Ileums, Gewichtsverlust durch Malabsorption) und Fieber vor (Podolsky 1991). Nach dem ersten Auftreten der Erkrankung erleiden praktisch alle Patienten einen Rückfall. Innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung müssen 30 % der Erkrankten operiert werden. Die Häufigkeit eines operativen Eingriffes bei den verbleibenden Patienten wird mit 5 % pro Jahr angegeben (Wright et al. 1987; de Boer Visser et al. 1990). Die Rückfallrate kann durch die Operation jedoch nicht gesenkt werden. Innerhalb eines Jahres kommt es bei 80 % der Patienten nach chirurgischem Eingriff zu einem erneuten Auftreten der Erkrankung, meist proximal der Operationsstelle (Rutgeerts et al. 1984; Rutgeerts et al. 1990).

Im Gegensatz zum Morbus Crohn ist der entzündliche Prozess bei der Colitis ulcerosa auf die Mukosa und Submukosa des Kolons beschränkt (Podolsky 1991). Typischerweise breitet sich die Erkrankung kontinuierlich vom Rektum aus nach proximal aus, jedoch sind seltene Fälle beschrieben, in denen es zu einer Aussparung des Rektums kommt (Spiliadis et al. 1987). Die Ausdehnung des Krankheitsprozesses variiert. Bei Erwachsenen ist in 55 % der Fälle das Rektum betroffen, zu 30 % dehnt sich der Krankheitsprozess bis zur linken Kolonflexur und zu 15 % auf das gesamte Kolon aus (Ghosh et al. 2000). In seltenen Fällen kommt es zum Befall des terminalen Ileums, der so genannten „Backwash-ileitis“. Histopathologisch treten Mikroabszesse und eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in die Lamina Propria auf. In späteren Stadien kommt es zu oberflächlichen Ulzerationen der Schleimhaut, die makroskopisch sichtbar und von mukopurulentem Exsudat bedeckt sind. Häufig sind Pseudopolypen nachweisbar (Podolsky 1991).

Hauptsymptom der Erkrankung sind rektale Blutungen oder blutige Durchfälle. Viele Patienten klagen über abdominelle Schmerzen mit Betonung der linken

Seite, die vorwiegend bei Defäkation auftreten. Die Stuhlfrequenz ist erhöht und der Stuhl drang vermehrt (Rao et al. 1988). Systemisch kann Müdigkeit, Gewichtsverlust und Fieber auftreten. Extraintestinale Manifestationen wie Erythema nodosum, Iritis, Uveitis und eine sklerosierende Cholangitis wurden beobachtet (Ghosh et al. 2000). Nach Remission der Erkrankung kommt es typischerweise zu Rückfällen, wobei deren Häufigkeit und Ausprägung sehr variabel ist. Die kumulative Wahrscheinlichkeit, einen Rückfall zu erleiden, liegt innerhalb von 2 Jahren bei 80 %, innerhalb von 10 Jahren bei mehr als 95 %. Patienten mit Colitis ulcerosa haben ein signifikant erhöhtes Risiko für Kolonkarzinome (Hendriksen et al. 1985; Munkholm 2003).

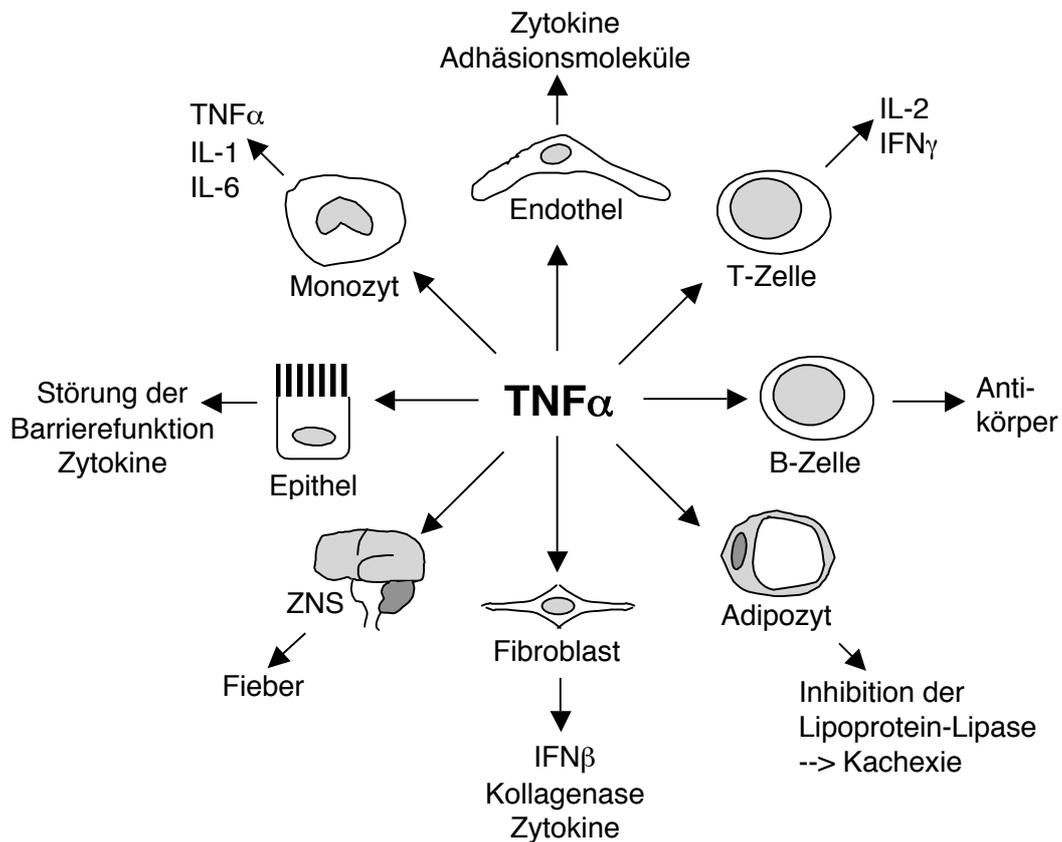
#### **1.2.4 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen**

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist TNF- $\alpha$  sowohl beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa erhöht. Im Vergleich beider Erkrankungen wurden bei Morbus Crohn höhere Konzentrationen sowohl im Plasma als auch im Stuhl und in der Darmmukosa gemessen (Murch et al. 1991; Braegger et al. 1992; Murch et al. 1993; Breese et al. 1994). TNF- $\alpha$  stellt ein wesentliches Element in der Pathogenese der Entzündungsreaktion bei CED dar. Die erfolgreiche Behandlung von Morbus Crohn-Patienten mit dem chimären TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab zeigt die Wirksamkeit anti-inflammatorischer Therapie durch die spezifische Blockade von TNF- $\alpha$  (van Dullemen et al. 1995; Targan et al. 1997; Present et al. 1999).

Schon 1893 konnten Coley und Mitarbeiter feststellen, dass bei bösartigen Erkrankungen eine schwere Infektion zu einer Verkleinerung der Tumorgroße führte (Coley 1893). In der Folge wurde dieser Effekt auf die im Entzündungsgeschehen sezernierten Zytokine zurückgeführt. Hierbei hat der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , dessen Name von diesem Effekt herrührt, einen entscheidenden Einfluss. Das TNF- $\alpha$ -Protein konnte erstmals 1985 gereinigt, isoliert (Aggarwal et al. 1985) und sein Gen geklont werden (Shirai et al. 1985). Die Transkriptionsregulation kann zell- oder stimuluspezifisch erfolgen. Es sind

Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z. B. Nukleärer Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und „Cyclic adenosine monophosphate response element“ (CRE) beschrieben (Tsai et al. 1996).

Hauptquelle von TNF- $\alpha$  sind Monozyten und Makrophagen, aber es konnte auch eine Synthese durch T-, B-, und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie durch Mastzellen und intestinale Mesenchym- und Epithelzellen nachgewiesen werden (Jung et al. 1995; Tamma et al. 1997; Bischoff et al. 1999). TNF- $\alpha$  wirkt auf eine Vielzahl von Zelltypen und ruft verschiedene Wirkungen hervor. Die Pleiotropie von TNF- $\alpha$  ist in Abbildung 3 zusammengefasst.



**Abbildung 3.** Biologische Wirkungen von TNF- $\alpha$  auf Zelltypen der Kolonmukosa (modifiziert nach Eigler et al. 1997)

### 1.2.5 Bisherige Therapiemöglichkeiten und Grenzen

Wirkstoffe, die bei den aktuellen Therapieschemata für CED Verwendung finden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

**Tabelle 1.** Medikamentöse Therapie von CED

	Wirkungsweise	Indikation
5-Aminosalicylsäure	antiinflammatorisch	MC: Standardtherapie bei Kolonbefall; CU: Standardtherapie; leichter Schub; Remissionserhaltung
Kortikosteroide (topisch und systemisch)	antiinflammatorisch, immunsuppressiv	MC/CU: Mittelschwerer bis schwerer Schub
Azathioprin	immunsuppressiv	MC/CU: chronisch aktive Form; Remissionserhaltung
6-Mercaptopurin	immunsuppressiv	MC/CU: chronisch aktive Form; Azathioprinnebenwirkungen
Cyclosporin	immunsuppressiv	CU: hochakuter Schub; steroidrefraktärer Verlauf
Metronidazol		MC: perianale Erkrankung, Fisteln CU: Pouchitis

Diese dargestellten Standardtherapeutika führen in vielen Fällen zu einer Besserung des Krankheitsgeschehens und der Lebensqualität der Patienten. Jedoch ist es in 30 % der Fälle nicht möglich, eine Remission zu induzieren oder eine Langzeitremission aufrechtzuerhalten. Zudem kommt es häufig zu Nebenwirkungen durch die Steroidtherapie. Deshalb ist es notwendig, neue spezifisch wirksamere Therapieansätze zu finden, um die Nebenwirkungen zu reduzieren und das Entzündungsgeschehen effektiver zu unterdrücken.

Im August 1998 wurde von der *Food and Drug Administration* der USA der Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab als die erste gegen ein einzelnes Zytokin gerichtete Immuntherapie zur Behandlung des Morbus Crohn zugelassen. Hierbei handelt es sich um einen chimären human-murinen Immunglobulin (Ig)G1

monoklonalen Antikörper, der sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Form von TNF- $\alpha$  bindet. Infliximab lysiert zusätzlich TNF- $\alpha$ -produzierende Zellen durch Komplement-Fixation und Antikörper-vermittelte Zellyse (Scallon et al. 1995). Studien zur erfolgreichen Behandlung des aktiven Morbus Crohn (Van Dullemen et al. 1995; Targan et al. 1997), zur Remissionserhaltung (Rutgeerts et al. 1999) und zur Therapie von Fisteln (Present et al. 1999) wurden publiziert. Infliximab wird bei therapieresistenten Verläufen und nicht als Primärmedikation eingesetzt (Lochs et al. 1997). Die dauerhafte Anwendung führt zur Produktion von Autoantikörpern und Antikörpern gegen doppelsträngige DNA (Rutgeerts et al. 1999), was die weitere Erforschung alternativer Methoden zur Inhibition von TNF- $\alpha$  notwendig macht. Bei der Colitis ulcerosa zeigte Infliximab in einer Studie eine signifikante Verbesserung des Krankheitsgeschehens (Sands et al. 2001). In einer zweiten Studie konnte dagegen keine Wirksamkeit festgestellt werden (Probert et al. 2003).

CDP571 ist ein chimärer Maus anti-human IgG4-Antikörper, der ebenso die lösliche wie die transmembrane Form von TNF- $\alpha$  bindet. Bei Patienten mit Morbus Crohn konnte eine klinische Besserung des Krankheitsverlaufes in mehreren Studien gezeigt werden (Stack et al. 1997; Sandborn et al. 2001a). Bei der Colitis ulcerosa ist bisher eine unkontrollierte klinische Pilotstudie publiziert, die eine Wirksamkeit nahe legt (Evans et al. 1997). Der komplett humane TNF- $\alpha$ -Antikörper Adalimumab wird aktuell in klinischen Studien zur Behandlung des Morbus Crohn getestet.

### **1.3 Phosphodiesterase-Inhibition als antiinflammatorischer Therapieansatz**

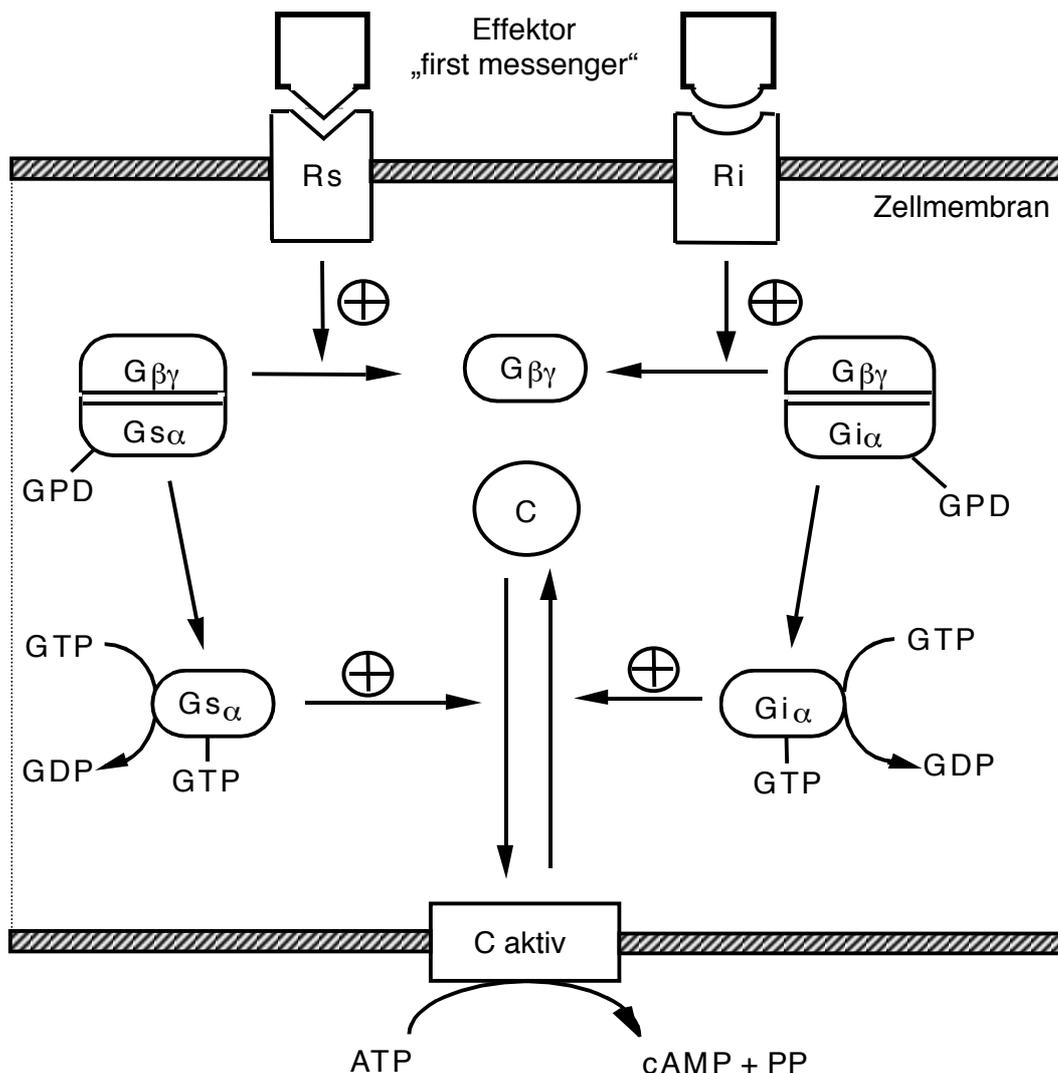
Durch Einsatz von Phosphodiesteraseinhibitoren, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, wird die Synthese von TNF- $\alpha$  gehemmt. In der Folge soll auf den Wirkmechanismus dieser Medikamentengruppe und die für die vorliegende Arbeit relevanten Isoenzyme der Phosphodiesterasen eingegangen werden.

#### **1.3.1 Zyklisches Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat**

cAMP wurde von dem amerikanischen Biochemiker Earl Sutherland als intrazellulärer Vermittler der Wirkung vieler Hormone entdeckt. Deshalb wird cAMP auch als zweiter Informationsüberträger oder „second messenger“ bezeichnet (Löffler 1997; Torphy 1998).

In der Folge wird das Adenylatzyklasesystem näher dargestellt (Abbildung 4). Zunächst gehören zu diesem System die Rezeptoren für stimulierende ( $R_s$ ) oder hemmende ( $R_i$ ) Hormone oder Substanzen. Nach Bindung eines entsprechenden Effektors („first messenger“) wird die Adenylatzyklase als katalytische Einheit (C) nicht direkt beeinflusst, sondern es kommt zu einer Weiterleitung des Signals auf entsprechende heterotrimere G-Proteine. Im Falle einer Aktivierung dissoziieren die Untereinheiten und es wird die für den stimulierenden Effekt wichtige Einheit  $G_s\alpha$  freigesetzt. Die Bindung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) befähigt diese Untereinheit dann zur Aktivierung der Adenylatzyklase (C), die wiederum Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in cAMP und Pyrophosphat (PP) umwandelt. Die Inhibition der Adenylatzyklase erfolgt interessanterweise auf ähnliche Weise. Nach Beladung des inhibitorischen Rezeptors ( $R_i$ ) kommt es auch hier zur Dissoziation eines G-Proteins. Die inhibitorische Untereinheit  $G_i\alpha$  ist nach Bindung von GTP in der Lage, die katalytische Untereinheit C von einer aktiven in eine inaktive Form zu überführen. Für eine Löschung des inhibitorischen bzw. stimulatorischen Signales sind keine weiteren Proteine notwendig. Beide Untereinheiten haben eine intrinsische GTPase-Aktivität, die für die Hydrolyse des gebundenen GTP

zu Guanosin-5'-diphosphat (GDP) und Phosphat verantwortlich ist. Dies beendet die stimulatorische bzw. inhibitorische Aktivität, führt zu einer Reassoziierung der G-Protein-Komplexe und damit zu einer Beendigung der Beeinflussung der Adenylatzyklase.



**Abbildung 4.** Darstellung des Adenylatzyklasesystems von der Beladung des Rezeptors bis zur Synthese von cAMP. Rs und Gs: stimulierender Rezeptor bzw. G-Protein, Ri bzw. Gi: inhibitorischer Rezeptor bzw. G-Protein, C: katalytische Untereinheit (Adenylatzyklase) (nach Löffler 1997)

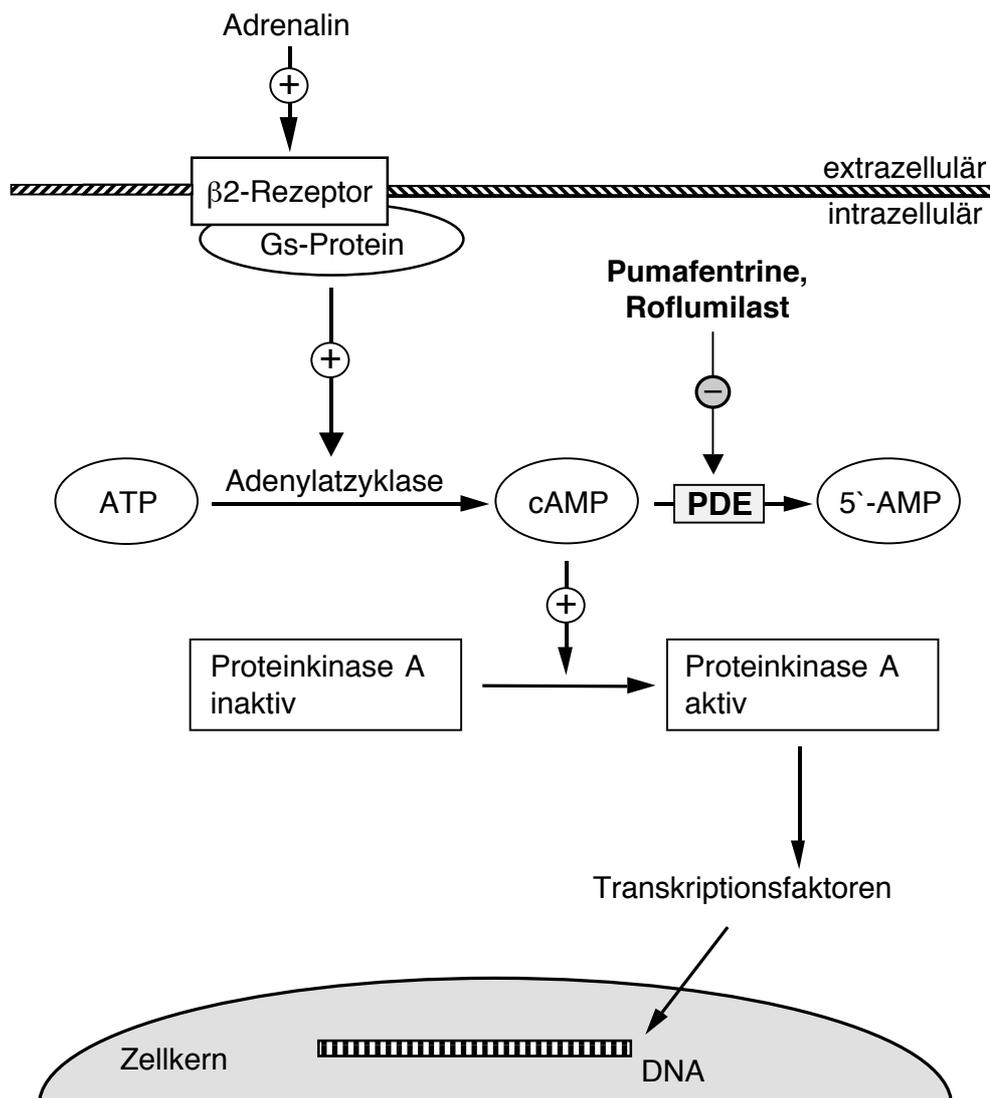
cAMP aktiviert die tetramere Proteinkinase A (PKA) durch Dissoziation der regulatorischen von den katalytischen Untereinheiten. Die aktivierte PKA phosphoryliert eine Reihe von Substraten, die wichtige zelluläre Mechanismen regulieren. Hierzu gehört auch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren

CRE-binding proteins. Diese binden direkt an spezifische Sequenzen der Promotorregion bestimmter Gene und stellen so die letzte Verbindung zwischen einem extrazellulären „first messenger“ und dem Erbgut dar. Eine ähnliche Sequenz wurde in der Promotorregion des TNF- $\alpha$ -Gens gefunden (Lalli und Sassone-Corsi 1994). Vermutlich findet hier die Beeinflussung der TNF- $\alpha$ -Expression durch cAMP erhöhende Substanzen statt.

Eine cAMP-Erhöhung bewirkt eine Unterdrückung der Aktivität von Immun- und Entzündungszellen: Monozyten sezernieren geringere Mengen an TNF- $\alpha$  und Eicosanoiden, Lymphozyten produzieren weniger Interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-2 und IL-13 (Bourne et al. 1974; Kammer 1988; Moore und Willoughby 1995).

### **1.3.2 Wirkungsmechanismen und Familie der Phosphodiesterasen**

Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration wird durch die Aktivität der PDE begrenzt, die cAMP zu 5'-Adenosin-Monophosphat (AMP) abbauen. Durch Hemmung dieser Phosphodiesterasen wird die Hydrolyse verhindert und die intrazellulären cAMP-Spiegel steigen. Diese Beobachtung wurde erstmals 1958 von Sutherland und Rall publiziert (Sutherland and Rall 1958) (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Wirkungsmechanismus der Phosphodiesterasen

Bisher sind elf verschiedene Klassen innerhalb der Familie der PDE bekannt (Beavo 1995; Torphy 1998, Fawcett et al. 2000). Diese Isoenzyme lassen sich durch unterschiedliche Substratspezifität bzw. -affinität, die Regulation durch verschiedene Aktivatoren bzw. Inhibitoren oder durch die Affinität zu Pharmaka unterscheiden. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Enzyme, ihr Substrat und eine Auswahl bereits bekannter Inhibitoren in einer Tabelle dargestellt (Tabelle 2). Innerhalb dieser Familien sind teilweise mehrere Gene identifiziert. Aufgrund der Genstruktur (bei den humanen PDE zwischen 10 und 22 Exons) gibt es eine unterschiedliche Anzahl an Splicevarianten (Torphy 1998). Diese

weisen gewebsspezifische Unterschiede in der Affinität zum Substrat auf, werden aber alle durch den gleichen Inhibitor gehemmt. Beim Menschen wird deshalb eine Gesamtzahl von 50 verschiedenen Proteinen erwartet (Hatzelmann und Schudt 2001).

**Tabelle 2.** Bisher bekannte Klassen an Phosphodiesterase-Isoenzymen (Beavo 1995; Torphy 1998; Fawcett et al. 2000)

Klasse	Charakteristika	Isoformen	Inhibitoren
1	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-abhängig	7 verschiedene Isoformen	Vinpocetin
2	Zyklisches Guanosin-3',5'-Mono-Phosphat (cGMP)-stimuliert	nur eine Isoform bekannt, hydrolytische Aktivität für cAMP	
3	cGMP-inhibiert	bisher 2 bekannte Isoformen, hydrolytische Aktivität für cAMP	Milrinon, Zardaverin (auch PDE Typ 4), <b>Pumafentrine (auch PDE Typ 4)</b>
4	cAMP-spezifisch	30 verschiedene Isoformen, größte Familie der PDE	Rolipram, Denbufyllin, Zardaverin (auch PDE Typ 3), <b>Roflumilast, Pumafentrine (auch PDE Typ 3)</b>
5	cGMP-spezifisch	eine Isoform bekannt	Sildenafil, Dipyridamol
6	Photoaktivierung cGMP-spezifisch	neun verschiedene Isoenzyme bekannt	Dipyridamol
7	hohe Affinität cAMP-spezifisch	ein Isoenzym bekannt, nahe verwandt mit PDE Typ 4	3-Isobutyl-1-methylxanthin (IMBX) insensitiv
8	cAMP-spezifisch	ein Isoenzym bekannt	IMBX insensitiv
9	cGMP-spezifisch	ein Isoenzym bekannt	
10	cAMP und cGMP	ein Isoenzym bekannt	Dipyridamol
11	cAMP und cGMP	drei Subtypen vermutet	Dipyridamol

### **1.3.3 Phosphodiesterase Typ 3-Isoenzymfamilie**

#### **Enzymcharakteristika**

Die PDE Typ 3 wurde anfangs als Enzym mit hoher Affinität zu cAMP beschrieben, das durch Cilostamide (ein spezifischer PDE Typ 3-Inhibitor) und cGMP gehemmt wurde (Yamamoto et al. 1984; Harrison et al. 1986; Kariya and Dage et al. 1988). 1986 wurde PDE Typ 3 aus dem Rinderherz (Harrison et al. 1986) und später aus anderen Gewebetypen humanen und tierischen Ursprungs isoliert (Degerman et al. 1987; Rascon et al. 1992; Le Bon et al. 1992; Degerman et al. 1993). Eine Unterscheidung zu anderen Isoenzymen der PDE ist durch die hohe Affinität zu cAMP *und* cGMP möglich (Degerman et al. 1987).

