

**Untersuchungen zur PDE-Ausstattung
unterschiedlicher Zelllinien und Xenograft-
Tumoren sowie zum Wirkmechanismus
substituierter Pteridine**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D386)

Vorgelegt von
Diplom Chemikerin
Claudia-Elisabeth Kunz

Betreuer: **Prof. Dr. G. Eisenbrand**

Kaiserslautern, 2000

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen März 1997 und November 2000 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine Anregungen und wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Schrenck danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Kuball möchte ich mich für die Übernahme des Vorsitzes bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	3
1. Verwendete Abkürzungen	6
2. Einleitung	9
2.1. Krebs	9
3. Theoretische Grundlagen.....	12
3.1. Der Zellzyklus.....	12
3.1.1. Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs)	13
3.1.2. Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKIs).....	16
3.2. Der cAMP-Signalweg.....	19
3.3. Der Einfluss von cAMP auf entzündliche Prozesse und das Zellwachstum	26
3.4. Phosphodiesterasen (PDEs)	28
3.4.1. Nomenklatur.....	30
3.4.2. PDE1	31
3.4.3. PDE2	31
3.4.4. PDE3	32
3.4.5. PDE4	33
3.4.6. PDE5	41
3.4.7. PDE6	42
3.4.8. PDE7	42
3.4.9. PDE8	43
3.4.10. PDE9	43
3.4.11. PDE10.....	44
3.4.12. PDE11.....	44
3.5. Pteridine.....	45
4. Problemstellung	47
5. Ergebnisse und Diskussion.....	50
5.1. PDE-Aktivität und PDE4-Gehalt humaner Xenograft-Tumoren	50
5.1.1. PDE-Aktivität.....	50
5.1.2. Rolipram-Hemmbarkeit	53
5.1.3. Zusammenfassung	55
5.2. Untersuchungen zur PDE-Ausstattung des Xenograft-Tumors LXFL529	55
5.2.1. Diskussion.....	65
5.2.2. Zusammenfassung	68
5.3. Vergleich solider Tumor-Zelllinie	69
5.3.1. PDE-Aktivität.....	69
5.3.2. Rolipram-Hemmbarkeit	70

5.3.3.	Zusammenfassung	72
5.4.	PDE-Hemmung durch DC-TA-46.....	72
5.4.1.	LXFL529L-Zellen und LXFL529-Xenograft-Tumor	72
5.4.2.	Diskussion.....	79
5.4.3.	LXFS650L-Zellen und LXFS650L-Xenograft-Tumor	81
5.4.4.	Diskussion.....	90
5.5.	Hemmwirkung substituierter Pteridine	91
5.5.1.	Ergebnisse	92
5.5.2.	Zusammenfassung	116
5.6.	Subzelluläre Lokalisation der Pteridinderivate	117
5.6.1.	Diskussion.....	121
5.7.	Oszillation der PDE-Aktivität während des Zellzyklus	122
5.7.1.	Arretierung durch Nocodazol	123
5.7.2.	Arretierung durch Serumentzug.....	127
5.7.3.	Diskussion.....	130
5.7.4.	Zusammenfassung	133
5.8.	Wirkung von DC-TA-46 auf die CKIs p21 ^{cip1} und p27 ^{kip1}	134
5.8.1.	Diskussion.....	136
6.	Zusammenfassung	138
7.	Material	140
7.1.	Zellkultur	143
7.1.1.	Zelllinien	143
7.1.2.	Kultivierung von Zellen	143
7.1.3.	Passagieren von Zellen.....	143
7.1.4.	Zählen von Zellen.....	144
7.1.5.	Untersuchung auf Mykoplasmenkontaminationen.....	144
7.1.6.	Einfrieren von Zellen	145
7.1.7.	Auftauen von Zellen	145
7.1.8.	Synchronisation von Zellen.....	146
7.1.9.	Morphologiebestimmung	147
7.1.10.	Durchflußzytometrische Messungen.....	147
7.2.	Versuche zur PDE-Hemmung durch verschiedene Substanzen an Zellen.....	148
7.3.	Zellaufarbeitung	148
7.4.	Tumoraufarbeitung.....	149
7.5.	Bestimmung der PDE-Aktivität	150
7.6.	PDE-Hemmtest	151
7.7.	Proteinbestimmung.....	152
7.8.	Anionenaustausch-Chromatographie.....	153

7.9.	Ultrafiltration	155
7.10.	Gelfiltration.....	155
7.11.	Acetonfällung von Proteinen.....	156
7.12.	Immunpräzipitation	157
7.13.	Western-Blot-Analyse	158
7.13.1.	SDS-Gelelektrophorese.....	158
7.13.2.	Elektroblotting.....	160
7.13.3.	Immunoblotting.....	161
7.13.4.	Silberfärbung von SDS-Gelen.....	162
7.14.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	163
7.14.1.	mRNA-Präparation.....	164
7.14.2.	RT-PCR	165
7.14.3.	Agarose-Gelelektrophorese.....	166
8.	Veröffentlichungen	168
9.	Literatur.....	169
10.	Anhang	181
10.1.	Liste der für die RT-PCR verwendeten Primer:	181
10.2.	Werte zur PDE-Hemmung verschiedener Purin- und Pteridinderivate	182
11.	Lebenslauf	210
12.	Dank.....	211

1. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Abb.	:	Abbildung
AC	:	Adenylatzyklase
ADP	:	Adenosindiphosphat
AKAP	:	“Protein-A-Kinase anchoring protein”
AMP	:	Adenosinmonophosphat
APS	:	Ammoniumpersulfat
ATF	:	„Activator transcription factor“
ATP	:	Adenosintriphosphat
Bcl-2	:	„B-Cell Lymphoma-2“-Gen
BSA	:	Rinderserumalbumin („Bovine serum albumin“)
C	:	Celsius
CAK	:	„Cyclin activating kinase“
CaM	:	Calmodulin
cAMP	:	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
cdc2	:	andere Bezeichnung für CDK1 („cell division cycle“)
CDK	:	Cyclin abhängige Kinase („Cyclin dependent kinase“)
cGMP	:	3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat
Ci	:	Curie
CKI	:	„Cyclin dependent kinase inhibitors“
cpm	:	Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
CRE	:	„cAMP responsive element“
CREB	:	„cAMP responsive element binding protein“
CREM	:	„cAMP responsive element modulator protein“
c-Src	:	Humanes Homolog des Onkogens des Rous-Sarcoma-Virus (Cytoplasmatische Tyrosinkinase)
CXF280	:	Colorectal Xenograft Fiebig
DAPI	:	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC-TA-46	:	7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin
DMSO	:	Dimethylsulfoxid
DNA	:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	:	Wachstumsfaktor (“Epidermal growth factor“)
EGTA	:	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EHNA	:	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin
erb-B	:	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
Erk	:	“extrazellulär regulierte Kinase”
evtl	:	eventuell
FKS	:	Fetales Kälberserum
g	:	Erdbeschleunigung
GDP	:	Guanosindiphosphat
GTP	:	Guanosintriphosphat
h	:	Stunden
HPDE4	:	“high affinity Rolipram-binding-PDE4”
HPLC	:	“High performance liquid chromatography“
IBMX	:	Isobutylmethylxanthin

IC ₅₀	:	“Inhibitory concentration”; Substanzkonzentration, bei der im Vergleich zur Kontrolle noch 50% der Zellen vital sind bzw. noch eine Enzymaktivität von 50% vorliegt
ICER	:	“Inducible cAMP Early Repressor“
IFN- γ	:	Interferon Gamma
Ig	:	Immunoglobulin
IGF	:	“Insulin-like growth factor“
IL	:	Interleukin
Ki-Ras	:	Kirsten Rat Sarcoma (GTPase und Onkogen)
kDa	:	Kilodalton
K _M	:	Michaelis-Menten-Konstante
LPDE4	:	“low affinity Rolipram-binding-PDE4“
LXFA	:	Lung Xenograft Fiebig Adenocarcinom
LXFL 529	:	Lung Xenograft Fiebig large cell
LXFS 650	:	Lung Xenograft Fiebig small cell
MAP-Kinase	:	Mitogen-activated protein kinase
mdm2	:	Gegenspieler von p53 (“mouse double minute”)
mg	:	Milligramm
μ g	:	Mikrogramm
μ l	:	Mikroliter
min	:	Minute
ml	:	Milliliter
mM	:	Millimolar
mRNA	:	“messenger RNA“
MyoD	:	Transkriptionsfaktor
μ M	:	Mikromolar
n.b.	:	nicht bestimmt
NGF	:	“nerve growth factor“
nm	:	Nanometer
Nocodazol	:	[5-(Thiophen-2-carbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]- carbamidsäuremethylester
N-Ras	:	Neuroblastoma Rat Sarcoma (GTPase und Onkogen)
PAXF	:	“Pancreas Xenograft Fiebig“
PBS	:	Phosphatpuffer (“phosphate buffered saline“)
PCNA	:	“proliferating cell nuclear antigen“
PCR	:	Polymerase-Kettenreaktion (“Polymerase-chain-reaction“)
PDE	:	3',5'-zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase
PDGF	:	Wachstumsfaktor (“Platelet derived growth factor“)
PGE ₁	:	Prostaglandin E ₁
PKA	:	Proteinkinase A
PKC	:	Proteinkinase C
pmol	:	pikomolar
PMSF	:	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	:	Peroxidase
pRb	:	Retinoblastoma-Protein
p53	:	Tumorsuppressorgen
RI und RII	:	regulatorische Untereinheiten der PKA
Raf-1	:	Kinase des MAP-Kinase-Wegs
Ras	:	G-Protein des MAP-Kinase-Wegs
<i>rb</i>	:	Retinoblastoma-Gen

rpm	:	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RNA	:	Ribonukleinsäure
RT	:	Raumtemperatur
RT-PCR	:	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RXF	:	Renal Xenograft Fiebig
s	:	Sekunde
SDS	:	Natriumdodecylsulfat („Sodiumdodecylsulphate“)
Ser	:	Serin
SH2	:	“Src homology domain 2“
SRB	:	Sulforhodamin B
SRB101	:	Sulforhodamin 101
<i>src</i>	:	Humanes Homolog des Onkogens vom Rous-Sarkoma-Virus
Tab.	:	Tabelle
TBS	:	Tris-Puffer („tris buffered saline“)
TEMED	:	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	:	Threonin
TGF β	:	Wachstumsfaktor („Transforming growth factor β “)
TNF α	:	Tumor-Necrosis Faktor α
TRIS	:	Tris-(hydroxyethyl)aminomethan
Tween 20	:	Polyethylensorbitan-monolaurat
Tyr	:	Tyrosin
UCR1	:	“upstream conserved region 1”
wee1	:	Kinase
% [v/v]	:	Volumenprozent

2. EINLEITUNG

2.1. Krebs

Kaum eine andere Erkrankung wird so sehr gefürchtet wie Krebs. Maligne Tumoren waren schon in frühen Kulturen bekannt, als Todesursache jedoch unbedeutend. Erst mit dem Zurückdrängen anderer Krankheiten und mit zunehmender Lebensdauer stieg die Häufigkeit von Krebs. Heute stellen Tumorerkrankungen in den westlichen Industrienationen nach Herz-Kreislaufproblemen die zweithäufigste Todesursache dar. Jeder 4. Mensch erkrankt an Krebs, jeder 5. stirbt daran.

Abb. 1 zeigt die verschiedenen Stadien der Krebsentstehung: Alle Tumorarten gehen letztlich aus einer einzigen Zelle des entsprechenden Ursprungsgewebes (orange dargestellt in Abb. 1 und Abb. 2) hervor, deren Wachstumskontrolle gestört ist und die als Krebszelle oder neoplastische Zelle bezeichnet wird. Diese können durch Transformation in jedem Gewebe entstehen. Bei Krebszellen ist die Kontrolle des Wachstums gestört, die Zellen teilen sich ohne Rücksicht auf die Bedürfnisse des Gesamtorganismus und führen schließlich zu dessen Tod. In neoplastischen Zellen liegt eine Mutation des genetischen Materials vor, die bei jeder Zellteilung weitergegeben wird. Die veränderte Zelle und ihre Tochterzellen sind zwar äußerlich weiterhin normal, vermehren sich jedoch zu stark, das Gewebe zeigt Hyperplasie (B). Eine weitere mögliche Mutation führt zu weiterer Entartung (rosa). Die Tochterzellen sind nun bezüglich der Form und der Orientierung abnorm (Dysplasie, C). Eine seltene dritte Mutation (lila) führt zu einem prä-invasiven Tumor (D in Abb. 2), der jedoch noch keine Gewebegrenzen durchdringt. Erst weitere Mutationen (blau) führen zu einem malignen Tumor (E).

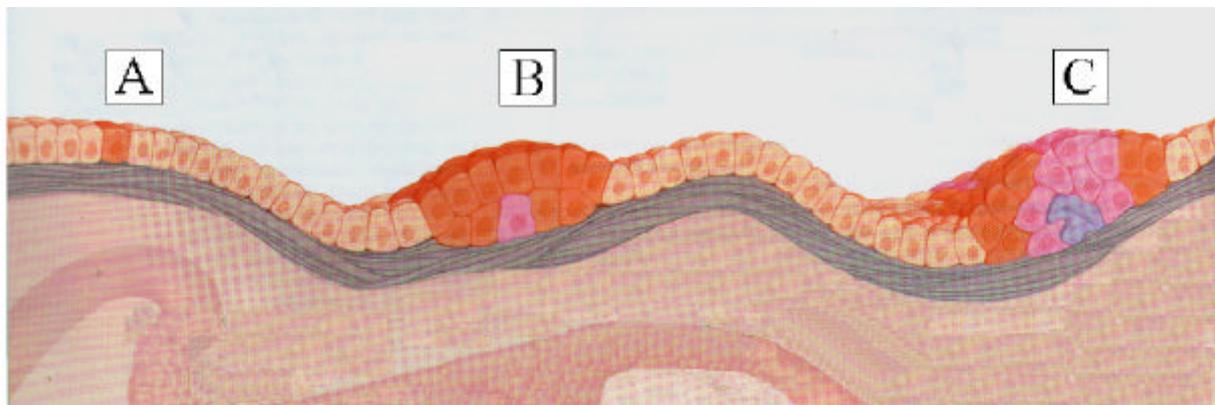


Abb. 1:
Schrittweise Entwicklung eines bösartigen Tumors in einem Epithelgewebe, frühe Stadien [Weinberg, 1999].

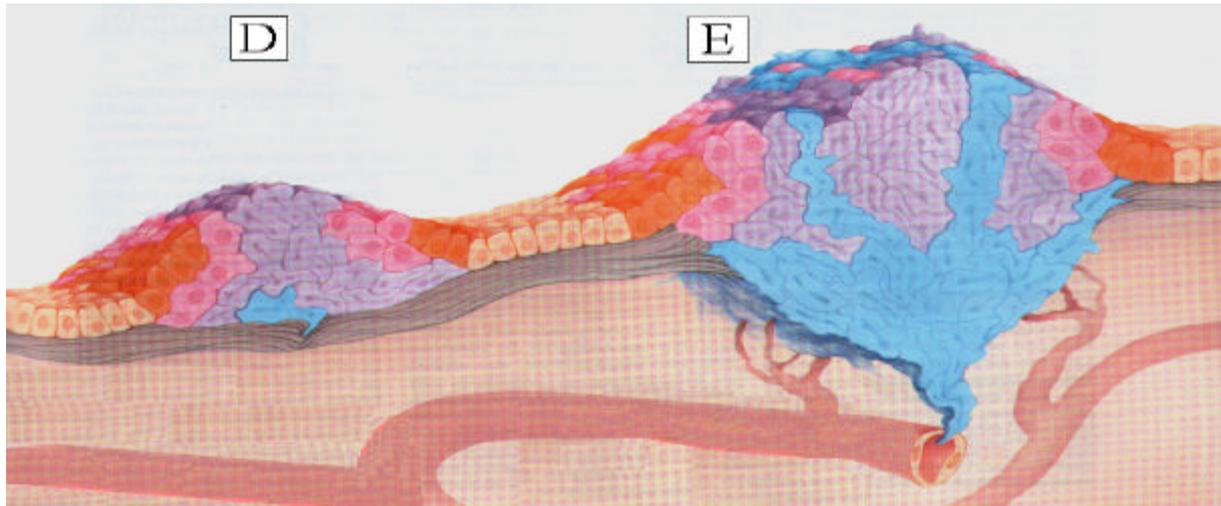


Abb. 2:
Schrittweise Entwicklung eines bösartigen Tumors in einem Epithelgewebe, späte Stadien [Weinberg, 1999].

Die wohl gefährlichste Eigenschaft dieses Tumors ist sein infiltratives Wachstum. Er hält sich nicht an Gewebegrenzen und wächst in andere Organe und vor allem auch Blutgefäße hinein. Damit können neoplastische Zellen mit dem Blut im Körper verteilt werden (E), sich in gesunden Geweben ansiedeln und dort Metastasen ausbilden [Weinberg, 1999].

Der Übergang einer Normalzelle in eine Krebszelle ist ein Mehrstufenprozess, der in Initiation, Promotion und Progression unterteilt wird. Bei der Initiation ereignen sich mehrere irreversible Veränderungen des genetischen Materials innerhalb kurzer Zeit, die an die Tochterzellen weitergegeben werden. Durch Eingriffe in Signalketten wird das Zellwachstum während der Promotion stimuliert, wobei sich initiierte Zellen bevorzugt vermehren. Bei der Progression erfolgt eine Zunahme der Wachstumsautonomie und Malignität des Mikrotumors und Tumors durch weitere Mutationen über einen längeren Zeitraum [Eisenbrand und Metzler, 1994].

Bedeutsam sind vor allem Mutationen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen, da diese verheerende Auswirkungen auf die Integrität des Organismus haben: Protoonkogene fördern das Zellwachstum und ihre Proteine sind häufiger Bestandteil von Signalübertragungswegen (z.B. Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren, Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren). Bei Mutationen entstehen aus Protoonkogenen Onkogene, die ständig aktiv die Proliferation der Zellen anregen. Tumorsuppressorgene regulieren in ihrer natürlichen Funktion die Proliferation negativ. Durch Mutationen geht ihre wichtige Funktion als Wachstumsbremse der Zellen verloren.

Tab. 1 gibt eine Übersicht, in welchen Genen bei verschiedenen Krebsarten häufig Mutationen gefunden werden:

Tabelle 1:

Onkogene und Tumorsuppressorgene, in denen bei verschiedenen Krebsarten häufig Mutationen detektiert werden [Weinberg, 1999].

<u>Tumorsuppressorgene:</u>		
	Normale Funktion	Bei Fehlfunktion verursachte Tumoren
<i>RB</i>	Negative Regulation des Zellzyklus	Retinoblastom, Knochen-, Brust-, Blasenkrebs, kleinzelliges Lungenkarzinom
<i>p53</i>	kann nach DNA-Schädigung den Zellzyklus anhalten	breites Spektrum

<u>Onkogene:</u>		
	Normale Funktion	Bei Fehlfunktion verursachte Tumoren
<i>PDGF</i>	Wachstumsfaktor (<i>Platelet derived growth factor</i>)	Hirntumoren (Gliome)
<i>erb-B</i>	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF)	Hirntumoren (Glioblastome) und Brustkrebs
<i>Ki-ras</i>	G-Protein (GTPase)	Tumoren in Lunge, Eierstöcken, Dickdarm und Bauchspeicheldrüse
<i>N-ras</i>	G-Protein (GTPase)	Leukämien
<i>Bcl-2</i>	verhindert Apoptose	Follikuläres B-Zell-Lymphom
<i>MDM2</i>	Gegenspieler von <i>p53</i>	Bindegewebstumoren (Sarkome) und andere Krebsarten

3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1. Der Zellzyklus

Der eukaryontische Zellzyklus wird in vier unterschiedliche Phasen eingeteilt; G1 (Gap1), S (DNA-Synthese), G2 (Gap 2) und M (Mitose). Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung des Zellzyklus, der im folgenden genauer beschrieben wird. Die Weitergabe der genetischen Information von einer Zellgeneration auf die nächste erfordert die Replikation des gesamten Genoms und die anschließende Aufteilung auf die Tochterzellen.

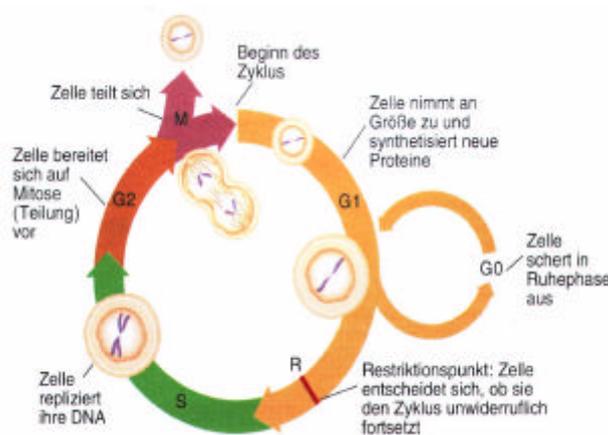


Abb. 3:
Stadien des Zellzyklus [Weinberg, 1999].