#### **Enzymverteilung**

Die PDE Typ 3 wird wie die PDE Typ 4 vorwiegend in humanen Immun- und Entzündungszellen exprimiert wie z. B. in basophilen Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten (Robicsek et al. 1991; Peachell et al. 1992, Tenor et al. 1995; Torphy 1998).

#### **Wirkung der Inhibition der Phosphodiesterase Typ 3 in verschiedenen Zelltypen *in vitro***

In verschiedenen Zellen wie basophilen Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten kommt es bei alleiniger Hemmung der PDE Typ 3 zu keiner oder im Vergleich zu einer PDE Typ 4-Hemmung zu nur geringer Suppression der Entzündungsantwort (Robicsek et al. 1991; Peachell et al. 1992, Molnar-Kimber et al. 1993, Essayan et al. 1997).

### **1.3.4 Phosphodiesterase Typ 4-Isoenzymfamilie**

#### **Enzymcharakteristika**

Die PDE Typ 4 wurde zu Anfang als cAMP-spezifische PDE in Hundenieren identifiziert, die nicht von cGMP beeinflusst, aber durch das Alkoxybenzyl-substituierte Imidazolin Ro 20-1724 (ein spezifischer PDE Typ 4-Inhibitor) gehemmt werden konnte (Thompson et al. 1979; Epstein et al. 1982). In der folgenden Zeit wurden PDE Typ 4 aus verschiedenen Zelltypen isoliert und teilweise charakterisiert, z. B. aus humanen Monozyten und Leukozyten (Torphy et al. 1993, Truong und Muller 1994). Die PDE Typ 4 sind die vorherrschende Enzymgruppe in hämatogenen Entzündungszellen (Giembycz and Dent 1992). Die PDE Typ 4-Aktivität wird kurzfristig durch Phosphorylierung reguliert (Conti et al. 1995). Ein langfristig erhöhter cAMP-Spiegel bewirkt eine Aktivitätssteigerung der PDE Typ 4 durch eine Erhöhung der Genexpression (Torphy et al. 1992). Zusätzlich kann eine Stimulation von Immunzellen zu einer PDE Typ 4-Aktivierung führen. Valette und Mitarbeiter konnten eine erhöhte PDE Typ 4-Aktivität in Thymozyten der Ratte nach einer Stunde Stimulation mit dem Mitogen Concavalin A zeigen. Eine ähnliche Beobachtung wurde in mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten peritonealen Makrophagen der Maus gemacht (Valette et al. 1990; Okonogi et al. 1991).

#### **Enzymverteilung**

PDE Typ 4 sind in T-Lymphozyten, neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, in Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sowie in Epithelzellen nachweisbar (Torphy 1998). In diesen Zellen kommt die PDE Typ 4 neben anderen Isoenzymen vor.

## **Wirkung der Inhibition der Phosphodiesterase Typ 4 in verschiedenen Zelltypen *in vitro***

*Neutrophile Granulozyten:* In humanen Neutrophilen aus dem peripheren Blut reduzieren PDE Typ 4-Inhibitoren die Superoxidanionproduktion nach Stimulation (Wright et al. 1990, Ottonello et al. 1995) stärker als in Gewebeneutrophilen (Al-Essa et al. 1995). Die Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen wird vermindert (Derian et al. 1995). Dies geschieht vermutlich durch die Fähigkeit der Inhibitoren, die Expression der Adhäsionsmoleküle „Cluster of Differentiation“(CD)11b/CD18 auf Neutrophilen zu supprimieren (Berends et al. 1997).

*Basophile Granulozyten:* In basophilen Granulozyten unterdrücken PDE Typ 4-Inhibitoren die antigeninduzierte Histamin- und Cysteinyl-Leukotrienfreisetzung (Weston et al. 1997).

*Eosinophile Granulozyten:* In diesem Zelltyp wird eine Reihe von Funktionen gehemmt. Hierzu gehören die basale Superoxidanion-Produktion (Souness et al. 1991), die TNF- $\alpha$ -vermittelte Adhäsion an Endothelzellen (Torphy et al. 1994) und die Leukotrien B<sub>4</sub>-Synthese in Eosinophilen von Guinea-Schweinen (Barnette al. 1995). Im humanen System wurde u. a. eine Hemmung der Superoxid-Generierung (Cohan et al. 1996) und der Chemotaxis durch PDE Typ 4-Inhibition beschrieben (Kaneko et al. 1995).

*Monozyten und Makrophagen:* Monozyten und Makrophagen sind die Hauptquelle von TNF- $\alpha$  in entzündlichen Prozessen. Humane Monozyten aus dem peripheren Blut zeigen vorwiegend PDE Typ 4-Aktivität, enthalten aber auch geringe Anteile an PDE Typ 1 und 3 (Greten et al. 1996, Gantner et al. 1997). Der spezifische PDE Typ 4-Inhibitor Rolipram reduziert neben anderen Entzündungsmediatoren die TNF- $\alpha$ -Sekretion aus LPS-stimulierten Monozyten und Makrophagen (Semmler et al. 1993; Seldon et al. 1995; Schudt et al. 1995). Rolipram induziert die NO- und die IL-10-Synthese und erhöht die

IL-10-Produktion in murinen und humanen Makrophagen (Kambayashi et al. 1995; Eigler et al. 2000).

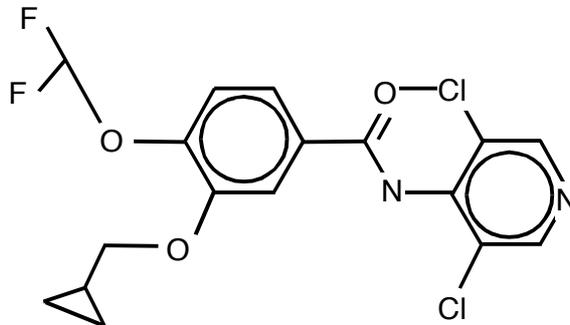
*B-Lymphozyten:* Erhöhte cAMP-Spiegel inhibieren die Proliferation von B-Zellen, können aber zu einem Switch in der produzierten Antikörperklasse führen (Paul-Eugene et al. 1993; Lycke 1993). Der PDE Typ 4-Inhibitor Ro 20-1724 inhibiert die Sekretion von IgE aus mononukleären Zellen von atopischen Spendern. Dieser Effekt ist vermutlich indirekt, da eine ähnliche Wirkung bei reinen B-Zellpopulationen nicht beobachtet werden konnte (Chan und Hanifin 1993).

*T-Lymphozyten:* Die dominierenden Enzymfamilien in T-Zellen sind die PDE Typ 3 und 4 (Robicsek et al. 1991). Applikation von Ro 20-1724 führt zu einer teilweisen Hemmung der Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten Zellproliferation. Diese Hemmung ist in Zellen von atopischen Spendern verstärkt (Banner et al. 1995). Ein erhöhter cAMP-Spiegel durch PDE Typ 4 Inhibition reduziert die Sekretion von Zytokinen wie IL-2, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$ , „Granulocyte-macrophage colony-stimulation-factor“ (GM-CSF) (Mary et al. 1987; Essayan et al. 1997).

## **Roflumilast**

Das in dieser Arbeit verwendete Benzamid-Derivat Roflumilast (3-cyclopropylmethoxy-4-difluoromethoxy-N-[3,5-di-chloropyrid-4-yl]-benzamid) (Abbildung 6) ist ein selektiver PDE Typ 4 Inhibitor und beeinflusst die Isoenzyme PDE Typ 1-3 und PDE Typ 5 nicht. Bisher wurde eine Beeinflussung der „neuen“ Familienmitglieder PDE Typ 7 bis 11 nicht untersucht. Die  $IC_{50}$  für die PDE Typ 4 in humanen neutrophilen Granulozyten beträgt 0,8 nM. Roflumilast ist somit mehr als 100-fach potenter als Ariflo<sup>TM</sup> (Cilomilast; ein spezifischer PDE Typ 4-Inhibitor der zweiten Generation) oder Rolipram (Hatzelmann und Schudt 2001). Roflumilast zeigt antiinflammatorische und immunmodulatorische Wirkungen *in vitro*. Es inhibiert die Entzündungsreaktion humaner neutrophiler und eosinophiler Granulozyten, die Proliferation und

Zytokinsynthese in CD4+ T-Zellen (IL-2, IFN- $\gamma$ ) und vermindert die Synthese von TNF- $\alpha$  durch Monozyten und die davon abgeleiteten Makrophagen und dendritischen Zellen (Bundschuh et al. 2001; Hatzelmann und Schudt 2001).



**Abbildung 6.** Strukturformel Roflumilast (3-Cyclopropylmethoxy-4-difluoromethoxy-N-[3,5-di-chloropyrid-4-yl]-benzamid)

## Pumafentrine

Beim Verfassen dieser Arbeit existierten noch keine Publikationen zu dieser Substanz.

### 1.3.5 Prinzip der dualen Hemmung der Phosphodiesterasen Typ 3 und Typ 4

Die PDE Typ 3 und 4 sind die vorherrschenden Phosphodiesterasen in humanen immunkompetenten Zellen (Torphy 1998). In T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, basophilen Granulozyten und Endothelzellen werden Isoenzyme der PDE Typ 3 *und* 4 mit einem Überwiegen der PDE Typ 4 exprimiert (Robicsek et al. 1991; Peachell et al. 1992; Tenor et al. 1995; Schudt et al. 1995; Weston et al. 1997; Hatzelmann und Schudt 2001).

Schudt und Mitarbeiter berichteten über eine stärkere Suppression der TNF- $\alpha$ -Produktion in humanen alveolären Makrophagen durch gleichzeitige Hemmung der PDE Typ 3 und 4 im Vergleich zu einer Blockade nur einer Isoform (Schudt et al. 1995). Ein synergistischer Effekt wurde ebenso bei der Reduktion der

T-Zell-Proliferation und Zytokinexpression wie bei der Verminderung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Produktion in humanen dendritischen Zellen beschrieben (Bielekova et al. 2000; Hatzelmann und Schudt 2001). In basophilen Granulozyten kommt es zu einer Potenzierung der Suppression antigeninduzierter Histaminfreisetzung im Vergleich zu alleiniger Anwendung eines PDE Typ 4-Hemmers. Die Blockade der PDE Typ 3 alleine zeigte keine Wirkung (Peachell et al. 1992). Robicsek und Mitarbeiter wiesen einen additiven Effekt des PDE Typ 3-Inhibitors CI-930 und des PDE Typ 4-Hemmers Ro 20-1724 auf die Verminderung der PHA-induzierten Zellproliferation nach (Robicsek et al. 1991). Es lässt sich somit für einen dualselektiven Inhibitor ein breiteres Wirkungsspektrum erwarten.

#### **1.4 Tiermodelle für chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Es existiert eine Vielzahl an Tiermodellen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Kim and Berstad 1992; Elson et al. 1995; Dieleman et al. 1997; Boismenu und Chen 2000). Diese Modelle werden in spontan auftretende oder in Tieren mit gesundem Immunsystem exogen induzierte Kolitiden sowie in Kolitiden in Tieren mit Genveränderungen (Knockout- und Transgentiere) oder durch Zelltransfer in Tiere mit eingeschränktem Immunsystem eingeteilt (zusammengestellt in Tabelle 3). Jedoch ist keines der Modelle dem humanen Krankheitsgeschehen in allen Bereichen ähnlich und so kann jedes einzelne Modell nur zu einem Teil der Erforschung der Erkrankung dienen. Bisher gibt es auch noch kein Tiermodell, das den chronischen Verlauf mit akuten Schüben der CED imitieren kann.

Das Modell der DSS-induzierten Kolitis wurde erstmals im Jahre 1985 mit Hamstern beschrieben (Ohkusa 1985). Die Übertragung auf die Maus wurde fünf Jahre später von Okayasu und Mitarbeitern publiziert (Okayasu et al. 1990) und 1993 von Cooper und Mitarbeitern näher charakterisiert (Cooper et al. 1993). In diesem Modell wird eine Kolitis durch kontinuierliche oder zyklische Applikation des Polysaccharids DSS über das Trinkwasser ausgelöst.

**Tabelle 3.** Tiermodelle für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

<b>1. Spontan auftretend</b>		
Cotton Top Tamarin	Affe	(Chalifoux und Bronson 1981)
C3H/HeJ Bir mouse	Maus	(Sundberg et al. 1994)
Samp1/Yit mouse	Maus	(Kosiewicz et al. 2001)
<b>2. Exogen induziert in Tieren mit gesundem Immunsystem</b>		
Essigsäure	Ratte, Maus, Hase, Meerschweinchen	(MacPherson und Pfeiffer 1978)
TNBS/Ethanol	Ratte, Maus, Hase	(Morris et al. 1989)
DSS	Ratte, Maus, Hamster	(Okayasu et al. 1990)
Carrageenan	Ratte, Maus, Meerschwein	(Watt und Marcus 1969)
PG-PS	Ratte	(Sartor et al. 1985)
Indomethacin	Ratte, Hund, Hase	(Yamada et al. 1993)
Immunkomplexe	Hase, Ratte	(Kirsner 1961)
<b>3. Durch Zelltransfer in Tiere mit eingeschränktem Immunsystem</b>		
CD45 Rb <sup>High</sup> -> SCID	Maus	(Morrissey et al. 1993)
BMC-> Cd3εTg26	Maus	(Hollander et al. 1995)
Hsp60 specific CD8+ cells -> TCRβ -/-	Maus	(Steinhoff et al. 1999)
<b>4. Durch Genveränderungen (Knockout / Gentransfer)</b>		
Interleukin-2 -/-	Maus	(Sadlack et al. 1993)
Interleukin-10 -/-	Maus	(McCafferty et al. 2000)
T-Zell-Rezeptor α -/-	Maus	(Mombaerts et al. 1993)
TGFβ1 -/-	Maus	(Shull et al. 1992)
STAT3 -/- (Makrophagen und Neutrophile)	Maus	(Takeda et al. 1999)

DSS hat einen toxischen Effekt auf die Kolonepithelzellen *in vitro* (Dieleman et al. 1994; Diaz-Granados et al. 2000). Es bindet an die Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen (Tsubamoto et al. 1994; Sasaki et al. 1996) und wird von diesen phagozytiert. Es kommt zu deren Aktivierung und zur Sekretion von makrophagentypischen Zytokinen, u. a. IL-1 und TNF-α. Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und ELAM-1 in den Endothelzellen der Submukosa werden

hochreguliert und die Einwanderung von Leukozyten ist in der Folge erhöht. Die Beteiligung der bakteriellen Mikroflora ist noch unklar und ändert sich im Versuchsverlauf. Die luminalen Konzentrationen von Bacteroides- und Clostridium-Spezies sind erhöht (Okayasu et al. 1990).

Histopathologisch treten an Tag 3 der DSS-Applikation primär epitheliale Veränderungen auf. Es kommt zu einer Abflachung und zu einem Verlust der Krypten ohne entzündliche Aktivität. Ab Tag 5 wandern Granulozyten, Makrophagen und CD4+ Zellen in die Kolonmukosa ein und erste Erosionen treten auf (Dieleman et al. 1998). Reaktive Epithelveränderungen als Zeichen von Reparationsprozessen beginnen an Tag 7. Die histologischen Veränderungen korrelieren in ihrer Schwere mit dem klinischen Verlauf. Es kommt zu blutigen Durchfällen bis hin zur rektalen Blutung und Gewichtsverlust. Das Mausmodell der DSS-induzierten Kolitis zeigt mukosale Veränderungen, die mit den Schleimhautschäden der beiden Vertreter der CED vergleichbar sind. Ähnlichkeiten mit dem Morbus Crohn sind der diffuse Befall, die Ausdehnung der Entzündung ins submuköse Bindegewebe, aphtöse Erosionen und die transmurale Entzündungsausbreitung. Es finden sich im Mausmodell jedoch keine Granulome und keine Fisteln. Das gleichzeitige Vorhandensein von aktiven neben inaktiven Bereichen spricht eher für eine Vergleichbarkeit mit der Colitis ulcerosa, wobei auch Kryptenabszesse nachgewiesen werden können (Hartmann et al. 2000).

Auch das Zytokinmuster kann nicht eindeutig einem der beiden Formen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zugeordnet werden. In der Kolonmukosa beim chronischen Verlauf sind sowohl IFN- $\gamma$  als Th1-Zytokin (Morbus Crohn) als auch IL-4 als Th2-Zytokin (Colitis ulcerosa) erhöht (Dieleman et al. 1998).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Labormaterial und Geräte

- Hemocare (CARE diagnostica GmbH, Voerde)
- 24 G Microlance Kanüle (Braun, Melsungen AG, Melsungen)
- 1 ml Injekt Tuberkulinspritzen (Braun, Melsungen AG)
- Katheter zur oralen Applikation (Unimed, Lausanne, Schweiz)
- Eppendorfröhrchen (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- 15 ml Röhrchen (Greiner GmbH, Frickenhausen)
- 50 ml Röhrchen (Greiner GmbH)
- Pipetten (Greiner GmbH)
- Zellkulturplatten (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- Plastiksiebe 70  $\mu\text{m}$  und 100 $\mu\text{m}$  (Falcon)
- Begasungsbrutschrank Heraeus BBD C220 (Heraeus, Hanau)

#### Mikroskopisches Zubehör

- Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena)
- Neubauer-Zählkammer (Eppendorf GmbH)

#### Zentrifugen und Mixgeräte

- Ultrazentrifuge 5417 R (Eppendorf GmbH)
- Omnifuge 2 ORS (Heraeus)

### 2.2 Häufig verwendete Substanzen

#### Kulturmedium

Zur Herstellung des Kulturmediums wurde RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin) mit 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, 10 mM Hapes

(N-2-Hydroxyethyl)piperazin-N-[2-Ethanol-sulfonsäure]) (alle Sigma, München), 0,4 mM L-Glutamin (Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland) und 10 % fetalem Kälberserum (Fa. Seromed, Berlin) versetzt. Es wurden ausschließlich endotoxinarme Medien und Substanzen eingesetzt, um eine unspezifische Stimulation zu vermeiden. Um Komplementfaktoren zu inaktivieren, wurde das verwendete humane Serum für 30 min bei 56°C inkubiert. Das Kulturmedium wurde für die Verdünnung der Stimulantien, die Isolation der Splenozyten und alle *in vitro*-Experimente verwendet.

## **Stimulation**

### Lipopolysaccharid

LPS (Escherichia coli, Serotyp 055:B5, Sigma) ist ein Hauptbestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien. Es besteht aus einem äußeren Polysaccharid, der „O“-Kette, die mit der „Core“(Kern)-Region verbunden ist. Der innere Teil dieser Kernregion ist kovalent mit dem Lipid A verbunden, welches die biologische Wirkung des Endotoxins vermittelt. Für die Versuche wurde das LPS in Kulturmedium aufgelöst und aliquotiert (Konzentration 100 µg/ml), bei -80°C in 2 ml Eppendorfröhrchen tiefgefroren und bei Bedarf einzeln aufgetaut und mit Hilfe von Kulturmedium in die entsprechende Konzentration verdünnt.

### Phorbol 12-Myristat 13-Acetat

Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) (Sigma) ist ein stark wirksames Mitogen. Es aktiviert die Proteinkinase C *in vivo* und *in vitro* und fördert die Expression der induzierbaren NO-Synthase. Für die Versuche wurde der Phorbol-Ester in Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) (Sigma) auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt, aliquotiert und bei -80°C in 0,5 ml Eppendorfröhrchen tiefgefroren. Die Aliquots wurden einzeln aufgetaut und mit Kulturmedium auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

## Calcium Ionophore A23187

Die Ausgangssubstanz Calcium ionophore A23187 (Calcimycin) wurde mit DMSO (Sigma) auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in 0,5 ml Eppendorfröhrchen tiefgefroren. Die Aliquots wurden einzeln aufgetaut und mit Kulturmedium auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Calcimycin zeigt eine hohe Selektivität für Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), erhöht die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration in der Zellkultur und stimuliert die Produktion von NO durch die calmodulinabhängige NO-Synthase. Calcimycin wurde immer in Kombination mit PMA eingesetzt, um die Zellen maximal zu stimulieren.

### 2.3 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand von Oberflächenantigenen zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dies geschieht durch die Analyse der Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel mittels eines optischen Messsystems. Voraussetzung für die Messung ist, dass die Zellen als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Die Zellsuspension wird angesaugt und über eine Kapillare in eine Quarzküvette (Messkammer) geleitet. Die Messkammer wird von einer Trägerflüssigkeit laminar durchströmt, die die Zellsuspension beim Eintritt in die Kammer erfasst, auf das Zentrum der Küvette verengt und stark beschleunigt, so dass die Zellen einzeln und in ausreichendem Abstand zueinander am Messpunkt vorbeifließen („hydrodynamische Fokussierung“).

Am Messpunkt wird mittels eines Laserstrahls das Streulicht und die Lichtemission durch Photodetektoren gemessen und in elektrische Signale (Einheit Volt) umgewandelt. Das Vorwärtsstreulicht ( $0^{\circ}$ - $10^{\circ}$  zur Richtung des einfallenden Lichtstrahles) erlaubt Aussagen über die Größe der Zellen und das Seitwärtsstreulicht ( $90^{\circ}$  zur Richtung des einfallenden Strahls) bestimmt

hauptsächlich die Granularität. Die gemessene Lichtemission der durch den Laserstrahl angeregten Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die Typisierung der Zellen nach vorheriger Markierung mit entsprechenden Antikörpern gegen Oberflächenmerkmale. Das Zwischenschalten von Bandpassfiltern ermöglicht es, das einfallende Licht nach Wellenlänge aufzutrennen und einzelne Fluoreszenzfarbstoffe getrennt voneinander zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurden als Farbstoffe Fluorescein-Isothiozyanat (FITC, Bandpassfilter 525 nm) und Phycoerythrin (PE, Bandpassfilter 575 nm) verwendet. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper und somit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. So kann das Ergebnis entweder als prozentualer Anteil an positiven Zellen von der Gesamtzellzahl angegeben werden oder als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), die sich aus dem arithmetischen Mittel der Fluoreszenzintensitäten aller im Analysefenster befindlichen Ereignisse errechnet.

Vor jeder Zählreihe muss das Zytometer durch Messung einer Isotypkontrolle eingestellt werden. Hierbei wird eine Zellsuspension mit unspezifisch bindenden Antikörpern angefärbt und dient als Negativkontrolle. Damit kann der Messbereich festgelegt werden, der als negativ für das entsprechend markierte Antigen zu werten ist.

In dieser Arbeit wurde ein FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Pharmingen, NJ, USA) verwendet. Es arbeitet mit einem Argonlaser. Die Auswertung der mittels des FACS-Gerätes gewonnenen Ergebnisse erfolgte entweder mit CELL Quest (Version 3.2.1) oder FlowJo Software (Version 2.7.8).

## **2.4 Zytokinmessung mit „Enzyme-linked immunosorbent assays“**

Interferon- $\gamma$

Um die IFN- $\gamma$  Konzentration der Proben zu bestimmen, wurde ein kommerzieller muriner Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Endogen, Woburn, USA)

verwendet. Im ersten Schritt wurden die entsprechend des Nachweisbereiches verdünnten Proben und die Standards in eine vorher mit Anti-murin-IFN- $\gamma$ -Antikörper beschichtete 96-well Kulturplatte pipettiert. Im zweiten Schritt wurde ein biotinylierter Anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper hinzugefügt und für eine Stunde inkubiert. Als nächstes wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat hinzugefügt, das innerhalb der Inkubationszeit von 30 min an das vorhandene Biotin bindet. Nicht gebundenes Konjugat wurde in einem Waschschrift entfernt. Der Streptavidin-Peroxidase-Komplex wurde durch die Zugabe einer Substratlösung zu einem Farbstoff entwickelt und die Farbintensität nach Zugabe einer Stop-Lösung mit Hilfe eines ELISA-Readers (Dynatech-Laboratories, Guernsey, GB) photometrisch bestimmt. Der verwendete ELISA hat eine Sensitivität von  $< 10$  pg/ml und einen Messbereich von 15 bis 3000 pg IFN- $\gamma$ /ml.

#### Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

Die Messung des murinen TNF- $\alpha$  funktionierte analog. Einzige Ausnahme war eine gemeinsame Gabe der Probe bzw. des Standards und des biotinylierten Antikörpers mit anschließender zweistündiger Inkubation. Der murine TNF- $\alpha$ -ELISA hatte eine Sensitivität von  $< 10$  pg/ml und einen Messbereich von 10 bis 2450 pg TNF- $\alpha$ /ml.

## 2.5 Bradford-Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinbestimmung im Koloneluat erfolgte colorimetrisch mit Serva Blau nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford 1976). Dazu wurde eine Stammlösung aus 0,1 g/ml Bovines Serum Albumin (BSA) mit Aqua dest. zu 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000  $\mu$ g/ml Standardlösungen verdünnt. Die Bradford-Reagenz wurde zu vier Teilen mit *Aqua dest.* gemischt. Nun wurden 10  $\mu$ l des Standards bzw. der Proben auf eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200  $\mu$ l verdünntem Bradford-Reagenz vermischt. Nach 5 Minuten wurden die Konzentrationen mit einem ELISA-Reader (OD 595 nm) bestimmt.

## **2.6 Tiere und Tierhaltung**

### **2.6.1 Tierversuchsantrag**

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsvorhaben wurden gemeinsam mit dem Tierschutzbeauftragten der Innenstadtkliniken (Prof. Dr. med. vet. Elmar Richter) und dem Tierstallbeauftragten der Medizinischen Klinik (Prof. Dr. med. Roland Gärtner) zwei Tierschutzanträge nach §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes für die Bundesrepublik Deutschland (BGBl 1986) an die Regierung von Oberbayern gestellt und genehmigt.

### **2.6.2 Tierbeschaffung**

Als Versuchstiere wurden vorwiegend 6 bis 8 Wochen alte, 20 bis 22 g schwere, weibliche Bagg-albino/c (Balb/c)-Mäuse (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon) benutzt. Balb-Mäuse wurden 1913 von der Firma Bagg entwickelt. 1932 wurden die Rechte auf die Firma Snell übertragen, die das /c an den Namen anhängte. Dieser Mausstamm ist sehr weit verbreitet, gehört zu den häufigsten drei verwendeten Inzuchtstämmen, ist genetisch stabil und kostengünstig. Von uns wurde dieser Stamm ausgewählt, da hierzu für das DSS-Modell Erfahrungen aus der Literatur und unserem Labor vorlagen (Okayasu et al. 1990; Hartmann et al. 2000). Weibliche Mäuse sind in der Handhabung einfacher, da sie weniger aggressiv als männliche Mäuse sind.

### **2.6.3 Tierhaltung**

Im Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU München wurden die Mäuse in Gruppen zu maximal 5 Tieren gehalten. Es wurden Plastik Käfige mit Edelstahlabdeckung, deren Boden mit Normalstreu ausgelegt war, verwendet. Die Mäuse lebten unter kontrollierten Bedingungen bei einem automatisch gesteuerten 12-stündigen hell/dunkel Rhythmus, 22°C Raumtemperatur und 65 % Luftfeuchtigkeit. Als Nahrung erhielten die Tiere kommerziell erhältliches Standardmäusefutter und Trinkwasser *ad libitum* bzw. während der Versuche

DSS gelöst in *Aqua ad injectabile ad libitum*. Die Tiere wurden frühestens acht Tage nach Ankunft in die Versuche aufgenommen, um eine Akklimatisierung an die vorgegebenen Bedingungen zu gewährleisten.

#### **2.6.4 Anästhesie und Euthanasie der Mäuse**

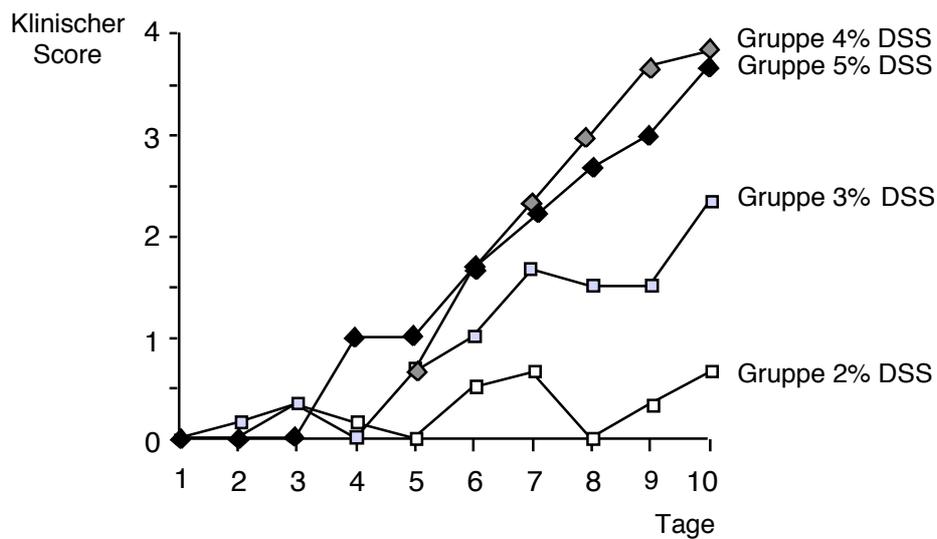
Zur Anästhesie der Mäuse wurden diese in einen Glasbehälter gesetzt, der mit Isofluran ((1-Chlor-2,2,2,-trifluorethyl)difluormethylether, Rhodia Limited, Bristol, GB) getränkten Zellstoff enthielt. Die Narkotisierung der Tiere dauerte etwa 30 Sekunden. In schlafendem Zustand wurden die Mäuse dann durch zervikale Dislokation des Kopfes getötet. Die hier verwendete Methode ist in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzgesetzen geeignet, den Tod der Maus innerhalb von Bruchteilen von Sekunden herbeizuführen.

#### **2.7 Dextran-Sodium-Sulfat-Modell**

Für unsere Versuchsreihen wurde Dextran-Sodium-Sulfat mit einem Molekulargewicht von 40.000 Dalton bei ICN Biomedicals GmbH (Eschwede) verwendet. Zur Herstellung einer Konzentration von 3,5 % wurden 35 g DSS in 1 l *Aqua ad injectabile* (Braun, Melsungen AG) gelöst. Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt und zweimal wöchentlich gewechselt.

In unseren Versuchen wurde den Mäusen über eine Versuchsdauer von 11 Tagen 3,5 % DSS in *Aqua dest. ad libitum* angeboten. Die Kontrolltiere erhielten Trinkwasser *ad libitum* über den gleichen Zeitraum. Die Therapie erfolgte ebenfalls von Tag 1 bis zum Versuchsende, es handelt sich also um ein prophylaktisches Modell. Die DSS-Konzentrationen für das Kolitismodell in der Literatur variieren. Es ist zum einen bekannt, dass die Konzentrationen des eingekauften DSS bei der Firma ICN von Charge zu Charge variieren. Zum anderen induziert die gleiche Konzentration an DSS bei verschiedenen Mausstämmen unterschiedliche Schweregrade an Kolitis (Mahler et al. 1998). Die von uns verwendete Konzentration von 3,5 % DSS wurde aufgrund eines

Titrierversuches mit Balb/c-Mäusen in der Klinischen Pharmakologie als die für unsere Einrichtung derzeit Beste gewählt (Abbildung 7). Während die Verabreichung von 4 % und 5 % DSS im Trinkwasser eine zu schwere Kolitis induzierte, bewirkte die 3 % DSS-Konzentration keine für die Testung von Pharmaka ausreichenden Entzündungsausprägungen. Am letzten Versuchstag wurden die Mäuse getötet und weiter untersucht.



**Abbildung 7.** Dextran-Natrium-Sulfat Titrierversuch (n = 5/Gruppe)

## 2.8 Therapeutika

### Auflösung der Therapiesubstanzen

#### Roflumilast

Roflumilast wurde uns freundlicherweise von der Firma Altana (ehemals Byk Gulden Lomborgsche Chemiefabrik, Konstanz) zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Sonnen- oder UV-Bestrahlung. Für die Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht (KG) wurden 3 mg Roflumilast in ein Glasgefäß mit 200  $\mu$ l Polyethylenglykol 400 (Boehringer Ingelheim, Heidelberg) gegeben, auf 70°C erhitzt und mit einem Rührer gemischt, bis die Substanz vollständig gelöst war. Danach wurden 29,8 ml einer 4 % Methylcellulose-(Methocel-)Lösung (Methylhydroxypropylcellulose; Dow Chemicals, Midland, USA) hinzugegeben und bei Raumtemperatur erneut gerührt.

Für die Dosis von 5 mg/kg KG wurden 5 mg Roflumilast in ein Glasgefäß mit 400  $\mu$ l Polyethylenglykol 400 (Boehringer Ingelheim) gegeben, auf 70°C erhitzt und mit einem Rührer gemischt, bis die Substanz vollständig gelöst war. Danach wurden 9,6 ml einer 4 % Methocel-Lösung hinzugegeben und bei Raumtemperatur erneut gerührt. Es entstand eine homogene Suspension, die an jedem Versuchstag neu angesetzt wurde.

#### Pumafentrine

Pumafentrine wurde uns freundlicherweise von der Firma Altana zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur in einem geschlossenen, lichtgeschützten Glasbehälter. Aufgrund der Löslichkeit wurde auch in diesem Ansatz 4 % Methocel-Lösung verwendet. Die Auflösung der Substanz erfolgte wie bei Roflumilast beschrieben. Die Applikationsdosen betragen 5 mg/kg KG und 20 mg/kg KG.

## **Applikation der Therapiesubstanzen**

Die Gabe erfolgte mit Hilfe einer 1 ml Tuberkulinspritze, der ein Katheter der Länge 8 cm (Innendurchmesser 1 mm) aufgesteckt wurde. Die Substanzen wurden direkt in den Ösophagus der Mäuse appliziert. Nach der Verabreichung wurden die Mäuse über eine Dauer von etwa drei Minuten weiter beobachtet. So lässt sich ein eventuelles Regurgitieren der Substanzen feststellen. Das Applikationsvolumen betrug bei beiden Substanzen 200  $\mu$ l einmal täglich am Morgen.

## **2.9 Quantifizierung der experimentellen Kolitis**

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Untersucher zu vermeiden, wurden alle Versuche geblindet durchgeführt. Verschiedene Endpunkte unterliegen einer variablen Beurteilungsmöglichkeit durch den Beobachter. Um diesen Faktor zu minimieren, wurde die Bestimmung dieser Parameter bei allen Versuchen durch in diesem Modell erfahrene Mitarbeiter durchgeführt.

### **2.9.1 Verlauf**

Der Versuchsverlauf wurde mit einem klinischen Score bewertet, der sich aus drei Parametern zusammensetzt: dem prozentualen Gewichtsverlust der Tiere im Verhältnis zum Gewicht an Tag 1, der Stuhlkonsistenz und dem Blut im Stuhl (Siegmond et al. 2001). Für jeden dieser Parameter wird ein Wert von 0 Punkten (gesund) bis 4 Punkten (schwer ausgeprägt) vergeben. Der Gesamtscore ist der Durchschnitt dieser drei Einzelparameter und reicht somit ebenfalls von 0 Punkte (gesund) bis 4 Punkte (schwerste Kolitisaktivität). Er wurde jeden Morgen bei jedem Tier einmal bestimmt. Der klinische Score orientiert sich an dem von Cooper und Mitarbeiter verwendeten Disease Activity Index (Cooper et al. 1993). Murthy und Mitarbeiter konnten zeigen, dass diese Bewertungsmethode mit spezifischeren Entzündungsparametern korreliert (Murthy et al. 1993).

## **Gewicht**

Die Mäuse wurden jeden Morgen einmal auf einer Küchenpräzisionswaage mit der Genauigkeit 0,5 g gewogen. Der Gewichtsverlust wurde in die prozentuale Gewichtsabnahme vom Anfangsgewicht zu Versuchsbeginn umgerechnet und nach folgendem Schema berechnet (Tabelle 4):

**Tabelle 4.** Gewichtsverlust Score

<b>Gewichtsabnahme in Prozent vom Ausgangsgewicht (Tag 1)</b>	<b>Punkte</b>
0 %	0
< 5 %	1
5 % bis 9,9 %	2
10 % bis 20 %	3
> 20 %	4

## **Stuhlkonsistenz**

Zur Bestimmung der Stuhlkonsistenz wurde von den Mäusen nach dem Wiegen eine Stuhlprobe gewonnen. Die Stuhlkonsistenz wurde nach folgenden Kriterien mit Punkten bewertet (Tabelle 5):

**Tabelle 5.** Stuhlkonsistenz Score

<b>Stuhlkonsistenz</b>	<b>Punkte</b>
Normal geformt	0
Weich, deformiert, nicht am Anus klebend	2
Flüssig, am Anus klebend	
Durchfall	4

## ***Blut im Stuhl***

Die gewonnenen Stuhlproben wurden auf makroskopisch sichtbare Blutbeimengungen und auf okkultes, nur auf Hemocare-Testbriefchen darstellbares Blut hin untersucht. Die Punkte für den klinischen Score wurden wie folgt vergeben (Tabelle 6):

**Tabelle 6.** Blut im Stuhl Score

<b>Blutungsstärke</b>	<b>Punkte</b>
Negativer Hämoccult	0
Positiver Hämoccult	2
Makroskopisch sichtbare Blutbeimengung	4

Der klinische Score wurde von zwei Untersuchern geblindet durchgeführt, mit Aufdeckung der Versuchsreihe am Ende jedes Versuches. Mäuse, die im Versuchsverlauf gestorben waren, wurden mit einem klinischen Score von 4 (schwerste Kolitisaktivität) bis zum Ende des Versuches bewertet. Gestorbene Tiere repräsentieren im Bezug auf den klinischen Score eine Gruppe mit maximaler Krankheitsausprägung. Jedoch mussten diese Mäuse aus der Bewertung der weiteren Endpunkte ausgeschlossen werden, da hier kein Score, sondern absolute Zahlenwerte bestimmt wurden.

### **2.9.2 Kolonlänge**

*Post mortem* wurde das Abdomen der Tiere eröffnet und das Kolon vom Caecum bis zur Analöffnung herauspräpariert. Danach folgte die Aufbringung auf eine Zellstoffunterlage, ohne das Kolon zu dehnen, und die Länge wurde bestimmt. Die Kolonlänge ist in diesem Modell ein sehr gut reproduzierbarer, indirekter Entzündungsparameter. In der Literatur wurde diese Methode bereits mehrfach beschrieben (Okayasu et al. 1990, Bennett et al. 1997, Hartmann et

al. 2000). Sie korreliert mit den pathologischen Veränderungen im Kolon (Okayasu et al. 1990).

### 2.9.3 Histologischer Score

Nach Messung der Kolonlänge wurde ein 0,5 cm langer Ring aus dem Kolon transversum herausgeschnitten und in 10 % Formalin (Sigma) in 2 ml Eppendorfröhrchen eingelegt. Die Einbettung in Paraffin, die Anfertigung der Schnitte, die Hämatoxilin-Eosin-Färbung und die histologische Beurteilung der Präparate wurde nach Blindung der Proben durch Prof. Dr. Hans-Anton Lehr (Pathologisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz) durchgeführt. Der histologische Score bewertet zwei Parameter, die Infiltration der Darmwand durch Entzündungszellen und die Gewebeschäden. Beide Hilfsgrößen werden von 0 Punkte (keine Ausprägung) bis 3 Punkte (starke Ausprägung des Merkmales) beurteilt. Der Gesamtscore ist die Summe beider Parameter, reicht also von 0 Punkten (kein Entzündungszellinfiltrat, keine Gewebeschäden) bis 6 Punkten (starke Infiltration, massive Gewebeschäden). Dieser Score lehnt sich an das Bewertungssystem von Dieleman et al. 1994 an und wurde von Prof. Lehr weiterentwickelt. Die genauen Kriterien der Punktevergabe können Tabelle 7 entnommen werden.

**Tabelle 7.** Histologischer Score

<b>Infiltration durch Entzündungszellen</b>	<b>Punkte</b>
Keine bis seltene Infiltration der Lamina Propria	0
Verstärkte Infiltration der Lamina Propria	1
Konfluenz der Entzündungszellen, Ausbreitung bis in die Submukosa	2
Transmurale Ausdehnung	3

<b>Gewebeschaden</b>	<b>Punkte</b>
Keine Beschädigung der Mukosa	0
Diskrete fokale lymphoepitheliale Läsionen	1
Erosion/Ulzeration der Mukosa	2
Transmurale Mukosaschäden	3

#### **2.9.4 Zytokinmessung im Koloneluat**

Die Zytokinmessung wurde nach dem Protokoll von Hartmann et al. 2000 und Siegmund et al. 2001 durchgeführt. Zur Zytokinextraktion aus dem Kolongewebe wurden Kolonabschnitte von etwa 4 cm abgetrennt und mit „Phosphate-buffered saline“ (PBS), versetzt mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beide Sigma) gespült. Die Proben wurden in 100 µl PBS in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen eingelegt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Kolonstücke gewogen. Es folgte ein einminütiger Mischvorgang auf einem Rüttler (Vortex VF2, Fa. Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz), ehe die Versuchsstücke bei 10.000 g und 4°C für 15 min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert wurden. Aus dem entstehenden Überstand wurde die Zytokinkonzentration mittels eines kommerziellen ELISA-Kits (siehe 2.4) bestimmt und das Ergebnis im Verhältnis zum Gewicht der Proben bzw. im Verhältnis zum Gesamtprotein angegeben.

#### **2.9.5 Bestimmung des Milzgewichtes**

Nach steriler Entnahme der Milzen wurden diese in vorher abgewogene 1,5 ml Eppendorf-Gefäße in Kulturmedium gegeben. Aus der Gewichts Differenz konnte das Milzgewicht bestimmt werden.

#### **2.9.6 Isolation der Splenozyten**

Die Splenozyten wurden in Anlehnung an das Protokoll vom Coligan und Mitarbeitern isoliert (Coligan et al. 1992). Nach dem Wiegen wurden die Milzen unter Spülung mit 10 ml gekühltem Kulturmedium mit Hilfe eines Plastikstabes durch einen Nylonfilter (Porengröße 100 µm) gepresst und die entstehende Zellsuspension in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Nach einem Zentrifugationsschritt (520 g, 10 min, 4°C, Beschleunigungsfaktor 9, Bremsfaktor 4) und dem Dekantieren des Überstandes wurde das verbleibende Zellpellet für 12 min in einen Erythrozyten-Lyse-Puffer (Lysing Reagent, Ortho-Clinical Diagnostics GmbH, Neckargemünd) aufgenommen. Der verwendete

Puffer führt zu einer Anhäufung von Ammoniumchlorid im Erythrozyten und damit zu einem Anstieg des osmotischen Druckes. Dies bewirkt ein Platzen der Zellmembran. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium, dem 1 % humanes Serum (Sigma) beigegeben war, aufgenommen und die Zellzahl nach Trypanblau-Färbung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### **2.9.7 Zellkultur der Splenozyten**

Die Splenozytensuspension wurde auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt. In einer 48-well Zellkulturplatte wurden 250  $\mu$ l Medium oder der entsprechende Stimulus (LPS oder PMA/Calcimycin) vorgelegt und 250  $\mu$ l der Splenozytensuspension dazugegeben. Die nun in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml vorliegenden Splenozyten wurden für 20 h in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen entweder nach drei Frier-Tau-Zyklen bei -80°C zur späteren Zytokinmessung mit ELISA (siehe 2.4) tiefgefroren (so kann neben den Zytokinen im Überstand auch das Lysat der Splenozyten in die Messung miteinbezogen werden) oder zur Analyse mit Durchflusszytometrie vorbereitet.

### **2.9.8 Durchflusszytometrie-Analyse der Splenozyten**

Nach Ende der Inkubationszeit wurden etwa  $1 \times 10^6$  Zellen in ein Reagenzröhrchen gegeben, zentrifugiert (520 g, 10 min, 4°C, Beschleunigungsfaktor 9, Bremsfaktor 4) und das Pellet in 1 ml gekühltem Kulturmedium aufgenommen. Nach Färbung und Viabilitätsnachweis mit Trypanblau wurden die Zellen gezählt, auf eine Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml gebracht und erneut gewaschen. 50  $\mu$ l dieser Suspension, d. h.  $2 \times 10^5$  Splenozyten, wurden in ein neues Reagenzröhrchen pipettiert und gekühlt. Zur Unterscheidung verschiedener Subpopulationen und des Aktivierungsgrades der Splenozyten wurden folgende FITC und PE markierte Antikörper gegen subtypenspezifische Zelloberflächenantigene verwendet: Die Hase-Anti-

Maus Antikörper gegen CD3 $\epsilon$  (PE), CD4 (PE und FITC), CD8a (FITC), CD19 (FITC), CD45R (PE), CD69 (PE) und Ly6G (PE) sowie die entsprechenden Isotypkontrollen. MoMa-2 (FITC) stammt von Serotec (Biozol, Eching). Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist unter Punkt 2.3 beschrieben.

## **2.10 Software und Statistik**

Die Ergebnisse werden als arithmetische Mittel angegeben. Die Streuung wird als „standard error of mean“ Standardfehler des Mittels (SEM) dargestellt. Der Vergleich der Mittelwerte wurde durch Anwendung einer ANOVA-Analyse und eines Bonferroni-Dunn-Tests geprüft. Signifikante Unterschiede wurden für  $p < 0,05$  angenommen. Alle statistischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des Programms StatView 4.51 (Abacus Concepts, Calabasas, USA) durchgeführt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Therapeutische Wirkungen von Roflumilast**

#### **3.1.1 Versuchsaufbau**

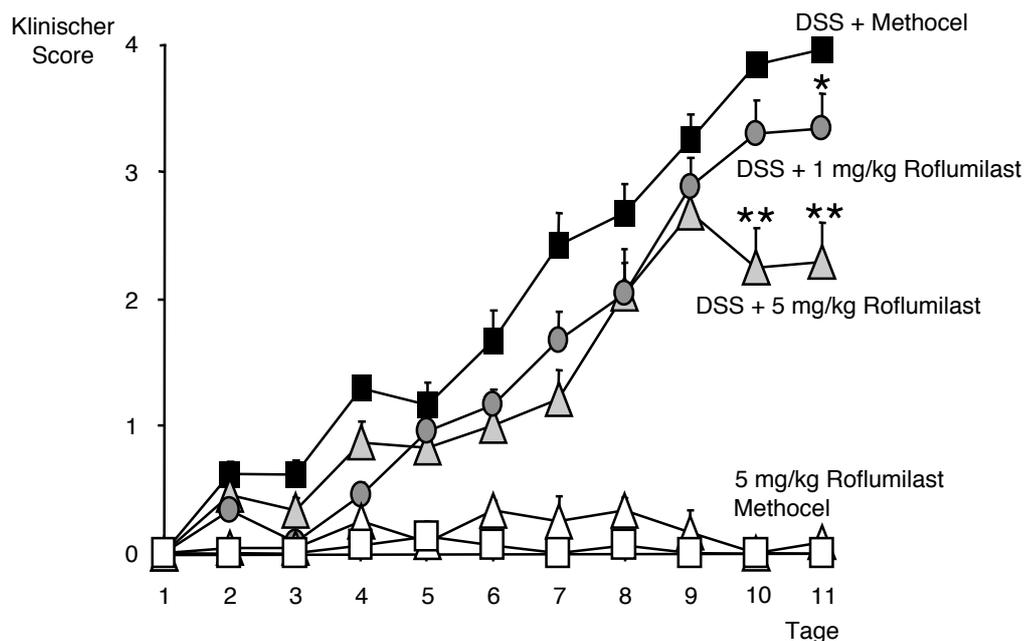
Es wurde zunächst der Effekt von Roflumilast auf die DSS-induzierte Kolitis untersucht. Hierzu wurde den Mäusen 11 Tage lang 3,5 % DSS im Trinkwasser verabreicht, Kontrollmäuse bekamen reines Trinkwasser. Zur Therapie bzw. Kontrolle wurde den Mäusen Roflumilast in den Konzentrationen 1 mg/kg KG bzw. 5 mg/kg KG oder Methocel 4 % als Trägersubstanz/Kontrolle einmal täglich *per os* ebenso über die gesamte Versuchsdauer von 11 Tagen appliziert. Ziel war die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Die hier eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen waren im murinen LPS-Endotoxinmodell wirksam. Dieses Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt.

#### **3.1.2 Klinischer Score**

Die Tiere, die mit DSS versetztes Trinkwasser und Methocel 4 % bekamen, entwickelten klinische Zeichen einer Kolitis, definiert durch einen klinischen Score  $> 0,5$ , beginnend an Tag 2 (Abbildung 8). Bei oraler Gabe von Roflumilast traten Kolitiszeichen erstmals an Tag 4 auf, jedoch verminderten sich die klinischen Auswirkungen der Kolitis während der ersten 6 Tage im Vergleich mit den DSS-Methocel-Tieren nicht. Ab Tag 7 kam es bei der Dosis von 5 mg/kg KG zu einer Senkung des klinischen Scores ( $1,2 \pm 0,2$  bei den DSS-Mäusen mit der 5 mg/kg KG Dosis;  $1,7 \pm 0,2$  bei den Mäusen mit der 1 mg/kg KG Dosis und  $2,4 \pm 0,3$  in der DSS-Methocel-Gruppe). Diese Verbesserung war bei der 5 mg/kg KG-Gruppe ab dem zehnten ( $p < 0,01$ ) und bei der 1 mg/kg KG Dosis ab dem elften Versuchstag ( $p < 0,05$ ) statistisch signifikant gegenüber der DSS-Methocel-Gruppe (Versuchstag 11:  $2,3 \pm 0,3$  bei den DSS-Mäusen mit der 5 mg/kg KG Dosis;  $3,3 \pm 0,3$  bei den DSS-Mäusen mit 1 mg/kg KG Dosis und 4,0 in der DSS-Methocel-Gruppe;  $n = 8$ ; Abbildung 8).

Die Kontrollgruppen, die kein DSS und Roflumilast 5 mg/kg KG bzw. Methocel 4 % erhielten, zeigten keine klinischen Zeichen einer Kolitis. Jeder Parameter des klinischen Scores (Blut im Stuhl, Stuhlkonsistenz und Gewichtsverlust; für die Bedeutung des klinischen Scores siehe 2.9.1) und damit auch der Gesamtscore wurde durch die Gabe von Roflumilast dosisabhängig verbessert.

Ein Tier aus der 5 mg/kg KG Roflumilast Gruppe starb während des Versuchsverlaufes. Dies war vermutlich auf das geringe Anfangsgewicht des Tieres von 17 g und nicht auf eine toxische Wirkung des Medikamentes zurückzuführen.



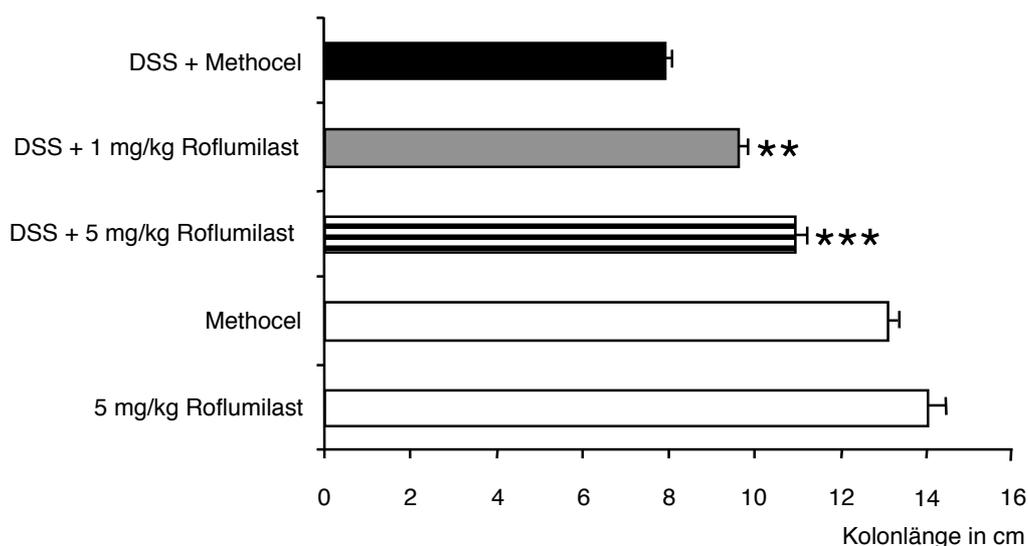
**Abbildung 8.** Wirkung von Roflumilast auf den klinischen Score.

Die Mäuse erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Es wurde entweder Roflumilast in 2 Dosierungen (1 mg/kg KG oder 5 mg/kg KG) oder Methocel 4 % einmal täglich oral verabreicht (n = 8). Die Kontrollen erhielten entweder 5 mg/kg KG Roflumilast (n = 8) oder Methocel 4 % (n = 5). Die Auswirkungen der Kolitis wurden über den klinischen Score, bestehend aus Gewichtsverlust, Blut im Stuhl und Stuhlkonsistenz bestimmt, der von 0 Punkte (gesund) bis 4 Punkte (schwerste Kolitis) reicht. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM.