Der Zellzyklus beginnt mit der G1-Phase, wo sich die Zellen auf den Prozess der DNA-Replikation vorbereiten [Johnson et al., 1999]. Hier können die Zellen auf extrazelluläre Stimuli reagieren und schreiten im Zellzyklus fort oder treten z.B. beim Entzug von Wachstumsfaktoren in eine Ruhephase ein, die G0-Phase, die typisch für ausdifferenzierte Zellen ist [Pucci et al., 1999]. Bei Tumorgewebe ist im Vergleich zu Normalgewebe meist nicht die Dauer der G1-Phase verkürzt, sondern der Anteil

der Zellen in der G0-Phase verringert [Eisenbrand und Metzler, 1994]. Wenn in der späten G1-Phase ein Schwellenwert für die Zellgröße erreicht und ein Restriktionspunkt passiert wurde, kann die Zelle in die S-Phase eintreten, und die Anwesenheit von Mitogenen hat dann keinen Einfluss mehr auf die Zellzyklus-Progression [Chiarugi et al., 1994]. In der S-Phase findet nun die DNA-Synthese (Replikation) statt [Pucci et al., 1999]. In der auf die S- nachfolgenden G2-Phase kontrolliert die Zelle, ob die DNA komplett und fehlerfrei repliziert wurde, und bereitet sich auf die Mitose vor [Gillett et al., 1998]. Die eigentliche Zellteilung mit der Aufteilung der DNA auf die Tochterzellen findet während der M-Phase statt [Pucci et al., 1999].

In typischen eukaryontischen Zellen dauert die G1-Phase mit ungefähr 12 h am längsten, während die S-Phase 6-8 h, die G2-Phase 3-6 h und die Mitose ca. 30 min in Anspruch nehmen. Die genauen Zeiten hängen jedoch vom Zelltyp und den Wachstumsbedingungen ab [Shackelford et al., 1999].

Ein wichtiger Aspekt des Zellzyklus ist seine Genauigkeit: In gesunden Zellen wird die Zellzyklus-Maschinerie sofort angehalten, wenn die DNA beschädigt oder unvollständig repliziert wurde oder eine Störung der Mitosespindel auftritt.

Mehrere Restriktionspunkte koordinieren die Übergänge zwischen den verschiedenen Zellzyklus-Phasen. Ein Kontrollpunkt kontrolliert den G1/S-Übergang, ein weiterer überwacht, ob die Synthesephase korrekt durchlaufen wurde, bevor die Zellen mit der Mitose beginnen. An einem dritten Restriktionspunkt werden die Ausbildung der Mitosespindel und der Austritt aus der M-Phase kontrolliert. Sobald die Zellen den ersten Restriktionspunkt überschritten haben, der wichtig für die Integrität der Erbinformation ist, reagieren sie nicht mehr auf Wachstumsfaktoren, sind zur Teilung befähigt und verbleiben im Zellzyklus bzw. treten nicht mehr in die G0-Phase ein [Chiarugi et al., 1994]. Ein Ausfall dieser Checkpunkte ist mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Krebsentstehung beteiligt [Murray, 1992]. Bei Bedarf kann an diesen Restriktionspunkten der Zellzyklus angehalten werden und der DNA-Schaden repariert werden. Bei Gelingen wird der Zellzyklus wieder aufgenommen, bei Misslingen wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet [Pucci et al., 1999].

3.1.1. Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs)

Die Regulation von vielen Schritten des Zellzyklus, wie z.B. DNA-Replikation und Mitose, erfolgt häufig durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten regulatorischer Proteine. Schlüsselenzyme hierbei sind Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs). CDKs sind Serin/Threoninkinasen mit kleiner katalytischer Untereinheit von ca. 300 Aminosäuren, die unphosphoryliert und ohne regulatorische Untereinheiten inaktiv ist, da die Bindungsstelle für das Substrat blockiert ist [Morgan, 1996]. In Säugern sind zur Zeit neun verschiedene CDKs bekannt (CDK 1-9), die eine 40-75%ige Homologie in der Aminosäuresequenz zeigen.

Eine teilweise Aktivierung der Kinasen erfolgt durch Bindung von regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen [Lees, 1995]. Bekannt sind zur Zeit mindestens 16 verschiedene Cycline (Tabelle 2), von denen jedes ein bestimmtes Expressionsmuster während des Zellzyklus zeigt [Johnson et al., 1999].

Die Cyclin-Level werden sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch posttranslational geregelt. Der Zeitpunkt der Cyclin-Expression ist also der entscheidende Faktor, der bestimmt, in welcher Phase die konstitutiv exprimierten Cyclin-abhängigen Kinasen aktiv werden (s. Abb. 5). Die Cyclinbindung erhöht die Aktivität der CDKs ca. 40000-fach. Evtl. wird durch die Konformationsänderung in der sogenannten PSTAIRE-Region, dem konservierten Cyclin-bindenden Bereich, ein für die ATP-Bindung günstiger Zustand herbeigeführt.

Die komplette Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung der CDK-Untereinheit durch die CDK-activating-kinase (CAK) an 2 konservierten Stellen, wodurch der Cyclin/CDK-Komplex stabilisiert wird. Die CAK besteht selbst aus einem Cyclin/CDK-Komplex (Cyclin H/CDK7). Die Konzentration von CDK7 bleibt während des Zellzyklus konstant [Lees, 1995].

Tabelle 2:

Cycline von Säugerzellen; ?: Funktion unbekannt [Johnson et al., 1999].

Cyclin	zugehörige Kinase	Funktion
A	CDK1 (cdc2), CDK2	S-Phase-Eintritt und -Übergang
B1, B2	CDK1	G2-Austritt, Mitose
C	CDK8	Transkriptionelle Regulation, G0/S-Übergang
D1, D2, D3	CDK4, CDK6	G0/S-Übergang
E	CDK2	G1/S-Übergang
F	?	G2/M-Übergang
G1, G2	CDK5	Reaktion auf DNA-Schädigung
H	CDK7	Aktivierung von CDKs, transkriptionelle Regulation, DNA-Reparatur
I	?	?
K	?	Aktivierung von CDKs, transkriptionelle Regulation
T1, T2	CDK9	Transkriptionelle Regulation

Substrate der Cyclin-abhängigen Kinasen sind in der G1/S-Phase z.B. das Tumorsuppressor-Protein pRb bzw. der Transkriptionsfaktor E2F (s. Abb. 4). pRB spielt eine wichtige Rolle für das korrekte Durchlaufen des Zellzyklus. Zu Beginn der G1-Phase liegt es hypophosphoryliert vor. In dieser aktiven Form vermag pRB Transkriptionsfaktoren wie E2F zu binden und dadurch ihre Funktion zu hemmen, so dass keine Transkription bestimmter Gene, die für die Zellzyklus-Progression verantwortlich sind, zustande kommt [Johnson et al., 1999].

Die G2-Phase enthält ebenfalls einen Kontrollpunkt, an dem auf DNA-Schäden reagiert werden kann. Dort erfolgt eine Verzögerung, um den Schaden zu reparieren, bevor die Zelle in die

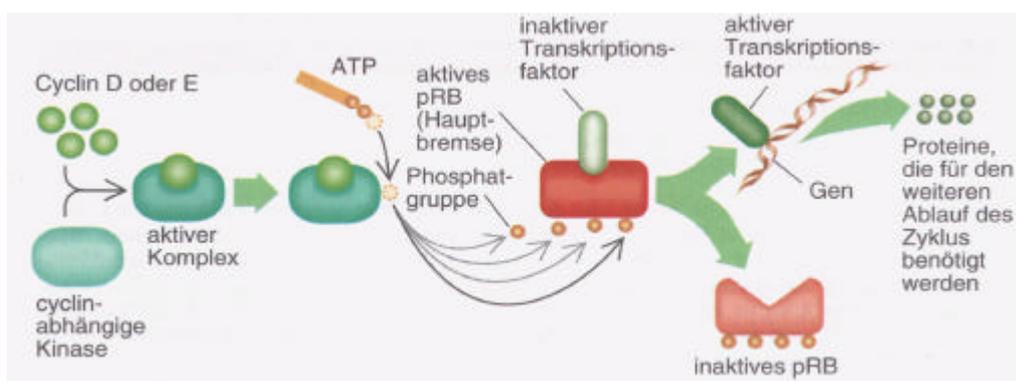


Abb. 4:

Schematische Skizze der Funktion von pRB und des Cyclin/CDK-Komplexes; pRB: Protein des Retinoblastomgens [Weinberg, 1999].

Mitose eintritt. Die Mitose wird durch CDK1 in Verbindung mit den Cyclinen A, B1 und B2 reguliert. In der G2/M-Phase stellen Proteine, die das Cytoskelett organisieren, Substrate für die Cyclin-abhängigen Kinasen dar. Zu nennen sind z.B. die Lamine oder Myosin sowie Histon H1, außerdem möglicherweise Komponenten der Mitosespindel [Johnson et al., 1999].

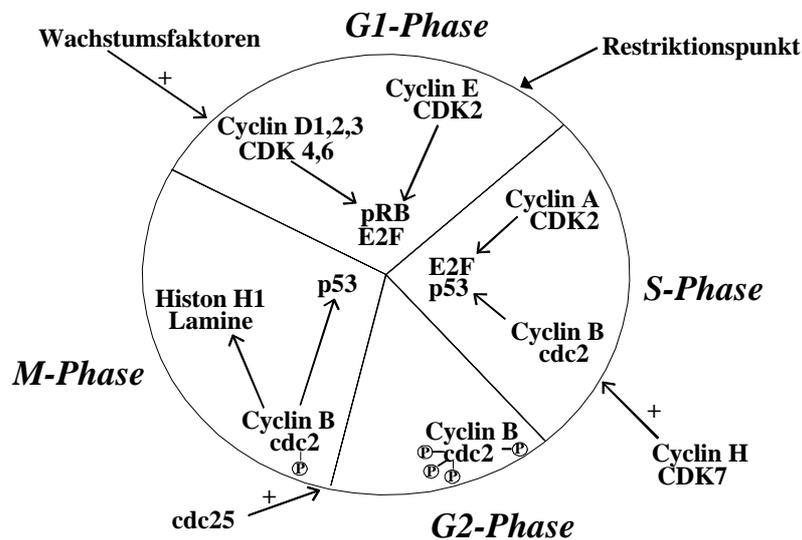


Abb. 5
Cyclin/CDK-Assoziation während des Zellzyklus [Krauss, 1997].

Störungen der Funktion der CDKs können schwerwiegende Fehlregulationen der Zelle verursachen und so zur Krebsentstehung beitragen [Lania et al., 1999; Morgan, 1995].

Abb. 5 zeigt sowohl die Zeitpunkte der Cyclinexpression im Zellzyklus als auch die zugehörigen CDKs. Weiterhin werden die Substrate der Kinasen sowie die Eingriffspunkte positiver Regulatoren dargestellt.

Die Aktivität des Cyclin/CDK-Komplexes kann auf verschiedene Arten gehemmt werden:

- Phosphorylierung der CDK-Untereinheit an inhibitorischen Stellen;
- Bindung von Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKIs) [Garrett et al., 1999].

Die Phosphorylierung kann z.B. durch die Kinase wee1 an den konservierten Aminosäureresten Tyr 15 oder Thr 14 erfolgen [Russell et al., 1987; Igarashi et al., 1991]. Diese hemmende Phosphorylierung behindert die ATP-Bindung nicht, wirkt aber sterisch ungünstig auf das Substrat. Die Dephosphorylierung und somit die Aktivierung erfolgt durch Phosphatasen der cdc25-Familie. Die gegenläufigen Eigenschaften von wee1 und cdc25C bestimmen den Zeitpunkt der Mitose, da durch die inhibitorische Phosphorylierung ein großer Pool an inaktiven Cyclin/CDK-Komplexen angehäuft werden kann, die durch cdc25 schnell aktiviert werden können [Russell et al., 1987; Galaktionov et al., 1991; Chiarugi et al., 1994].

3.1.2. Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKIs)

3.1.2.1. Inhibitoren der INK4-Familie

Die INK4-Familie enthält p16^{INK4} (auch Mts, CDK_n2, CDK4i genannt) sowie drei verwandte Polypeptide, p15^{INK4B} (Mts2), p18^{INK4C} (Ink6A) und p19^{INK4D} (Ink6B, ARF). Alle Inhibitoren der Familie zeigen eine große Spezifität für die Bindung an CDK4 und CDK6, welche ihrerseits nur an D-Typ-Cycline (G1-Cycline) binden (s. Abb. 5). Die Zugabe von p16 zu dem Komplex aus Cyclin D/CDK 4 führt zur Dissoziation der Verbindung, außerdem verhindert die Bindung von p16 an monomere CDK4 die Verknüpfung mit Cyclin D [Morgan, 1996]. Diese Inhibitorfamilie ist also fähig, sowohl an monomere CDKs als auch an den CDK/Cyclin-Komplex zu binden [Harper, 1997]. Alle Substrate der INK4-Familie sind nochmals in Abb. 6 dargestellt.

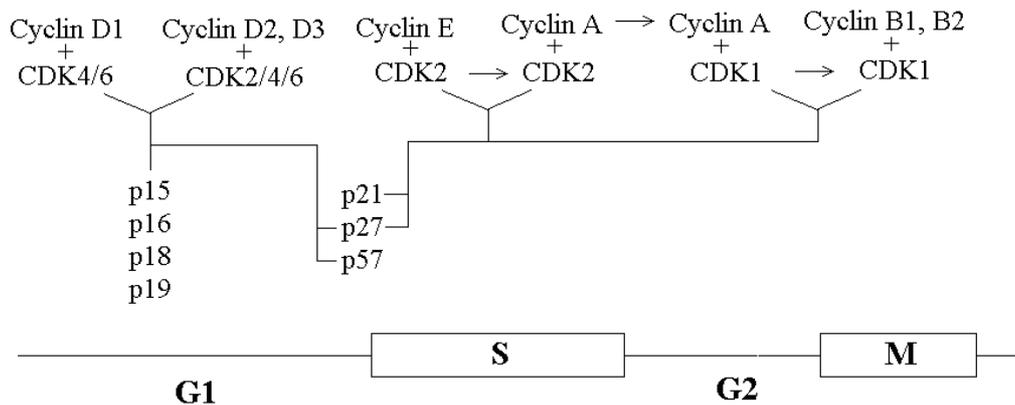


Abb. 6: Substrate der verschiedenen CKIs sowie Zuordnung zu den verschiedenen Zellzyklus-Phasen [Gillett et al., 1998].

INK4-Homologe hemmen spezifisch die Aktivität von CDK4 und CDK6, von denen angenommen wird, dass sie für die Inaktivierung (=Phosphorylierung) des Retinoblastom-Proteins verantwortlich sind. Phosphorylierung, z.B. durch CDK4/Cyclin D, CDK6/Cyclin D oder CDK2/Cyclin E, inaktiviert pRb, der Transkriptionsfaktor E2F wird freigesetzt und die Transkription beginnt. Eine unkontrollierte Phosphorylierung von pRb kann durch einen Verlust von p16 zustande kommen. In diesem Fall kommt es zum Eintritt in den Zellzyklus. Die Konzentration von p16 kann ihrerseits durch pRB moduliert werden [Lees, 1995].

Das p16-Gen ist in einigen Krebsarten mutiert und spielt evtl. die Rolle eines Tumorsuppressorgens. Auch p15 ist als Tumorsuppressor bekannt, während es bei p18 und p19 keine Hinweise auf eine derartige Funktion gibt [Gillett et al., 1998].

3.1.2.2. kip/cip- oder p21-Familie

Zu dieser Gruppe der Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren gehören p21^{cip1} (oder auch Cip1, Pic1, Sdi1 oder waf1 genannt), p27^{kip1} (Kip1, Ick, Pic2) und p57^{kip2}.

Alle Familienmitglieder besitzen im Amino-Terminus eine konservierte Region, die wichtig für die Wechselwirkung und somit die Hemmung der Cyclin/CDK-Komplexe zu sein scheint.

Gehemmt werden v.a. Cyclin-CDK-Komplexe der G1-Phase (CyclinD/CDK4+6; Cyclin E/CDK2), in geringerem Maße auch Cyclin B/cdc2-Komplexe. Die Mitglieder dieser Familie werden als universelle Inhibitoren bezeichnet, da sie nicht so spezifisch sind wie die Mitglieder der INK4-Familie. In Abb. 6 sind nochmals die Bindungspartner beider Inhibitorfamilien dargestellt, darunter sind die entsprechenden Zellzyklus-Phasen aufgezeigt. Im Gegensatz zur INK4-Familie zeigen die Inhibitoren der p21^{cip1}-Familie eine höhere Affinität zum Cyclin/CDK-Komplex als zu monomeren CDKs [Morgan, 1996].

Bei der Bindung kontaktiert p21^{cip1} sowohl die Cyclin- als auch die Kinase-Untereinheit und verhindert so die ATP-Bindung [Harper, 1997]. Die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Komplexe durch die CAK kann verhindert werden, wobei dies aber nicht der Hauptweg für die Hemmung zu sein scheint. Diese kommt durch die Bindung der CKIs an Cyclin/CDK-Komplexe zustande. Diese Bindung erfolgt auch, wenn die Komplexe schon durch CAK phosphoryliert wurden [Morgan, 1996].

3.1.2.2.1. **P21^{CIP1}**

p21^{cip1} stellt ein Target für die transkriptionelle Aktivierung durch das p53-Genprodukt dar, welches durch Bindung an den Promotor von p21^{cip1} dessen Transkription aktiviert [Krauss, 1997]. Allerdings unterliegt die basale Transkription von p21^{cip1} nicht der Kontrolle durch p53, und es existieren auch p53-unabhängige Wege zur Induktion der p21^{cip1}-Expression [Shackelford et al., 1999; Lieberman et al., 1995]. So wird p21^{cip1} z.B. durch die Expression von MyoD induziert, einem Transkriptionsfaktor, der Muskeldifferenzierung auslöst, aber auch durch Kontaktinhibition oder den Entzug von Wachstumsfaktoren. Die höchsten Spiegel von p21^{cip1} findet man in der Milz und der Thymusdrüse [Harper, 1997].

Das Protein enthält zwei unabhängige Regionen: Einen Bereich am Amino-Terminus, der für die Hemmung zuständig ist, und der auch in p27^{kip1} und p57^{kip2} vorgefunden wird, und eine Domäne im Carboxy-Terminus, die die DNA-Replikation hemmen kann. Dies geschieht durch die Bildung eines stabilen Komplexes mit dem DNA-Polymerase δ „processivity factor“ (proliferating cell nuclear antigen, PCNA). p21^{cip1} ist das einzige Mitglied dieser Familie, das zu dieser Bindung befähigt ist.

In normalen proliferierenden Zellen ist die Hauptmenge von p21^{cip1} an den Cyclin/CDK-Komplex gebunden, ohne dass eine Hemmung auftritt. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass

p21^{cip1} unter normalen Umständen keine Hemmwirkung entfaltet, sondern für die Zellzyklusprogression wichtig ist. Eine Hemmung kommt erst zustande, dass mehr als ein Molekül p21^{cip1} an den Komplex bindet („multiple molecule hypothesis“). Dies erklärt, wie geringe Veränderungen im p21^{cip1}-Level die CDK-Aktivität dramatisch verändern können [Morgan, 1996].

p21^{cip1} kann durch verschiedenste Agenzien wie beispielsweise den Topoisomerase-Hemmstoff Etoposid induziert werden [Arriola et al., 1999]. Eine Induktion erfolgt außerdem durch Resveratrol, einem Polyphenol, das im Rotwein vorkommt [Hsieh et al., 1999] oder durch die immunsuppressive Verbindung Cyclosporin über Induktion von TGF- β [Khanna et al., 1999]. Weiterhin wird p21^{cip1} durch den Protein-Phosphatase-Inhibitor Okadasäure über p53 [Milczarek et al., 1999] induziert, durch das Umweltgift Methylquecksilber [Ou et al., 1999], oxidativen Stress (p53-unabhängiger Weg) [Russo et al., 1995] sowie durch EGF [Reddy et al., 1999].

p21^{cip1}-defiziente (-/-) Mäuse sind größer als p21^{cip1}-Wildtyp-Tiere. Dies kommt durch eine erhöhte Zellzahl zustande, die Wachstumsrate ohne p21^{cip1} ist höher. Außerdem sind die weiblichen Tiere unfruchtbar. Eine erhöhte Rate von bösartigen Tumoren wird jedoch nicht beobachtet [Harper, 1997].

3.1.2.2.2. P27^{KIP1}

Die Expression des 27 kDa großen Phosphoproteins wird durch den Transforming-growth-factor β (TGF- β) induziert [Morgan, 1996]. Ein hoher p27^{kip1}-Spiegel wird in differenzierenden Zellen beobachtet [Alessandrini et al., 1997]. Bis heute ist jedoch unklar, ob die CKI-Expression die Differenzierung verursacht oder die Folge davon ist [Harper, 1997]. Auch ruhende Zellen weisen einen erhöhten p27^{kip1}-Spiegel auf, bei proliferierenden Zellen ist die Menge niedriger [Morgan, 1996].

Während des Zellzyklus wird eine Oszillation der Proteinmenge beobachtet mit einem Maximum in der G1-Phase und geringeren Konzentrationen in S und G2/M [Morgan, 1996].

Interessanterweise bleibt der Level der mRNA gleich. Dieser Unterschied zwischen konstanter mRNA-Menge, aber verschiedenen Proteinmengen in verschiedenen Zellzyklus-Phasen lässt sich durch eine verlängerte Halbwertszeit des p27^{kip1}-Proteins oder eine erhöhte Translation der p27^{kip1}-mRNA erklären [Harper, 1997].

Der Abbau von p27^{kip1} verläuft über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg. Dabei erfolgt eine kovalente Bindung von Ubiquitin an das Target-Protein. Dieses Addukt wird von den Proteasomen, multimeren Proteinkomplexen, erkannt und abgebaut, wobei das Ubiquitin wiederverwendet wird. Ruhende Zellen zeigen eine wesentlich geringere Ubiquitinierungsaktivität und damit einen höheren p27^{kip1}-Spiegel. Diese spezifische Proteolyse spielt eventuell eine Rolle bei der Regulation der Cyclin/CDK-Komplexe durch p27^{kip1}. Wichtig

für den Abbau von p27^{kip1} scheint auch der Phosphorylierungsstatus zu sein [Alessandrini et al., 1997]. Weiterhin kann p27^{kip1} durch Angriff viraler Onkoproteine (z.B. adenovirales E1A, humanes Papillomavirus E7) vom Cyclin/CDK-Komplex (Cyclin D/CDK4+6, Cyclin E/CDK2) abgelöst werden und verliert so seine hemmende Wirkung [Alessandrini et al., 1997].

Im Gegensatz zu p21^{cip1} erfolgt keine Wechselwirkung mit PCNA [Morgan, 1996].

p27^{kip1} kann als Tumorsuppressorgen betrachtet werden; so entwickeln p27^{kip1}-defiziente (-/-) Mäuse zu 100% Tumoren. Im Gegensatz zu traditionellen Tumorsuppressorgen findet man jedoch kaum Veränderungen wie z.B. Mutationen oder Deletionen im p27^{kip1}-Gen in Tumoren. Die Abwesenheit von p27^{kip1}-Protein in Tumorgewebe (z.B. in großzelligen Lungenkarzinomen, Brustkrebs und kolorektalen Tumoren) ist allerdings gleichbedeutend mit einer schlechten Prognose. Auch hier kann ein erhöhter Abbau des Phosphoproteins ein Mechanismus der Elimination sein [Alessandrini et al., 1997].

Eine Induktion von p27^{kip1} kann durch cAMP und negative Regulatoren des Zellzyklus erfolgen [Lloyd et al., 1999]. Auch durch Serumentzug [Loubat et al., 1999], Kontaktinhibition und N-Cadherin wird p27^{kip1} induziert [Levenberg et al., 1999]. Eine Induktion erfolgt außerdem bei Behandlung von Zellen mit Tamoxifen, Lovastatin und Rapamycin [Alessandrini et al., 1997].

Wahrscheinlich spielt jede Gruppe der Inhibitoren eine spezifische Rolle im Zellzyklus. Erst durch das Zusammenspiel der verschiedenen Wege kann auf Signale optimal reagiert werden [Harper, 1997].

3.2. Der cAMP-Signalweg

Extrazelluläre Signale wie Hormone und Neurotransmitter werden von Membranrezeptoren registriert und über Kaskaden gekoppelter Reaktionen ins Zellinnere übertragen. Die Zelle bedient sich zur Weiterleitung von Signalen zweier Mechanismen: Die Signalübertragung kann durch Protein-Protein-Wechselwirkung (z.B. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen) vermittelt werden oder mit Hilfe niedermolekularer Botenstoffe, die auch „second messenger“ genannt werden. Diese werden im Zuge der Signalübertragung in spezifischen enzymatischen Reaktionen gebildet oder freigesetzt und dienen als Effektoren, mit denen die Aktivität nachgeschalteter Proteine reguliert werden kann. Die second messenger sind Signalmoleküle und erreichen ihr Ziel vorwiegend auf dem Weg der Diffusion. Eine enge räumliche Zuordnung der verschiedenen Komponenten der Signalübertragung ist aus diesem Grund nicht unbedingt nötig.

Die wichtigsten intrazellulären Botenstoffe sind Ca²⁺, Inositol-Phosphate, cGMP und cAMP, die einen hydrophilen Charakter besitzen und aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit vorwiegend cytosolisch lokalisiert sind. Als hydrophobe und deshalb membranassoziierte

second messenger sind vor allem Diacylglycerol und Phosphatidyl-Inositol-Phosphate zu nennen. Die besondere Eignung der second messenger für Signalübertragungs-Prozesse besteht vor allem in der Möglichkeit der raschen Erzeugung und des Abbaus, ihrer spezifischen Freisetzung aus Speicherorganellen und der ortsspezifischen Produktion oder Inaktivierung. Damit ist es der Zelle möglich, zeitlich und örtlich begrenzte Signale zu generieren.

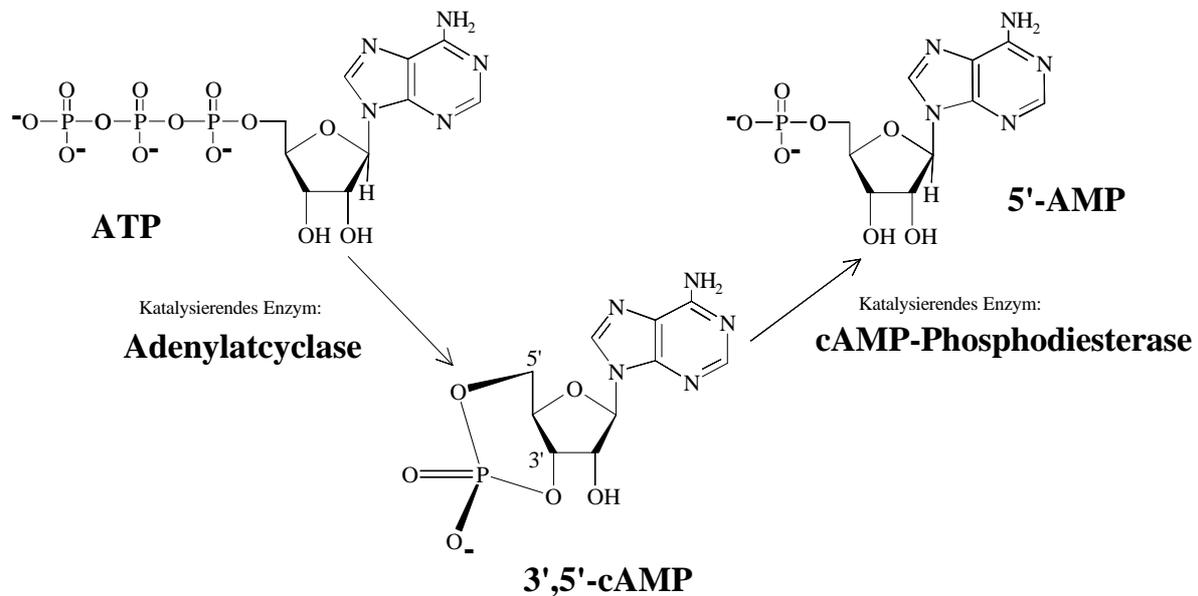


Abb. 7:
Bildung und Abbau von cAMP.

Das 3',5'-cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) ist bereits seit 1957 bekannt [Sutherland und Rall, 1957]. cAMP stellt einen zentralen intrazellulären Botenstoff dar. Wie in Abb. 7 gezeigt, wird es durch die Adenylatcyclase gebildet und durch Phosphodiesterasen abgebaut.

Abb. 8 und 9 zeigen den Verlauf des cAMP-Weges: Der Rezeptor des cAMP-Weges ist ein G-Protein-gekoppelter Transmembranrezeptor mit 7 Sequenzabschnitten, die die Zellmembran durchspannen („7-Helix-Transmembran“- oder „Serpentin“-Rezeptor). Auf der Außenseite kann ein Ligand an die extrazellulären Schleifen des Rezeptors binden. Diese Bindungsstellen sind abhängig von Struktur und Größe des zu bindenden Partners. Der Rezeptor im Grundzustand, d.h. ohne gebundenen Liganden, ist in Abb. 8 dargestellt. Nach Anlagerung eines Liganden wie z.B. eines Hormons oder Neurotransmitters wird der Rezeptor aktiviert und das nachgeschaltete heterotrimere G-Protein bindet an den aktivierten Rezeptor. Je nach Funktion der α -Untereinheit werden G-Proteine in 4 Gruppen eingeteilt: G_s , G_i , G_q und G_{12} [Gilman, 1995]. Die G_s - α -Untereinheit wirkt stimulierend, die G_i -Gruppe hemmend auf die Adenylatcyclase, die G_q -Untereinheit stimulierend auf die Phospholipase C_β . Die Funktion der α -Untereinheit von G_{12} -Proteinen ist noch nicht genau bekannt. Durch die Bindung des aktivierten Rezeptors wird an das G-Protein gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht.

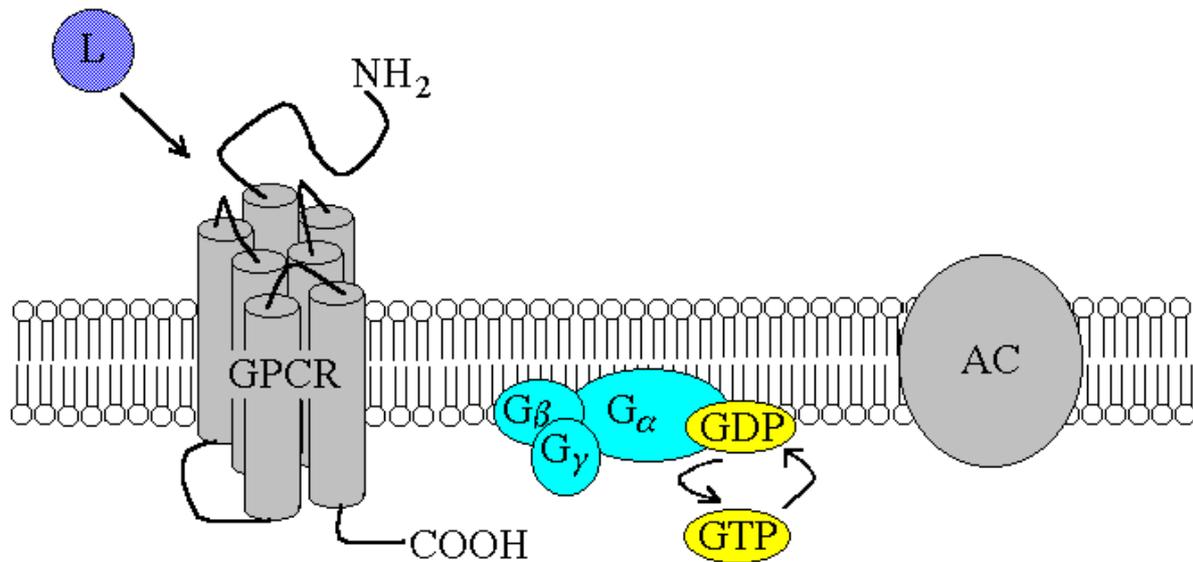


Abb. 8:
Signalübertragung entlang des cAMP-Weges. Die Adenylatcyclase (AC) und das G-Protein mit den Untereinheiten α , β und γ befinden sich noch im inaktiven Grundzustand, da der Ligand (L) noch nicht an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor („G-Protein coupled receptor“, GPCR) gebunden hat.

Bei GTP-Bindung wird das G-Protein aktiviert. Nur in der aktiven Form kann das Signal an nachgeschaltete Effektoren weitergegeben werden. Die GTP-Bindung hat zwei Konsequenzen: Zum einen dissoziieren die β - und die γ -Untereinheiten des G-Proteins, die gemeinsam einen fest verbundenen Komplex bilden, von der α -Untereinheit ab; zum anderen wird die Bindung des G-Proteins zum aktivierten Rezeptor gelöst. Die freie α -Untereinheit, die die Bindungsstelle für GTP trägt, stellt die aktive Form des heterotrimeren G-Proteins dar und trägt das Signal weiter. Der aus dem Komplex entlassene aktivierte Rezeptor kann seinerseits noch weitere bislang inaktive G-Proteine aktivieren, und es kommt so zu einer Amplifikation des Signals. Die GTP-gebundene α -Untereinheit des stimulatorischen G_s -Proteins aktiviert nun das nachgeschaltete Effektormolekül, die Adenylatcyclase. Dieser Teil der cAMP-Signalübertragung ist in Abb. 9 dargestellt [Krauss, 1997]. Die Termination der Signalübertragung kann auf dieser Stufe durch Hydrolyse von GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit des G-Proteins erfolgen. In der inaktiven GDP-gebundenen Form hat die α -Untereinheit eine hohe Affinität zum $\beta\gamma$ -Komplex und assoziiert mit diesem, wodurch das G-Protein wieder in seinen heterotrimeren Grundzustand überführt wird. G-Proteine üben also eine Schalterfunktion aus, die auf einem zyklischen unidirekten Übergang zwischen einer aktiven GTP-gebundenen und einer inaktiven GDP-gebundenen Form durch eine intrinsische GTPase-Aktivität beruht.

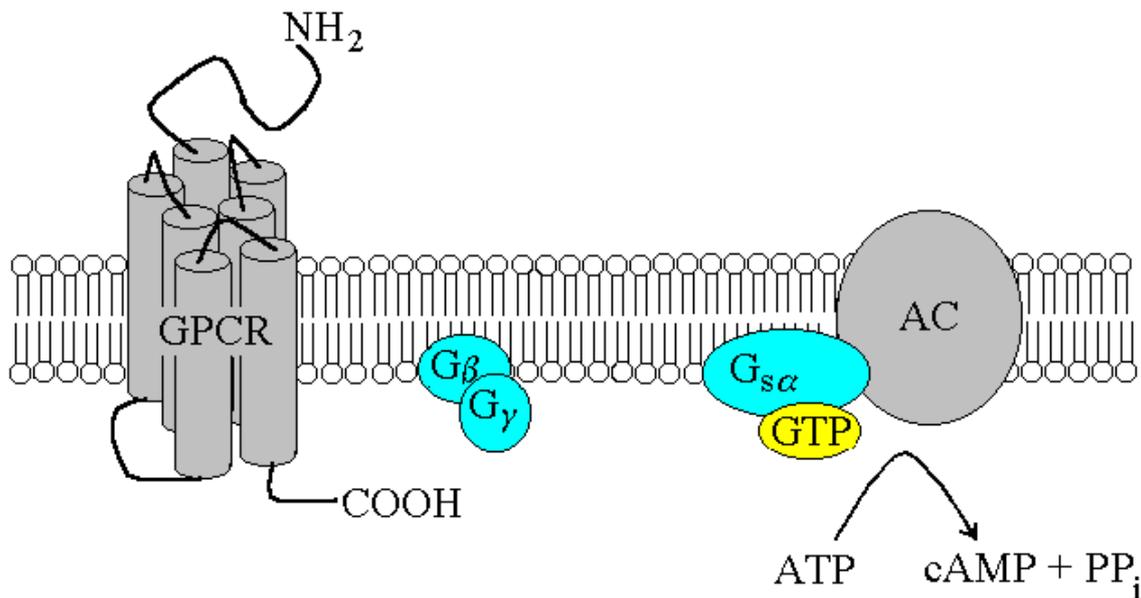


Abb. 9:
Signalübertragung entlang des cAMP-Weges. Nach Bindung eines Liganden katalysiert der Komplex aus Adenylatcyclase (AC) und GTP-gebundener α -Untereinheiten eines stimulatorischen G-Proteins (G_s) die Bildung von cAMP aus ATP.

Adenylatcyclasen sind große Transmembranproteine mit einer komplexen Transmembrantopologie. Außer durch die freie, GTP-gebundene α -Untereinheit kann das Enzym auch durch Calcium/Calmodulin sowie das in Abb. 10 dargestellte Diterpenoid Forskolin aus der in Indien beheimateten Pflanze *Coleus forskolii* aktiviert werden [Römpf Chemie Lexikon]. Eine Hemmung kommt z.B. durch inhibitorische G_i -Proteine zustande. Adenylatcyclasen stellen einen Koizidenzdetektor dar, an dem verschiedene Signale zusammenlaufen.

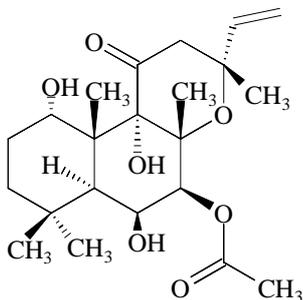


Abb. 10:
Struktur von Forskolin.

Bei Aktivierung generiert die Adenylatcyclase aus ATP den second messenger 3',5'-cyclisches Adenosin-Monophosphat, cAMP [Cann et al., 1998]. Der weitere Verlauf der cAMP-Signalübertragung ist in Abb. 11 schematisch skizziert: cAMP aktiviert nun seinerseits die im inaktiven Zustand als Tetramer aus je 2 katalytischen und regulatorischen Untereinheiten vorliegende cAMP-abhängige Proteinkinase A

(PKA). Die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten führt zur Dissoziation in ein Dimer der regulatorischen Untereinheiten und in zwei monomere katalytische Untereinheiten, die in den Kern transloziert und dort nun katalytisch aktiv werden, indem sie

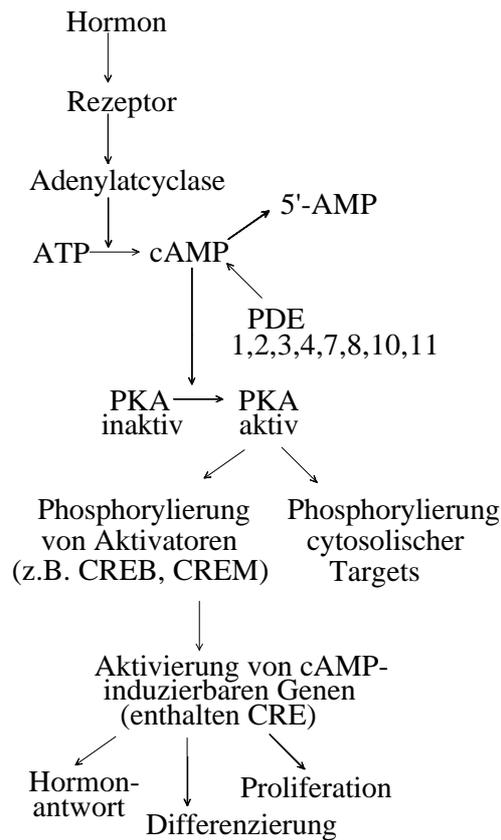


Abb. 11:
Weiterer Verlauf des cAMP-Weges
[Della Fazia et al., 1997, modifiziert].

Substrate phosphorylieren können. Die Regulation der PKA kann über verschiedene Wege erfolgen, so z.B. durch Autoinhibition, da die regulatorische Untereinheit Autophosphorylierungsstellen enthält. Die cAMP-Konzentration ist die Regelgröße, die die Aktivität der PKA kontrolliert. Durch einen negativen Feedback-Effekt kann der G-Proteingekoppelte Rezeptor durch PKA phosphoryliert und desensitiviert werden, wodurch die Signalübertragung abgeschwächt wird.

Eine weitere negative Regulation kann durch Phosphorylierung einer Phosphodiesterase (PDE) durch die PKA erfolgen, dadurch wird die PDE aktiviert und hydrolysiert mehr cAMP. Durch diesen negativen Feedback-Mechanismus kann die PKA ihre eigene Steady-State-Aktivität kontrollieren [Krauss, 1997].

Wichtige Substrate der PKA sind z.B. Mitglieder der CREB- (cAMP-responsive element binding protein) oder ATF2- (Activator transcription factor) Familie. Diese Transkriptionsfaktoren, die als Homo- oder Heterodimere agieren, benötigen

für ihre Aktivierung eine PKA-vermittelte Phosphorylierung an Ser133 [Monaco et al., 1997; Sassone-Corsi, 1998; Montminy, 1997]. Nach der Phosphorylierung assoziieren die CREB-Proteine mit dem CREB-binding-protein, CPB. Dieser Komplex ist schließlich in der Lage, mit dem basalen Transkriptionsapparat zu wechselwirken und die Transkription von Genen, die in ihrem Promotorbereich ein cAMP-responsive element (CRE) tragen, zu veranlassen [Andrisani, 1999]. Weitere Mitglieder der CREB-Familie sind CREM (cAMP responsive element modulator protein) und ICER (Inducible cAMP Early Repressor). Während CREM als Transkriptionsaktivator wirkt und zur Aktivierung die PKA-vermittelte Phosphorylierung benötigt, stellt das Protein des early-response-Gens ICER einen Repressor der Transkription dar. ICER wird durch einen alternativen Promotor am 3'-Ende aus dem CREM-Gen generiert. Das im Vergleich zu CREM stark verkürzte Produkt besteht aus 120 Aminosäuren, enthält nur die DNA-Bindungsdomäne und stellt mit 13,4 kDa einen der kleinsten bekannten Transkriptionsfaktoren dar. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der CREB-Familie ist ICER durch cAMP induzierbar und wird nicht durch PKA phosphoryliert, so dass das Maß für die Aktivität nicht der Phosphorylierungsstatus, sondern die intrazelluläre cAMP-Konzentration ist [Sassone-Corsi, 1998; Montminy, 1997].

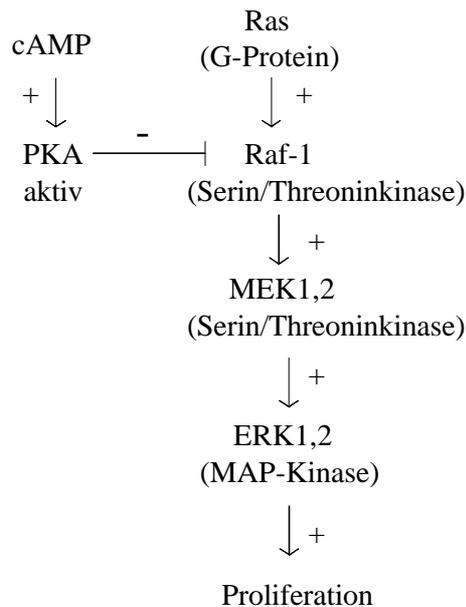


Abb. 12:
Cross-Talk zwischen Map-Kinase-Weg
und cAMP-Signalübertragung.

Ein weiteres wichtiges Substrat der PKA ist die Raf-1-Kinase der Ras/MAP-Kinase-Kaskade (Abb. 12): Dieser Signalweg ist vor allem für die Zellteilung und -differenzierung von Bedeutung.