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 vs. DSS + Methocel.

### 3.1.3 Kolonlänge

Am Tag 11 wurde der Versuch beendet und die Kolonlänge als indirekter morphologischer Entzündungsparameter gemessen. Dieser Endpunkt wurde in vorherigen Arbeiten als sehr gut reproduzierbare Größe identifiziert (siehe 2.9.2). Die Kolonlänge in den mit Roflumilast behandelten DSS-Gruppen war dosisabhängig geringer verkürzt ( $10,9 \pm 0,3$  cm in der 5 mg/kg KG-Gruppe,  $p < 0,001$ ;  $9,6 \pm 0,2$  in der 1 mg/kg KG-Gruppe,  $p < 0,01$ ) als das Kolon in der DSS-Methocel-Gruppe ( $7,9 \pm 0,2$  cm; Abbildung 9). Die Kontrollen zeigten die längste Kolonlänge ( $14,4 \pm 0,4$  cm in der 5 mg/kg KG Roflumilast-Kontrollgruppe;  $13,1 \pm 0,2$  cm in der Methocel-Kontrollgruppe).

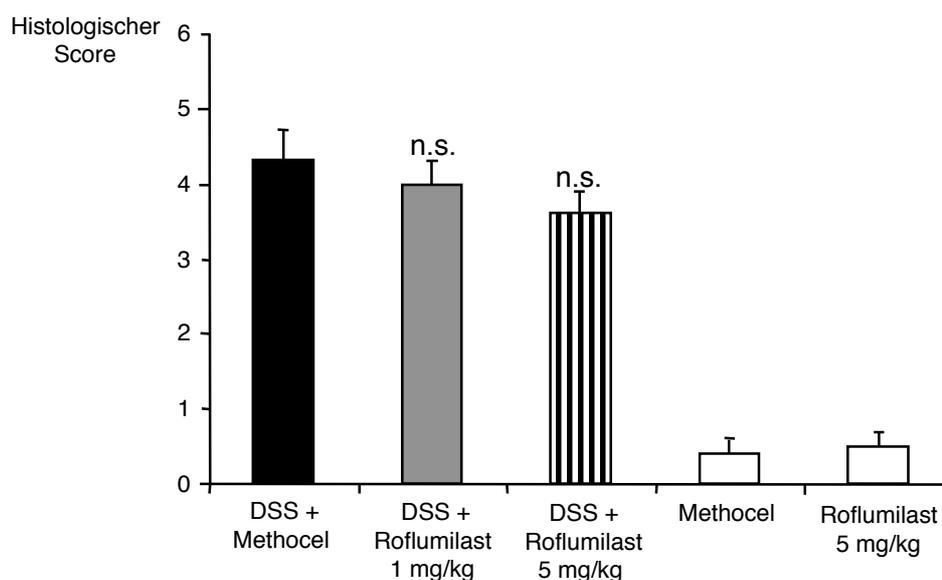


**Abbildung 9.** Wirkung von Roflumilast auf die Kolonlänge.

Die Mäuse erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Es wurde entweder Roflumilast in 2 Dosierungen (1 mg/kg KG oder 5 mg/kg KG) oder Methocel 4 % einmal täglich oral verabreicht ( $n = 8$ ). Die Kontrollen erhielten entweder 5 mg/kg KG Roflumilast ( $n = 8$ ) oder Methocel 4 % ( $n = 5$ ). Die Auswirkungen der Kolitis wurden *post mortem* über Messung der Kolonlänge an Tag 11 bestimmt. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. DSS + Methocel.

### 3.1.4 Histologischer Score

Die histologische Auswertung der Abschnitte des Kolon transversum (siehe 2.9.3) zeigte bei den Mäusen aus den DSS-Gruppen multiple erosive Läsionen und eine Infiltration der Darmwand durch Entzündungszellen. Diese bestanden hauptsächlich aus Makrophagen mit wenigen Lymphozyten und gelegentlich auftretenden eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Die Gabe von Roflumilast über 11 Tage führte zu einem Trend zur Senkung des histologischen Scores ( $4,0 \pm 0,3$  bei den 1 mg/kg KG DSS-Roflumilast-Mäusen;  $3,6 \pm 0,3$  bei der 5 mg/kg KG Roflumilast-Gruppe; nicht signifikant) gegenüber den Mäusen mit DSS und Methocel ( $4,3 \pm 0,4$ ; Abbildung 10). Bei den Kontrolltieren konnten weder bei der Roflumilast-Behandlungsgruppe ( $0,5 \pm 0,2$ ) noch bei den Methocel-Mäusen ( $0,4 \pm 0,2$ ) histologische Zeichen einer Entzündung festgestellt werden.

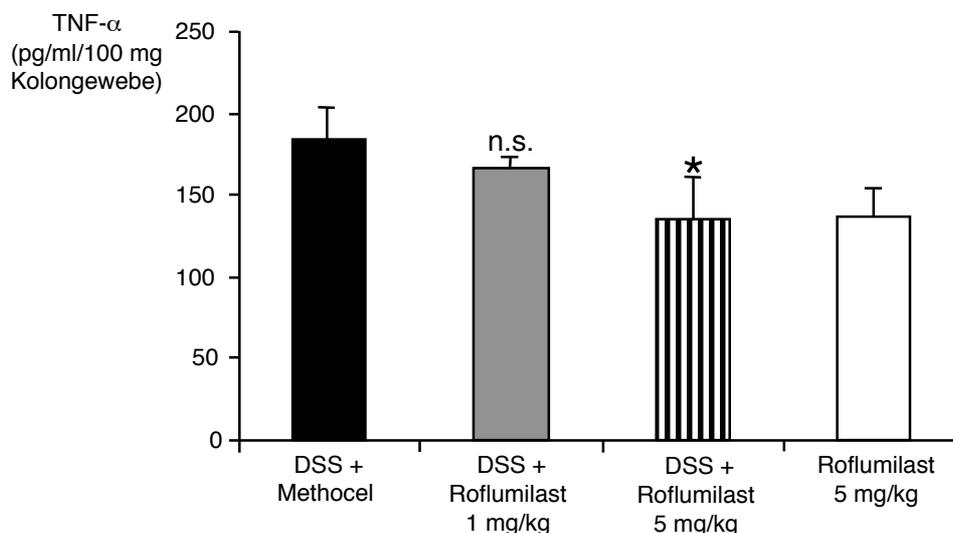


**Abbildung 10.** Effekt von Roflumilast auf den histologischen Score.

Die Versuchstiere erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Die Mäuse wurden über die gesamte Versuchsdauer einmal täglich entweder mit Roflumilast in 2 verschiedenen Dosierungen (1 mg/kg KG oder 5 mg/kg KG, n = 8) oder Methocel (beides oral n = 8 bei der DSS Gruppe, n = 5 bei den Kontrollen) behandelt. Kolonabschnitte des Kolon transversum wurden nach Versuchsende mit Hilfe eines Scores auf histologische Entzündungszeichen hin untersucht. Der Score reicht von 0 Punkte (keine Entzündungszeichen) bis 6 Punkte (starke Infiltration durch Entzündungszellen und massiver Gewebeschaden). Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. n. s. = nicht signifikant vs. DSS + Methocel.

### 3.1.5 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe

An Tag 11 wurden die Kolonproben, wie unter Punkt 2.9.4 beschrieben, zur Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe mittels ELISA vorbereitet. Die DSS-Methocelgruppe zeigte die höchsten Konzentrationen an TNF- $\alpha$  ( $183 \pm 20$  pg/ml/100 mg Kolongewebe). Es konnte eine dosisabhängige TNF- $\alpha$ -Suppression für Roflumilast nachgewiesen werden, wobei die Suppression durch die Behandlung mit 5 mg/kg statistisch signifikant war ( $165 \pm 9$  pg/ml/100 mg Kolongewebe in der DSS-Roflumilast 1 mg/kg KG Gruppe, nicht signifikant, und  $134 \pm 27$  pg/ml/100 mg Kolongewebe bei den DSS-Roflumilast 5 mg/kg KG Mäusen,  $p < 0,05$ ; Abbildung 11). Die mit 5 mg/kg KG Roflumilast behandelten Kontrolltiere zeigten eine Konzentration an TNF- $\alpha$  im Kolongewebe von  $137 \pm 17$  pg/ml/100 mg Kolongewebe.

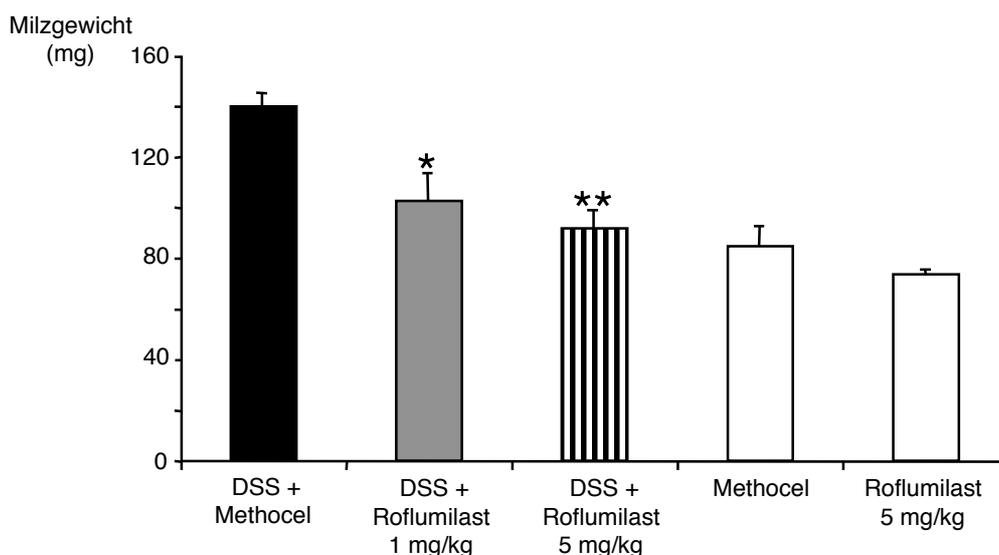


**Abbildung 11.** Wirkung von Roflumilast auf die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe.

Die Versuchstiere erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Über die gesamte Versuchsdauer wurde einmal täglich entweder Roflumilast in 2 verschiedenen Dosierungen (1 mg/kg KG oder 5 mg/kg KG) oder Methocel 4 % (beides oral;  $n = 8$ ) verabreicht. An Tag 11 wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe gemessen. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. n. s. = nicht signifikant, \* $p < 0,05$  vs. DSS + Methocel.

### 3.1.6 Milzgewicht

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass das Milzgewicht in Tieren mit induzierter DSS-Kolitis im Versuchsverlauf zunimmt und einen Parameter der systemischen Entzündungsreaktion darstellt. Am Ende des Versuches zeigte die DSS-Methocel-Gruppe ein Milzgewicht von  $140 \pm 5$  mg. Die Vergrößerung des Milzgewichtes in den DSS-Gruppen wurde durch Gabe von 1 mg/kg KG Roflumilast auf  $103 \pm 11$  mg ( $p < 0,05$ ) und durch Applikation der 5 mg/kg KG Dosis Roflumilast auf  $92 \pm 7$  mg ( $p < 0,01$ ) gegenüber der DSS-Methocel-Gruppe vermindert (Abbildung 12). Die Kontrolltiere ohne DSS im Trinkwasser zeigten das geringste Gewicht ( $73 \pm 2$  mg in der 5 mg/kg KG Roflumilast-Gruppe und  $85 \pm 8$  mg in der Methocelkontrollgruppe).



**Abbildung 12.** Effekt von Roflumilast auf das Milzgewicht.

Die Versuchstiere erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Über die gesamte Versuchsdauer wurde einmal täglich entweder Roflumilast in 2 verschiedenen Dosierungen (1 mg/kg oder 5 mg/kg;  $n = 8$ ) oder Methocel 4 % (beides oral;  $n = 8$  bzw.  $n = 5$ ) verabreicht. Am Tag 11 wurde das Milzgewicht der Tiere bestimmt. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. DSS + Methocel.

### **3.2 Therapeutische Wirkungen von Pumafentrine**

Die Wirksamkeit der Blockade der PDE Typ 4 durch Roflumilast in der DSS-Kolitis veranlasste uns, die Auswirkungen einer dualselektiven Hemmung der PDE Typ 3 und Typ 4 in unserem Modell zu untersuchen. Hierzu verwendeten wir die Substanz Pumafentrine.

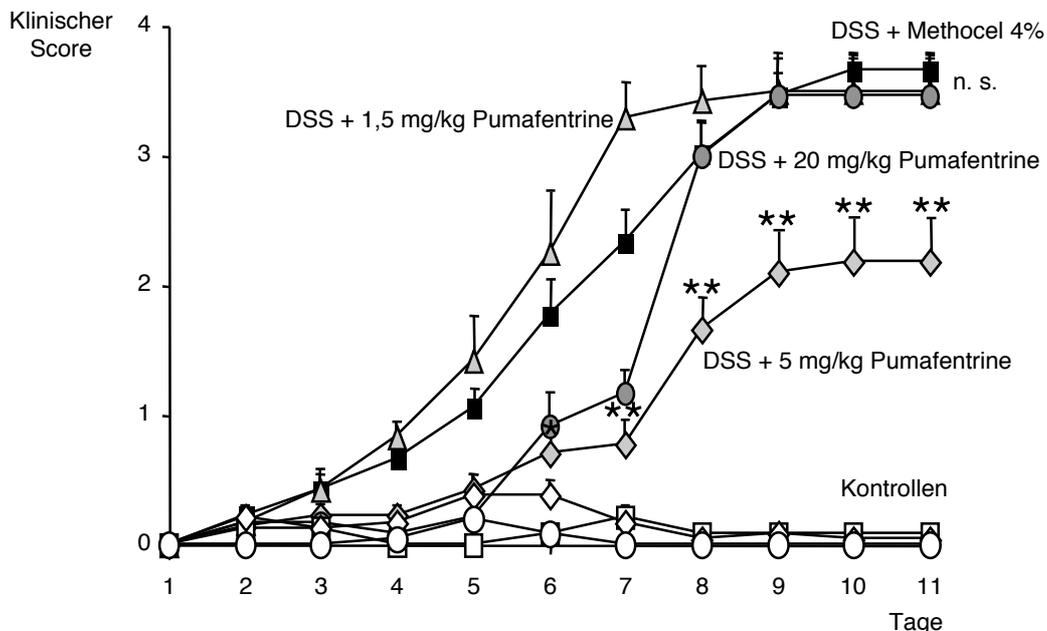
#### **3.2.1 Versuchsaufbau**

Der Effekt von Pumafentrine auf die Entstehung einer Kolitis im prophylaktischen DSS-Modell wurde anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve in drei verschiedenen Dosierungen untersucht. Analog der Testung von Roflumilast wurde den Mäusen 11 Tage lang 3,5 % DSS im Trinkwasser verabreicht, Kontrollmäuse bekamen reines Trinkwasser. Wir teilten die Testung von Pumafentrine in 2 Versuchsansätze auf. Im ersten Protokoll verwendeten wir die Dosierungen 5 mg/kg KG und 20 mg/kg KG bzw. Methocel 4 %. Im zweiten Ansatz wurde die 5 mg/kg KG Dosis mit der 1,5 mg/kg KG Dosis bzw. Methocel 4 % verglichen. Die Applikation erfolgte einmal täglich. In jeder Versuchsgruppe waren jeweils 8 Mäuse.

#### **3.2.2 Klinischer Score**

Die Mäuse, die DSS und Methocel erhielten, entwickelten erste klinische Zeichen einer Kolitis, definiert durch einen klinischen Score  $> 0,5$ , beginnend mit Tag 4. Sowohl die Verabreichung der 5 mg/kg KG als auch der 20 mg/kg KG-Dosis Pumafentrine verzögerte das Auftreten klinischer Kolitiszeichen bis zu Tag 6 und führte zu einer geringeren Entzündungsausprägung bis Tag 7 ( $0,8 \pm 0,2$  in der 5 mg/kg KG DSS-Gruppe und  $1,2 \pm 0,2$  bei den 20 mg/kg KG DSS-Tieren gegenüber  $2,3 \pm 0,2$  in der DSS-Methocel-Gruppe). Jedoch bewirkte im weiteren Versuchsverlauf nur die 5 mg/kg KG-Dosis Pumafentrine eine signifikante Senkung des klinischen Scores, beginnend mit Tag 6 bis zum Versuchsende an Tag 11 ( $2,2 \pm 0,3$  bei den 5 mg/kg KG DSS-Mäusen,  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ) gegenüber  $3,5 \pm 0,3$  in

der 20 mg/kg KG DSS-Gruppe und  $3,7 \pm 0,1$  in der DSS-Methocel-Gruppe (Abbildung 13). Die Gabe von 1,5 mg/kg KG Pumafentrine verzögerte das Auftreten der Kolitiszeichen nicht (klinischer Score an Tag 4:  $0,8 \pm 0,1$ ) und beeinflusste auch im weiteren Verlauf nicht den klinischen Score (klinischer Score Tag 11:  $3,5 \pm 0,3$  in der 1,5 mg/kg KG DSS-Gruppe gegenüber  $3,7 \pm 0,1$  in der DSS-Methocel-Gruppe, nicht signifikant). Die Kontrollen, die normales Trinkwasser und zusätzlich Pumafentrine der Dosis 5 mg/kg KG bzw. 20 mg/kg KG oder Methocel 4 % erhielten, blieben während des gesamten Versuchsverlaufes unterhalb eines Scores von 0,5. Während der Pumafentrine-Versuche starben 4 Tiere aus der DSS-Methocel Gruppe.

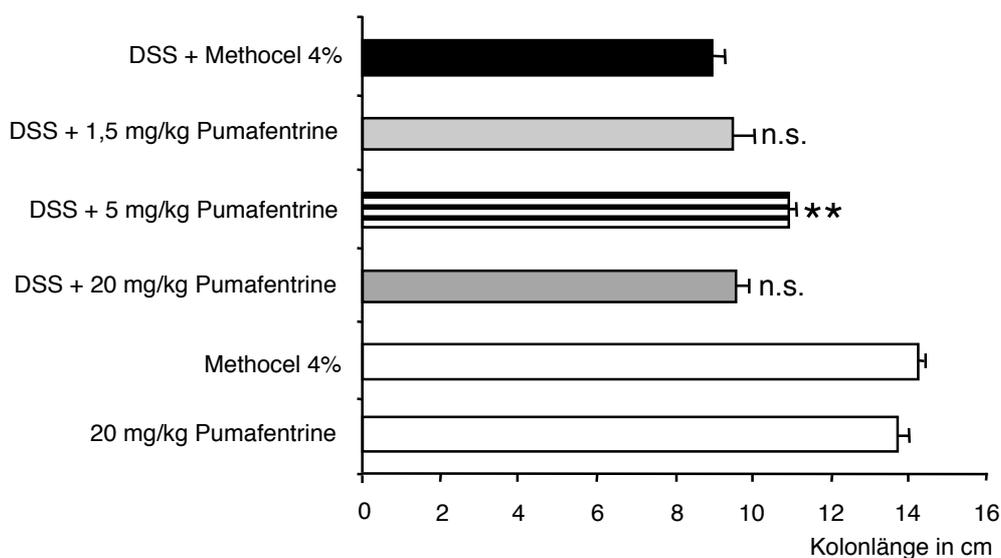


**Abbildung 13.** Wirkung von Pumafentrine auf die experimentelle Kolitis der Maus.

Die Mäuse erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Es wurde entweder Pumafentrine in drei Dosierungen [1,5 mg/kg ( $n = 8$ ), 5 mg/kg KG ( $n = 16$ ) und 20 mg/kg KG ( $n = 8$ )] oder Methocel 4 % ( $n = 16$ ) einmal täglich oral verabreicht. Die Kontrollen erhielten entweder 5 mg/kg KG oder 20 mg/kg KG Pumafentrine ( $n = 8$ ) oder Methocel 4 % ( $n = 8$ ). Die Auswirkungen der Kolitis wurden über den klinischen Score, bestehend aus Gewichtsverlust, Blut im Stuhl und Stuhlkonsistenz bestimmt, der von 0 Punkte (gesund) bis 4 Punkte (schwerste Kolitis) reicht. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. n. s. = nicht signifikant, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. DSS + Methocel.

### 3.2.3 Kolonlänge

Am Tag 11 wurde der Versuch beendet und die Kolonlänge, wie bereits oben beschrieben, als indirekter morphologischer Entzündungsparameter gemessen (Abbildung 14). Die DSS-Methocel-Gruppe zeigte im Mittel die stärkste Verkürzung der Kolonlänge im Versuchsverlauf ( $9,0 \pm 0,2$  cm). Durch Therapie mit Pumafentrine kam es zu einer geringeren Verkürzung der Kolonlänge über die Versuchsdauer. Der stärkste Effekt wurde bei der 5 mg/kg KG DSS-Gruppe gemessen ( $10,9 \pm 0,2$  cm in der 5 mg/kg KG DSS-Gruppe,  $p < 0,01$ ;  $9,6 \pm 0,3$  cm bei den 20 mg/kg KG DSS-Tieren und  $9,5 \pm 0,4$  cm in der 1,5 mg/kg KG DSS-Gruppe, beide nicht signifikant). Bei den Kontrollen war die Kolonlänge am längsten ( $14,2 \pm 0,2$  in der Methocel-Gruppe,  $13,7 \pm 0,3$  bei den 20 mg/kg KG-Tieren und  $13,6 \pm 0,2$  bei den 5 mg/kg KG-Tieren).

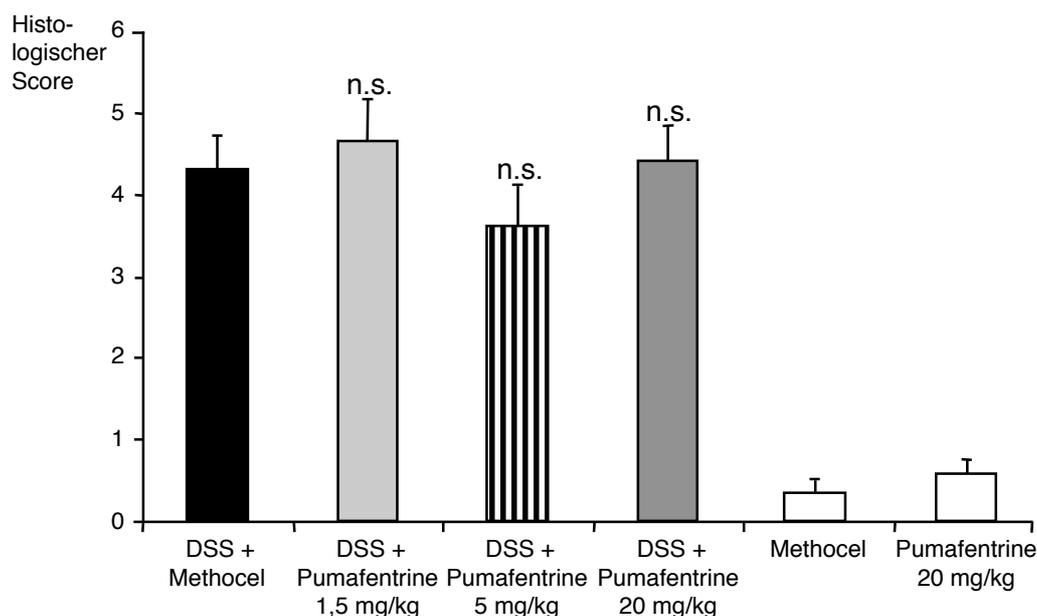


**Abbildung 14.** Effekt von Pumafentrine auf die Kolonlänge.

Die Mäuse erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Es wurde entweder Pumafentrine in drei Dosierungen [1,5 mg/kg KG (n = 8), 5 mg/kg KG (n = 16) und 20 mg/kg KG (n = 8)] oder Methocel 4 % (n = 12) einmal täglich oral verabreicht. Die Kontrollen erhielten entweder 5 mg/kg KG (n = 8) oder 20 mg/kg KG (n = 8) Pumafentrine bzw. Methocel 4 % (n = 8). Die Auswirkungen der Kolitis wurden *post mortem* über Messung der Kolonlänge an Tag 11 bestimmt. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. n. s. = nicht signifikant, \*\* $p < 0,01$  vs. DSS + Methocel.

### 3.2.4 Histologischer Score

Auch in dieser Versuchsserie konnten bei den DSS-exponierten Tieren im Kolon histologisch multiple erosive Läsionen und eine Infiltration der Darmwand durch Entzündungszellen nachgewiesen werden, und auch hier waren vor allem Makrophagen und Lymphozyten sowie gelegentlich eosinophile und neutrophile Granulozyten zu finden. Die Gabe von 5 mg/kg KG Pumafentrine über die Versuchsdauer führte zu einer Senkung des histologischen Scores, bestimmt an Tag 11, gegenüber den drei anderen DSS-Gruppen (Abbildung 15). Die Behandlung der Versuchstiere mit der 1,5 bzw. der 20 mg/kg KG Dosis bewirkte sogar einen Anstieg der histologischen Entzündungsparameter. Die beobachteten Veränderungen waren nicht statistisch signifikant ( $3,7 \pm 0,5$  in der 5 mg/kg KG DSS-Gruppe;  $4,6 \pm 0,4$  bei den 20 mg/kg KG DSS-Tieren,  $4,8 \pm 0,7$  in der 1,5 mg/kg KG DSS-Gruppe und  $4,3 \pm 0,4$  in der DSS-Methocel-Gruppe). Bei den Kontrollen, die Trinkwasser und 20 mg/kg KG Pumafentrine oder Methocel 4 % erhielten, wurden keine histologischen Zeichen einer Kolitis festgestellt ( $0,3 \pm 0,2$  in der Methocel-Gruppe und  $0,6 \pm 0,2$  in der 20 mg/kg KG-Gruppe).