Die Weiterleitung von externen Signalen von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. EGF, IGF und NGF und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. c-Src, aber auch von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erfolgt über G-Proteine der Ras-Superfamilie. Zur Weitergabe des Signals werden hier keine second messenger benutzt, sondern die Signalübertragung erfolgt durch direkte Wechselwirkung von Proteinen bzw. Phosphorylierungskaskaden [Malarkey et al., 1995; Burgering et al., 1995]. Die PKA-vermittelte Phosphorylierung der Serin-Threonin-Proteinkinase Raf-1 kann die MAP-Kinase-Signalübertragung hemmen. Auf diese Weise

kommt es durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels zu einem „Cross-Talk“ zwischen den beiden Signalwegen [Jordan et al., 1998].

Von vielen Bestandteilen des cAMP-Wegs existiert nicht nur eine Form, sondern eine Vielzahl von Isoformen. So sind bislang 9 verschiedene Isoformen der Adenylatcyclase, ungefähr 50 verschiedene Phosphodiesterasen und multiple Formen der katalytischen und regulatorischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) charakterisiert. Von vielen dieser Komponenten ist die Funktion, ihre Regulation und intrazelluläre Verteilung noch unbekannt, allerdings scheint die große Diversität wichtig für den Ablauf der Signalübertragung zu sein, da sie das „Maßschneidern“ von Signal-Antworten durch zeitliche und örtliche Kontrolle und den Cross-Talk mit anderen Signalwegen erlaubt.

Durch die große Diversität entsteht die Möglichkeit der Kompartimentierung der cAMP-Signalübertragung, d.h. der Zuordnung von bestimmten Komponenten des Signalwegs an diskrete Orte in der Zelle. Houslay et al. zeichneten 1997 die „Geschichte“ vom kompartimentierten cAMP als Cartoon, die in Abb. 13 wiedergegeben ist.

Der Lokalisation der verschiedenen Komponenten des Signalwegs kommt eine wichtige Rolle für die Funktion der Zelle zu. So findet man die Adenylatcyclase in diskreten Stellen der Zellmembran, und unterschiedliche Subtypen der regulatorischen Untereinheiten der PKA kommen ausschließlich im Cytosol (RI) oder im Partikular (RII) durch Wechselwirkungen mit A-Kinase-Anchoring-Proteins (AKAPs) vor. Auch verschiedene PDE-Isoformen besitzen

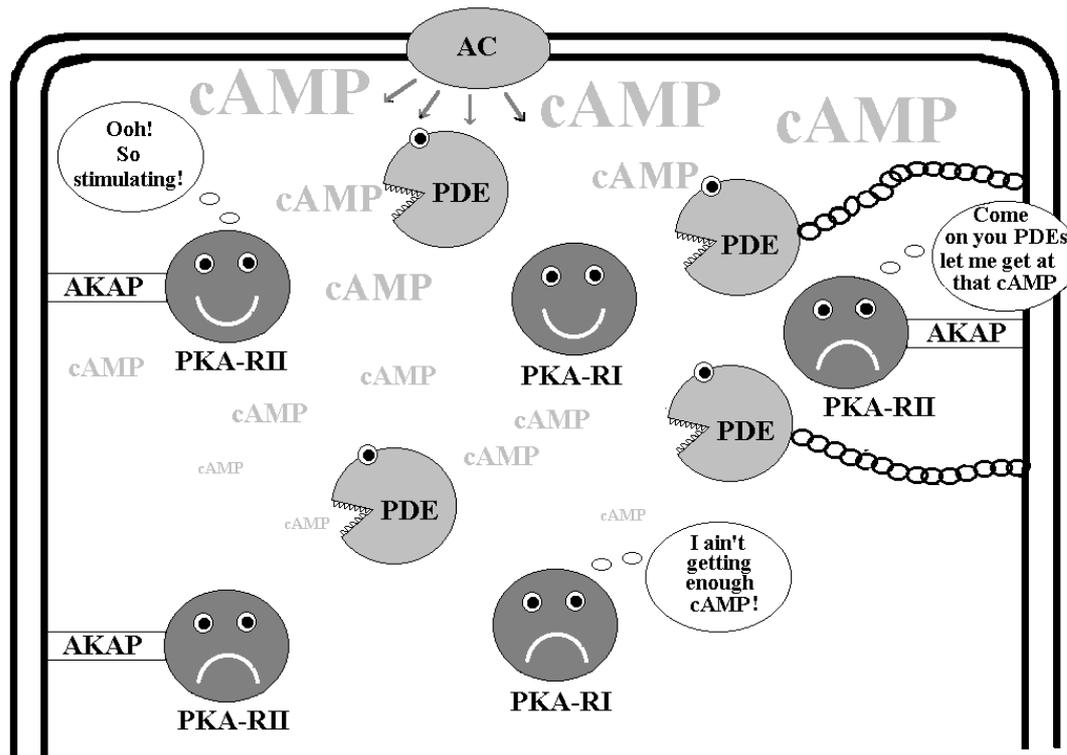


Abb. 13:

Geschichte vom kompartimentierten cAMP. PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase A, AKAP: PKA-verankernde Proteine, RI und RII: unterschiedliche regulatorische Untereinheiten der PKA [Houslay & Bolger, 1997].

unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. Dieses Targeting hat ebenfalls funktionale Konsequenzen für die zeitliche und örtliche Integration der Signale und erlaubt eine Feinregulation. So können nicht immer alle Formen der PKA durch das entstehende cAMP aktiviert werden, da sie möglicherweise in der Nähe von PDEs lokalisiert sind, oder die örtliche cAMP-Konzentration zu gering ist, so dass der Schwellenwert zur Aktivierung nicht erreicht wird.

Bezüglich des basalen Status des cAMP-Wegs existieren zwei Extreme:

Im ersten Zelltyp wie z.B. Adipozyten ist die basale Aktivität der Adenylatcyclase und damit auch die cAMP-Produktion hoch („high-cycling“). Um unter der Schwellenkonzentration für die Aktivierung der PKA zu bleiben, die ungefähr bei einer cAMP-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ liegt, muss die basale PDE-Aktivität ebenfalls hoch sein. Dieses System ist sehr sensitiv. Der cAMP-Spiegel kann durch geringe Aktivitätssteigerungen der Adenylatcyclase einerseits und PDE-Hemmung andererseits über den Schwellenwert zur PKA-Aktivierung angehoben werden. Im zweiten Zelltyp wie z.B. Hepatozyten ist die basale Adenylatcyclaseaktivität gering, deshalb wird auch wenig cAMP generiert („low-cycling“). Hier hat der Einsatz von PDE-Hemmstoffen keinen Erfolg; der cAMP-Spiegel kann nur über eine Steigerung der Adenylatcyclase-Aktivität angehoben werden.

Abhängig davon, welche Isoformen der Adenylatcyclase und PDE in den zu untersuchenden Zellen vorkommen, kann die physiologische Konsequenz auf PDE-Hemmstoffe also durchaus unterschiedlich ausfallen [Houslay et al., 1997].

3.3. Der Einfluss von cAMP auf entzündliche Prozesse und das Zellwachstum

Die Hauptaufgabe von cAMP besteht in der Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), weiterhin ist cAMP auch an der Regulation des Ca^{2+} -Durchtritts durch Kationenkanäle beteiligt [Krauss, 1997]. Auch bei sekretorischen Prozessen, der Gluconeogenese, der Geruchswahrnehmung, der Muskelkontraktion, der Regulation von Ionenkanälen, der Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen und ihrer Wirkung sowie bei der Lipogenese spielt cAMP eine Rolle. Außerdem ist es an Lernprozessen, der Differenzierung, Wachstumskontrolle und Apoptose beteiligt [Houslay & Bolger, 1997].

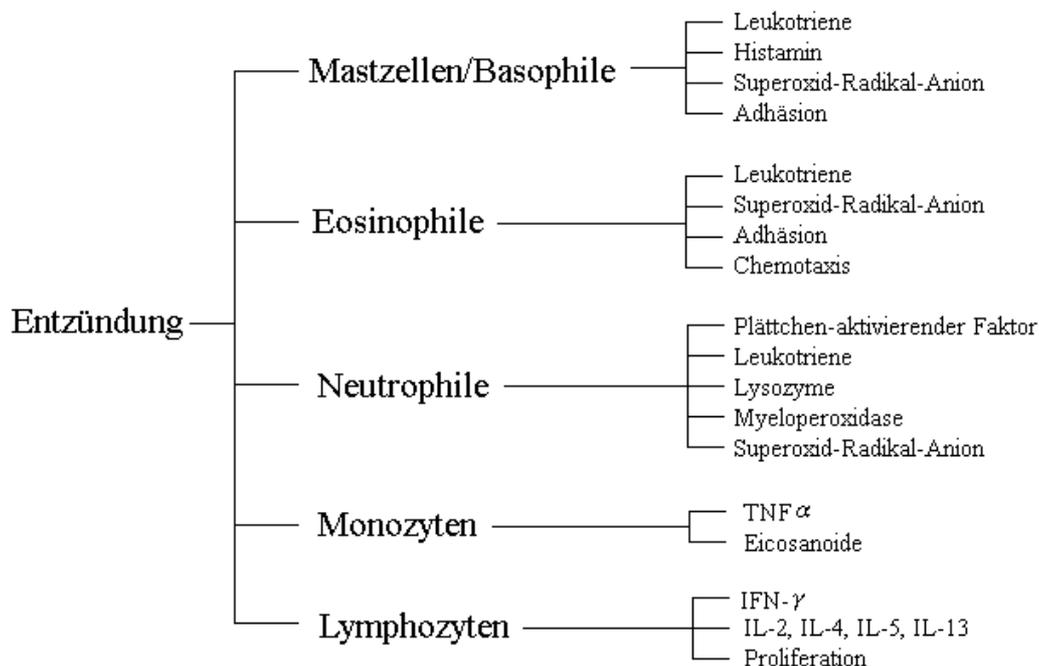


Abb. 14:

Entzündliche Prozesse, die durch Erhöhung des cAMP-Spiegels möglicherweise gehemmt werden können. IL: Interleukin, TNF α : Tumor-Necrosis Faktor α , IFN- γ : Interferon Gamma [Torphy, 1998; Torphy und Udem, 1991; modifiziert].

Bei vielen entzündlichen Prozessen, die durch eine Aktivierung von Immunzellen wie z.B. Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten und die Freisetzung von Mediatoren wie z.B. Cytokinen und Leukotrienen hervorgerufen werden, spielt cAMP eine wichtige Rolle. Die

verschiedenen inflammatorischen Zellen, auf die eine Erhöhung des cAMP-Spiegels wesentliche Auswirkungen hat, sowie die entstehenden Produkte dieser Zellen sind in Abb. 14 gezeigt. Durch Anheben des cAMP-Spiegels wird in vielen Zelltypen die Produktion der entzündlichen Mediatoren gehemmt. Vor allem bei der Behandlung von Asthma und chronischen Atemwegserkrankungen sollen zukünftig die positiven Effekte des cAMP genutzt werden. Im Lungenepithel vermag cAMP die Schlagfrequenz der Flimmerhärchen zu erhöhen und so die Reinigung der Atemwege zu unterstützen, außerdem wird durch cAMP eine Entspannung der glatten Muskulatur der Atemwege induziert [Torphy, 1998].

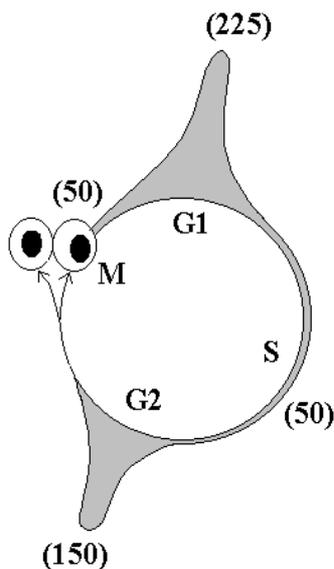


Abb. 15:
cAMP-Gehalt während der verschiedenen Zellzyklus-Phasen der humanen lymphoiden Zelllinie RPMI 8866. Angaben in pmol cAMP/mg Protein [Millis et al., 1974].

Während des Zellzyklus unterliegt der cAMP-Spiegel periodischen Schwankungen. Z.B. wird bei der humanen lymphoiden Zelllinie RPMI 8866 (Abb. 15) ein Maximum in der G1-Phase detektiert (225 pmol cAMP/mg Protein), sowie ein zweiter Peak in der G2-Phase (150 pmol cAMP/mg Protein), während in den anderen Stadien des Zellzyklus wenig oder gar kein cAMP gemessen wird [Millis et al., 1974].

Änderungen des cAMP-Spiegels regulieren den Ein- und Austritt der Zellen in den Mitose-Zyklus, wobei cAMP sowohl als negativer als auch als positiver Regulator der Zellproliferation dienen kann [Gottesmann & Fleischmann, 1986]. Dies verdeutlicht, dass cAMP in sehr komplexer Weise und in Abhängigkeit vom Zelltyp oft unterschiedlich wirkt. So zeigt cAMP in vielen Zelltypen wie z.B. T-Lymphozyten, Fibroblasten, Neuroblastom- und Astroblastomzellen einen zytostatischen Effekt beim Übergang zwischen G0- und G1-Phase und in der

Mitte der G1-Phase, in seltenen Fällen auch während der G2-Phase aus, während es in anderen Zelltypen den G1/S-Übergang fördert. Durch Substanzen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, konnte in Thymozyten und lymphoblastoiden B-Zellen Apoptose induziert werden [McConkey et al., 1990 und 1992; Jiang et al., 1996; Marko et al., 1998].

In verschiedenen Studien wurde ein negativer Effekt von cAMP auf die Proliferation der glatten Atemwegsmuskulatur nachgewiesen [Friedman et al., 1976; Pastan et al., 1975; Torphy, 1998]. In verschiedenen SHE-Zellkulturen (Embryonalzellen des Syrischen Hamsters) korrelierte eine Zunahme des cAMP-Gehalts mit einer geringeren Proliferationsrate. Umgekehrt wurde in unterschiedlichen Studien nachgewiesen, dass in Tumorzellen eine hohe Proliferationsrate mit einem niedrigen cAMP-Spiegel einher geht [Otten et al., 1972; Hickie et al., 1974; Marko et al., 1998], und dass eine cAMP-Erhöhung eine Hemmung der Zellproliferation bewirkt [Janik et

al., 1980; Fentiman et al., 1984; Marko et al., 1998]. Weiterhin wurde in murinen Keratinozyten eine Korrelation zwischen Transformationsgrad und cAMP-Gehalt gefunden; so nimmt mit steigendem Malignitätsgrad der cAMP-Spiegel in den Zellen ab [Marko et al., 1998].

Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels kann z.B. direkte Stimulierung der Adenylatcyclase erfolgen. Forskolin vermittelt durch Aktivierung der Adenylatcyclase eine wachstumshemmende Wirkung [Lando et al., 1990]. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von nicht-hydrolysierbaren cAMP-Analoga, die die PDE kompetitiv hemmen [Jastorff et al., 1991] und/oder außerdem auf die PKA wirken [Cho-Chung, 1993]. Welche Methode für das zu untersuchende Zellsystem geeignet ist, hängt vom Zelltyp ab.

Ein Eingriff in die cAMP-Signaltransduktion, der zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt, bietet somit die Möglichkeit, in vielen Zellsystemen das Zellwachstum zu hemmen.

3.4. Phosphodiesterasen (PDEs)

Der Abbaus der second messenger cAMP und cGMP und damit die Termination des Signals des cAMP- bzw. cGMP-Weges erfolgt ausschließlich durch Phosphodiesterasen, die die zyklischen Nukleotide zu AMP bzw. GMP hydrolysieren und damit inaktivieren. Zur Zeit sind 11 verschiedene PDE-Familien mit ungefähr 50 Proteinen bekannt [Conti et al., 2000; Fawcett et al., 2000]. Die Einteilung in diese Familien erfolgt anhand ihrer Substratspezifität, dem K_M -Wert, ihrer Sensitivität gegenüber Hemmstoffen oder Modulatoren und nach strukturellen Homologien [O'Donnell et al., 1999]. Eine kurze Übersicht über diese Familien und ausgewählte Inhibitoren gibt Tabelle 3.

Der generelle Aufbau der PDEs ist in Abb. 16 skizziert: Alle Phosphodiesterasen enthalten eine ca. 270 Aminosäuren große katalytische Domäne sowie eine N-terminale regulatorische Untereinheit. Bei einigen ist am C-Terminus eine regulatorische Region unbekannter Funktion lokalisiert. Die katalytische Domäne zeigt ungefähr 30% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen den 11 verschiedenen Familien und 85-95% innerhalb der verschiedenen Isoenzyme einer Familie. Außerhalb der katalytischen Region herrscht in einer Familie eine Homologie von > 60%, während zwischen unterschiedlichen Familien keine oder nur geringe Übereinstimmung gefunden wird [Fisher et al., 1998a]. Innerhalb der katalytischen Region werden bei allen PDE-Familien konservierte Motive gefunden, die strukturell mit dem katalytischen Zentrum der Zink-Hydrolasen verwandt sind. Ohne Zn^{2+} -Ionen nimmt die katalytische Aktivität der PDEs stark ab [Francis et al., 1994].

Tabelle 3:

Bislang bekannte PDE-Familien und ausgewählte Inhibitoren [Palfreyman & Souness, 1996; Fisher et al., 1998a; Fisher et al., 1998b; Soderling et al., 1999; Fawcett et al., 2000].

PDE-Familie	Charakteristik	K_M [μM]		ausgewählte Hemmstoffe
		cAMP	cGMP	
1	Ca ²⁺ /Calmodulin-stimulierbar	2-70	2-20	Vinpozetin
2	cGMP-stimulierbar	30-100	10-30	EHNA
3	cGMP-hemmbar	0,1-0,5	0,1-0,5	Motapizon
4	cAMP-spezifisch	0,5-2	> 50	Rolipram, DC-TA-46
5	cGMP-spezifisch	> 40	4-6	Zaprinast, Sildenafil
6	cGMP-spezifisch (Photorezeptor PDE)	> 500	17-20	Dipyridamol, Zaprinast
7	cAMP-spezifisch, nicht Rolipram-sensitiv	0,2	-	IBMX
8	cAMP-spezifisch, nicht IBMX- sensitiv	0,055	124	Dipyridamol
9	cGMP-spezifisch	230	0,017-0,07	Zaprinast
10	Duale PDE (Hydrolyse von cAMP und cGMP)	0,05	3	IBMX, Dipyridamol
11	Duale PDE (Hydrolyse von cAMP und cGMP)	1,04	0,52	IBMX, Dipyridamol, Zaprinast

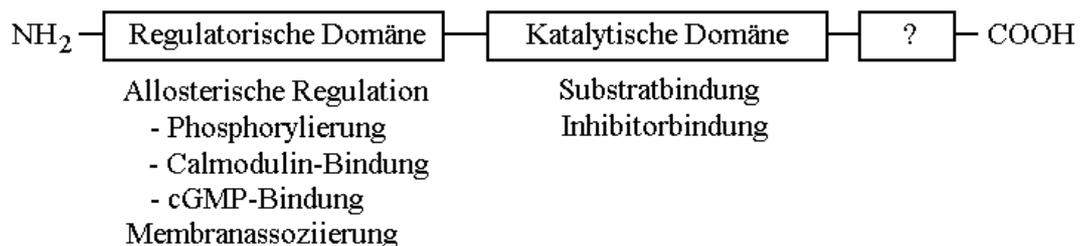


Abb. 16:

Allgemeiner Aufbau der PDEs und Funktion der Domänen [Torphy, 1997].

Die meisten Aufgaben werden von der regulatorischen Untereinheit am 5'-Ende (N-Terminus) übernommen: In dieser Domäne liegen die Bindungsstellen für Calmodulin in PDE1 und cGMP in PDE2, bei PDE1, 3, 4, 5 werden dort Phosphorylierungsstellen detektiert sowie die Bindungsstelle des Transducin bei PDE6 [Torphy, 1998; Houslay, 1998].

Wahrscheinlich spielt diese Region auch für die subzelluläre Lokalisation eine große Rolle. In verschiedenen PDEs, z.B. RNPDE4A1 (auch RD1 genannt), wurde nachgewiesen, dass dieser

Bereich für die Membranassoziation verantwortlich ist [Torphy, 1998; Houslay, 1998]. Die Funktion des C-Terminus ist bislang nicht bekannt. Lediglich in PDE4D1 konnte gezeigt werden, dass diese Region für eine Dimerisierung des Enzyms verantwortlich ist [Shakur et al., 1993; Torphy, 1998].

Die große Anzahl verschiedene PDE-Isoenzyme beruht auf unterschiedlichen Genprodukten sowie verschiedenen Initiationsstellen und daraus resultierenden Spleißvarianten. In einigen Fällen wird die Enzymaktivität sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung geregelt. Weitere Regulation kommt durch die gewebs- und zelltypspezifische Expression der Isoenzyme und durch definierte subzelluläre Lokalisation zustande [O'Donnell et al., 1999]. Diese exakte Regulation der Enzymaktivität und ihre Bedeutung bei vielen physiologischen Prozessen macht die PDEs zu einem wichtigen Angriffspunkt für eine selektive Beeinflussung durch verschiedene Inhibitoren [Soderling et al., 1999].

Neben unspezifischen PDE-Inhibitoren wie z.B. Papaverin, IBMX und dem natürlichen Methylxanthinderivat Theophyllin (Abb. 17) wurden eine Vielzahl von isoenzym- und sogar subtypspezifischen Hemmstoffen entwickelt. Diese werden bei den Beschreibungen der jeweiligen Familien erwähnt.

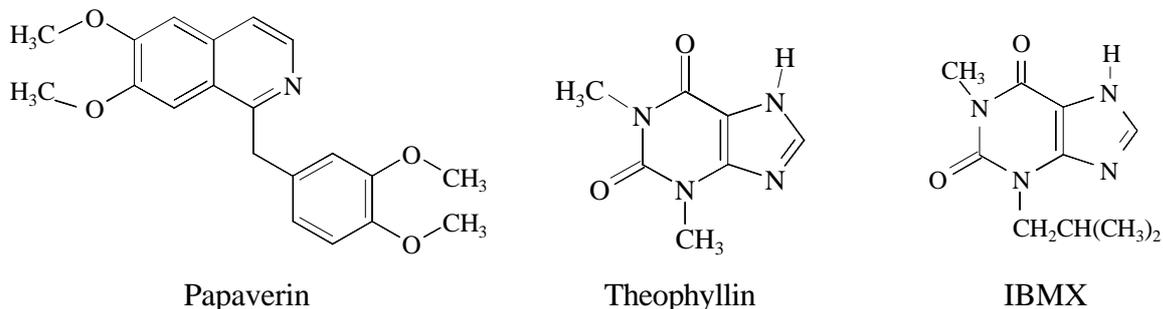


Abb. 17:
Strukturformeln der unspezifischen Inhibitoren Papaverin, Theophyllin und IBMX.

3.4.1. Nomenklatur

Aufgrund der Größe und Komplexität der PDE-Superfamilie sowie der ständigen Entdeckung neuer Mitglieder wurde 1994 ein Nomenklatur-System etabliert. Dieses wird am Beispiel des Enzyms HSPDE4D3 kurz erläutert: Auf die ersten beiden Buchstaben der Spezies (z.B. HS für homo sapiens), aus dem das Enzym isoliert wurde, folgt „PDE“ für „zyklische-Nukleotid Phosphodiesterase“, dann eine arabische Nummer für die entsprechende Genfamilie (hier 4), ein Buchstaben für das Gen (D), und schließlich eine arabische Nummer für die Spleiß-Variante (3) [Beavo et al.; 1994].

3.4.2. PDE1

Die PDE1-Familie wird durch 3 Gene (A, B, C) kodiert. Weitere Vielfalt entsteht durch alternatives mRNA-Spleißen, so existieren wahrscheinlich von jedem Gen mindestens 2 Spleißvarianten. Im Gegensatz zu den meisten anderen PDEs existiert für PDE1 auch alternatives Spleißen am C-Terminus [Conti et al., 2000]. Diese Familie der Phosphodiesterasen vermag sowohl cAMP als auch cGMP (Abb. 18) zu hydrolysieren. Die PDE1-Isoenzyme sind durch Calcium/Calmodulin stimulierbar, so bewirken bereits mikromolare Konzentrationen von Ca^{2+} /Calmodulin einen 5-20-fachen Aktivitätsanstieg des Enzyms.

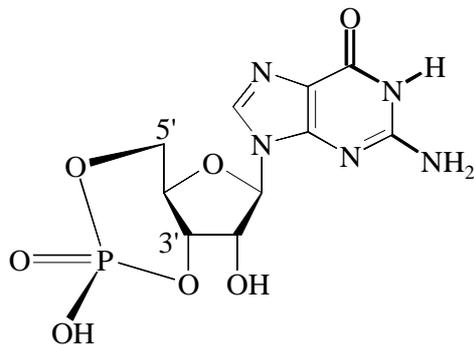


Abb. 18:
Strukturformel von cGMP.

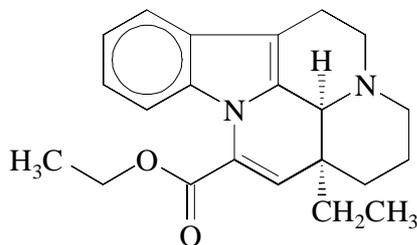


Abb. 19:
Strukturformel von Vinpocetin.

Während PDE1A und PDE1B eine höhere Affinität für cGMP als für cAMP zeigen, weist PDE1C auch für cAMP eine hohe Affinität auf ($K_M \cong 1 \mu\text{M}$) [Conti et al., 2000; Kakkar et al., 1999].

Mitglieder der PDE1-Familie können durch PKA und eine weitere Kinase, CaM-Kinase II, phosphoryliert werden. Die PKA-vermittelte Phosphorylierung von PDE1A vermindert deren Aktivität, die CaM-Kinase II-vermittelte Phosphorylierung von PDE1B ist für die reduzierte Affinität zu Calmodulin verantwortlich [Beavo, 1995]. Die höchsten Aktivitäten von PDE1, deren relative Menge im Vergleich zu den anderen Familien jedoch gering ist, wurden in Rinderhirn (ca. 10 mg/kg) und -herz (1-2 mg/kg) gefunden [Sharma & Hickie, 1996]. PDE1 spielt eine Rolle bei der Signalübertragung an Nervensynapsen und in Prozessen der Geruchswahrnehmung. Ein typischer Inhibitor der PDE1 ist z.B. das Vinca-Alkaloid

Vinpocetin (Abb. 19), das einen IC_{50} -Wert von $20 \mu\text{M}$ zeigt und klinisch getestet wurde als Relaxanz der glatten Gefäßmuskulatur und als bewusstseinsweiterndes Agens [Beavo, 1995].

3.4.3. PDE2

Von der PDE2-Familie wurde bislang nur ein Gen detektiert, von dem jedoch mindestens 2 Spleißvarianten generiert werden. Wie PDE1-Enzyme hydrolysiert auch die PDE2-Familie sowohl cAMP als auch cGMP, beide mit ähnlichem V_{max} .

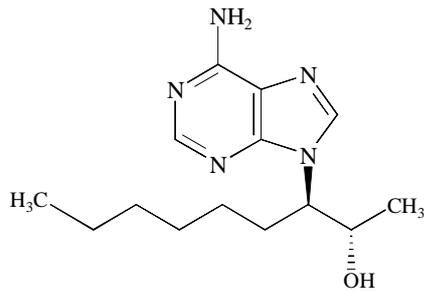


Abb. 20:
Strukturformel von EHNA.

PDE2-Isoenzyme sind durch cGMP stimulierbar, da dieses an eine regulatorische Stelle nahe des N-Terminus bindet, die jedoch nicht das katalytische Zentrum darstellt.

Bei Bindung von cGMP kommt es zu einer Stimulation des cAMP-Umsatzes durch konformationelle Änderungen in der regulatorischen Region und damit einhergehenden Veränderungen der katalytischen Domäne (allosterische Aktivierung).

PDE2 kommt vor allem in der Nebennierenrinde und in verschiedenen Regionen des Gehirns vor, sie spielt eine wichtige Rolle bei der Epinephrin-Freisetzung und bei der Regulation von Ca^{2+} -Strömen. Einen wichtigen PDE2-Hemmstoff stellt der Deaminase-Inhibitor EHNA (Abb. 20) mit einem IC_{50} von $1,0 \mu\text{M}$ dar [Podzuweit et al., 1995; Beavo et al., 1994; Beavo, 1995].

3.4.4. PDE3

Die PDE3-Genfamilie wird durch 2 Gene kodiert und ist im Gegensatz zu PDE2 durch cGMP hemmbar. Es handelt sich dabei um eine kompetitive Hemmung, da cGMP am aktiven Zentrum gebunden, aber nicht hydrolysiert werden kann. Die katalytische Untereinheit ist dann blockiert, und es findet kein cAMP-Umsatz statt. cGMP kann also die Aktivität verschiedener PDEs sowohl positiv (PDE2) als auch negativ (PDE3) beeinflussen [Houslay et al., 1998]. PDE3A kommt häufig in der glatten Muskulatur, Blutplättchen und im Herzen vor, während PDE3B in Adipozyten und in der Leber gefunden wird. Beide Formen werden allerdings in geringeren Konzentrationen auch in anderen Geweben detektiert. PDE3 spielt eine Rolle bei der Aggregation von Blutplättchen, eine Hemmung des Enzyms hat anti-aggregatorische Wirkung.

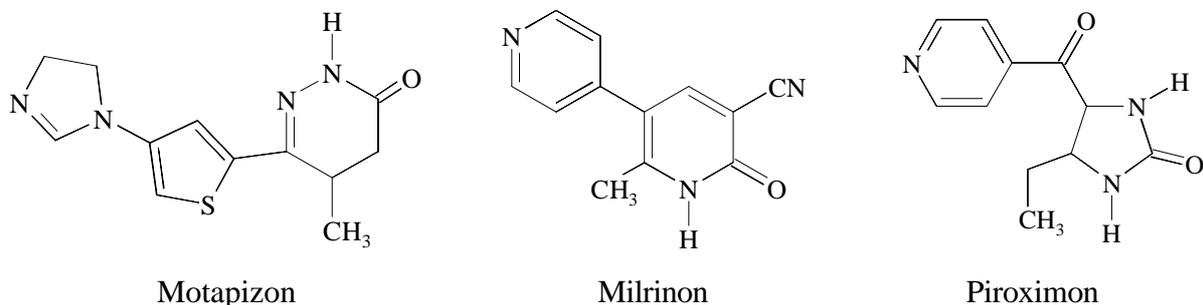


Abb. 21:
Strukturformeln der PDE3-Hemmstoffe Motapizon, Milrinon und Piroximon.

Inhibitoren der PDE3-Genfamilie sind häufig auch Relaxantien der glatten Muskulatur. Weiterhin spielt PDE3 auch bei der Kontraktilität des Herzmuskels eine wichtige Rolle, eine

Hemmung erhöht die Kontraktilität durch Steigerung des Ca^{2+} -Einstroms. Beide Isoenzyme können durch PKA phosphoryliert und aktiviert werden. Außerdem kann eine Phosphorylierung durch Insulin-abhängige Kinasen erfolgen, die ebenfalls stimulierend auf die Aktivität der PDE3 wirkt. PDE3 vermittelt dadurch eventuell einige der metabolischen Effekte des Insulins, z.B. die Hemmung der cAMP-stimulierten Lipolyse [Beavo, 1995].

Typische Inhibitoren der PDE3 sind Motapizon, Milrinon und Piroximom, die in Abb. 21 dargestellt sind. Milrinon zeigt einen IC_{50} -Wert von $0,3 \mu\text{M}$ [Beavo, 1995].

3.4.5. PDE4

Die 4 Subtypen (PDE4A-D) der cAMP-spezifischen PDE4-Familie, die insensitiv gegenüber Calcium und cGMP ist, werden durch 4 verschiedene Gene kodiert, die auf den Chromosomen 1, 5 sowie zwei unterschiedlichen Regionen des Chromosoms 19 lokalisiert sind [Horton et al., 1995a und 1995b; Milatovich et al., 1994; Szpirer et al., 1995]. Weitere Komplexität kommt durch die Fähigkeit des alternativen mRNA-Spleißens und dem Gebrauch von multiplen Promotoren zustande [Houslay et al., 1998]. Zur Zeit sind ca. 15 verschiedene Isoenzyme der PDE4-Familie bekannt [Conti et al., 2000].

Tabelle 4:
Vorkommen verschiedener PDE4-Isoenzyme [Houslay et al., 1998]

Gewebe	PDE4-Klasse			
	4A	4B	4C	4D
Gehirn	+	+	+	+
Leberzellen	+	+	-	+
Adipozyten	+	+	+	+
B-Zellen	+	+	-	-
Eosinophile	+	+	-	+
Neutrophile	+	+	-	+
Herz	+	+	-	+
Lunge	+	+	+	+
Nieren	+	+	+	+

Charakteristisch ist das selektive Auftreten der verschiedenen Isoformen und ihrer Transkripte in verschiedenen Zelltypen und Gehirnregionen (s. Tabelle 4) [Bolger et al., 1994 und 1996, Engels et al., 1995, Shakur et al., 1995]. Im Gehirn ist PDE4 involviert in die Regulation von

Stimmungen und in die Geruchswahrnehmung, in Lymphozyten spielt PDE4 eine Rolle bei der Regulation von entzündlichen Prozessen [Beavo, 1995].

PDE4 zeigt die höchste Sequenzhomologie zu *Drosophila melanogaster dunce* PDE, deren Inaktivierung zu Lerndefekten führt [Dauwalder & Davis, 1995; Davis, 1988; Davis & Davidson, 1986; Nighorn et al., 1991; Qiu et al., 1991].

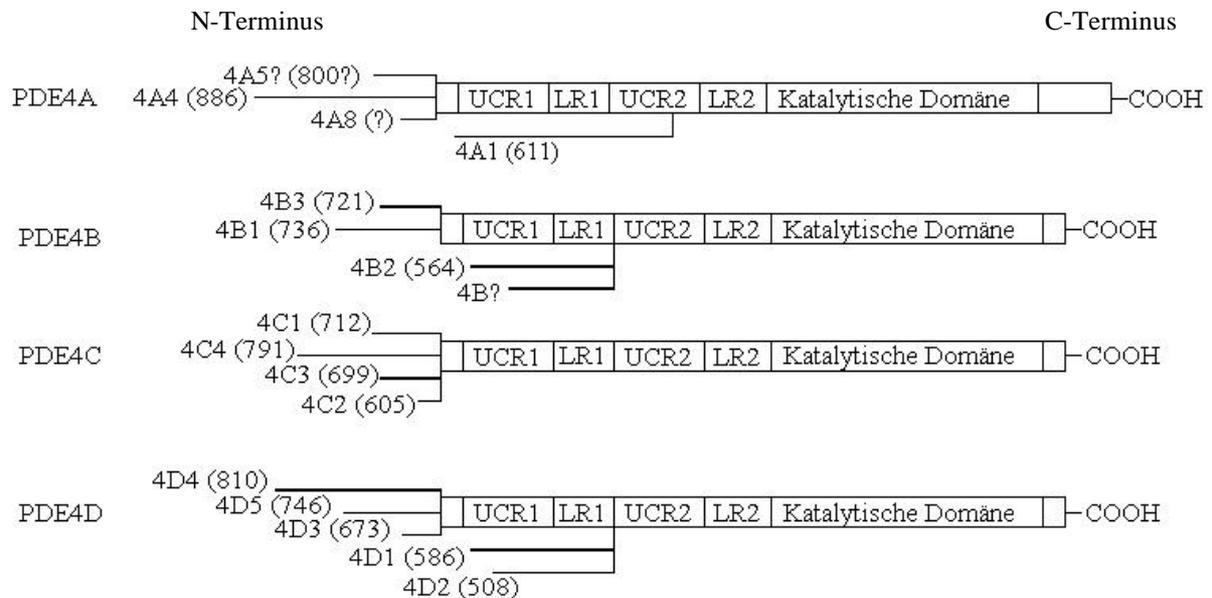


Abb. 22:

Schematische Darstellung humaner PDE4-Subtypen (4A-D). Hinter der Benennung der verschiedenen Spleißvarianten ist in Klammern die Anzahl der Aminosäuren angegeben (Houslay et al., 1998; Torphy, 1998; Conti et al., 2000).

Die Kernregion, die Homologie zu allen anderen PDE-Familien zeigt, enthält die katalytische Domäne des Enzyms, die aus ca. 270 Aminosäuren besteht [Charbonneau, 1990]. Abb. 22 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau der PDE4-Isoenzyme. Einzigartig für diese Familie ist das Auftreten von 2 hochkonservierten Regionen in der Nähe des N-Terminus. Diese Domänen werden *upstream-conserved regions* (UCR) 1 und 2 genannt [Bolger, 1994; Bolger et al., 1993] und sind durch Sequenzen („Linker“) miteinander bzw. mit der katalytischen Untereinheit verknüpft, die als L1 und L2 bezeichnet werden. PDE4-Formen, die sowohl die katalytische Domäne als auch UCR1 und UCR2 enthalten, werden als lange Formen („long forms“) bezeichnet, während Varianten, denen die UCR1-Domäne fehlt, kurze Formen („short forms“) genannt werden. Eine Ausnahme bilden PDE4A1 [Sullivan et al., 1998] und PDE4C6 [Oberholte et al., 1997], die nur einen Teil von UCR2 enthalten. In den langen Formen wird upstream von UCR1 eine weitere konservierte Region gefunden (UCR3?), die möglicherweise funktional bedeutsam ist. Weiterhin befindet sich im N-Terminus evtl. eine inhibitorische Domäne, bei deren Deletion eine Zunahme der Enzymaktivität erfolgt [Lim et al., 1999].

Ein weiterer Aktivitätsanstieg wird durch posttranslationale Veränderungen wie Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen wie ERK/MAP-Kinasen, Cyclin-abhängige Kinasen oder MAPKAP2 und Bindung regulatorischer Proteine vermittelt.

So bewirkt z.B. die Phosphorylierung durch Protein-Kinase A (PKA) an Ser54 in UCR1 eine Veränderung der Wechselwirkung zwischen UCR1 und UCR2 und führt zu einem Aktivitätsanstieg [Houslay et al., 1998]. Außerdem scheint der N-Terminus verantwortlich für die subzelluläre Lokalisation zu sein: Die kurzen und aktiveren PDE4-Formen liegen häufig cytosolisch vor, während lange Formen meist an die Membran gebunden sind [Houslay & Milligan, 1997].

Innerhalb der verschiedenen PDE4-Subfamilien (PDE4A-D) zeigen alle Mitglieder identische Sequenzen im C-terminalen Bereich, während sich die C-Termini der verschiedenen PDE4-Gene unterscheiden. Die verschiedenen Spleißvarianten besitzen spezifische Sequenzen am äußersten N-Terminus, die durch alternatives Spleißen entstehen. Diese Verschiedenheiten können Unterschiede in der Aktivität der Isoformen bedingen [Houslay et al., 1998].

Die Expression der kurzen Formen (z.B. 4D1 und 4D2 [Beavo, 1995; Verghese et al., 1995]) kann durch cAMP induziert werden, wodurch es zu einem Feedback-Mechanismus kommt. Diese PDEs besitzen einen cAMP-abhängigen Promotor [Vicini et al., 1997].

Die langen Formen scheinen einen oder mehrere cAMP-unabhängige Promotoren zu besitzen, da sie nicht cAMP-induzierbar sind. Die Induktionen halten bei verschiedenen Formen unterschiedlich lange an. Die Veränderung der Expression einer Form kann das Expressionsmuster anderer Formen positiv oder negativ beeinflussen [Pooley et al., 1997]. Die Aktivierung durch direkte Phosphorylierung stellt einen Mechanismus des schnellen Eingriffs in den cAMP-Weg dar, während durch die Regulation auf transkriptioneller Ebene eine langsamere, aber längerfristige Kontrolle zustande kommt [Beavo, 1995].

Der K_M -Wert für cAMP liegt bei 1-5 μM für alle PDE4-Isoenzyme. Meist werden lineare Lineweaver-Burke-Plots gefunden, allerdings treten manchmal auch ungewöhnliche nichtlineare Plots auf. Eine mögliche Erklärung dafür stellt die Tatsache dar, dass PDE4-Enzyme im Gleichgewicht zwischen zwei verschiedenen Konformationen vorzuliegen scheinen. Die Substratbindung führt zu einer 3. Konformation. Nach Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes kehrt das Enzym in seine Ausgangskonformation zurück (mnemonischer Mechanismus).

Bei einer Vielzahl verschiedener Krankheiten wie z.B. Asthma, atopischer Dermatitis, Depression, septischem und toxischem Schock, AIDS, multipler Sklerose, Schuppenflechte sowie rheumatoider Arthritis wird über die Möglichkeit einer Therapie mit Hilfe selektiver PDE4-Hemmstoffe diskutiert, wobei die anti-inflammatorischen (entzündungshemmenden) und anti-asthmatischen Wirkungen dieser Inhibitoren besonders hervorzuheben sind [Ashton et al., 1994; Lowe et al., 1992; Masamune et al., 1995; Muller et al., 1996; Raeburn et al., 1993;

Souness et al., 1997; Torphy, 1987 und 1994; Torphy et al., 1994, 1993 a, b, c; Torphy et al., 1991].

Der in Abb. 23 dargestellte Inhibitor Rolipram stellt einen kompetitiven Hemmstoff der PDE4 dar, der alle Mitglieder der PDE4-Familie zu hemmen vermag. Die Bindungsstelle für Rolipram liegt wahrscheinlich in der katalytischen Region der PDE4-Enzyme.

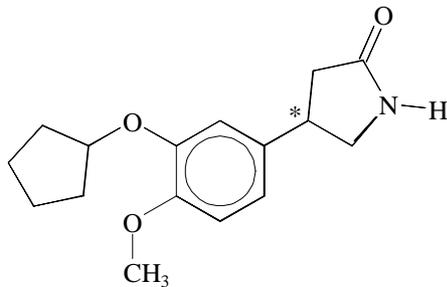


Abb. 23:
Struktur von (±)-Rolipram;
*: optisch aktives Zentrum.