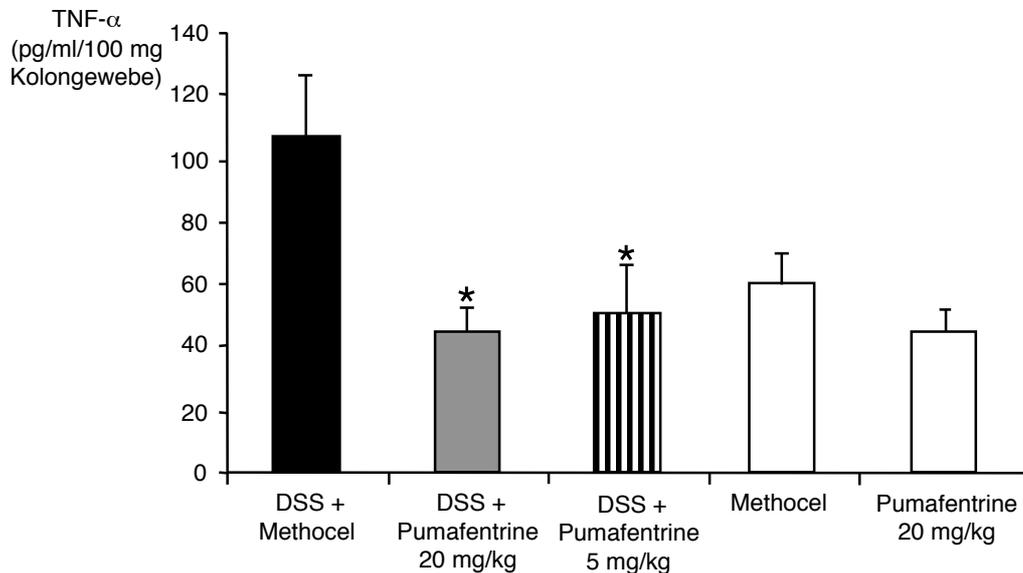


**Abbildung 15.** Wirkung von Pumafentrine auf den histologischen Score. Die Versuchstiere erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Die Mäuse wurden über die gesamte Versuchsdauer einmal täglich entweder mit Pumafentrine in drei verschiedenen Dosierungen [1,5 mg/kg KG (n = 8), 5 mg/kg KG (n = 16) oder 20 mg/kg KG (n = 8)] oder Methocel 4 % [beides oral (n = 8)] behandelt. Kolonabschnitte des Kolon transversum wurden nach Versuchsende mit Hilfe eines Scores auf histologische Entzündungszeichen hin untersucht. Der Score reicht von 0 Punkte (keine Entzündungszeichen) bis 6 Punkte (maximale Entzündung). Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. n. s. = nicht signifikant vs. DSS + Methocel.

### 3.2.5 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe

Zur Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe wurde die Zytokinkonzentration im Verhältnis zum Gesamtgewicht des Kolongewebes bestimmt (siehe 2.9.4). In der DSS-Methocelgruppe wurden die höchsten Konzentrationen an TNF- $\alpha$  gemessen ( $108 \pm 18$  pg/ml/100 mg Kolongewebe; Abbildung 16). Durch die Behandlung mit Pumafentrine wurde die Zytokinexpression von TNF- $\alpha$  im Kolongewebe signifikant gesenkt ( $50 \pm 16$  pg/ml/100 mg Kolongewebe in der 5 mg/kg KG DSS-Gruppe,  $p < 0,05$ ;  $45 \pm 7$  pg/ml/100 mg Kolongewebe in der 20 mg/kg KG DSS-Gruppe,  $p < 0,05$ ). Die mit 20 mg/kg KG Pumafentrine oder Methocel 4 % behandelten

Kontrolltiere zeigten eine TNF- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe von  $60 \pm 10$  pg/ml/100 mg Kolongewebe bzw.  $42 \pm 13$  pg/ml/100mg Kolongewebe.



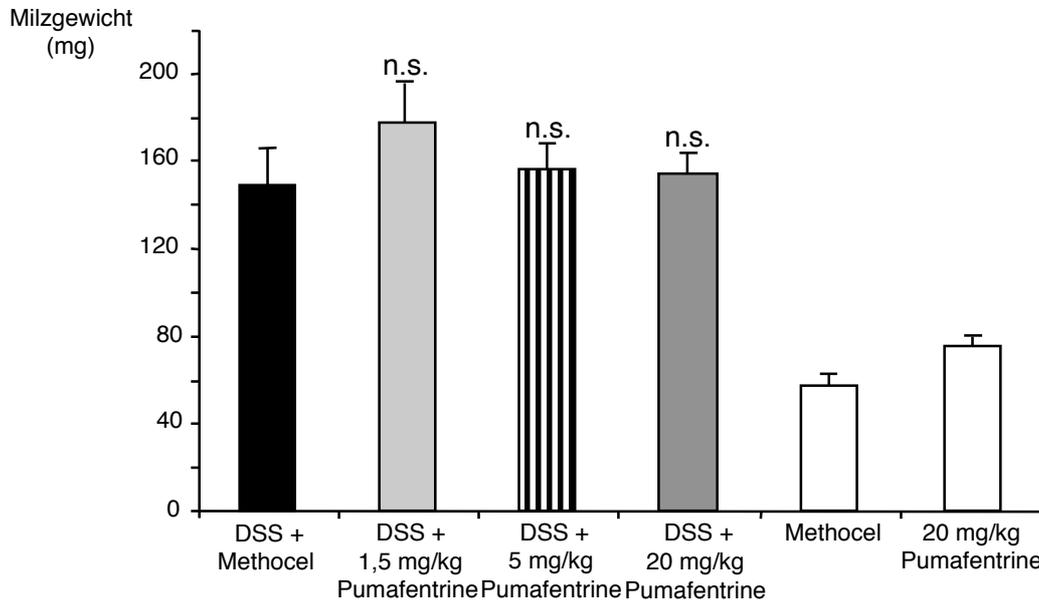
**Abbildung 16.** Effekt von Pumafentrine auf die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe.

Die Versuchstiere erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Über die gesamte Versuchsdauer wurde einmal täglich entweder Pumafentrine in 2 verschiedenen Dosierungen [5 mg/kg KG oder 20 mg/kg KG (n = 8)] oder Methocel 4 % (beides oral; n = 4) verabreicht. Die Kolonabschnitte wurden wie unter 2.9.4 beschrieben zur Zytokinmessung mittels ELISA vorbereitet. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. DSS + Methocel.

### 3.2.6 Milzgewicht

Wie bereits bei vorangehenden Experimenten gezeigt, hatten auch hier die DSS-Methocel-Mäuse am Ende des Versuches ein durchschnittlich höheres Milzgewicht ( $149 \pm 18$  mg) als die Kontrolltiere ohne DSS im Trinkwasser ( $58 \pm 5$  mg in der Methocel-Gruppe,  $76 \pm 4$  mg in der 20 mg/kg KG Pumafentrine-Gruppe und  $92 \pm 9$  mg bei den 5 mg/kg KG Kontrolltieren; Abbildung 17). Überraschenderweise führte die Applikation von Pumafentrine über die Versuchsdauer von 11 Tagen zu einem weiteren Anstieg des

Milzgewichtes ( $154 \pm 10$  in der 20 mg/kg KG DSS-Gruppe,  $156 \pm 12$  bei den 5 mg/kg KG DSS-Tieren und  $178 \pm 18$  in der 1,5 mg/kg KG DSS-Gruppe).



**Abbildung 17.** Milzgewichte bei Gabe von Pumafentrine.

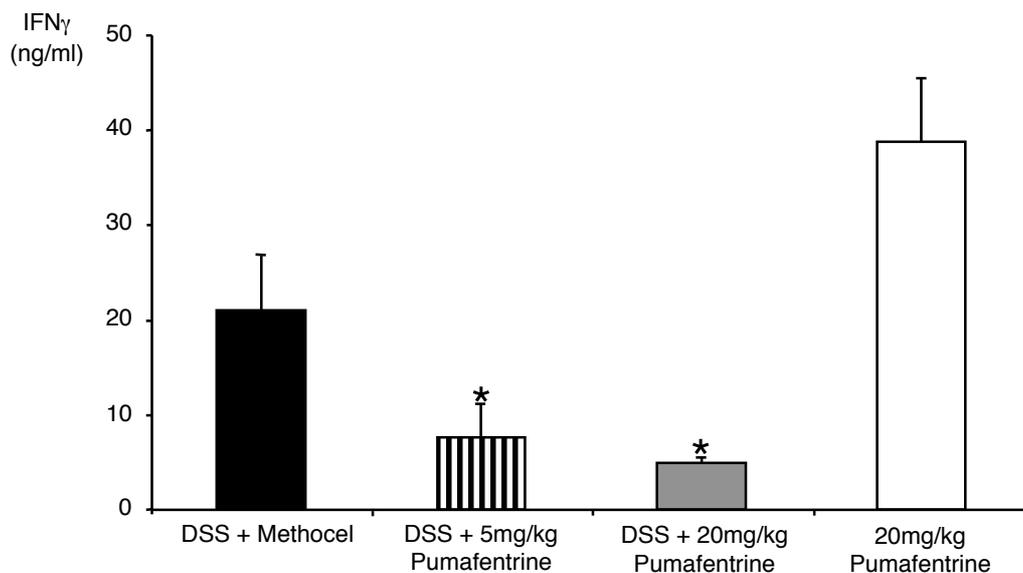
Die Versuchstiere erhielten 3,5 % DSS im Trinkwasser über 11 Tage. Über die gesamte Versuchsdauer wurde einmal täglich Pumafentrine in drei verschiedenen Dosierungen [1,5 mg/kg KG ( $n = 8$ ), 5 mg/kg KG ( $n = 8$ ) und 20 mg/kg KG ( $n = 8$ )] oder Methocel 4 % (beides oral;  $n = 8$ ) verabreicht. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM.

### 3.2.7 Interferon- $\gamma$ -Synthese stimulierter Splenozyten

Um festzustellen, ob die Gabe von Pumafentrine zur Therapie der DSS-induzierten Kolitis *in vivo* die IFN- $\gamma$  Synthese *in vitro* beeinflusst, wurden die Splenozyten entweder mit 25 ng/ml PMA plus 500 ng/ml Calcimycin oder 100 ng/ml LPS bzw. Medium über eine Dauer von 20 h inkubiert.

Die isolierten Splenozyten der DSS-Methocel Mäuse zeigten nach *ex vivo* Stimulation mit PMA plus Calcimycin eine höhere IFN- $\gamma$ -Synthese von  $21 \pm 6$  ng/ml im Vergleich mit den *in vivo* DSS-Pumafentrine behandelten Gruppen ( $8 \pm 4$  ng/ml in der 5 mg/kg KG Gruppe und  $5 \pm 1$  ng/ml in der 20 mg/kg KG

Gruppe,  $p < 0,05$ ; Abbildung 11). Splenozyten der nicht DSS-behandelten Kontrolltiere (Pumafentrine 20 mg/kg KG) zeigten nach Stimulation mit PMA/Calcimycin *in vitro* die höchsten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen von  $39 \pm 7$  ng/ml. In Vorversuchen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Synthese zwischen den mit Pumafentrine und den mit Methocel behandelten Kontrolltieren. Die unstimulierten Zellen dieser Gruppe produzierten kein IFN- $\gamma$ .



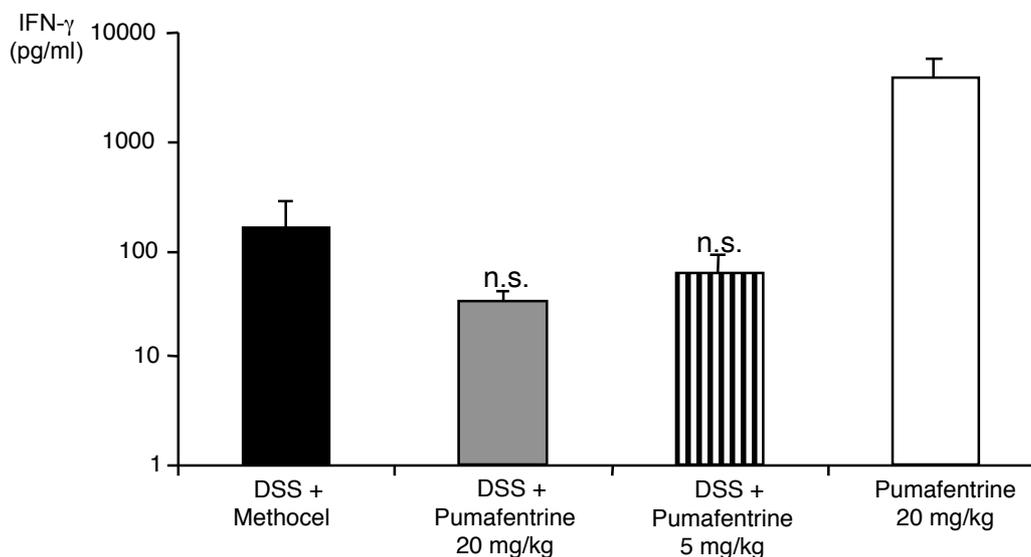
**Abbildung 18.** Effekt von Pumafentrine auf die *in vitro* IFN- $\gamma$ -Synthese isolierter Splenozyten nach Stimulation mit PMA/Calcimycin.

Nach der Versuchsdauer von 11 Tagen wurden die Splenozyten wie unter 2.9.6 beschrieben isoliert. Nach 20 h Inkubation mit PMA 25 ng/ml und Calcimycin 500 ng/ml wurden die Proben durch drei Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen und die IFN- $\gamma$ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. DSS + Methocel.

Als nächsten Schritt wurden die Splenozyten der Versuchsgruppen *in vitro* mit LPS der Konzentration 100 ng/ml stimuliert. Die DSS-Methocel-Gruppe zeigte im Mittel eine *in vitro* IFN- $\gamma$ -Synthese der Splenozyten von  $158 \pm 123$  pg/ml (Abbildung 19). Die IFN- $\gamma$ -Expression war in der Pumafentrine behandelten DSS-Gruppe deutlich supprimiert ( $60 \pm 30$  pg/ml in der 5 mg/kg KG DSS-Gruppe und  $33 \pm 8$  pg/ml in der 20 mg/kg KG DSS-Gruppe, beide nicht signifikant). Die Kontrolltiere, die im Versuchsverlauf normales Trinkwasser und

Pumafentrine der Dosis 20 mg/kg KG erhielten, synthetisierten *in vitro* die größte Menge IFN- $\gamma$  mit  $3697 \pm 1775$  pg/ml. In Vorversuchen bestanden auch nach LPS-Stimulation keine signifikanten Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Konzentration zwischen den Pumafentrine und den Methocel behandelten Kontrolltieren.

Bei den unstimulierten Splenozyten (20 h Inkubation mit Medium) zeigten sich zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede in der Konzentration von IFN- $\gamma$ .



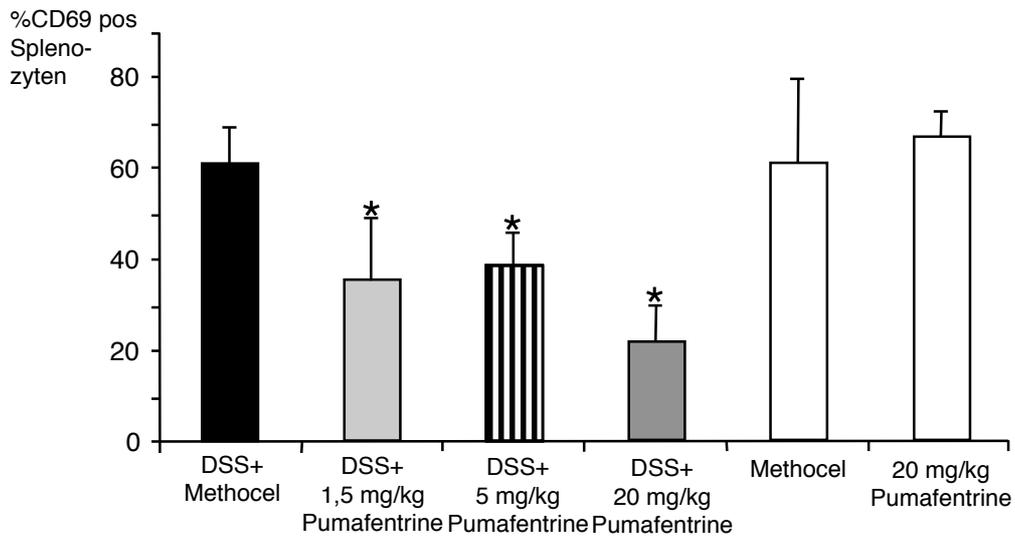
**Abbildung 19.** Wirkung von Pumafentrine auf die *in vitro* IFN- $\gamma$  Synthese isolierter Splenozyten nach Stimulation mit LPS.

Nach der Versuchsdauer von 11 Tagen wurden die Milzen steril entnommen, gewogen und die Splenozyten wie unter 2.9.6 beschrieben isoliert. Nach 20 h Inkubation mit LPS 100ng/ml wurden die Proben durch drei Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen und die IFN- $\gamma$ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind als arithmetisches Mittel angegeben  $\pm$  SEM. n. s. = nicht signifikant vs. DSS + Methocel.

### 3.2.8 CD69-Expression stimulierter Splenozyten

Nach Stimulation der Splenozyten wurde deren Oberflächenexpression von CD69 als Aktivitätsmarker bestimmt (Abbildung 20). Die Splenozytenpopulation bestand aus 50 % Lymphozyten (CD45R+), 32 % T-Zellen (CD3+) sowie aus 7 % Monozyten/Makrophagen (Mac-1+) und 11 % Zellen nicht bekannter Zuordnung. Nach Stimulation mit PMA/Calcimycin für 20 h waren  $61 \pm 8$  % der Zellen aus der DSS-Methocel Gruppe positiv für CD69. Im Vergleich zeigten die *in vivo* mit Pumafentrine behandelten DSS-Tiere eine geringere CD69-Expression ( $36 \pm 13$  % in der 1,5 mg/kg KG Gruppe,  $p < 0,05$ ;  $39 \pm 7$  % in der 5 mg/kg KG Gruppe,  $p < 0,05$  und  $22 \pm 8$  % in der 20 mg/kg KG Gruppe,  $p < 0,05$ ). Bei den Splenozyten der Kontrolltiere ohne DSS und mit 5 mg/kg KG bzw. 20 mg/kg KG Pumafentrine *in vivo* waren  $68 \pm 15$  % bzw.  $67 \pm 5$  % der Zellen nach *ex vivo* Stimulation CD69 positiv. Die Splenozyten der Methocel-Kontrolltiere waren zu  $61 \pm 18$  % positiv für CD69.

Bei den unstimulierten Milzzellen konnte nach Ende der Inkubationszeit kein Unterschied in der Expression zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen festgestellt werden. Die maximale Höhe der CD69 positiven Zellen betrug 7 %.



**Abbildung 20.** Wirkung von Pumafentrine auf die *ex vivo* CD69 Expression isolierter Splenozyten nach Stimulation.

Nach der Versuchsdauer von 11 Tagen wurden die Milzen steril entnommen, gewogen und die Milzzellen wie unter 2.9.6 beschrieben isoliert. Nach 20 h Inkubation mit PMA 25 ng/ml und Calcimycin 500 ng/ml wurde die CD69-Expression wie unter 2.9.8 beschrieben bestimmt. Die Werte zeigen das arithmetische Mittel der Prozentzahl an Zellen, die für CD69 positiv sind  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. DSS + Methocel.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden und Endpunkte**

#### **4.1.1 Mausmodell der Dextran-Sodium-Sulfat-induzierten Kolitis**

Das DSS-Modell hat eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Tiermodellen für CED. Es ist kostengünstig, einfach zu handhaben und es besteht eine hohe Uniformität der Läsionen. Darüber hinaus sind die Veränderungen durch die Kolitis innerhalb eines Mausstammes bezüglich des zeitlichen Verlaufes und der Schwere der Krankheitsausprägungen gut reproduzierbar. Das DSS-Mausmodell ist zur präklinischen Testung pharmakologischer Substanzen für CED empfohlen (Cooper et al. 1993; Elson et al. 1995). Deshalb haben wir dieses Modell für die Testung der PDE-Inhibitoren ausgewählt. Das DSS-Modell ist eines der am häufigsten verwendeten Kolitismodelle.

In der Literatur werden drei verschiedene Ansätze der DSS-induzierten Kolitis beschrieben (Okayasu et al. 1990; Cooper et al. 1993). Der Vorteil des präventiven Ansatzes ist das deutlichere Hervortreten von Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen im Vergleich mit dem therapeutischen und dem chronischen Modell. Dies empfiehlt sich vor allem für die Testung von Pharmakawirkungen. Ist die Erprobung der Fähigkeit einer Substanz zur Behandlung eines bereits bestehenden Schubes bzw. zur Regenerationsförderung erwünscht, wird das therapeutische Modell angewendet. Besteht die Notwendigkeit der Untersuchung eines chronischen Verlaufes und der Beteiligung des erworbenen Immunsystems, so ist die Anwendung des chronischen Modells notwendig.

In dem hier verwendeten präventiven Ansatz fanden einige Modifikationen gegenüber der ursprünglich in der Literatur verwendeten Methode statt. Die in der Literatur beschriebenen DSS-Konzentrationen variieren von 4 % bis 10 %. Diese Menge erwies sich aufgrund der hohen Mortalität der Tiere im Versuchsverlauf als nicht brauchbar. Aufgrund eines hier durchgeführten

Titrierversuches wurde die DSS-Konzentration von 3,5 % als derzeit Beste ausgewählt (siehe 2.7). Hierbei ist noch zu beachten, dass die gleiche Konzentration an DSS in verschiedenen Mausstämmen unterschiedliche Schweregrade einer Kolitis induziert (Mahler et al. 1998). Die Versuchsdauer betrug 11 Tage. Dies ist eine im Vergleich mit der Literatur längere Zeitdauer. Das hat folgende Vorteile: Zum einen treten die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen deutlicher hervor. Zum anderen kann durch die Verlängerung des Entzündungsreizes eine beginnende Chronifizierung erreicht werden, jedoch sicherlich mit einer weiterhin bestehenden Dominanz der akuten Entzündungsreaktion.

In unseren Versuchen wurde die gute Reproduzierbarkeit des DSS-Modells bestätigt. Es wurde eine Alters- und Gewichtsabhängigkeit der Tiere deutlich. Balb/c-Mäuse mit einem Alter von 6 Wochen und einem Gewicht von 17 g und darunter reagierten stärker auf die Gabe von 3,5 % DSS, während Tiere älter als 9 Wochen und schwerer als 23 g weniger Auswirkungen einer Kolitis zeigten. Ein häufiger Kritikpunkt an diesem Modell ist die Verabreichung des DSS über das Trinkwasser und damit eine schwer kontrollierbare Aufnahme von DSS. Da die Tiere innerhalb ihrer Gruppen vergleichbare Kolutisauswirkungen zeigten, ist die Wahrscheinlichkeit einer unterschiedlichen Trinkmenge innerhalb einer Versuchsgruppe gering. Diaz-Granados und Mitarbeiter stellten eine geringere Trinkmenge der Versuchstiere nach Applikation des spezifischen PDE Typ 4-Inhibitors Rolipram fest (minus 4 bis 28 % gegenüber der nur DSS-Gruppe). Jedoch wurden hier die positiven Effekte von Rolipram nicht auf die reduzierte Aufnahme von DSS zurückgeführt, da es praktisch keine Unterschiede in der Histopathologie der Tiere gab (Diaz-Granados et al. 2000). Bei den Messungen der Trinkmenge in unserem Labor bestand kein Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungs- bzw. DSS- und Nicht-DSS-Gruppen.

#### 4.1.2 Endpunkte der Versuchsreihen

Der *klinische Score* ist ein in der Literatur etablierter Parameter für die klinische Krankheitsaktivität der Mäuse während des Versuchsverlaufes (Cooper et al. 1993; Hartmann et al. 2000; Siegmund et al. 2001; Loher et al. 2002). Die *Kolonlänge* als indirekter morphologischer Entzündungsparameter ist als sehr gut reproduzierbarer Endpunkt in diesem Modell beschrieben (Okayasu et al. 1990; Cooper et al. 1993; Hartmann et al. 2000; Siegmund et al. 2001). Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Schwere der pathologischen Veränderungen durch die Kolitis und der Verkürzung der Kolonlänge (Okayasu et al. 1990). Der *Histologische Score*, ursprünglich von Cooper und Mitarbeitern beschrieben (Cooper et al. 1993), wurde in modifizierter Form verwendet (Hartmann et al. 2000; Siegmund et al. 2001). Die Messung der *Zytokinkonzentration im Kolongewebe* wurde in Anlehnung an die Literatur durchgeführt (Hartmann et al. 2000, Siegmund et al. 2001). McComb und Mitarbeiter beschrieben die *Messung des Milzgewichtes* als reproduzierbaren Parameter für eine systemische Entzündungsreaktion in der Ratte. Dies wurde von Hartmann und Siegmund für die Maus bestätigt (McComb et al. 1999; Hartmann et al. 2000; Siegmund et al. 2001). Die *Isolation der Milzzellen* erfolgte nach der von Coligan und Mitarbeitern beschriebenen Methode (Coligan et al. 1992). Dieses Verfahren wurde auch von Siegmund 2001 für unser Modell publiziert (Siegmund et al. 2001).

#### 4.2 Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

##### 4.2.1 Hemmung der Phosphodiesterase zur Suppression von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

Die PDE Typ 3 und PDE Typ 4 wurden als die vorherrschenden Isoenzymformen in Immun- und Entzündungszellen identifiziert. Die Hemmung des Abbaus von intrazellulärem cAMP durch eine Hemmung der PDE führt zu einer Suppression der TNF- $\alpha$ -Synthese (Sinha et al. 1995) und zu einem

Anstieg der Synthese von IL-10. Roflumilast hemmt *in vitro* die TNF- $\alpha$ -Synthese in Monozyten, der Hauptquelle von TNF- $\alpha$ , mehr als 15-fach potenter als der spezifische PDE Typ 4-Inhibitor Rolipram und mehr als 7500-fach potenter als der unspezifische PDE-Inhibitor Pentoxifyllin (Hatzelmann und Schudt 2001). Eine gleichzeitige Hemmung der PDE Typ 3 und Typ 4 führte zu einer wenigstens additiven Wirkung auf die Hemmung der TNF- $\alpha$ -Produktion *in vitro* (Schudt et al. 1995; Hatzelmann und Schudt 2001).

#### **4.2.2 Phosphodiesterase Typ 4-Inhibitoren und Roflumilast *in vivo***

Eine Inhibition der PDE Typ 4 wurde in der Vergangenheit vor allem für Erkrankungen des respiratorischen Systems evaluiert. In einer Vielzahl von Tiermodellen für Asthma reduzieren PDE Typ 4-Inhibitoren die Entzündungsauswirkungen (Torphy 1998). Der spezifische PDE Typ 4-Inhibitor Rolipram führte in Tiermodellen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis und experimentellen Arthritis, beides Modelle, in denen TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt, zu einer Besserung (Sommer et al. 1995, Nymann et al. 1997; Ross et al. 1997). Der spezifische PDE Typ 4-Inhibitor Cilomilast (Ariflo™) und Rolipram senken die LPS induzierten TNF- $\alpha$ -Spiegel in der Maus (Griswold et al. 1998). Beim Menschen wurden bisher mehrere PDE Typ 4-Inhibitoren getestet. Probleme traten entweder durch die geringe Wirksamkeit oder aber die starken Nebenwirkungen auf. Neuere Ergebnisse aus klinischen Studien mit einem PDE Typ 4-Inhibitor der neueren Generation Cilomilast unterstützen das Konzept der Inhibition der PDE Typ 4 als therapeutischen Ansatz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (Barnette 1999).