Die Unterschiede in den IC_{50} -Werten der verschiedenen Isoenzyme kommen dabei vor allem durch die unterschiedliche zelluläre Lokalisation zustande. Bindungsstudien mit [3H]-Rolipram an Gehirn und anderen Geweben zeigten das Vorhandensein von Bindungsstellen für Rolipram mit K_d -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich [Schneider et al., 1986; Souness & Scott, 1993; Kelly et al., 1996; Souness & Rao, 1997] und eine beachtliche Stereoselektivität für das R-(-)- Rolipram-Enantiomer, das ca. 20-fach stärker

als die S-(+)-Verbindung gebunden wird. Diese Bindung wird als „high affinity“ PDE4 (HPDE4) bezeichnet [Schneider et al., 1996]. Im Gegensatz dazu wurde in verschiedenen anderen Geweben, die reich an PDE4-Aktivität sind, keine Bevorzugung dieses Enantiomers gefunden. Die Hemmung der PDE-Aktivität zeigt also ein variierendes Maß an Stereoselektivität [Jakobitz et al., 1996; Kelly et al. 1996; Souness und Rao, 1997; Souness und Scott, 1993]. Auch weitere Versuche der Expression verschiedener PDE4-Isoformen in verschiedenen Geweben sowie die Hemmung durch Rolipram unterstützten diese Beobachtungen. Abb. 24 zeigt ein von Houslay et al. (1998) skizziertes Modell, mit dessen Hilfe sich die Unterschiede in der Stereoselektivität erklären lassen: PDE4-Isoenzyme können in 2 unterschiedlichen Konformationen vorliegen, die sich ineinander umwandeln können [Marchmont et al., 1981; Souness and Rao, 1997; Torphy et al., 1992]. Die beiden Formen unterscheiden sich in ihrer Affinität für die Rolipram-Bindung. Eine weit verbreitete Annahme geht von einem bislang unbekanntem „Trigger-Mechanismus“ aus, der den Übergang von einer in die andere Form bewirkt. Rolipram dient als sensibler Monitor für die beiden Konformere. PDE4-Enzyme (z.B. 4A, 4D3) können also in zwei verschiedenen Konformationen mit verschiedenen Kinetiken für die Hemmung durch Rolipram vorliegen [Huston et al., 1996]. Der Triggermechanismus könnte eventuell die Phosphorylierung der low-affinity-PDE (LPDE4) durch eine Kinase oder die Wirkung von Insulin sein [Marchmont and Houslay, 1980]. Die high-affinity-PDE (HPDE4) kann dann durch PKA phosphoryliert werden, wodurch es zu einer Zunahme der Enzymaktivität kommt. Dies wurde bei PDE4D3 beobachtet [Sette et al., 1996 und 1994a,b,c; Lim et al., 1999].

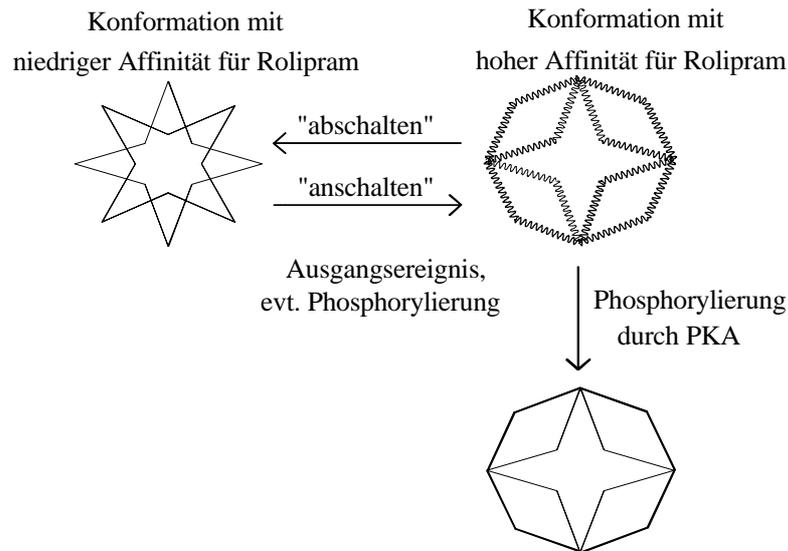


Abb. 24:

Unterschiedliche Konformere der PDE4 können durch einen bislang unbekanntem Triggermechanismus ineinander umgewandelt werden. Die Konformation, die eine hohe Affinität für Rolipram aufweist, wird bevorzugt durch PKA phosphoryliert und aktiviert (nach Houslay, 1998).

Die Rolle der Rolipram-Bindungsstelle ist bis heute unklar, beide Konformere sind katalytisch aktiv. Die Aktivität der HPDE4 wird durch Rolipram mit einem IC_{50} -Wert von 2 nM [Souness und Rao, 1997], für die Hemmung der cAMP-Hydrolyse wurde ein IC_{50} -Wert von 0,1-2 μ M ermittelt [Beavo et al., 1990]. Die relative Menge der Konformere variiert in verschiedenen Geweben stark.

Im Hinblick auf den potentiellen Einsatz verschiedener PDE4-Inhibitoren zur Behandlung von Krankheiten des Menschen sind vor allem Substanzen von biologischer Bedeutung, die zwischen den verschiedenen PDE4-Familien bzw. den beiden Konformationen unterscheiden können. Dabei wird eine Bevorzugung der LPDE4 angestrebt, da viele therapeutische Effekte mit deren Hemmung zusammenhängen, während die Hemmung der HPDE4 oft für die Nebenwirkungen wie z.B. Erbrechen, Schwindel oder erhöhte Magensäuresekretion verantwortlich gemacht wird. Ein weiterer Ansatz ist die Synthese von Verbindungen, die spezifisch auf ein spezielles Isoenzym wirken, da so eine selektive Hemmung und eine Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen möglich ist. Hilfreich können bereits Substanzen sein, die nicht gegen PDE4C wirken, da dieses Isoenzym nicht in inflammatorischen Zellen, dafür jedoch im ZNS vorkommt, so dass eine Hemmung von PDE4C nicht angestrebt wird. Zu beachten ist jedoch, dass möglicherweise bei selektiver Hemmung eines Isoenzym andere Subtypen hochreguliert werden könnten [Torphy, 1998].

PDE4-Hemmstoffe können gemäß Tabelle 5 nach ihrer Struktur in verschiedene Gruppen eingeteilt werden; daneben sind noch weitere Hemmstoffe bekannt, die in keine der Gruppen eingeordnet werden können.

Tabelle 5:
Verschiedene Familien von PDE4-Inhibitoren.

Gruppe	Ausgewählte Beispiele
Catecholether-Derivate	Rolipram, RO 201724, Trequinsin, CDP840, SB207499 (Ariflo), RP 73401 (Piclamilast)
Chinazolindion-Derivate	Nitraquazon, CP77059, RS 25344, RS 33793
Xanthinderivate	Theophyllin, Denbufyllin,
Purinderivate	BWA78U, Arofyllin
Pteridin- und Pyrimido-[5,4-d]-pyrimidin-Derivate	DC-TA-46, Mopidamol (RA233), DC-MA40

Rolipram hemmt alle PDE4-Isoenzyme mit einem IC_{50} von 1-5 μM , die anderen PDE-Familien werden nicht oder nur sehr schwach gehemmt ($IC_{50} > 200 \mu M$). Von Rolipram wurde eine antidepressive Wirkung beschrieben [O'Donnell et al., 1999]. In Nagern durchgeführte Studien mit Rolipram zeigen außerdem eine verbesserte Gedächtnisleistung und Lernfähigkeit durch Erhöhung der cAMP-Spiegel [Imanishi et al., 1997]. Leider verhindern starke Nebenwirkungen wie Übelkeit und Schwindel [Fleischhacker et al., 1992; Scott et al., 1991] den Einsatz am Patienten. Sowohl der therapeutische Effekt als auch die Nebenwirkungen scheinen durch die Hemmung der high-affinity-PDE-Aktivität im zentralen Nervensystem zustande zu kommen.

Nitraquazon (Abb. 25) zeigt wie auch seine Analoga eine größere Affinität für HPDE4 ($IC_{50} = 14 \text{ nM}$). Der IC_{50} -Wert für die Hemmung der cAMP-Hydrolyse beträgt 1,9 μM (LPDE4) [Souness und Rao, 1997; Lowe et al., 1991].

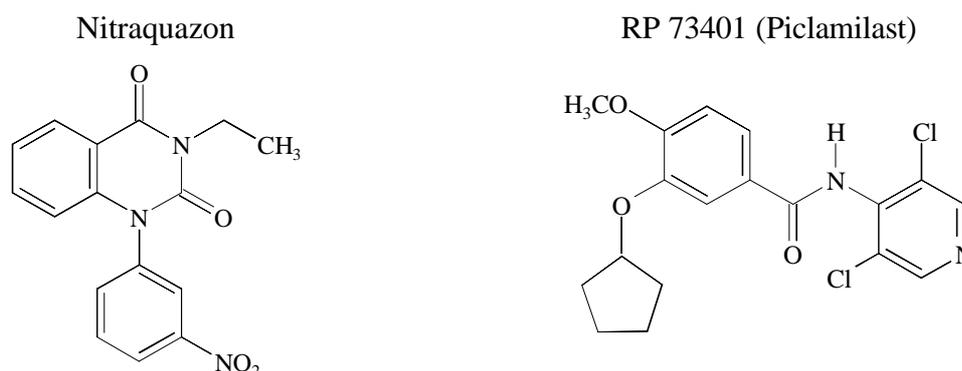


Abb. 25:
Strukturformel der PDE4-Hemmstoffe Nitraquazon und RP 73401 (Piclamilast).

Der in Abb. 25 dargestellte Inhibitor RP 73401 (Piclamilast) unterscheidet nicht zwischen den Konformeren und wurde in klinischen Studien zur Behandlung von Asthma eingesetzt.

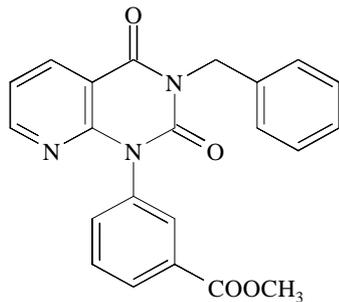


Abb. 26:
Strukturformel von CP 77059.

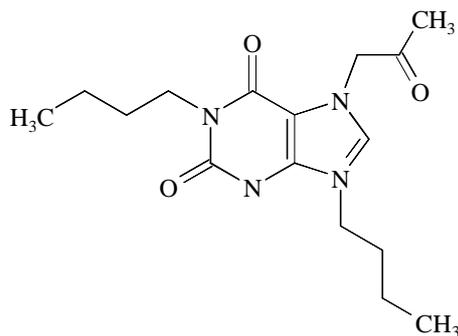


Abb. 27:
Strukturformel von Denbufyllin.

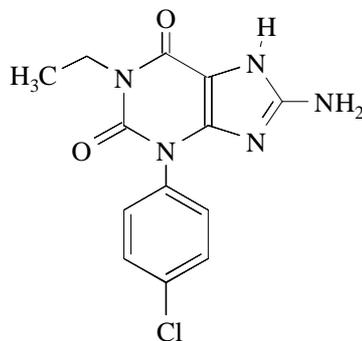


Abb. 28:
Strukturformel von Arofyllin.

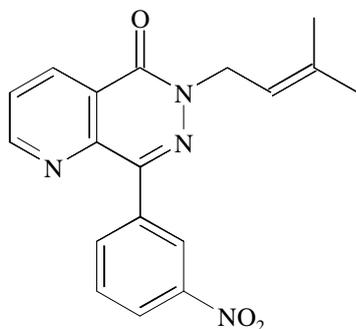


Abb. 29:
Strukturformel von RS 33793.

[Souness und Rao, 1997]. Mit einem IC₅₀-Wert von 1 nM gehört diese Verbindung zu den stärksten selektiven PDE4-Inhibitoren.

Wie auch bei RO 201724 sowie CDP 840 beobachtet, wird PDE4C durch RP 73401 (Piclamilast) schwächer als die anderen PDE4-Isoenzyme gehemmt [Cohan et al., 1996]. Piclamilast befindet sich in der klinischen Prüfung als Antiasthmatikum und bei der Behandlung rheumatoider Arthritis [de Brito et al., 1997].

CP 77059 (Abb. 26) kann zwischen PDE4A und D unterscheiden und bevorzugt PDE4D. Dieser Hemmstoff weist IC₅₀-Werte von 40 nM für die LPDE4 und 1,3 nM für die HPDE4 auf. Nur wenige Xanthinderivate sind PDE-spezifische Inhibitoren. Abb. 27 zeigt die Strukturformel von Denbufyllin, das wie die Nitraquazon-Analoga eine hohe Affinität zur HPDE4 aufweist und einen IC₅₀-Wert von 1,0 µM für PDE4D zeigt [Houslay et al., 1998].

Arofyllin (Abb. 28) ist ein selektiver PDE4-Hemmstoff (IC₅₀ ≈ 5 µM), der für die orale Anwendung als Bronchodilatator geeignet und nicht mit den Nachteilen von Theophyllin behaftet sein soll. Dieser Hemmstoff befindet sich in Phase III der klinischen Prüfung [de Brito et al., 1997].

Ähnlich wie Rolipram können auch die in Abb. 29 sowie 30 gezeigten Chinazolidione RS 33793 und RS 25344 (IC₅₀ = 0,28 nM) zwischen den beiden PDE-Konformationen unterscheiden und bevorzugen die high-affinity-PDE [Houslay, 1998].

Interessant an RS 25344 ist vor allem, dass dieser Hemmstoff in der Lage ist, zwischen verschiedenen Phosphorylierungsstadien von

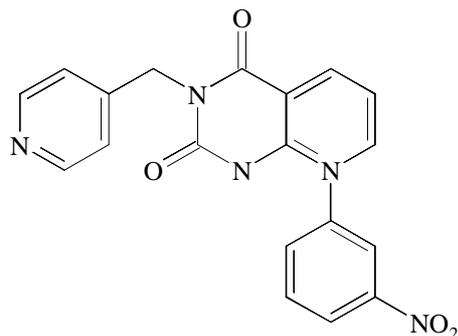


Abb. 30:
Strukturformel von RS 25344.

PDE4D zu unterscheiden: Je geringer phosphoryliert das Enzym vorliegt, desto geringer ist auch die Sensitivität von RS 25344 [Saldou et al., 1998].

Mit Hilfe von Inhibitoren, die die low-affinity-PDE bevorzugen, wie z.B. SB 207499 („ArifloTM“, Strukturformel s. Abb. 31) oder CDP 840 (Abb. 31), sowie verschieden substituierten 3-Norbornyl-4-methoxy-phenyl-methylen-Oxindolen (Pfizer Oxindol, Abb. 32A) [Masamune et al., 1995] und Catechol-Benzamidazolen (Pfizer Benzamidazol, Abb. 32)

[Cheng et al., 1995] kann Emesis stark reduziert werden.

SB 207499 weist IC_{50} -Werte von 92 nM für die LPDE sowie 120 nM für HPDE4 auf. CDP 840 (Abb. 31) hemmt die cAMP-Hydrolyse (LPDE4) mit einem IC_{50} -Wert von 4 nM und die [³H]-Rolipram-Bindung (LPDE4) mit einem IC_{50} von 60 nM [Hughes et al., 1996; Souness und Rao, 1997].

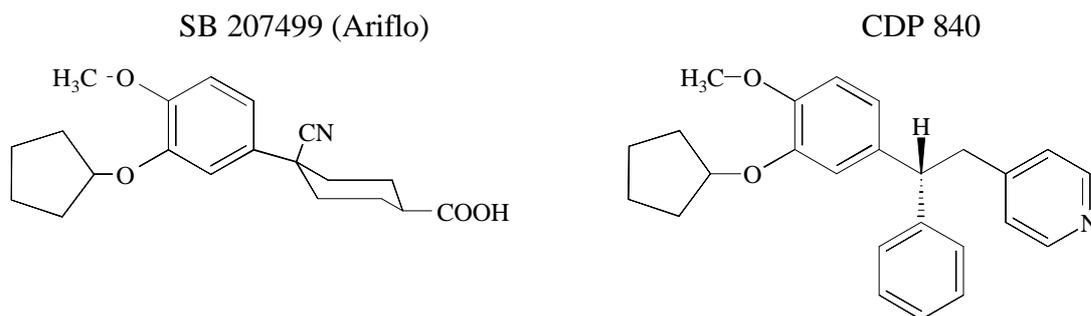


Abb. 31:
Strukturformel von SB 207499 (ArifloTM) und CDP 840.

A: substituierte 3-Norbornyl-4-methoxy-phenyl-methylen-Oxindole B: substituierte Catechol-Benzimidazole

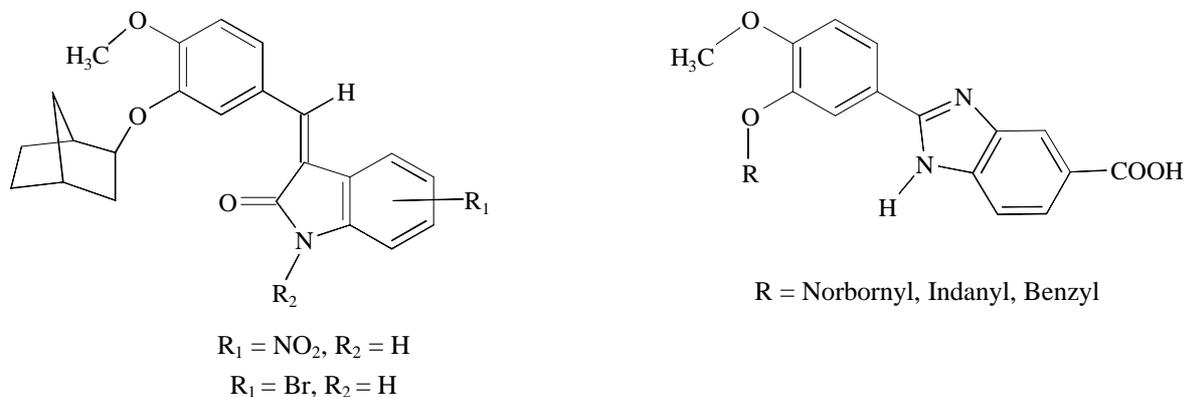


Abb. 32:
Strukturformeln der Pfizer-Verbindungen.

Um die entzündungshemmenden Eigenschaften der PDE4-Inhibitoren mit den muskelrelaxierenden Eigenschaften der PDE3-Hemmstoffe kombinieren zu können, wurden dualselektive PDE3/4-Inhibitoren entwickelt. Beispiele hierfür sind z.B. Trequinsin und Zardaverin (Abb. 33). Trequinsin hemmt PDE3 mit einem IC_{50} -Wert von 0,4 nM und PDE4 mit einem IC_{50} von 1 μ M [Saldou et al., 1998]. Die IC_{50} -Werte von Zardaverin liegen bei 0,6 μ M für PDE3 und 0,2 μ M für PDE4 [Beavo, 1995].

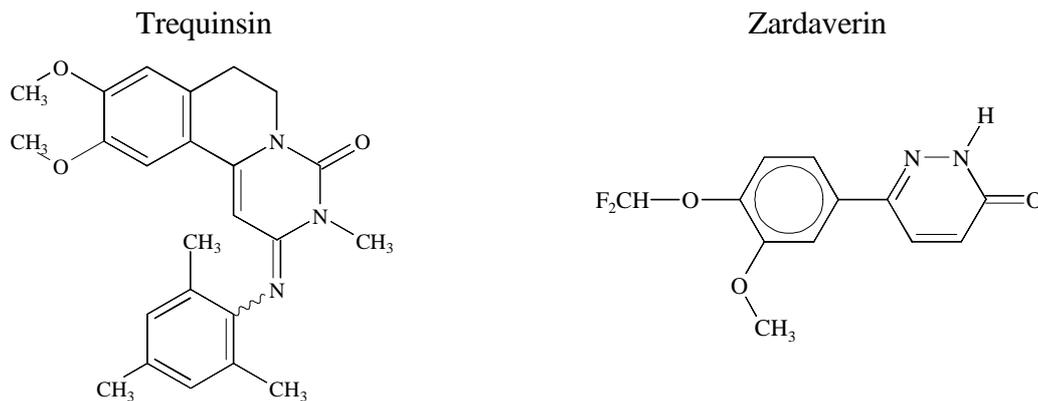


Abb. 33:
Strukturformeln der dualen PDE3/PDE4-Hemmstoffe Trequinsin und Zardaverin.

3.4.6. PDE5

PDE5 ist spezifisch für cGMP und wird deshalb auch cGMP-spezifische PDE genannt. Neben der cGMP-Bindungsstasche in der katalytischen Region weist PDE5 wie auch PDE2 zwei

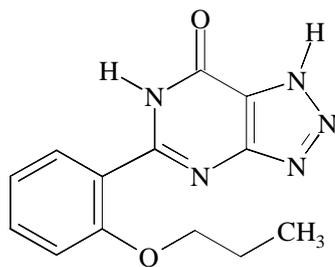


Abb. 34:
Strukturformel von Zaprinast.

nichtkatalytische Bindungsstellen für cGMP am N-Terminus auf. Eine hochaffine Bindung von Zink scheint wesentlich für die katalytische Aktivität zu sein [Beavo et al., 1994]. Obwohl bislang nur eine PDE5 bekannt ist, vermutet man die Existenz von mindestens zwei Spleißvarianten. Aus Lunge, Aorta, Blutplättchen und glatter Muskulatur konnte PDE5 bisher isoliert werden, eine weitere Rolle spielt PDE5 in der Niere, wo es mitverantwortlich für die Regulation der Na^+ -Konzentration ist [Beavo et al., 1994; Beavo, 1995].

Der Einsatz geringer Dosen von PDE5-Hemmstoffen kann die Wirkung von NO-generierenden Medikamenten auf die Relaxation der glatten Muskulatur verstärken. Ein typischer Hemmstoff der PDE5 ist Zaprinast (Abb. 34) mit einem IC_{50} -Wert von 0,76 μ M. Die Eigenschaft von Zaprinast, als Zinkchelator zu fungieren, ist möglicherweise bedeutsam für die Hemmung von PDE5 [Beavo et al., 1994].

Die Erhöhung der Hydrophilie von Zaprinast durch Einführung eines Sulfonamidrestes führt zu einer Aktivitätssteigerung und verbesserten Selektivität bei Sildenafil (Abb. 35). Neben PDE5 ($IC_{50} = 3 \text{ nM}$) hemmt das entstehende Produkt auch PDE1, allerdings deutlich schwächer ($IC_{50} = 260 \text{ nM}$). Sildenafil ist ein Relaxanz der glatten Muskulatur des *Corpus cavernosum* (Schwellkörper) und inzwischen als ViagraTM im Handel [Terrett et al., 1996]. Dipyridamol (Abb. 35) hemmt neben PDE6, 8, 10 und 11 auch PDE5 mit einem IC_{50} von $0,9 \mu\text{M}$ [Beavo, 1995; Torphy, 1998].

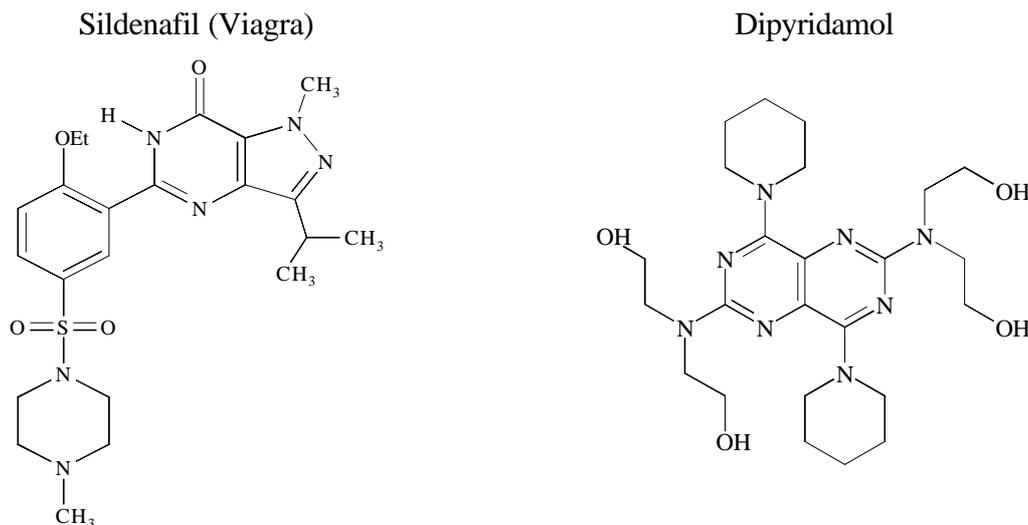


Abb. 35:
Strukturformeln von Sildenafil und Dipyridamol.

3.4.7. PDE6

PDE6 ist ebenfalls eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase ($K_M = 17\text{-}20 \mu\text{M}$), die ausschließlich in den Zäpfchen und Stäbchen der Netzhaut des Auges vorkommt. Aus diesem Grund wird PDE6 auch häufig als Photorezeptor-PDE bezeichnet.

Das heterotrimere G-Protein dieses Weges, Transducin, wird bei Einstrahlung von Licht durch Rhodopsin aktiviert. Die im weiteren Signalweg aktivierte PDE6 vermindert durch Hydrolyse die cGMP-Konzentration. Dadurch wird die cGMP-Belegung von Kationenkanälen der Membran erniedrigt. Diese Kanäle sind offen, wenn cGMP gebunden ist. Die Erniedrigung der cGMP-Konzentration führt nun zu einer Hyperpolarisation der Zelle [Beavo, 1995].

3.4.8. PDE7

Zur Zeit sind 2 Mitglieder dieser PDE-Familie bekannt (PDE7A und 7B). PDE7A wird häufig in CD4- und CD8-T-Lymphozyten und im Skelettmuskel gefunden [Beavo et al., 1994; Beavo, 1995]. PDE7B kommt in Gehirn, Herz und Leber vor.

Alle Mitglieder der cAMP-spezifischen PDE7-Familie erwiesen sich als insensitive gegenüber PDE4-Inhibitoren wie z.B. Rolipram oder RO 201724 sowie gegen Stimulation durch Magnesiumionen. Lange Zeit existierte für PDE7 kein spezifischer Hemmstoff, deshalb wurde der PDE7-Gehalt aus der Tatsache ermittelt, dass der IC_{50} -Wert des Methylxanthinderivat IBMX für PDE7 bei 30 μ M, für die meisten anderen PDEs - bis auf PDE8 und PDE11- jedoch deutlich niedriger liegt [Fisher et al., 1998a; Fisher et al., 1998b; Michaeli et al., 1993; Giembycz et al., 1996 ; Fawcett et al., 2000]. Neueste Untersuchungen wiesen Benzyllderivate von 2,1,3-Benzo- und Benzothieno[3,2-a]thiadiazin-2,2-Dioxiden als potentiell spezifische PDE7-Inhibitoren aus [Martinez et al., 2000].

3.4.9. PDE8

Bislang sind zwei Mitglieder der PDE8-Familie charakterisiert (PDE8A und B). PDE8A zeigt eine hohe Affinität zu cAMP ($K_M \approx 55$ nM), aber einen relativ niedrigen V_{max} -Wert. Eventuell kommt PDE8A vor allem in Zellen mit geringem cAMP-Gehalt vor und sorgt dort für das Niedrighalten der basalen cAMP-Konzentrationen.

Die höchsten Level von PDE8A-mRNA werden in den Hoden, Ovarien, Dünndarm und Kolon gefunden; in der Thymusdrüse und Leukozyten kommt PDE8 dagegen nicht vor.

Die Mitglieder dieser Familie sind insensitive gegenüber den meisten bekannten PDE-Inhibitoren wie z.B. Rolipram (Abb. 23), Zaprinast (Abb. 34) und Vinpocetin (Abb. 19), jedoch sensitiv gegen Dipyridamol (Abb. 35). Da PDE8A mit einem IC_{50} -Wert von 100 μ M noch wesentlich insensitiver gegenüber IBMX ist als PDE7, wird diese PDE auch als cAMP-spezifische, IBMX-insensitive PDE bezeichnet. Auch diese PDE benötigt zweiwertige Metallionen, bevorzugt Mg^{2+} und Mn^{2+} , für die Enzymaktivität. Eine Modulation der Enzymaktivität durch cGMP wurde nicht beobachtet [Fisher et al., 1998a].

3.4.10. PDE9

Erst 1998 wurde ein Mitglied dieser PDE-Familie entdeckt, nämlich HSPDE9A. PDE9A zeigt eine sehr hohe Umsatzrate und eine ebenso hohe Spezifität für cGMP ($V_{max} = 4,9$ nmol/min x μ g rekombinantes Enzym; $K_{M(cGMP)} = 170$ nm). Die wesentlich höhere Spezifität für cGMP als alle anderen cGMP-spezifischen PDEs lässt die Vermutung zu, dass PDE9A in Zellen mit relativ niedrigem cGMP-Gehalt vorkommen könnte. Die Sequenzhomologie der katalytischen Domäne zu anderen bekannten PDEs ist relativ gering und für alle nahezu 30%. PDE9A kommt in allen bisher untersuchten Geweben vor (höchste mRNA-Konzentrationen werden in Milz, Dünndarm und Gehirn detektiert), was auf keine sehr spezifische Rolle dieser PDE-Familie hindeutet. Die katalytische Aktivität lässt sich durch Zugabe von Manganionen stark steigern, Magnesium und Calcium sind weniger wirksam. PDE9A wird lediglich durch den PDE5-

Inhibitor Zaprinast (Abb. 34) gehemmt, alle anderen Inhibitoren sind wirkungslos. Aufgrund der geringen Sequenzhomologie zu anderen PDEs ist dies jedoch nicht verwunderlich. Außerhalb der katalytischen Domäne werden keine Motive für eine allosterische cGMP-Bindung gefunden [Fisher et al., 1998b].

3.4.11. PDE10

Die PDE10-Isoenzymfamilie wurde 1999 in Mäusen erstmals beschrieben. Der einzig bekannte Vertreter, PDE10A, vermag sowohl cAMP als auch cGMP zu hydrolysieren, wobei eine höhere spezifische Aktivität für cGMP gezeigt werden konnte, da der V_{\max} -Wert für cGMP wesentlich höher als für cAMP ist. PDE10A enthält die Konsensussequenz für die katalytische Domäne der PDEs, weist allerdings weniger als 50% Homologie zu allen anderen bekannten Phosphodiesterasen auf.

Obwohl im N-Terminus ähnliche Motive gefunden wurden, wie sie auch in PDE2, 5 und 6 vorkommen und für die nichtkatalytische cGMP-Bindung verantwortlich sind, ist PDE10A weder durch cGMP noch durch cAMP stimulierbar. Die niedrigen K_M und V_{\max} -Werte für cAMP lassen jedoch die Möglichkeit offen, dass es sich bei PDE10A *in vivo* um eine cAMP-hemmbarere cGMP-Phosphodiesterase handeln könnte.

Die höchsten Level werden in Gehirn und Hoden detektiert; in Lunge, Herz, Leber und Milz findet man nur sehr wenig bzw. gar keine PDE10-mRNA. Diese PDE-Familie wird im Gegensatz zu PDE8 und PDE9 durch den unspezifischen PDE-Inhibitor IBMX gehemmt. Auch Dipyridamol (hemmt PDE5/6/8/11, s. Abb. 35), Zaprinast (PDE5/6/9, s. Abb. 34) und Rolipram (PDE4, s. Abb. 23) hemmen die PDE10, allerdings nur in wesentlich höheren Konzentrationen als spezifisch für die entsprechenden Isoenzyme. Keine Hemmung wird durch EHNA (PDE2, s. Abb. 20) und Sildenafil (PDE5, s. Abb. 35) erzielt [Soderling et al., 1999].

3.4.12. PDE11

Diese PDE-Familie wurde 2000 erstmals beschrieben. Bei PDE11 handelt es sich um eine dualselektive PDE; für cGMP beträgt der K_M -Wert 0,52 μM und der V_{\max} -Wert 3,9 $\text{pmol} \times (\text{min} \times \text{mg Enzym})^{-1}$, für cAMP 1,04 μM bzw. 3,6 $\text{pmol} \times (\text{min} \times \text{mg Enzym})^{-1}$. Von dem Gen für PDE11A sind mindestens 3 verschiedene Transkripte bekannt. PDE11A weist in der katalytischen Domäne die größte Homologie zu PDE5 auf (50% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz). Im N-terminalen Bereich wird eine potentielle allosterische Bindungsstelle für cGMP bzw. einen anderen kleinen Liganden gefunden. Die höchsten mRNA-Konzentrationen werden in Prostata, Skelettmuskel, Niere, Leber und Hoden detektiert, während in Magen, Uterus, Blase, Kolon, Herz und Dünndarm keine mRNA nachgewiesen werden konnte. PDE11A ist sensitiv gegenüber der Hemmung durch den unselektiven Inhibitor

IBMX ($IC_{50} = 49,8 \mu\text{M}$), Zaprinast ($IC_{50} = 12 \mu\text{M}$) sowie Dipyridamol ($IC_{50} = 0,37 \mu\text{M}$). Keine Hemmung wird bei Einsatz von Milrinon und Rolipram erzielt [Fawcett et al., 2000].

3.5. Pteridine

Pteridine (von griech. pteryx: Feder, Flügel [Römpp Chemie Lexikon]) wurden 1890 von G. Hopkins entdeckt und ihre Struktur von H. Wieland, C. Schöpf (1926) und R. Purmann (1940) aufgeklärt. Zur Isolierung von 40 g Leukoapterin benötigte Wieland 200000 Kohlweißlinge. Die synthetische Verbindung Pteridin (Abb. 36) und ihre häufig in der Natur vorkommenden Derivate stellen eine Gruppe von Verbindungen dar, die ein Pteridin-Ringsystem (Pyrimidino-[4,5b]-pyrazine oder Pyrazin-[2,3d]-pyrimidine) enthalten.

Natürlich auftretende Pteridine sind chemisch verwandt mit Pterin (Abb. 36) (2-Amino-4-oxodihydropteridin) und im Tierreich weit verbreitet. So kommen z.B. in den Pigmenten von



Abb. 36:
Strukturformeln von Pteridin und Pterin.

Insektenflügeln, v.a. Schmetterlingen, Leukoapterin (weißer Farbstoff des Kohlweißlings), Chrysopterin (gelb), Erythropterin (orangerot), Pterorhodin (rot), Ekapterin (farblos) und Lepidopterin (farblos) vor. In Abb. 37 ist ein Zitronenfalter dargestellt, dessen gelbe Flügelfarbe durch Xanthopterin [Römpp Chemie Lexikon] zustande kommt. In den gelben und roten Augenpigmenten von *Drosophila melanogaster* werden z.B. die Derivate Sepiapterin, Iso-

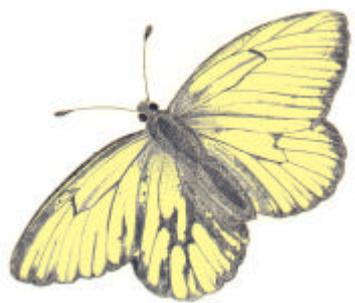


Abb. 37:
Zitronenfalter.

sepiapterin, Drosopterin, Isodrosopterin und Neodrosopterin gefunden. Auch in Fischschuppen, Schlangen- und Amphibienhaut, in bestimmten Algen (*Anacystis nidulans*) und in tierischem und menschlichen Urin kommen Pteridine vor. Außerdem werden Bienenköniginnenlarven von ihrem Volk mit Nahrung gefüttert, die Biopterin und Neopterin enthält. Pteridine bilden häufig Komplexe mit Proteinen und Nukleinsäuren.

Die Synthese von Alkylamino-substituierten Pteridinen basiert ausgehend von 2,4,6,7-Tetrachloropteridin auf der nukleophilen aromatischen Substitution der Chloratome. Für die Reaktion mit sekundären Aminen wurde folgende Reaktivität der Positionen gefunden: C4>C7>C2>C6 [Merz et al., 1998].

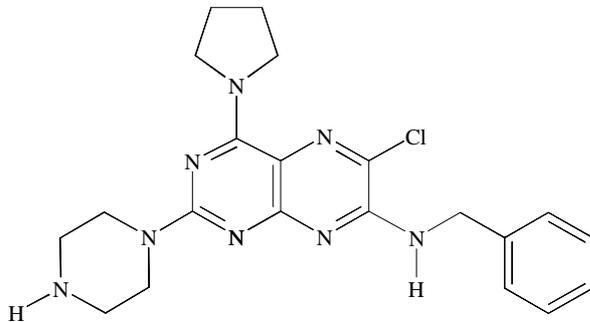


Abb. 38:
Strukturformel von 7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin (DC-TA-46, Verbindung E481).

In B16- (Mausmelanomzellen) und in MCF-7-Zellen (Mammakarzinomzellen) wird durch DC-TA-46 (7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin, auch Verbindung E481 genannt, s. Abb. 38), einen Hemmstoff mit Pteridingrundgerüst, ein dosisabhängiger Wachstumsarrest erzielt. Damit einhergehend war eine Hemmung der PDE4-Aktivität und eine Zunahme der cAMP-Konzentration festzustellen [Drees et al., 1993].

In der hochmalignen Spindelzellkarzinomzelllinie CarB, die einen hohen PDE4-Gehalt aufweist, konnte durch DC-TA-46 Apoptose induziert werden [Marko et al., 1997]. Dies konnte auch an den humanen Lungenxenograft-Zelllinien LXFL529L (Apoptose aus der G1-Phase) und LXFS650L (Apoptose aus G1 und G2) gezeigt werden [Wagner, 1998].

4. PROBLEMSTELLUNG

Viele Tumorzellen zeigen eine gegenläufige Korrelation zwischen Proliferationsgeschwindigkeit und cAMP-Spiegel [Prasad, 1981; Ralph, 1983]. Gleichzeitig wird eine erhöhte PDE-Aktivität beobachtet. So zeigt beispielsweise das hochmaligne Spindelzellkarzinom der Maus (CarB) im Vergleich zu anderen nichttransformierten, neonatal gewonnenen Keratinozyten einen signifikant erniedrigten cAMP-Spiegel und eine erhöhte PDE-Aktivität [Marko et al., 1998]. Hieraus ergibt sich die Frage, ob auch in solidem Tumorgewebe Unterschiede in der PDE-Ausstattung zu beobachten sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte an einem kleinen Spektrum humaner Xenograft-Tumoren exemplarisch die cAMP-hydrolysierende PDE-Aktivität untersucht werden. Ein besonderer Schwerpunkt lag hierbei auf der Frage, ob in allen Tumoren unterschiedlichen Gewebersprungs PDE4 die am stärksten exprimierte Isoenzymfamilie ist und somit ein potentiell therapeutisches Target darstellt.

Ferner sollte untersucht werden, ob tumorassoziiert bislang nicht beschriebene PDE-Isoenzyme exprimiert werden. Bei Vorarbeiten im Arbeitskreis wurde aus soliden Tumoren des großzelligen humanen Xenograft-Tumors LXFL529 eine cAMP-hydrolysierende Fraktion isoliert, die nach SDS-PAGE und Silberfärbung ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa aufwies [Marko, 1994]. Aus der Arbeitsgruppe von Prof. Conti (Stanford, USA) stehen nun Antikörper zur Verfügung, die unterschiedliche Domänen von PDE4-Isoenzymen erkennen. Aufgrund des außergewöhnlich geringen Molekulargewichts von ca. 35 kDa ist von einer stark verkürzten PDE-Isoform oder einem präparationsbedingten Hydrolyseprodukt auszugehen. Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Antikörper sollte geklärt werden, ob es sich bei diesem Protein tatsächlich um ein PDE4-Isoenzym handelt, und welche charakteristischen Domänen enthalten sind.

Für zwei der zu untersuchenden Xenograft-Tumoren standen auch entsprechende Permanent-Zelllinien zur Verfügung. Wirkmechanistische Untersuchungen mit PDE4-Hemmstoffen wurden bislang ausschließlich an solchen Zelllinien durchgeführt. Es stellt sich jedoch die Frage, ob durch fortwährende Passagierung in Zellkultur eine Veränderung der PDE-Ausstattung auftritt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die PDE-Ausstattung dieser Zelllinien mit entsprechendem solidem Tumorgewebe vergleichend untersucht werden, um Anhaltspunkte dafür zu erhalten, inwieweit die Ergebnisse *in vitro* auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind.

Der cAMP-Gehalt von Zellen kann während des Zellzyklus periodischen Schwankungen unterliegen [Millis et al., 1974]. Dies könnte auf einer gegenläufigen, ebenfalls periodischen Oszillation der PDE-Aktivität beruhen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche Oszillation der PDE-Aktivität in den verschiedenen Zellkompartimenten (Cytosol, Partikular) im Laufe des Zellzyklus untersucht werden. Als Testsystem sollten zuvor synchronisierte

LXFL529L-Zellen genutzt werden. Zur Untersuchung, ob die Methode der Synchronisation bzw. die Phase, in der arretiert wird, eine Rolle spielt, sollten zwei verschiedene Arten der Synchronisation, Serumentzug und Nocodazolbehandlung durchgeführt werden. Zur Untersuchung, ob nicht Isoenzyme der PDE4-Familie während des Zellzyklus in ihrer Aktivität verändert werden, sollte der Gehalt von PDE4 während der verschiedenen Zellzyklus-Phasen bestimmt werden.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung der Hemmwirkung von Pteridinderivaten auf isolierte PDE4 aus soliden Tumoren im Vergleich zu Zellkulturen. Der potente PDE4-Hemmstoff DC-TA-46 zeigt an isolierter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe einen IC_{50} -Wert von $0,016 \mu\text{M}$ [Merz et al., 1998]. Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen wird jedoch erst mit einem IC_{50} -Wert von $2,3 \mu\text{M}$ beobachtet. Um die Diskrepanz in der Wirkkonzentration zu erklären, sollte untersucht werden, ob sich PDE-Präparationen aus Tumorgewebe und Zelllinie in ihrer Sensitivität gegen DC-TA-46 unterscheiden. Ferner sollte der Frage nachgegangen werden, ob DC-TA-46 auch in der Zelle die PDE-Aktivität hemmt. Diese Untersuchungen sollten vergleichend an zwei humanen Tumormodellen, dem großzelligen Lungenkarzinom LXFL529 und dem kleinzelligen Lungenkarzinom LXFS650, die sich *in vitro* hinsichtlich der wachstumshemmenden Wirkung von DC-TA-46 unterscheiden, durchgeführt werden.

Um zu klären, ob die Bestimmung der Hemmwirkung in der Zelle einen wichtigen Parameter für die Wirksamkeitsprüfung darstellt, sollte für ein Spektrum von DC-TA-46-Derivaten die Hemmwirkung an isolierter PDE4 sowie die Hemmwirkung auf die PDE-Aktivität in der Zelle bestimmt und der wachstumshemmenden Wirkung im Sulforhodamin B-Test gegenübergestellt werden. Bisherige Arbeiten im Arbeitskreis zeigten, dass sich DC-TA-46 in Membranstrukturen des endoplasmatischen Retikulums anreichert [Marko et al., 1997]. Der Hauptteil der PDE-Aktivität ist jedoch im Cytosol lokalisiert, was wesentlich zur Reduktion der Wirkung der Substanz beitragen kann. Ein wichtiger Grund für die Synthese der neuen Derivate war deshalb eine Reduktion der Lipophilie mit dem Ziel der verstärkten cytosolischen Lokalisierung. Mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte deshalb ergänzend dargestellt werden, ob es Anhaltspunkte dafür gibt, dass die neusynthetisierten Derivate im Vergleich zu DC-TA-46 eine veränderte subzelluläre Lokalisation aufweisen.