Roflumilast wirkt in mehreren Tiermodellen für Asthma und chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) antiinflammatorisch. Die TNF- $\alpha$ -Synthese wird ebenso wie die Einwanderung und Akkumulation von Entzündungszellen, das Remodeling der Luftwege und die Ödembildung supprimiert. Roflumilast ist in diesen Studien effektiver als die Vergleichssubstanzen aus der Gruppe der PDE Typ 4-Inhibitoren Rolipram, Piclamilast und Cilomilast (Bundschuh et al. 2001; Kumar et al. 2003).

#### **4.2.3 Phosphodiesterase Typ 3/4-Inhibitoren und Pumafentrine *in vivo***

Auch die selektiven PDE Typ 3/4-Hemmer wurden bisher vor allem in der Asthmatherapie getestet (Nicholson und Shahid 1994; Torphy 1998). Substanzen wie Benafentrine (AH 21-132) (Foster et al. 1992) und Zardaverine (Brunnee et al. 1992; Ukena et al. 1995) wurden bereits in klinischen Studien bei gesunden Patienten und bei Asthmatikern eingesetzt. *In vivo* konnte der *in vitro* vorhandene, wenigstens additive Effekt einer dualen Hemmung (siehe Punkt 1.3.5) bisher nicht überzeugend gezeigt werden (Nagai et al. 1995; Elwood et al. 1995; Banner und Page 1995). Zu Pumafentrine sind bisher keine Daten publiziert.

#### **4.2.4 Hemmung der Phosphodiesterasen und chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Die entzündungshemmende Potenz der Phosphodiesteraseinhibitoren macht den Einsatz dieser Substanzklasse bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sinnvoll. Es liegen Daten sowohl aus Tiermodellen als auch von einer klinischen Untersuchung vor.

Im TNBS-Modell der Ratte reduzierte die Behandlung mit dem unspezifischen PDE-Hemmer Pentoxifyllin die pathologischen Veränderungen im Kolon (Peterson et al. 1997). Zusätzlich reduziert Pentoxifyllin die klinischen und histopathologischen Zeichen einer Kolitis sowie die zirkulierenden TNF- $\alpha$ -Spiegel im chronischen DSS-Modell (Murthy et al. 1999). Die spezifischen PDE Typ 4-Inhibitoren Rolipram und Mesopram verbesserten die Auswirkungen der Kolitis im akuten (Versuchsdauer 11 Tage) und therapeutischen DSS-Modell (Hartmann et al. 2000, Loher et al. 2003). Ein Vergleich zwischen Rolipram und Pentoxifyllin im akuten DSS-Modell (Versuchsdauer 5 Tage) ergab eine höhere Wirksamkeit von Rolipram gegenüber einer unspezifischen PDE-Hemmung durch Pentoxifyllin (Diaz-Granados et al. 2000).

Bis heute wurde kein isotypspezifischer PDE-Inhibitor bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen am Menschen getestet. Es existieren jedoch Daten über die Anwendung von Pentoxifyllin bei Morbus Crohn. Bei 16 Patienten mit steroidabhängigem Morbus Crohn wurde bei viermal täglicher Applikation von Pentoxifyllin keine Besserung der klinischen oder histologischen Zeichen der Kolitis erreicht (Bauditz et al. 1997). Dies kann damit zusammenhängen, dass *in vitro* sehr hohe Konzentrationen eines unspezifischen PDE-Inhibitors notwendig sind, um die TNF- $\alpha$ -Produktion zu senken (Reimund et al. 1997). Die hohe Potenz und Spezifität von Roflumilast machen die Möglichkeit einer wirksamen Anwendung in niedrigen Dosierungen wahrscheinlicher.

Zusätzlich ist bekannt, dass eine Aktivierung der Adenylatzyklase durch Substanzen wie Prostaglandin E2 und Prostacyclin synergistisch mit der Inhibition der PDE wirkt, zum einen auf eine Erhöhung des intrazellulären cAMP und zum anderen auf eine Suppression der TNF- $\alpha$ -Synthese (Sinha et al. 1995). In der entzündeten Kolonschleimhaut bei CED sind Prostaglandin E2 und Prostacycline in erhöhten Konzentrationen nachweisbar. Deshalb könnten spezifische PDE-Inhibitoren bei systemischer Applikation lokal im Entzündungsgebiet ihre größte Wirkung erzielen.

#### **4.2.5 Roflumilast im Modell der Dextran-Sodium-Sulfat-induzierten Kolitis**

Roflumilast zeigte im Mausmodell der DSS-induzierten Kolitis eine deutliche antiinflammatorische Potenz und führte in der höheren verwendeten Dosierung (5 mg/kg KG) zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Verlaufes der Kolitis. In Übereinstimmung hierzu kam es zu einer geringeren Verkürzung der Kolonlänge als indirektem Entzündungsparameter. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration im nativen Kolongewebe wurde signifikant gesenkt. Dies unterstreicht die Rolle von TNF- $\alpha$  im Entzündungsgeschehen und dessen Suppression als therapeutische Strategie. Eine Verbesserung im histologischen Score blieb jedoch statistisch nicht signifikant. Mögliche Erklärungen hierfür sind eine stärkere Entzündungsausprägung über den Versuchsverlauf im Vergleich mit

vorhergehenden Studien. Dies führt auch zu einer insgesamt stärkeren histologischen Veränderung. Ein weiterer Grund ist die nicht mögliche Beurteilung der *post mortem* Parameter von während der Versuche gestorbenen Tieren. Dies führt zu einem Ausschluss der kränksten Tiere und damit zu einem geringeren Unterschied zwischen der DSS-Methocel Gruppe und den Therapiegruppen. Wie erwartet, senkte die Behandlung mit Roflumilast das Milzgewicht als systemischem Entzündungsparameter.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von Roflumilast, da bei der niedrigeren 1 mg/kg KG Dosis nur der klinische Score, die Kolonlänge und das Milzgewicht signifikant verbessert wurden.

#### **4.2.6 Pumafentrine im Modell der Dextran-Sodium-Sulfat-induzierten Kolitis**

Auch der selektive PDE Typ 3/4-Inhibitor Pumafentrine führte in der 5 mg/kg KG-Gruppe zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Scores und einer geringeren Verkürzung der Kolonlänge. Der histologische Score besserte sich nur tendenziell, wobei auch hier das Ausschließen der kränksten Versuchstiere - 4 Tiere starben während der Experimente - bei der Bewertung der *post mortem* Parameter eine wahrscheinliche Erklärung darstellt. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Kolongewebe wurde signifikant gesenkt. Im Vergleich mit Roflumilast war die Suppression relativ zu den unbehandelten Tieren stärker ausgeprägt. Interessanterweise veränderte die Behandlung mit Pumafentrine das Milzgewicht nicht oder führte sogar zu einem Anstieg des Milzgewichtes, unabhängig von der Entzündungsaktivität im Kolon. Die Milzgewichte der während des Versuchsverlaufes gestorbenen Mäuse wurden nicht in die *post mortem* Parameter eingeschlossen und führen somit zu einem künstlich niedrigerem Milzgewicht der Gesamtgruppe. Ein Ansteigen des Milzgewichtes wurde auch bei der Verabreichung von Anti-IL-18-Antiserum in diesem Modell beobachtet (Siegmond et. al. 2001). Im Gegensatz hierzu steht eine Studie in Ratten, die zu keiner Vergrößerung des Milzgewichtes nach vier Wochen

kontinuierlicher Applikation von Pumafentrine führte (Information der Firma Altana).

Die isolierten Splenozyten aus den *in vivo* mit Pumafentrine behandelten Tieren zeigten *in vitro* eine geringere Fähigkeit zur Produktion von IFN- $\gamma$  verglichen mit den DSS-Methocel Tieren. Hauptproduzent von IFN- $\gamma$  sind Th1-Zellen, CD8+ Zellen und NK-Zellen, aktiviert durch Antigene, Alloantigene oder Mitogene. Die wichtigste biologische Aktivität von IFN- $\gamma$  ist die Immunmodulation (Farrar und Schreiber 1993). IFN- $\gamma$  induziert in Monozyten und Makrophagen die Expression von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Philip et al. 1986). IFN- $\gamma$  ist in der Kolonmukosa von Patienten mit Morbus Crohn in erhöhten Konzentrationen nachweisbar (Parronchi et al. 1997).

Pumafentrine führte *in vitro* verglichen mit den *in vivo* DSS-Methocel Tieren ebenso zu einer verminderten Expression von CD69. CD69 gehört zu den Oberflächenmarkern, die nach Stimulation am frühesten auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, Thymozyten, B-Zellen, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten nachweisbar sind (Gavioli et al. 1992; Ziegler 1994). In der proximalen Promotorregion sind 2 NF $\kappa$ B-Motive lokalisiert, die verschiedene NF $\kappa$ B-Familienmitglieder binden (Castellanos et al. 1997). NF $\kappa$ B-Familienmitglieder scheinen u. a. bei akuten Entzündungsprozessen eine Vermittlerrolle zu spielen. Auch die Hochregulation von CD69 durch TNF- $\alpha$  ist abhängig von einer NF $\kappa$ B-Bindungsstelle auf dem CD69-Gen (Lopez-Cabrera et al. 1995). Auf Immunzellen aus Entzündungsinfiltraten bestimmter Erkrankungen (z.B.: Rheumatoide Arthritis; chronisch aktive Hepatitis, Asthma bronchiale) konnte eine erhöhte Expression von CD69 festgestellt werden (Garcia-Monzon et al. 1990; Laffon et al. 1991; Hartnell et al. 1993).

Die Effekte von Pumafentrine auf die *in vitro* IFN- $\gamma$ -Synthese und CD69 Expression kann nicht auf einen direkten Effekt des Medikaments zurückgeführt werden, da die Zellen im Isolationsprozess dreimal gewaschen wurden. Es scheint *in vivo* ein Priming dieser Immunzellen stattgefunden zu haben. Die

IFN- $\gamma$ -Synthese bzw. die Expression von CD69 war höher in den Splenozyten der Tiere, die kein DSS erhielten. Dieses Ergebnis ist eventuell auf eine Desensibilisierung während der systemischen Entzündungsreaktion zurückzuführen. Dies wurde von Ziegler-Heitbrock für die LPS-induzierte Desensibilisierung in murinen Monozyten beschrieben (Ziegler-Heitbrock et al. 1997). Vergleichbare Effekte wurden in unserem Labor bei der Testung des spezifischen PDE Typ 4-Inhibitors Mesopram beobachtet.

Die fehlende Wirksamkeit der 1,5 mg/kg KG Gruppe ist auf eine zu geringe Dosierung zurückzuführen, während das Nicht-Ansprechen der 20 mg/kg KG Gruppe im DSS-Modell bisher nicht erklärt werden kann. Da sich der klinische Score, der histologische Score und die Kolonlänge nicht verbessert haben, kann man einen lokal toxischen Effekt annehmen. Es ist bekannt, dass die Behandlung mit PDE-Inhibitoren bei Rheumatoider Arthritis mikrovaskuläre Dilatation und sekundär eine lokale Entzündungsreaktion hervorruft (persönliche Kommunikation mit GlaxoSmithKline). Dies ist eine mögliche Ursache der lokalen proinflammatorischen Wirkung. Hierfür spricht ebenso eine im Gegensatz zum lokalen Geschehen systemische Wirksamkeit auf die CD69 Expression und die IFN- $\gamma$ -Synthese der Splenozyten.

#### **4.2.7 Andere Strategien zur Hemmung von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ bei der Dextran-Sodium-Sulfat-induzierten Kolitis**

Wie bereits in Punkt 1.2.4 dargestellt, spielt TNF- $\alpha$  im Entzündungsgeschehen bei CED und im Mausmodell der DSS-induzierten Kolitis eine entscheidende Rolle. Neben der von uns genutzten Möglichkeit, die TNF- $\alpha$ -Genexpression durch eine Erhöhung von cAMP zu reduzieren, gibt es in diesem Modell noch eine Vielzahl an weiteren publizierten Ansätzen, in die Synthese von TNF- $\alpha$  einzugreifen.

1.) Auf der Ebene der *Transkriptionsfaktoren* führt eine Induktion von NF $\kappa$ B zur erhöhten Expression von TNF- $\alpha$ . Die Suppression von NF $\kappa$ B durch Sulfasalazin und Olsalazin (Axelsson et al. 1998), Lipoxin a4-Analoga (Gewirtz et al. 2002),

Gliotoxine (Herfarth et al. 2000) und spezifische TNF- $\alpha$ -Antisense-Oligonukleotide (Myers et al. 2003) führte zu einem Ansprechen in der akuten und chronischen Form der DSS-induzierten Kolitis. 2.) Das Phthalimido-Derivat LK423 weist Strukturverwandtschaft zu Thalidomid auf, welches die TNF- $\alpha$ -Synthese durch *Degradation von mRNA* hemmt. LK423 verbessert die DSS-induzierte Kolitis im präventiven und therapeutischen Modell (Moriguchi et al. 1999). 3.) Auch eine Hemmung der *TNF- $\alpha$ -mRNA-Translation* durch RDP58 verringerte die Entzündungsauswirkungen (Boismenu et al. 2000). 4.) Bereits *synthetisiertes oder membrangebundenes TNF- $\alpha$*  wird durch Antikörper neutralisiert. Die Gabe von monoklonalen TNF- $\alpha$ -Antikörpern reduzierte die klinischen Auswirkungen der Kolitis im präventiven Modell nicht, zeigte im chronischen Modell jedoch Wirksamkeit (Kojouharoff et al. 1997; Murthy et al. 1999). 5.) Unspezifischere Ansätze sind eine *Hemmung der Immunzellmigration* durch „Anti-macrophage migration inhibitory factor“ (Anti-MIF)-Antikörper (Ohkawara et al. 2002), Anti-ICAM-1-Antikörper (Taniguchi et al. 1998) oder einen P- und L-Selectin-Inhibitor (Zhang et al. 2001). Darüber hinaus sind eine Vielzahl von antiinflammatorischen oder immunsuppressiven Substanzen in diesem Tiermodell getestet worden, auf die hier nicht im einzelnen eingegangen werden soll. Durch die unspezifisch entzündungshemmende bzw. -unterdrückende Wirkung kommt es bei Behandlung in den meisten Fällen auch zu einer Reduktion von TNF- $\alpha$ .

#### **4.2.8 Nebenwirkungen der Phosphodiesterase-Inhibitoren**

Limitierend im Einsatz der PDE-Inhibitoren sind die Nebenwirkungen. Systemisch applizierte, unselektive PDE Typ 3-Inhibitoren können Vasodilatation und Arrhythmien durch erhöhte cAMP-Spiegel im Myokard und in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand auslösen. (Tsien 1977). Der unspezifische PDE Typ 4-Hemmer Rolipram führte in einer Phase 2 Studie als Antidepressivum zu Übelkeit und Erbrechen (Zeller et al. 1984). Es wurden in anderen Studien mit PDE Typ 4-Inhibitoren Veränderungen der Plasmaosmolarität festgestellt (Sturgess and Searle 1990). Die Sekretion von Magensäure durch Parietalzellen ist erhöht (Black et al. 1988). Auch bei dem

PDE Typ 3/4-Inhibitor Zardaverine traten Übelkeit und Erbrechen auf (Brunnee et al. 1992). Diese Effekte verhinderten bislang eine breite klinische Anwendung.

Ein Lösungsansatz ist die selektive Hemmung bestimmter Konformationen der PDE, um die therapeutischen von den unerwünschten Wirkungen abzukoppeln. Beispielsweise existieren wenigstens 2 verschiedene Konformationen der PDE Typ 4 (Souness et al. 1997). Die erste Form, die sogenannte „high-affinity rolipram binding site“ (HARBS), wird von Rolipram als PDE Typ 4-Inhibitor der ersten Generation potent gehemmt. Diese Konformation ist vor allem im ZNS und in den Parietalzellen des Magens vertreten und scheint deshalb für die unerwünschten Nebenwirkungen verantwortlich zu sein. Die zweite Form, die sogenannte „low-affinity rolipram binding site“ (LARBS), wird von Rolipram nur schwach inhibiert. Interessant ist, dass diese Konformationsform vor allem in Immunzellen vertreten ist. Gelingt es nun, die LARBS spezifisch zu hemmen, so wird es vermutlich zu einer geringeren Ausprägung der Nebenwirkungen bei höherer Wirksamkeit kommen. Erste viel versprechende Hinweise für dieses Konzept kommen aus klinischen Studien mit Cilomilast (Barnette et al. 1999), dem ersten PDE Typ 4-Inhibitor, bei dessen Design dieses Konzept berücksichtigt wurde (Torphy et al. 1997). Für ein ähnliches Wirkspektrum von Roflumilast sprechen bisher nur indirekte Hinweise (Hatzelmann und Schudt 2001).

Eine weitere Lösungsmöglichkeit stellt die kombinierte Hemmung der Isoenzyme PDE Typ 3 und 4 dar. Durch die synergistischen Effekte (siehe Punkt 1.3.5) kann eine Reduktion der Gesamtdosis mit entsprechender Verminderung der Nebenwirkungen erwartet werden.

### **Nebenwirkungen von Roflumilast und Pumafentrine in unseren Versuchen**

Die Therapie mit Roflumilast und Pumafentrine wurde von den Tieren gut toleriert. Nach oraler Applikation von Roflumilast kam es innerhalb von 5 Minuten zu einer verringerten Motilität der Tiere, die etwa 5 - 10 Minuten anhielt. In der Folge wurde kein abnormes Verhalten beobachtet. Die in der

Literatur für PDE Typ 4-Inhibitoren gelegentlich auftretenden Symptome wie Erbrechen, starker Speichelfluss und verstärktes Kratzen des Maules (Souness und Rao 1997; Robichaud et al. 1999) traten nicht auf.

### **4.3 Limitierung der Ergebnisse**

Bei der DSS-induzierten Kolitis handelt es sich um ein Tiermodell für die beim Menschen auftretenden CED. Hieraus ergeben sich einige Limitierungen der Ergebnisse. Erstens wird in dem von uns verwendeten Modell die Darmentzündung über ein Agens induziert, die Ursache der CED beim Menschen ist hingegen unbekannt und kann deshalb eine der DSS-Kolitis verschiedene Pathophysiologie haben. Zweitens wird in unserem Ansatz eine Kolitis über den Zeitraum von 11 Tagen induziert. Beim Menschen handelt es sich um eine lebenslange, schubweise verlaufende Erkrankung. Und drittens sind trotz vieler Ähnlichkeiten die Ergebnisse nicht uneingeschränkt von Tiermodellen auf den Menschen zu übertragen.

### **4.4 Klinische Relevanz**

Die bestehenden Therapieschemata für CED führen in der Regel zu einer Besserung des Entzündungsgeschehens. Jedoch wird dies in vielen Fällen durch schwere Nebenwirkungen „erkaufte“, die oftmals einen Abbruch der Therapie erzwingen. Zudem treten therapierefraktäre Verläufe auf. Die Rezidivrate ist hoch. Dies macht die Suche nach neuen Therapien notwendig, die die Nebenwirkungen reduzieren bzw. die Spezifität des Ansatzes erhöhen. In den letzten Jahren treten aufgrund neuer Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Erkrankung die immunmodulatorischen Ansätze in den Vordergrund. Die erfolgreiche Behandlung von Morbus Crohn Patienten mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab bestätigen die Suppression von TNF- $\alpha$  als Therapiestrategie. Spezifische PDE-Inhibitoren sind in der Lage, selektiv Isoenzyme der PDE und damit bereits die Synthese von TNF- $\alpha$  potent zu hemmen.

Unklar ist, ob die TNF- $\alpha$ -Suppression den einzigen Wirkmechanismus der PDE-Inhibitoren darstellt. Bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn zeigte das TNF- $\alpha$ -Bindungsmolekül Etanercept keine Wirksamkeit, trotz hoher Affinität zu löslichem TNF- $\alpha$  (Sandborn et al. 2001b). Lügering et al. zeigten bei Immunzellen von Morbus Crohn-Patienten eine proapoptotische Wirkung von Infliximab, das im Gegensatz zu Etanercept auch die membrangebundene Form von TNF- $\alpha$  bindet (Lügering et al. 2001; Van den Brande et al. 2003). Dies legt den Schluss nahe, dass die Wirkung der Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie mehr von einer Apoptoseinduktion der TNF- $\alpha$ -produzierenden Zellen als von einer Neutralisierung des löslichen TNF- $\alpha$  abhängt. Hierfür spricht auch, dass die Wirkung von Infliximab deutlich länger andauert als die Halbwertszeit des Antikörpers versprechen würde. Die aktuelle Datenlage für die Wirkung von PDE-Inhibitoren auf die Apoptose ist nicht eindeutig. Siegmund et al. zeigten eine Apoptoseinduktion und antiproliferative Wirkung durch Rolipram bei Lymphozyten von Patienten mit chronischer B-Zell-Leukämie, während in anderen Studien mit normalen Immunzellen eine spezifische und unspezifische Hemmung der PDE eine antiapoptotische Wirkung zeigte (Otonello et al. 1998; Niwa et al. 1999; Siegmund et al. 2001). Ob dieser Mechanismus bei den therapeutischen Effekten der PDE-Inhibitoren eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen. Auch aus den Daten dieser Arbeit kann hierzu keine klärende Aussage getroffen werden.

Das DSS-Mausmodell besitzt eine hohe klinische Relevanz. Neben den PDE-Inhibitoren wurden weitere Substanzen sowohl erfolgreich im Modell der DSS-Kolitis als auch in klinischen Studien getestet. Einige Präparate befinden sich bereits in der praktischen Anwendung bei CED.

**Tabelle 8.** Im Dextran-Natrium-Sulfat-Modell erfolgreiche Substanzen, die in klinischen Studien für CED getestet wurden/werden

Substanz	Literatur DSS-Kolitis	Literatur klinische Studie
IL-10	Tomoyose et al. 1998	Van Deventer et al. 1997
TNF-Antikörper	Kojouharoff et al. 1997	Targan et al. 1997
FK506	Takizawa et al. 1995	Sandborn et al. 2003
Sulfasalazine	Axelsson et al. 1998	Van Hees et al. 1981
Cyclosporin	Murthy et al. 1993	Brynskov et al. 1989
Pentoxifyllin	Diaz-Granados et al. 2000	Bauditz et al. 1997
Prostaglandine	Tessner et al. 1998	Goldin et al. 1983
ICAM-1 Antisense Oligonukleotide	Bennett et al. 1998	Yacyshyn et al. 2002

Die klinische Erprobung der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen ist weit fortgeschritten. Roflumilast befindet sich in den USA in Studien der Phase 2 für COPD bzw. Phase 3 für Asthma bronchiale. In Europa wird Roflumilast für beide Indikationen in Phase 3 Studien untersucht. Ergebnisse aus bereits publizierten klinischen Studien - getestet wurde die Wirkung auf allergische Rhinitis, Asthma bronchiale und COPD - zeigen eine starke anti-inflammatorische Potenz bei sicherer Applikation und guter Verträglichkeit (Schmidt et al. 2001; Timmer et al. 2002; Leichtl et al. 2002). Die Markteinführung ist bis 2005 geplant. Pumafentrine wird in Phase 2-Studien für COPD und Asthma getestet (Information der Firma Altana).

Aufgrund der überzeugenden Ergebnisse für Roflumilast und Pumafentrine im Mausmodell der DSS-induzierten Kolitis und der bereits guten klinischen Erfahrungen für andere Indikationen hoffen wir, diese Substanzen in weiteren Kolitismodellen oder klinischen Studien prüfen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die Suppression von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  durch die spezifische Hemmung der Phosphodiesterase konnte bisher sowohl *in vitro* als auch in verschiedenen Tiermodellen für chronisch entzündliche Erkrankungen gezeigt werden (Torphy 1998; Schudt et al. 1999; Bundschuh et. al. 2001; Hatzelmann und Schudt 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des spezifischen Phosphodiesterase Typ 4-Inhibitors Roflumilast und des dualselektiven Phosphodiesterase Typ 3/4-Inhibitors Pumafentrine im Mausmodell der Dextran-Natriumsulfat induzierten Kolitis getestet. Hierbei handelt es sich nach unserer Kenntnis um die erste Prüfung dieser Substanzen in diesem Tiermodell und um die erste Untersuchung eines Phosphodiesterase Typ 3/4-Inhibitors in einem Kolitismodell überhaupt.

Die Kolitis wurde durch orale Gabe von Dextran-Natriumsulfat im Trinkwasser über 11 Tage induziert. Die Entzündung des Kolons war mit geringer Variation gut reproduzierbar. Die Phosphodiesterase-Inhibitoren wurden mit Beginn der Dextran-Natriumsulfat-Gabe einmal täglich *p. o.* über den gesamten Versuchsverlauf appliziert. 109 weibliche Balb/c Mäuse wurden in den Versuchsreihen eingesetzt.

Roflumilast zeigte eine dosisabhängige Wirksamkeit. Die 5 mg/kg KG Dosis zeigte einen deutlichen therapeutischen Effekt auf den klinischen Verlauf, die Kolonlänge, die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  im Kolon sowie das Milzgewicht. Diese Verbesserung korrelierte mit einer geringeren Ausprägung der histopathologischen Veränderungen im Kolon. Bei der 1 mg/kg KG Dosis wurden nur der klinische Score, die Kolonlänge und das Milzgewicht signifikant verbessert.

Pumafentrine bewirkte in der mittleren eingesetzten Dosierung (5 mg/kg KG) eine Besserung des klinischen Scores, der Kolonlänge und der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Produktion im Kolongewebe. Es konnte keine Beeinflussung der systemischen Entzündungsreaktion anhand einer Verringerung des

Milzgewichtes beobachtet werden, jedoch zeigte sich bei *ex vivo* stimulierten Splenozyten eine signifikant geringere Aktivierbarkeit und Zytokinsynthese. Die 20 mg/kg KG Dosis verbesserte als einzigen Endpunkt die Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Produktion im Kolon, während die 1,5 mg/kg KG Dosis in keinem der untersuchten Parameter zu einer signifikanten Wirksamkeit führte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Phosphodiesterase-Inhibitoren Roflumilast und Pumafentrine dosisabhängig zu einer Verbesserung der Dextran-Natriumsulfat-induzierten Kolitis - als einem Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen - führen. Die spezifische Hemmung der Phosphodiesterase Typ 4 und die duale Hemmung der Phosphodiesterase Typ 3/4 stellen deshalb viel versprechende Ansätze in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen dar. Beide Substanzen befinden sich in fortgeschrittenen klinischen Studien für die chronisch obstruktive Lungenerkrankung und für Asthma bronchiale. Deshalb sollten diese Präparate in anderen Tiermodellen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder klinischen Studien weiter untersucht werden.

---

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AMP	5'-Adenosin-Monophosphat (S.13)
Anti-MIF	„Anti-macrophage migration inhibitory factor“ (S.66)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat (S.11)
Balb	Bagg Albino (S.29)
BSA	Bovines Serum Albumin (S.28)
Calcimycin	Calcium ionophor A23187 (S.26)
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat (S.1)
CD	„Cluster of differentiation“ (S.18)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung/en (S.1)
cGMP	Zyklisches Guanosin-3',5'-Mono-Phosphat (S.15)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung/en (S.60)
CRE	„Cyclic adenosine monophosphate response element“ (S.8)
CU	Colitis ulcerosa (S.2)
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid (S.25)
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat (S.1)
ELAM	„Endothelial leukocyte adhesion molecule“ (S.4)
ELISA	„Enzyme-linked immuno sorbent assay“ (S.27)
FACS	Durchflusszytometrie (S.26)
FITC	Flourescein-Isothiozyanat (S.27)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat (S.12)
GM-CSF	„Granouocyte-macrophage colony-stimulation-factor“ (S.19)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat (S.11)
HARBS	„High-affinity rolipram binding site“ (S.67)
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen (S.3)
ICAM	„Intercellular adhesion molecule“ (S.4)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$ (S.13)
Ig	Immunglobulin (S.9)
IL	Interleukin/e (S.4)
IMBX	3-Isobutyl-1-methylxanthin (S.15)
KG	Körpergewicht (S.32)
LARBS	„Low-affinity rolipram binding site“ (S.67)

LFA	„Leukocyte function-associated antigen“ (S.4)
LPS	Lipopolysaccharid (S.17)
Methocel	Methylcellulose (S.32)
MC	Morbus Crohn (S.2)
MCP	„Monocyte chemoattractant protein“ (S.4)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (S.27)
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B (S.8)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (S.8)
NO	Stickstoffmonoxid (S.4)
PBS	„Phosphate-buffered saline“ (S.37)
PDE	Phosphodiesterase/n (S.1)
PE	Phycoerithrin (S.27)
PHA	Phytohämagglutinin (S.19)
PKA	Proteinkinase A (S.12)
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (S.25)
PP	Pyrophosphat (S.11)
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes (S.39)
TGF	„Transforming growth factor“ (S.4)
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (S.1)

## 7 Literaturverzeichnis

Aggarwal B.B., Kohr W.J., Hass P.E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D. V., Harkins R. N.

Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization.

*J Biol Chem* (1985) **260**:2345-54.

Al-Essa L. Y., Niwa M., Kohno K., Nozaki M., Tsurumi K.

Heterogeneity of circulating and exudated polymorphonuclear leukocytes in superoxide-generating response to cyclic AMP and cyclic AMP-elevating agents. Investigation of the underlying mechanism.

*Biochem Pharmacol* (1995) **49**:315-22.

Axelsson L. G., Landstrom E., Bylund-Fellenius A. C.

Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine.

*Aliment Pharmacol Ther* (1998) **12**:925-34.

Banner K. H., Page C. P.

Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma.

*Eur Respir J* (1995) **8**:996-1000.

Banner K. H., Roberts N. M., Page C. P.

Differential effect of phosphodiesterase 4 inhibitors on the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells from normals and subjects with atopic dermatitis.

*Br J Pharmacol* (1995) **116**:3169-74.

Barnette M. S., Manning C. D., Cieslinski L. B., Burman M., Christensen S. B., Torphy T. J.

The ability of phosphodiesterase IV inhibitors to suppress superoxide production in guinea pig eosinophils is correlated with inhibition of phosphodiesterase IV catalytic activity.

*J Pharmacol Exp Ther* (1995) **273**:674-9.

Barnette M. S.

Phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

*Prog Drug Res* (1999) **53**:193-229.

Bauditz J., Haemling J., Ortner M., Lochs H., Raedler A., Schreiber S.

Treatment with tumour necrosis factor inhibitor oxpentifylline does not improve corticosteroid dependent chronic active Crohn's disease.

*Gut* (1997) **40**:470-4.

Beavo J. A.

Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms.

*Physiol Rev* (1995) **75**:725-48.

Bennett C. F., Kornbrust D., Henry S., Stecker K., Howard R., Cooper S., Dutson S., Hall W., Jacoby H. I.

An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.

*J Pharmacol Exp Ther* (1997) **280**:988-1000.

Bennett R. A., Rubin P. H., Present D. H.

Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease.

*Gastroenterology* (1991) **100**:1638-43.

Berends C., Dijkhuizen B., de Monchy J. G., Dubois A. E., Gerritsen J.,  
Kauffman H. F.

Inhibition of PAF-induced expression of CD11b and shedding of L-selectin on  
human neutrophils and eosinophils by the type IV selective PDE inhibitor,  
rolipram.

*Eur Respir J* (1997) **10**:1000-7.

BGBI

Tierschutzgesetz für die Bundesrepublik Deutschland

*Bundesgesetzblatt* (1986) I:1319.

Bielekova B., Lincoln A., McFarland H., Martin R.

Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated  
autoimmune diseases.

*J Immunol* (2000) **164**:1117-24.

Biamond I., Burnham W. R., D'Amaro J., Langman M. J.

HLA-A and -B antigens in inflammatory bowel disease.

*Gut* (1986) **27**:934-41.

Bischoff S. C., Lorentz A., Schwengberg S., Weier G., Raab R., Manns M. P.

Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in  
human intestinal tissue.

*Gut* (1999) **44**:643-52.

Black E. W., Strada S. J., Thompson W. J.

Relationships of secretagogue-induced cAMP accumulation and acid secretion  
in elutriated rat gastric parietal cells.

*J Pharmacol Methods* (1988) **20**:57-78.

Boismenu R., Chen Y.

Insights from mouse models of colitis.

*J Leukoc Biol* (2000) **67**:267-78.

Boismenu R., Chen Y., Chou K., El-Sheikh A., Buelow R.

Orally administered RDP58 reduces the severity of dextran sodium sulphate induced colitis.

*Ann Rheum Dis Suppl* (2002) **61**:19-24.

Bourne H. R., Lichtenstein L. M., Melmon K. L., Henney C. S., Weinstein Y., Shearer G. M.

Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP.

*Science* (1974) **184**:19-28.

Bradford M. M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

*Anal Biochem* (1976) **72**:248-54.

Braegger C. P., Nicholls S., Murch S. H., Stephens S., MacDonald T. T.

Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation.

*Lancet* (1992) **339**:89-91.

Breese E. J., Michie C. A., Nicholls S. W., Murch S. H., Williams C. B., Domizio P., Walker-Smith J. A., MacDonald T. T.

Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease.

*Gastroenterology* (1994) **106**:1455-66.

Brunnee T., Engelstatter R., Steinijs V. W., Kunkel G.

Bronchodilatory effect of inhaled zardaverine, a phosphodiesterase III and IV inhibitor, in patients with asthma.

*Eur Respir J* (1992) **5**:982-5.

Brynskov J., Freund L., Rasmussen S. N., Lauritsen K., de Muckadell O. S., Williams N., MacDonald A. S., Tanton R., Molina F., Campanini M. C.

A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of cyclosporine therapy in active chronic Crohn's disease.

*N Engl J Med* (1989) **321**:845-50.

Bundschuh D. S., Eltze M., Barsig J., Wollin L., Hatzelmann A., Beume R.

In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor.

*J Pharmacol Exp Ther* (2001) **297**:280-90.

Burgio V. L., Fais S., Boirivant M., Perrone A., Pallone F.

Peripheral monocyte and naive T-cell recruitment and activation in Crohn's disease.

*Gastroenterology* (1995) **109**: 1029-38.

Casini-Raggi V., Kam L., Chong Y. J., Fiocchi C., Pizarro T. T., Cominelli F.

Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation.

*J Immunol* (1995) **154**: 2434-40.

Castellanos M. C., Munoz C., Montoya M. C., Lara-Pezzi E., Lopez-Cabrera M., de Landazuri M. O.

Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1.

*J Immunol* (1997) **159**:5463-73.

Chalifoux L. V., Bronson R. T.

Colonic adenocarcinoma associated with chronic colitis in cotton top marmosets, *Saguinus oedipus*.

*Gastroenterology* (1981) **80**:942-6.

Chan S. C., Hanifin J. M.

Differential inhibitor effects on cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase isoforms in atopic and normal leukocytes.

*J Lab Clin Med* (1993) **121**:44-51.

Cohan V. L., Showell H. J., Fisher D. A., Pazoles C. J., Watson J. W., Turner C. R., Cheng J. B.

In vitro pharmacology of the novel phosphodiesterase type 4 inhibitor, CP-80633.

*J Pharmacol Exp Ther* (1996) **278**:1356-61.

Coley W. B.

The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases.

*Am J Med Sci* (1893) **105**:487-511.

Coligan J. E., Kruisbeck A. M., Margulies D. H., Shevach E.M., Strober W.

In vitro assays for mouse lymphocyte function.

In: *Current Protocols in Immunology*

John Wiley & Sons, Inc., New York (1992) S. 3.1.3-3.1.5.

Conti M., Iona S., Cuomo M., Swinnen J. V., Odeh J., Svoboda M. E.

Characterization of a hormone-inducible, high affinity adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase from the rat Sertoli cell.

*Biochemistry* (1995) **34**:7979-87.

Cooper H. S., Murthy S. N., Shah R. S., Sedergran D. J.

Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis.

*Lab Invest* (1993) **69**:238-49.

Daiss W., Scheurlen M., Malchow H.

Epidemiology of inflammatory bowel disease in the country of Tübingen (West Germany).

*Scand J Gastroenterol Suppl.* (1989) **170**:39-43.

De Boer Visser J., Bryant H., Hershfield N. B.

Predictors of hospitalization early in the course of Crohn's disease.

*Gastroenterology* (1990) **99**:380-5.

Degerman E., Belfrage P., Newman A. H., Rice K. C., Manganiello V. C.

Purification of the putative hormone-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase from rat adipose tissue using a derivative of cilostamide as a novel affinity ligand.

*J Biol Chem* (1987) **262**:5797-807.

Degermann E., Moos M. Jr., Rascon A., Vasta V., Meacchi E., Smith C. J., Lindgren S., Andersson K.-E., Belfrage P., Manganiello V. C.

Single step purification, partial structure and properties of human platelet cGMP inhibited cAMP phosphodiesterase.

*Biochem Biophys Acta* (1993) **1205**:189-198.

Derian C. K., Santulli R. J., Rao P. E., Solomon H. F., Barrett J. A.

Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators.

*J Immunol* (1995) **154**:308-17.

Diaz-Granados N., Howe K., Lu J., McKay D. M.

Dextran sulfate sodium-induced colonic histopathology, but not altered epithelial ion transport, is reduced by inhibition of phosphodiesterase activity.

*Am J Pathol* (2000) **156**:2169-77.

Dieleman L. A., Ridwan B. U., Tennyson G. S., Beagley K. W., Bucy R. P., Elson C. O.

Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice.

*Gastroenterology* (1994) **107**:1643-52.

Dieleman L. A., Pena A. S., Meuwissen S. G., van Rees E. P.

Role of animal models for the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease.

*Scand J Gastroenterol Suppl* (1997) **223**:99-104.

Dieleman L. A., Palmen M. J., Akol H., Bloemena E., Pena A. S., Meuwissen S. G., Van Rees E. P.

Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines.

*Clin Exp Immunol* (1998) **114**:385-91.

Eigler A., Sinha B., Hartmann G., Endres S.

Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine.

*Immunol Today* (1997) **18**:487-92.

Eigler A., Matschke V., Hartmann G., Erhardt S., Boyle D., Firestein G. S., Endres S.

Suppression of TNF-alpha production in human mononuclear cells by an adenosine kinase inhibitor.

*J Leukoc Biol* (2000) **68**:97-103.

Elson C. O., Sartor R. B., Tennyson G. S., Riddell R. H.

Experimental models of inflammatory bowel disease.

*Gastroenterology* (1995) **109**:1344-67.

Elwood W., Sun J., Barnes P. J., Giembycz M. A., Chung K. F.  
Inhibition of allergen-induced lung eosinophilia by type-III and combined type III-  
and IV-selective phosphodiesterase inhibitors in brown-Norway rats.  
*Inflamm Res* (1995) **44**:83-6.

Epstein P. M., Strada S. J., Sarada K., Thompson W. J.  
Catalytic and kinetic properties of purified high-affinity cyclic AMP  
phosphodiesterase from dog kidney.  
*Arch Biochem Biophys* (1982) **218**:119-33.

Essayan D. M., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L. M., Huang S. K.  
Differential regulation of human antigen-specific Th1 and Th2 lymphocyte  
responses by isozyme selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors.  
*J Pharmacol Exp Ther* (1997) **282**:505-12.

Evans R. C., Clarke L., Heath P., Stephens S., Morris A., Rhodes J. M.  
Treatment of ulcerative colitis with an engineered human anti-TNF $\alpha$   
antibody CDP571.  
*Aliment Pharmacol Ther* (1997) **11**:1031-5.

Farmer R. G.  
Study of family history among patients with inflammatory bowel disease.  
*Scand J Gastroenterol Suppl* (1989) **170**:64-5.

Farrar M. A., Schreiber R. D.  
The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor.  
*Annu Rev Immunol* (1993) **11**:571-611.

Fawcett L., Baxendale R., Stacey P., McGrouther C., Harrow I., Soderling S.,  
Hetman J., Beavo J. A., Phillips S. C.  
Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase  
gene family: PDE11A.  
*Proc Natl Acad Sci* (2000) **97**:3702-7.

Fiocchi C.

Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis.

*Gastroenterology* (1998) **115**: 182-205.

Foster R. W., Rakshi K., Carpenter J. R., Small R. C.

Trials of the bronchodilator activity of the isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitor AH 21-132 in healthy volunteers during a methacholine challenge test.

*Br J Clin Pharmacol* (1992) **34**:527-34.

Fuss I. J., Neurath M., Boirivant M., Klein J. S., de la Motte C., Strong S. A.,  
Fiocchi C., Strober W.

Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis PL cells manifest increased secretion of IL-5.

*J Immunol* (1996) **157**:1261-70.

Gantner F., Kupferschmidt R., Schudt C., Wendel A., Hatzelmann A.

In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-alpha release by PDE inhibitors.

*Br J Pharmacol* (1997) **121**:221-31.

Garcia-Monzon C., Moreno-Otero R., Pajares J. M., Garcia-Sanchez A., Lopez-Botet M., de Landazuri M. O., Sanchez-Madrid F.

Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis.

*Gastroenterology* (1990) **98**:1029-35.

Gavioli R., Risso A., Smilovich D., Baldissarro I., Capra M. C., Bargellesi A.,  
Cosulich M. E.

CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-  
transducing mechanisms.

*Cell Immunol* (1992) **142**:186-96.

Gewirtz A. T., Collier-Hyams L. S., Young A. N., Kucharzik T., Guilford W. J.,  
Parkinson J. F., Williams I. R., Neish A. S., Madara J. L.

Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory  
gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced  
colitis.

*J Immunol* (2002) **168**:5260-7.

Ghosh S., Shand A., Ferguson A.

Ulcerative colitis.

*BMJ* (2000) **320**:1119-23.

Giembycz M. A., Dent G.

Prospects for selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors in the  
treatment of bronchial asthma.

*Clin Exp Allergy* (1992) **22**:337-44.

Goldin E., Rachmilewitz D.

Prostanoids cytoprotection for maintaining remission in ulcerative colitis. Failure  
of 15(R), 15-methylprostaglandin E2.

*Dig Dis Sci* (1983) **28**:807-11.

Greten T. F., Sinha B., Haslberger C., Eigler A., Endres S.

Cicaprost and the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram, synergize in  
suppression of tumor necrosis factor-alpha synthesis.

*Eur J Pharmacol* (1996) **299**:229-33.

Griswold D. E., Webb E. F., Badger A. M., Gorycki P. D., Levandoski P. A., Barnette M. A., Grous M., Christensen S., Torphy T. J.

SB 207499 (Ariflo), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor, reduces tumor necrosis factor alpha and interleukin-4 production in vivo.

*J Pharmacol Exp Ther* (1998) **287**:705-11.

Harbinson P. L., MacLeod D., Hawksworth R., O'Toole S., Sullivan P. J., Heath P., Kilfeather S., Page C. P., Costello J., Holgate S. T., Lee T. H.

The effect of a novel orally active selective PDE4 isoenzyme inhibitor (CDP840) on allergen-induced responses in asthmatic subjects.

*Eur Respir J* (1997) **10**:1008-14.

Harrison S. A., Reifsnnyder D. H., Gallis B., Cadd G. G., Beavo J. A.

Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotonic drugs.

*Mol Pharmacol* (1986) **29**:506-14.

Hartmann G., Bidlingmaier C., Siegmund B., Albrich S., Schulze J., Tschöp K., Eigler A., Lehr H.A., Endres S.

Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice.

*J Pharmacol Exp Ther* (2000) **292**:22-30.

Hartnell A., Robinson D. S., Kay A. B., Wardlaw A. J.

CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines.

*Immunology* (1993) **80**:281-6.

Hatzelmann A., Schudt C.

Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro.

*J Pharmacol Exp Ther* (2001) **297**:267-79.

Hay A. R., Hay J. W.

Inflammatory bowel disease: medical cost algorithms.

*J Clin Gastroenterol* (1992) **14**:318-27.

Hendriksen C., Kreiner S., Binder V.

Long term prognosis in ulcerative colitis--based on results from a regional patient group from the county of Copenhagen.

*Gut* (1985) **26**:158-63.

Herfarth H., Brand K., Rath H. C., Rogler G., Scholmerich J., Falk W.

Nuclear factor-kappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin.

*Clin Exp Immunol* (2000) **120**:59-65.

Hollander G. A., Simpson S. J., Mizoguchi E., Nichogiannopoulou A., She J.,

Gutierrez-Ramos J. C., Bhan A. K., Burakoff S. J., Wang B., Terhorst C.

Severe colitis in mice with aberrant thymic selection.

*Immunity* (1995) **3**:27-38.

Hugot J. P., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cezard J. P., Belaiche J., Almer S., Tysk C., O'Morain C. A., Gassull M., Binder V., Finkel Y., Cortot A., Modigliani R., Laurent-Puig P., Gower-Rousseau C., Macry J., Colombel J. F., Sahbatou M., Thomas G.

Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.

*Nature* (2001) **411**:599-603.

Jung H. C., Eckmann L., Yang S. K., Panja A., Fierer J., Morzycka-Wroblewska E., Kagnoff M. F.

A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion.

*J Clin Invest* (1995) **95**:55-65.

Kambayashi T., Jacob C. O., Zhou D., Mazurek N., Fong M., Strassmann G.  
Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages.

*J Immunol* (1995) **155**:4909-16.

Kammer G. M.

The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response.

*Immunol Today* (1988) **9**:222-9.

Kaneko T., Alvarez R., Ueki I. F., Nadel J. A.

Elevated intracellular cyclic AMP inhibits chemotaxis in human eosinophils.

*Cell Signal* (1995) **7**:527-34.

Kariya T., Dage R. C.

Tissue distribution and selective inhibition of subtypes of high affinity cAMP phosphodiesterase.

*Biochem Pharmacol* (1988) **37**:3267-70.

Kim H. S., Berstad A.

Experimental colitis in animal models.

*Scand J Gastroenterol* (1992) **27**:529-37.

Kirsner J. B.

Experimental "colitis" with particular reference to hypersensitivity reactions in the colon.

*Gastroenterology* (1961) **40**:307-12.

Kojouharoff G., Hans W., Obermeier F., Mannel D. N., Andus T., Scholmerich J., Gross V., Falk W.

Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice.

*Clin Exp Immunol* (1997) **107**:353-8.

Kosiewicz M. M., Nast C. C., Krishnan A., Rivera-Nieves J., Moskaluk C. A., Matsumoto S., Kozaiwa K., Cominelli F.

Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease.

*J Clin Invest* (2001) **107**:695-702.

Kumar R. K., Herbert C., Thomas P. S., Wollin L., Beume R., Yang M., Webb D. C., Foster P. S.

Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma.

*J Pharmacol Exp Ther* (2003) **307**:349-55.

Laffon A., Garcia-Vicuna R., Humbria A., Postigo A. A., Corbi A. L., de Landazuri M. O., Sanchez-Madrid F.

Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis.

*J Clin Invest* (1991) **88**:546-52.

Lalli E., Sassone-Corsi P.

Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP.

*J Biol Chem* (1994) **269**:17359-62.

LeBon T. R., Kasuya J., Paxton R. J., Belfrage P., Hockman S., Manganiello V. C., Fujita Yamaguchi Y.

Purification and characterization of guanosine 3',5'-monophosphate-inhibited low K(m) adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase from human placental cytosolic fractions.

*Endocrinology* (1992) **130**:3265-74.

Leichtl S., Syed J., Bredenbroker D.

Efficacy of once-daily roflumilast, a new orally active, selective phosphodiesterase 4 inhibitor, in chronic obstructive pulmonary disease.

*Am J Respir Crit Care Med* (2002) **165**:A229.

Löffler G.

Endokrine Gewebe I: Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen.

In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Löffler G., Petrides P. E. (Hrsg.). Springer-Verlag, Heidelberg (1997), 5.Auflage, S.762-84.

Loher F., Hallwachs R., Schmall K., Bauer C., Siegmund B., Rieder F., Lehr H.A., Dauer M., Kapp J., Endres S., Eigler A.

The specific type 4 phosphodiesterase inhibitor mesopram alleviates experimental colitis in mice.

*Pharmacol Exp Ther* (2003) **305**:549-56.

Lopez-Cabrera M., Munoz E., Blazquez M. V., Ursa M. A., Santis A. G., Sanchez-Madrid F.

Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements.

*J Biol Chem* (1995) **270**:21545-51.

Lugering A., Schmidt M., Lugering N., Pauels H. G., Domschke W., Kucharzik T.

Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway.

*Gastroenterology* (2001) **121**:1145-57.

Lycke N. Y.

Cholera toxin promotes B cell isotype switching by two different mechanisms. cAMP induction augments germ-line Ig H-chain RNA transcripts whereas membrane ganglioside GM1-receptor binding enhances later events in differentiation.

*J Immunol* (1993) **150**:4810-21.

MacPherson B. R., Pfeiffer C. J.

Experimental production of diffuse colitis in rats.

*Digestion* (1978) **17**:135-50.

Mahler M., Bristol I. J., Leiter E. H., Workman A. E., Birkenmeier E. H., Elson C. O., Sundberg J. P.

Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis.

*Am J Physiol* (1998) **274**:G544-51.

Mary D., Aussel C., Ferrua B., Fehlmann M.

Regulation of interleukin 2 synthesis by cAMP in human T cells.

*J Immunol* (1987) **139**:1179-84.

McCafferty D. M., Sihota E., Muscara M., Wallace J. L., Sharkey K. A., Kubes P.

Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice.

*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2000) **279**:G90-9.

McComb J., Gould T., Chlipala E., Sennelo G., Frazier J., Kieft G., Seely J.,  
Edwards C. K. 3rd, Bendele A.

Antiarthritic activity of soluble tumor necrosis factor receptor type I forms in  
adjuvant arthritis: correlation of plasma levels with efficacy.

*J Rheumatol* (1999) **26**:1347-51.

McLeod R. S., Steinhart A. H., Siminovitch K. A., Greenberg G. R., Bull S. B.,  
Blair J. E., Cruz C. R., Barton P. M., Cohen Z.

Preliminary report on the Mount Sinai Hospital Inflammatory Bowel Disease  
Genetics Project.

*Dis Colon Rectum* (1997) **40**:553-7.

Molnar-Kimber K., Yonno L., Heaslip R., Weichman B.

Modulation of TNF alpha and IL-1 beta from endotoxin-stimulated monocytes by  
selective PDE isozyme inhibitors.

*Agents Actions* (1993) **39**:C77-9.

Mombaerts P., Mizoguchi E., Grusby M. J., Glimcher L. H., Bhan A. K.,  
Tonegawa S.

Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor  
mutant mice.

*Cell* (1993) **75**:274-82.

Monteleone G., Biancone L., Marasco R., Morrone G., Marasco O., Lizza F.,  
Pallone F.

Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal  
lamina propria mononuclear cells.

*Gastroenterology* (1997) **112**:1169-78.

Moore A. R., Willoughby D. A.

The role of cAMP regulation in controlling inflammation.

*Clin Exp Immunol* (1995) **101**:387-9.

Moriguchi M., Urabe K., Norisada N., Ochi C., Stalc A., Urleb U., Muraoka S.  
Therapeutic effects of LK 423, a phthalimido-desmuramyl-dipeptide compound,  
on dextran sulfate sodium-induced colitis in rodents through restoring their  
interleukin-10 producing capacity.

*Arzneimittelforschung* (1999) **49**:184-92.

Morris G. P., Beck P. L., Herridge M. S., Depew W. T., Szewczuk M. R.,  
Wallace J. L.

Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.

*Gastroenterology* (1989) **96**:795-803.

Morrissey P. J., Charrier K., Braddy S., Liggitt D., Watson J. D.

CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when  
transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease  
development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells.

*J Exp Med* (1993) **178**:237-44.

Munkholm P.

Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in  
inflammatory bowel disease.

*Aliment Pharmacol Ther Suppl* (2003) **2**:1-5.

Murch S. H., Lamkin V. A., Savage M. O., Walker-Smith J. A., MacDonald T. T.  
Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic  
inflammatory bowel disease.

*Gut* (1991) **32**:913-7.

Murch S. H., Braegger C. P., Walker-Smith J. A., MacDonald T. T.

Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic  
inflammatory bowel disease.

*Gut* (1993) **34**:1705-9.

Murthy S. N., Cooper H. S., Shim H., Shah R. S., Ibrahim S. A., Sedergran D. J.  
Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin.

*Dig Dis Sci* (1993) **38**:1722-34.

Murthy S., Cooper H. S., Yoshitake H., Meyer C., Meyer C. J., Murthy N. S.  
Combination therapy of pentoxifylline and TNF $\alpha$  monoclonal antibody in dextran sulphate-induced mouse colitis.

*Aliment Pharmacol Ther* (1999) **13**:251-60.

Myers K. J., Murthy S., Flanigan A., Witchell D. R., Butler M., Murray S., Siwkowski A., Goodfellow D., Madsen K., Baker B.  
Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor- $\alpha$  in two murine models of colitis.

*J Pharmacol Exp Ther* (2003) **304**:411-24.

Nagai H., Takeda H., Iwama T., Yamaguchi S., Mori H.  
Studies on anti-allergic action of AH 21-132, a novel isozyme-selective phosphodiesterase inhibitor in airways.

*Jpn J Pharmacol* (1995) **67**:149-56.

Nicholson C. D., Shahid M.  
Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes--their potential utility in the therapy of asthma.

*Pulm Pharmacol* (1994) **7**:1-17.

Niwa M., Hara A., Kanamori Y., Matsuno H., Kozawa O., Yoshimi N., Mori H., Uematsu T.

Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  induced neutrophil apoptosis by cyclic AMP: involvement of caspase cascade.

*Eur J Pharmacol* (1999) **371**:59-67.

Nyman U., Mussener A., Larsson E., Lorentzen J., Klareskog L.  
Amelioration of collagen II-induced arthritis in rats by the type IV  
phosphodiesterase inhibitor Rolipram.

*Clin Exp Immunol* (1997) **108**:415-9.

Ohkawara T., Nishihira J., Takeda H., Hige S., Kato M., Sugiyama T., Iwanaga  
T., Nakamura H., Mizue Y., Asaka M.

Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage  
migration inhibitory factor antibody in mice.

*Gastroenterology* (2002) **123**:256-70.

Ohkusa T.

Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate  
sodium and changes in intestinal microflora.

*Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* (1985) **82**:1327-36.

Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R.  
A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic  
ulcerative colitis in mice.

*Gastroenterology* (1990) **98**:694-702.

Okonogi K., Gettys T. W., Uhing R. J., Tarry W.C., Adams D. O., Prpic V.  
Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated cAMP accumulation by  
lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages.

*J Biol Chem* (1991) **266**:10305-12.

Ottonello L., Morone M. P., Dapino P., Dallegri F.

Tumour necrosis factor alpha-induced oxidative burst in neutrophils adherent to  
fibronectin: effects of cyclic AMP-elevating agents.

*Br J Haematol* (1995) **91**:566-70.

Ottonello L., Gonella R., Dapino P., Sacchetti C., Dallegri F.

Prostaglandin E2 inhibits apoptosis in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: role of intracellular cyclic AMP levels.

*Exp Hematol* (1998) **26**:895-902.

Parronchi P., Romagnani P., Annunziato F., Sampognaro S., Becchio A.,

Giannarini L., Maggi E., Pupilli C., Tonelli F., Romagnani S.

Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease.

*Am J Pathol* (1997) **150**:823-32.

Paul-Eugene N., Kolb J. P., Calenda A., Gordon J., Kikutani H., Kishimoto T.,

Mencia-Huerta J. M., Braquet P., Dugas B.

Functional interaction between beta 2-adrenoceptor agonists and interleukin-4 in the regulation of CD23 expression and release and IgE production in human.

*Mol Immunol* (1993) **30**:157-64.

Peachell P. T., Undem B. J., Schleimer R. P., MacGlashan D. W. Jr,

Lichtenstein L. M., Cieslinski L. B., Torphy T. J.

Preliminary identification and role of phosphodiesterase isozymes in human basophils.

*J Immunol* (1992) **148**:2503-10.

Peterson T. C., Davey K.

Effect of acute pentoxifylline treatment in an experimental model of colitis.

*Aliment Pharmacol Ther* (1997) **11**:575-80.

Philip R., Epstein L. B.

Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1.

*Nature* (1986) **323**:86-9.

Pizarro T. T., Michie M. H., Bentz M., Woraratanadharm J., Smith M. F. Jr.,  
Foley E., Moskaluk C. A., Bickston S. J., Cominelli F.

IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease:  
expression and localization in intestinal mucosal cells.

*J Immunol* (1999) **162**:6829-35.

Podolsky D. K.

Inflammatory bowel disease (First of two parts).

*N Engl J Med* (1991) **325**:928-37.

Podolsky D. K.

Inflammatory bowel disease (Second of two parts).

*N Engl J Med* (1991) **325**:1008-1016.

Present D. H., Rutgeerts P., Targan S., Hanauer S. B., Mayer L., van Hogezaand  
R. A., Podolsky D. K., Sands B. E., Braakman T., DeWoody K. L., Schaible T.  
F., van Deventer S. J.

Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease.

*N Engl J Med* (1999) **340**:1398-405.

Present D. H.

Review article: the efficacy of infliximab in Crohn's disease--healing of fistulae.

*Aliment Pharmacol Ther Suppl* (1999) **4**:23-8.

Probert C. S., Hearing S. D., Schreiber S., Kuhbacher T., Ghosh S., Arnott I. D.,  
Forbes A.

Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a  
randomised controlled trial.

*Gut* (2003) **52**:998-1002.

Rao S.S., Holdsworth C.D., Read N.W.

Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis.

*Gut* (1988) **29**:342-5.

Rascon A., Lindgren S., Stavenow L., Belfrage P., Andersson K. E., Manganiello V. C., Degerman E.

Purification and properties of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase from bovine aortic smooth muscle.

*Biochim Biophys Acta* (1992) **16**:149-56.

Reimund J. M., Dumont S., Muller C. D., Kenney J. S., Keding M., Baumann R., Poindron P., Duclos B.

In vitro effects of oxpentifylline on inflammatory cytokine release in patients with inflammatory bowel disease.

*Gut* (1997) **40**:475-80.

Reinecker H. C., Loh E. Y., Ringler D. J., Mehta A., Rombeau J. L., MacDermott R. P.

Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa.

*Gastroenterology* (1995) **108**:40-50.

Robichaud A., Tattersall F. D., Choudhury I., Rodger I. W.

Emesis induced by inhibitors of type IV cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE IV) in the ferret.

*Neuropharmacology* (1999) **38**:289-97.

Robicsek S. A., Blanchard D. K., Djeu J. Y., Krzanowski J. J., Szentivanyi A., Polson J. B.

Multiple high-affinity cAMP-phosphodiesterases in human T-lymphocytes.

*Biochem Pharmacol* (1991) **42**:869-77.

Ross S. E., Williams R. O., Mason L. J., Mauri C., Marinova-Mutafchieva L., Malfait A. M., Maini R. N., Feldmann M.

Suppression of TNF-alpha expression, inhibition of Th1 activity, and amelioration of collagen-induced arthritis by rolipram.

*J Immunol* (1997) **159**:6253-9.

Rutgeerts P., Geboes K., Vantrappen G., Kerremans R., Coenegrachts J. L., Coremans G.

Natural history of recurrent Crohn's disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery.

*Gut* (1984) **25**:665-72.

Rutgeerts P., Geboes K., Vantrappen G., Beyls J., Kerremans R., Hiele M.

Predictability of the postoperative course of Crohn's disease.

*Gastroenterology*. (1990) **99**:956-63.

Rutgeerts P., D'Haens G., Targan S., Vasiliauskas E., Hanauer S. B., Present D. H., Mayer L., Van Hogezaand R. A., Braakman T., DeWoody K. L., Schaible T. F., Van Deventer S. J.

Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease.

*Gastroenterology* (1999) **117**:761-9.

Sadlack B., Merz H., Schorle H., Schimpl A., Feller A. C., Horak I.

Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene.

*Cell* (1993) **75**:253-61.

Sandborn W. J., Feagan B. G., Hanauer S. B., Present D. H., Sutherland L. R., Kamm M. A., Wolf D. C., Baker J. P., Hawkey C., Archambault A., Bernstein C. N., Novak C., Heath P. K., Targan S. R., CDP571 Crohn's Disease Study Group.

An engineered human antibody to TNF (CDP571) for active Crohn's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial.

*Gastroenterology* (2001a) **120**:1330-8.

Sandborn W. J., Hanauer S. B., Katz S., Safdi M., Wolf D. G., Baerg R. D., Tremaine W. J., Johnson T., Diehl N. N., Zinsmeister A. R.  
Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

*Gastroenterology* (2001b) **121**:1088-94.

Sandborn W. J., Present D. H., Isaacs K. L., Wolf D. C., Greenberg E., Hanauer S. B., Feagan B. G., Mayer L., Johnson T., Galanko J., Martin C., Sandler R. S.  
Tacrolimus for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, placebo-controlled trial.

*Gastroenterology* (2003) **125**:380-8.

Sands B. E., Tremaine W. J., Sandborn W. J., Rutgeerts P. J., Hanauer S. B., Mayer L., Targan S. R., Podolsky D. K.  
Infliximab in the treatment of severe, steroid-refractory ulcerative colitis: a pilot study.

*Inflamm Bowel Dis* (2001) **7**:83-8.

Sartor R. B., Cromartie W. J., Powell D. W., Schwab J. H.  
Granulomatous enterocolitis induced in rats by purified bacterial cell wall fragments.

*Gastroenterology* (1985) **89**:587-95.

Sasaki T., Horiuchi S., Yamazaki M., Yui S.  
Stimulation of macrophage DNA synthesis by polyanionic substances through binding to the macrophage scavenger receptor.

*Biol Pharm Bull* (1996) **19**:449-55.

Scallon B. J., Moore M. A., Trinh H., Knight D. M., Ghrayeb J.  
Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions.

*Cytokine* (1995) **7**:251-9.

Schmidt B. M., Kusma M., Feuring M., Timmer W. E., Neuhauser M., Bethke T., Stuck B. A., Hormann K., Wehling M.

The phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast is effective in the treatment of allergic rhinitis.

*J Allergy Clin Immunol* (2001) **108**:530-6.

Schudt C., Tenor H., Hatzelmann A.

PDE isoenzymes as targets for anti-asthma drugs.

*Eur Respir J* (1995) **8**:1179-83.

Schudt C., Gantner F., Tenors H., Hatzelmann A.

Therapeutic potential of selective PDE inhibitors in asthma.

*Pulm Pharmacol Ther* (1999) **12**:123-9.

Scully C., Cochran K. M., Russell R. I.

Crohn's disease of the mouth: an indicator of intestinal involvement.

*Gut* (1982) **23**:198-201.

Seldon P. M., Barnes P. J., Meja K., Giembycz M. A.

Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha generation from human peripheral blood monocytes by inhibitors of phosphodiesterase 4: interaction with stimulants of adenylyl cyclase.

*Mol Pharmacol* (1995) **48**:747-57.

Semmler J., Wachtel H., Endres S.

The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses tumor necrosis factor-alpha production by human mononuclear cells.

*Int J Immunopharmacol* (1993) **15**:409-13.

Shirai T., Yamaguchi H., Ito H., Todd C. W., Wallace R. B.

Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor.

*Nature* (1985) **313**:803-6.

Shull M. M., Ormsby I., Kier A. B., Pawlowski S., Diebold R. J., Yin M., Allen R., Sidman C., Proetzel G., Calvin D.,  
Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease.  
*Nature* (1992) **359**:693-9.

Siegmund B., Fantuzzi G., Rieder F., Gamboni-Robertson F., Lehr H.A., Hartmann G., Dinarello C.A., Endres S., Eigler A.  
Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production.  
*Am J Physiol* (2000) **281**:R1264-73.

Siegmund B., Rieder F., Albrich S., Wolf K., Bidlingmaier C., Firestein G.S., Boyle D., Lehr H.A., Loher F., Hartmann G., Endres S., Eigler A.  
Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice.  
*J Pharmacol Exp Ther* (2001) **296**:99-105.

Siegmund B., Welsch J., Loher F., Meinhardt G., Emmerich B., Endres S., Eigler A.  
Phosphodiesterase type 4 inhibitor suppresses expression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in B-CLL cells and induces caspase-dependent apoptosis.  
*Leukemia* (2001) **15**:1564-71.

Sinha B., Semmler J., Eisenhut T., Eigler A., Endres S.  
Enhanced tumor necrosis factor suppression and cyclic adenosine monophosphate accumulation by combination of phosphodiesterase inhibitors and prostanoids.  
*Eur J Immunol* (1995) **25**:147-53.

Sommer N., Loschmann P. A., Northoff G. H., Weller M., Steinbrecher A., Steinbach J. P., Lichtenfels R., Meyermann R., Riethmuller A., Fontana A.  
The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis.

*Nat Med* (1995) **1**:244-8.

Souness J. E., Carter C. M., Diocee B. K., Hassall G. A., Wood L. J., Turner N. C.

Characterization of guinea-pig eosinophil phosphodiesterase activity.  
Assessment of its involvement in regulating superoxide generation.

*Biochem Pharmacol* (1991) **42**:937-45.

Souness J. E., Rao S.

Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases.

*Cell Signal* (1997) **9**:227-36.

Spiliadis C. A., Spiliadis C. A., Lennard-Jones J.E.

Ulcerative colitis with relative sparing of the rectum. Clinical features, histology, and prognosis.

*Dis Colon Rectum* (1987) **30**:334-6.

Stack W. A., Mann S. D., Roy A. J., Heath P., Sopwith M., Freeman J., Holmes G., Long R., Forbes A., Kamm M. A.

Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor-alpha in Crohn's disease.

*Lancet* (1997) **349**:521-4.

Stange E. F., Schreiber S., Folsch U. R., von Herbay A., Scholmerich J., Hoffmann J., Zeitz M., Fleig W. E., Buhr H. J., Kroesen A. J., Moser G., Matthes H., Adler G., Reinshagen M., Stein J.

Diagnostik und Therapie des M. Crohn – Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten.

*Z Gastroenterol* (2003) **41**:19-68.

Steinhoff U., Brinkmann V., Klemm U., Aichele P., Seiler P., Brandt U., Bland P. W., Prinz I., Zügel U., Kaufmann S. H.

Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells.

*Immunity* (1999) **11**:349-58.

Sturgess I., Searle G. F.

The acute toxic effect of the phosphodiesterase inhibitor rolipram on plasma osmolality.

*Br J Clin Pharmacol* (1990) **29**:369-70.

Sundberg J. P., Elson C. O., Bedigian H., Birkenmeier E. H.

Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice.

*Gastroenterology* (1994) **107**:1726-35.

Sutherland E. W., Rall T. W.

Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.

*J Biol Chem* (1958) **23**:1077-91.

Targan S. R., Hanauer S. B., van Deventer S. J., Mayer L., Present D. H., Braakman T., DeWoody K. L., Schaible T. F., Rutgeerts P. J.

A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group.

*N Engl J Med* (1997) **337**:1029-35.

Takeda K., Clausen B. E., Kaisho T., Tsujimura T., Terada N., Forster I., Akira S.

Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils.

*Immunity* (1999) **10**:39-49.

Takizawa H., Shintani N., Natsui M., Sasakawa T., Nakakubo H., Nakajima T., Asakura H.

Activated immunocompetent cells in rat colitis mucosa induced by dextran sulfate sodium and not complete but partial suppression of colitis by FK506.

*Digestion* (1995) **56**:259-64.

Tamma S. M., Chirmule N., Yagura H., Oyaizu N., Kalyanaraman V., Pahwa S. CD4 cross-linking (CD4XL) induces RAS activation and tumor necrosis factor-alpha secretion in CD4+ T cells.

*Blood* (1997) **90**:1588-93.

Taniguchi T., Tsukada H., Nakamura H., Kodama M., Fukuda K., Saito T., Miyasaka M., Seino Y.

Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats.

*J Gastroenterol Hepatol* (1998) **13**:945-9.

Targan S. R., Hanauer S. B., van Deventer S. J., Mayer L., Present D. H., Braakman T., DeWoody K. L., Schaible T. F., Rutgeerts P. J.

A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group.

*N Engl J Med* (1997) **337**:1029-35.

Tenor H., Hatzelmann A., Kupferschmidt R., Stanciu L., Djukanovic R., Schudt C., Wendel A., Church M. K., Shute J. K.

Cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme activities in human alveolar macrophages.

*Clin Exp Allergy* (1995) **25**:625-33.

Tessner T. G., Cohn S. M., Schloemann S., Stenson W. F.

Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice.

*Gastroenterology* (1998) **115**:874-82.

Thompson W. J., Epstein P. M., Strada S. J.

Purification and characterization of high-affinity cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase from dog kidney.

*Biochemistry* (1979) **18**:5228-37.

Timmer A., Goebell H.

Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995—a prospective study in an urban population in Germany.

*Z Gastroenterol* (1999) **37**:1079-84.

Timmer W., Leclerc V., Birraux G., Neuhauser M., Hatzelmann A., Bethke T., Wurst W.

The new phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast is efficacious in exercise-induced asthma and leads to suppression of LPS-stimulated TNF-alpha ex vivo.

*J Clin Pharmacol* (2002) **42**:297-303.

Tomoyose M., Mitsuyama K., Ishida H., Toyonaga A., Tanikawa K.

Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis.

*Scand J Gastroenterol* (1998) **33**:435-40.

Torphy T. J., Zhou H. L., Cieslinski L. B.

Stimulation of beta adrenoceptors in a human monocyte cell line (U937) up-regulates cyclic AMP-specific phosphodiesterase activity.

*J Pharmacol Exp Ther* (1992) **263**:1195-205.

Torphy T. J., DeWolf W. E. Jr., Green D. W., Livi G. P.

Biochemical characteristics and cellular regulation of phosphodiesterase IV.

*Agents Actions Suppl* (1993) **43**:51-71.

Torphy T. J., Barnette M. S., Hay D. W., Underwood D. C.

Phosphodiesterase IV inhibitors as therapy for eosinophil-induced lung injury in asthma.

*Environ Health Perspect Suppl* (1994) **10**:79-84.

Torphy T. J.

Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents.

*Am J Respir Crit Care Med* (1998) **157**:351-70.

Truong V. H., Muller T.

Isolation, biochemical characterization and N-terminal sequence of rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase from human mononuclear leukocytes.

*FEBS Lett* (1994) **353**:113-8.

Tsai E. Y., Yie J., Thanos D., Goldfeld A. E.

Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN.

*Mol Cell Biol* (1996) **16**:5232-44.

Tsien R. W.

Cyclic AMP and contractile activity in heart.

*Adv Cyclic Nucleotide Res* (1977) **8**:363-420.

Tsubamoto Y., Yamada N., Watanabe Y., Inaba T., Shiomi M., Shimano H., Gotoda T., Harada K., Shimada M., Ohsuga J.

Dextran sulfate, a competitive inhibitor for scavenger receptor, prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

*Atherosclerosis* (1994) **106**:43-50.

Ukena D., Rentz K., Reiber C., Sybrecht G. W.

Effects of the mixed phosphodiesterase III/IV inhibitor, zardaverine, on airway function in patients with chronic airflow obstruction.

*Respir Med* (1995) **89**:441-4.

Valette L., Prigent A. F., Nemoz G., Anker G., Macovschi O., Lagarde M.

Concanavalin A stimulates the Rolipram-sensitive isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat thymic lymphocytes.

*Biochem Biophys Res Commun* (1990) **169**:864-72.

Van den Brande J. M., Braat H., van den Brink G. R., Versteeg H. H., Bauer C. A., Hoedemaeker I., van Montfrans C., Hommes D. W., Peppelenbosch M. P., van Deventer S. J.

Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease.

*Gastroenterology* (2003) **124**:1774-85.

Van Deventer S. J., Elson C. O., Fedorak R. N.

Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group.

*Gastroenterology* (1997) **113**:383-9.

Van Dullemen H. M., van Deventer S. J., Hommes D. W., Bijl H. A., Jansen J., Tytgat G. N., Woody J.

Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2).

*Gastroenterology* (1995) **109**:129-35.

Van Hees P. A., Van Lier H. J., Van Elteren P. H., Driessen M., Van Hogezaand R. A., Ten Velde G. P., Bakker J. H., Van Tongeren J. H.

Effect of sulphasalazine in patients with active Crohn's disease: a controlled double-blind study.

*Gut* (1981) **22**:404-9.

Watt J., Marcus R.

Ulcerative colitis in the guinea-pig caused by seaweed extract.

*J Pharm Pharmacol Suppl* (1969) **21**:187S+.

Weston M. C., Anderson N., Peachell P. T.

Effects of phosphodiesterase inhibitors on human lung mast cell and basophil function.

*Br J Pharmacol* (1997) **121**:287-95.

Wright J. P., Young G. O., Tigler-Wybrandi N.

Predictors of acute relapse of Crohn's disease. A laboratory and clinical study.

*Dig Dis Sci.* (1987) **32**:164-70.

Wright C. D., Kuipers P. J., Kobylarz-Singer D., Devall L. J., Klinkefus B. A., Weishaar R. E.

Differential inhibition of human neutrophil functions. Role of cyclic AMP-specific, cyclic GMP-insensitive phosphodiesterase.

*Biochem Pharmacol* (1990) **40**:699-707.

Yacyshyn B. R., Chey W. Y., Goff J., Salzberg B., Baerg R., Buchman A. L., Tami J., Yu R., Gibiansky E., Shanahan W. R., ISIS 2302-CS9 Investigators.

Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease.

*Gut* (2002) **51**:30-6.

Yamada T., Deitch E., Specian R. D., Perry M. A., Sartor R. B., Grisham M. B.  
Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by  
indomethacin.

*Inflammation* (1993) **17**:641-62.

Yamamoto T., Lieberman F., Osborne J. C. Jr., Manganiello V. C., Vaughan M.,  
Hidaka H.

Selective inhibition of two soluble adenosine cyclic 3',5'-phosphate  
phosphodiesterases partially purified from calf liver.

*Biochemistry* (1984) **23**:670-5.

Zeller E., Stief H. J., Pflug B., Sastre-y-Hernandez M.

Results of a phase II study of the antidepressant effect of rolipram.

*Pharmacopsychiatry* (1984) **17**:188-90.

Zhang X. W., Liu Q., Thorlacius H.

Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran  
sodium sulfate-induced murine colitis.

*Scand J Gastroenterol* (2001) **36**:270-5.

Ziegler S. F., Ramsdell F., Alderson M. R.

The activation antigen CD69.

*Stem Cells* (1994) **12**:456-65.

Ziegler-Heitbrock H. W., Blumenstein M., Kafferlein E., Kieper D., Petersmann  
I., Endres S., Flegel W. A., Northoff H., Riethmuller G., Haas J. G.

In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor,  
interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion.

*Immunology* (1992) **75**:264-8.

## 8 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in die hervorragende Arbeitsatmosphäre seiner Gruppe. Insbesondere möchte ich mich für die stets sehr gute Betreuung und die Möglichkeit zum Besuch mehrerer Kongresse bedanken.

Für die kontinuierliche Betreuung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Andreas Eigler und besonders meiner direkten Betreuerin Frau Dr. Britta Siegmund danken.

Herrn Prof. Dr. Hans Anton Lehr und dem Institut für Pathologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz danke ich für die Mitarbeit und Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen.

Für ihre große Hilfsbereitschaft danke ich Herrn PD Dr. Gunther Hartmann, Herrn Dr. Florian Loher und meinen Co-Doktoranden Herrn Stefan Albrich, Frau Dr. Katrin Wolf und Herrn Dr. Christoph Bidlingmaier.

Allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, ohne die das Entstehen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 9 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der Arbeit wurden mit Genehmigung des Dekanats der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität veröffentlicht.

### Originalarbeiten

1. Siegmund B., **Rieder F.**, Albrich S., Wolf K., Bidlingmaier C., Firestein G.S., Boyle D., Lehr H.A., Loher F., Hartmann G., Endres S., Eigler A.  
Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice.  
*J Pharmacol Exp Ther* (2001) **296**:99-105.

2. Siegmund B., Fantuzzi G., **Rieder F.**, Gamboni-Robertson F., Lehr H.A., Hartmann G., Dinarello C.A., Endres S., Eigler A.  
Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production.  
*Am J Physiol* (2000) **281**:R1264-73.

3. Loher F., Hallwachs R., Schmall K., Bauer C., Siegmund B., **Rieder F.**, Lehr H.A., Dauer M., Kapp J., Endres S., Eigler A.  
The specific type 4 phosphodiesterase inhibitor mesopram alleviates experimental colitis in mice.  
*Pharmacol Exp Ther* (2003) **305**:549-56.

### Abstracts

1. Siegmund B., **Rieder F.**, Albrich S., Firestein G.S., Boyle D., Hartmann G., Endres S., Eigler A.  
Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice by inhibition of Th1 cytokine synthesis.  
*Digestive Disease Week 2000, San Diego, California, 21.-24. May 2000*

2. **Rieder F.**, Siegmund B., Dinarello C.A., Lehr H.A., Hartmann G., Endres S., Eigler A.

Spezifische Suppression der Th1-Antwort durch Anti-IL-18-Antiserum führt zu einer signifikanten Verbesserung der experimentellen Colitis in der Maus.

*55. Tagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Hamburg, 13.-16. September 2000*

3. **Rieder F.**, Siegmund B., Albrich S., Firestein G.S., Boyle D., Hartmann G., Endres S., Eigler A.

Der Adenosin-Kinase-Inhibitor GP515 führt zu einer signifikanten Verbesserung der experimentellen Colitis in der Maus.

*Research Festival, München Großhadern, 13.-14. Oktober 2000*

4. Loher F., Schmall K., **Rieder F.**, Bauer C., Siegmund B., Lehr H.A., Endres S., Eigler A.

In vivo efficacy of the specific type 4 phosphodiesterase inhibitor mesopram in DSS-induced murine colitis.

*Digestive Disease Week 2001, Atlanta, Georgia, 20.-23. May 2001*

5. Siegmund B., Fantuzzi G., **Rieder F.**, Gamboni-Robertson F., Eigler A., Endres S., Dinarello C.A.

Neutralisation of IL-18 exerts anti-inflammatory activity in experimental colitis in mice.

*Digestive Disease Week 2001, Atlanta, Georgia, 20-23 May 2001*

## **Veröffentlichungen zu anderen Themen:**

### **Originalarbeiten**

1. **Rieder F.**, West G.A., Phillips H., Cao W., Biancani P., Fiocchi C.

Cytokines in peptic esophagitis and their impact on motility.

*In Vorbereitung 2004*

### **Abstracts**

1. **Rieder F.**, Phillips. H., West G.A., Chak A., Cooper G., Isenberg G., Ray M., Katz J.A., Wong R.C., Post A., O`Shea R., Sivak M., Biancani P., Fiocchi C.

Production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-8 in active esophagitis.

*Digestive Disease Week, San Francisco, 19.-22. May 2002*

**10 Lebenslauf**

02.08.1976                      Florian Rieder, geboren in Dachau

**Schulbildung:**

1982 – 1986                      Grundschule an der Ährenfeldstraße, Gröbenzell

1986 – 1995                      Gymnasium Gröbenzell

**Zivildienst:**

1995 – 1996                      Rettungsdienst beim BRK Fürstenfeldbruck mit  
Ausbildung zum Rettungssanitäter

**Studium:**

1996                                Beginn des Studiums der Humanmedizin,  
Ludwig-Maximilians-Universität München

1998                                Ärztliche Vorprüfung

1999                                1. Staatsexamen

09/1999                            Beginn der Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. S. Endres,  
Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische  
Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität,  
München

05/2001 - 04/2002              Forschungsaufenthalt bei Prof. Fiocchi, School of  
Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland,  
Ohio, USA

2003                                2. Staatsexamen

04/2003 – 04/2004	Praktisches Jahr  I.Tertial: Innere Medizin an der Tulane University Medical School, New Orleans, Louisiana, USA II.Tertial: Chirurgie an der Chirurgischen Klinik Innenstadt der LMU München und dem Inselspital Bern, Schweiz III.Tertial: Neurologie an der Neurologischen Klinik der LMU München
2004	3. Staatsexamen, ärztliche Teilapprobation
seit 9/2004	Arzt im Praktikum und Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universität Regensburg, Direktor: Prof. Dr. J. Schölmerich