In vitro führt die Behandlung von Tumorzellen mit DC-TA-46 zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und zur Induktion von Apoptose [Wagner, 1998; Marko et al., 1998]. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist bislang nicht bekannt. Einen wichtigen Faktor bei einer Arretierung in der G1-Phase stellen häufig Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren dar. In BAC1.2F5A-Makrophagen wurde nach Behandlung mit cAMP-erhöhenden Agentien eine Induktion von $p27^{\text{kip1}}$, einem Mitglied der p21-Familie beschrieben [Kato et al., 1994]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob durch Behandlung mit DC-TA-46 die Expression der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren $p21^{\text{cip1}}$ und $p27^{\text{kip1}}$ induziert

wird. Diese Arbeiten sollen einen Beitrag zur Untersuchung des Wirkmechanismus von DC-TA-46 liefern.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1. PDE-Aktivität und PDE4-Gehalt humaner Xenograft-Tumoren

5.1.1. PDE-Aktivität

Eine Reihe von Untersuchungen zur PDE-Isoenzymausstattung verschiedener Gewebe und Zelllinien zeigte, dass abhängig vom Gewebersprung und Spezies große Unterschiede im Gehalt an PDE-Aktivität und der Isoenzymverteilung auftreten können [Nicholson et al., 1991]. Verschiedene Zelllinien und solide Tumoren unterschiedlichen Gewebersprungs weisen deutlich unterschiedliche Werte der PDE-Gesamtaktivität auf [Marko, 1994]. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob sich verschiedene Xenograft-Tumoren unterschiedlichen Gewebersprungs signifikant in ihrer PDE-Ausstattung unterscheiden.

Bei Xenograft-Tumoren handelt es sich um humane Tumoren, die chirurgisch entnommen wurden. Nach Befreiung von Resten des umliegenden Gewebes und Nekrosen wird das Tumormaterial in Zellen vereinzelt und in Kultur genommen. Durch meist dorsale Implantation in immundefiziente Nacktmäuse können im Idealfall solide Tumoren erzeugt werden, was *in-vivo* Untersuchungen antineoplastischer Wirkstoffe an humanen Tumoren erlaubt. Oft werden nur geringe Veränderungen im Vergleich zum ursprünglichen Tumorgewebe beobachtet, allerdings können speziesbedingte Unterschiede hinsichtlich Resorption, Metabolismus oder Metastasierung die Übertragbarkeit der Ergebnisse erschweren. Die Verwendung von Xenograft-Tumoren hat verglichen mit chirurgisch entnommenen Material den Vorteil, dass durch Implantation in Nacktmäuse größere Mengen identischen Gewebes zur Verfügung stehen [Fiebig et al., 1992].

Im folgenden werden die untersuchten Tumoren kurz charakterisiert:

Das großzellige Bronchialkarzinom **LXFL529L** (Lung Xenograft Fiebig Large 529) entstammt einer 34-jährigen Patientin und wurde nicht mit Antitumormitteln vorbehandelt. Die entnommenen Zellen waren hyperdiploid. Nach Entnahme des Tumors betrug die Überlebenszeit der Patientin noch 115 Tage, wobei ein regionaler Lymphknotenbefall, jedoch keine erkennbare Metastasierung festzustellen war. Seit April 1984 wird das großzellige Karzinom in Nacktmäusen passagiert. Bei diesen Zellen beträgt die Verdopplungszeit bei subkutanem Wachstum 5 Tage [Fiebig et al.; 1992].

Das kleinzellige Lungenkarzinom **LXFS650** (Lung Xenograft Fiebig Small 650) entstammt einem 64-jährigen Patienten. Der Primärtumor wurde vor Entnahme in sechs Zyklen mit einer

Kombination aus Adriamycin, Cyclophosphamid und Vincristin behandelt, wodurch eine partielle Remission erreicht wurde. Die entnommenen Zellen waren polyploid. Anschließend wurden 3 Behandlungszyklen mit Etoposid und Cis-Platin durchgeführt. Der wiederkehrende Tumor wurde anschließend mittels Radiotherapie behandelt. Neben dem Primärtumor zeigten sich Hautmetastasen, die zur Xenograftgewinnung entnommen wurden. Die Überlebensdauer des Patienten betrug nach Entnahme noch 53 Tage. Der Tumor wird seit Juni 1985 auf Nacktmäusen passagiert. Die Verdopplungszeit beträgt nach subkutaner Implantation 6 Tage [Fiebig et al.; 1992].

Das colorektale Tumorxenograft **CXF280** (Colorectal Xenograft Fiebig 280) entstammt einer 55-jährigen Patientin. Es handelte sich um ein undifferenziertes metastasierendes Adenokarzinom. Neben dem Primärtumor entwickelten sich Hautmetastasen, die zur Xenograftgewinnung herangezogen wurden. Der Primärtumor erfuhr keine chemotherapeutische Vorbehandlung. Die Überlebenszeit der Patientin betrug nach Entnahme der Hautmetastasen 175 Tage. Das Xenograft wird seit 1982 in Nacktmäusen passagiert. Die Verdopplungszeit beträgt bei subkutanem Wachstum 7 Tage [Fiebig et al.; 1992].

Das Tumorxenograft **LXFA629**, bei dem es sich um ein Adenokarzinom der Lunge handelt, wurde einem 59-jährigen Mann entnommen (hyperdiploide Zellen). Der Primärtumor erfuhr keinerlei Vorbehandlung. Die Überlebenszeit des Patienten nach Tumorentnahme betrug 101 Tage, wobei ein regionaler Lymphknotenbefall, jedoch keine erkennbare Metastasierung festzustellen war. Seit April 1985 wird der Tumor in Nacktmäusen passagiert. Seine Verdopplungszeit beträgt 11 Tage [Fiebig et al.; 1992].

Zum Pankreaskarzinom **PAXF736** und zum Mammakarzinom **MAXF/MX1** liegen keine genaueren Daten vor.

Das renale Karzinom **RXF1220** wurde einem 58-jährigen Mann entfernt, der dabei verstarb. Seit Februar 1989 wird das Karzinom in Nacktmäusen passagiert, wobei seine Verdopplungszeit 5 Tage beträgt [Fiebig et al.; 1992].

Bei **RXF631** handelt es sich ebenfalls um ein renales Karzinom, das einem männlichen 55-jährigen Patienten entnommen wurde. Die Überlebenszeit betrug 42 Tage. Seit Mai 1995 wird der Tumor in Nacktmäusen passagiert. Die Verdopplungszeit beträgt 7 Tage [Fiebig et al.; 1992].

Die Messungen wurden nach der Methode von Pöch (1972) unter Verwendung von [³H]-cAMP durchgeführt. Dabei wurde die Gesamt-PDE-Aktivität, d.h. der Gehalt aller cAMP-hydrolysierenden PDEs bestimmt (PDE1,2,3,4,7,8,10,11). Die Ergebnisse der Untersuchungen zur PDE-Gesamtaktivität der verschiedenen Xenograft-Tumoren sind in Tabelle 6 und Abb. 39 dargestellt.

Tabelle 6:
cAMP-hydrolysierende PDE-Gesamtaktivität verschiedener Tumoren.

Xenograft-Tumor	cAMP-hydrolysierende PDE-Gesamtaktivität [pmol x (min x mg Protein) ⁻¹]		
	Cytosol	Partikular	Rest
LXFL529	1074,9 ± 164,9	276,0 ± 70,9	5,4 ± 1,7
LXFS650	151,4 ± 4,8	22,2 ± 0,5	9,8 ± 0,6
LXFA629	179,5 ± 7,8	34,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0
RXF1220	106,9 ± 2,4	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0
RXF631	164,2 ± 0,8	123,9 ± 5,6	5,3 ± 0,4
MAXF/MX1	143,5 ± 21,0	70,1 ± 4,0	21,7 ± 0,9
CXF280	65,2 ± 0,5	7,0 ± 0,0	2,2 ± 0,1
PAXF736	45,3 ± 2,1	5,9 ± 0,6	0,0 ± 0,0

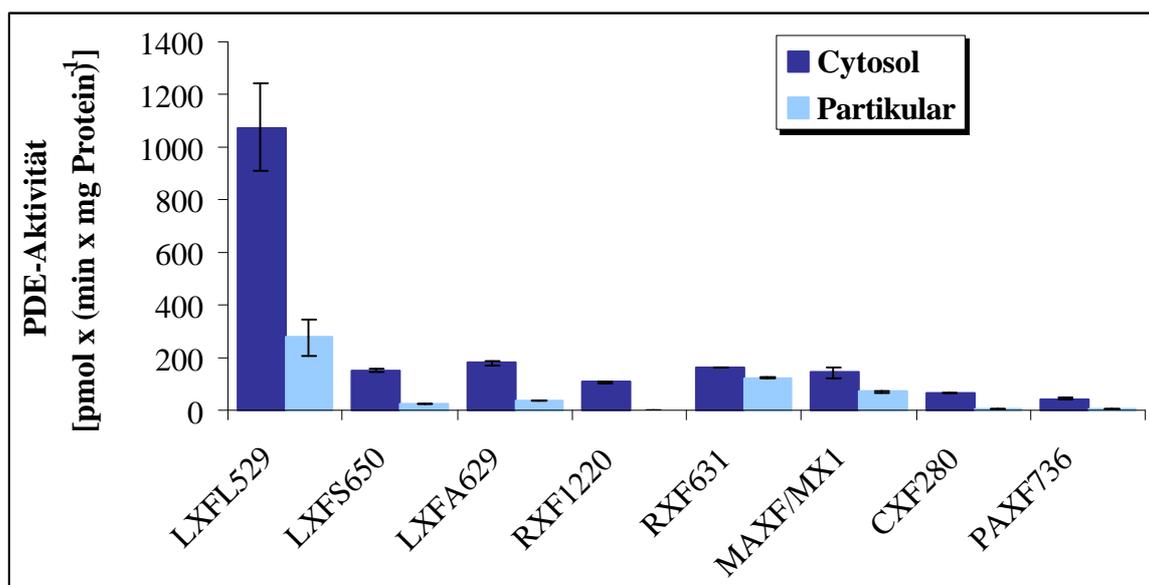


Abb. 39:
cAMP-hydrolysierende PDE-Aktivität verschiedener humaner Xenograft-Tumoren.

5.1.1.1. Cytosol

LXFL529-Tumorgewebe zeigt deutlich mehr cAMP-hydrolysierende Aktivität im Cytosol als alle anderen untersuchten Gewebe. Die cytosolische PDE-Aktivität des Adenokarzinoms der Lunge LXFA629 ist 6-fach geringer als die bei LXFL529 gemessene und stellt den zweithöchsten Wert dar. Eine mit LXFA629 vergleichbare PDE-Gesamtaktivität weisen LXFS650-, RXF631- und MAXF/MX1-Xenograftgewebe auf, allerdings ist hier die PDE-Aktivität bereits ungefähr um den Faktor 7 niedriger als die von LXFL529. RXF1220 zeigt mit

einem Wert von $106,9 \text{ pmol} \times (\text{min} \times \text{mg Protein})^{-1}$ eine um den Faktor 10 reduzierte Gesamt-PDE-Aktivität im Vergleich zu LXFL529. Interessant ist, dass sich die beiden renalen RXF-Tumoren bezüglich der cAMP-hydrolysierenden Aktivität deutlich voneinander unterscheiden. Auch die drei Lungenkarzinome LXFL529, LXFS650 und LXFA629 zeigen verschiedene PDE-Aktivitäten. Die geringste Aktivität weisen das kolorektale Karzinom CXF280 und das Pankreaskarzinom PAXF736 auf.

5.1.1.2. Partikular

Auffällig ist, dass die partikuläre Fraktion aller Tumoren deutlich weniger cAMP-hydrolysierende PDE-Aktivität enthält als das Cytosol. Die Reduktion liegt dabei zwischen dem Faktor 1,3 für RXF631, 2 für MAXF/MX1, 4 für LXFL529, 7 bei RXF631 und 9 für CXF280. LXFA629 weist im Partikular 23mal weniger PDE-Aktivität als im Cytosol auf, und bei RXF1220 wird im Partikular sogar nur noch ein Hundertstel der PDE-Gesamtaktivität des Cytosols gemessen. Die bereits für das Cytosol beschriebenen Ergebnisse gelten weitgehend auch für die partikuläre Fraktion der Zelllinien bzw. Tumoren: Auch im Partikular weist das Tumorgewebe von LXFL529 die höchste PDE-Aktivität auf, während LXFA629 an zweiter Stelle steht. Der dritthöchste Wert wird ebenfalls wieder bei RXF631 gemessen, gefolgt von LXFS650. Auch hier unterscheiden sich die drei Lungentumoren LXFL529, LXFA629 und LXFS650 sowie die renalen Tumoren RXF1220 und RXF631 bezüglich der cAMP-hydrolysierenden Aktivität deutlich voneinander, obwohl sie jeweils dem gleichen Organ, wenn auch im Falle der Lungentumoren aus unterschiedlichen Gewebepopulationen, entstammen.

5.1.2. Rolipram-Hemmbarkeit

Die Kenntnis der im Gewebe exprimierten Isoenzyme ist beim potentiellen Einsatz von isoenzymselektiven Inhibitoren zur Behandlung von Krankheiten sehr wichtig, um ein optimales Ergebnis zu erzielen bzw. um unerwünschte Nebenwirkungen bei einer Therapie zu vermeiden [Torphy, 1998]. Eine zentrale Frage war, ob in allen hier untersuchten Xenograft-Tumoren PDE4 die am stärksten exprimierte Isoenzymfamilie darstellt. Der Gehalt an PDE4 wurde bestimmt als der Anteil der cAMP-hydrolysierenden Aktivität, der durch Zugabe des selektiven Hemmstoffs Rolipram gehemmt wird.

Rolipram hemmt alle PDE4-Isoenzyme mit einem IC_{50} von $0,1-2 \mu\text{M}$ [Beavo et al., 1990], die anderen PDE-Familien werden nicht oder nur sehr schwach gehemmt ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$) [O'Donnell et al., 1999]. Die Endkonzentration von Rolipram im Reaktionsansatz beträgt $10 \mu\text{M}$. Bei dieser Konzentration kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der bestimmten Rolipram-hemmbareren PDE um PDE4 handelt.

Die Ergebnisse der Rolipram-Hemmbarkeit sind in Tabelle 7 und Abb. 40 zusammengestellt.

Tabelle 7:

Rolipram-Hemmbarkeit verschiedener humaner Tumoren; n.b.: nicht bestimmt.

Xenograft-Tumor	Rolipram-Hemmbarkeit [%]	
	Cytosol	Partikular
LXFL529	83,7 ± 4,1	78,5 ± 7,4
LXFS650	68,5 ± 3,2	62,4 ± 3,3
LXFA629	44,7 ± 16,9	47,4 ± 19,0
RXF1220	65,8 ± 7,0	73,6 ± 8,0
RXF631	40,1 ± 1,5	33,0 ± 1,0
MAXF/MX1	29,1 ± 2,0	22,6 ± 0,1
CXF280	49,9 ± 6,6	n.b.
PAXF736	47,9 ± 14,7	60,4 ± 1,3

Der höchste prozentuale Gehalt von Rolipram-hemmbarer PDE wird im Cytosol von LXFL529-Tumorgewebe gefunden, das ca. 900 pmol x (min x mg Protein)⁻¹ PDE4-Aktivität enthält. Auch im Partikular wird mit 217 pmol x (min x mg Protein)⁻¹ eine große Menge detektiert. Damit weist LXFL529-Tumorgewebe sowohl relativ als auch absolut die höchste PDE4-Aktivität auf. In LXFS650-Tumorgewebe ist sowohl der prozentuale als auch der absolute Gehalt an Rolipram-hemmbarer PDE deutlich geringer als in LXFL529. Der Anteil PDE4-Aktivität im Partikular von LXFL-529 Tumorgewebe liegt prozentual in der gleichen Größenordnung wie im Cytosol. Die PDE4-Aktivität beträgt im Cytosol von LXFS650 ca. 104 pmol x (min x mg Protein)⁻¹ und im Partikular ca. 14 pmol x (min x mg Protein)⁻¹.

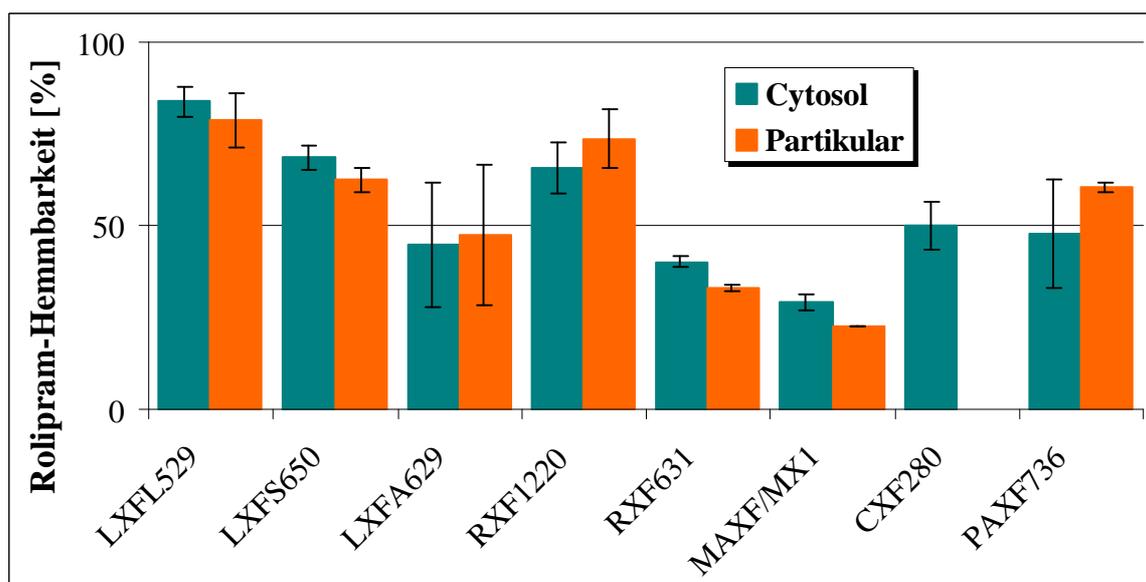


Abb. 40:

Rolipram-Hemmbarkeit verschiedener humaner Xenograft-Tumoren.

Im Tumorgewebe LXFA629 stellt PDE4 sowohl im Cytosol als auch in der partikulären Fraktion lediglich die Hälfte der Gesamt-PDE-Aktivität dar. Vergleichbare Werte werden auch im Cytosol von PAXF736 detektiert, während die PDE4-Aktivität im Partikular etwas höher ist. Bei RXF1220 liegt der PDE4-Gehalt im Cytosol ungefähr bei 66% der Gesamt-PDE-Aktivität, auch im Partikular werden ähnliche Werte erreicht.

Extrem wenig Rolipram-hemmbarere PDE zeigen die Xenografts RXF631 und MAXF/MX1. Bei RXF631 werden nur noch 40,1% der cytosolischen bzw. 33% der partikelgebundenen PDE-Aktivität durch Rolipram gehemmt, bei MAXF/MX1 im Cytosol sogar lediglich 29,1% der cAMP-hydrolysierenden Aktivität durch Rolipram inhibiert. Im Partikular liegt der Wert bei MAXF/MX1 sogar noch niedriger (22,6%).

5.1.3. Zusammenfassung

Bei der Untersuchung verschiedener Tumoren konnten deutliche Unterschiede bezüglich der PDE-Aktivität und des PDE4-Gehalts detektiert werden. Auch unterschiedliche Tumoren des gleichen Organs zeigen verschiedene Werte. Verglichen mit allen anderen Tumoren weist LXFL529-Tumorgewebe (Cytosol und Partikular) die höchste cAMP-hydrolysierende Aktivität auf. Den größten Anteil an der Gesamt-PDE-Aktivität in LXFL529-Tumorgewebe haben Isoenzyme der PDE4-Familie. LXFS650-Tumorgewebe besitzt weniger PDE-Gesamtaktivität als LXFL529, auch der PDE4-Gehalt ist niedriger. Am wenigsten PDE-Aktivität wird in den Xenograft-Tumoren CXF280 und PAXF736 gemessen, PDE4 stellt dort lediglich die Hälfte der Gesamtaktivität dar. Die geringsten Gehalte (29,1%) an Rolipram-hemmbarer PDE-Aktivität konnten im Mammakarzinom MAXF/MX1 nachgewiesen werden.

5.2. Untersuchungen zur PDE-Ausstattung des Xenograft-Tumors LXFL529

Solides Tumorgewebe des humanen großzelligen Lungentumor-Xenografts enthält von allen bislang im Arbeitskreis untersuchten soliden Tumoren und Zelllinien mit Abstand die höchste cAMP-hydrolysierende Aktivität (s. Kapitel 5.1.). Bei der Aufreinigung von PDE4 aus dem Cytosol von LXFL529-Tumormaterial werden nach Anionenaustauschchromatographie 3 Aktivitätspeaks detektiert. Mit Hilfe isoenzymspezifischer Modulatoren konnten diese als PDE1 (1. Peak), PDE4 (2. Peak) und PDE3 (3. Peak) identifiziert werden. Eine weitere Aufreinigung des mittleren Aktivitätspeaks mittels Ultrafiltration und Gelfiltration liefert erneut nicht nur einen, sondern zwei Aktivitätspeaks, die nach ihrer Elutionsreihenfolge nummeriert wurden.

Peak1 zeigte IC_{50} -Werte von $0,16 \mu\text{M}$ für die Hemmung durch Rolipram [Marko, 1994] und lag damit in dem für PDE4 charakteristischen Konzentrationsbereich von $0,1\text{-}2 \mu\text{M}$ [Beavo et al., 1990]. Der IC_{50} -Wert für DC-TA-46 betrug $0,11 \mu\text{M}$. Peak2 wies IC_{50} -Werte von $1 \mu\text{M}$ (Rolipram) und $0,029 \mu\text{M}$ (DC-TA-46) auf. Beide Aktivitätsspeaks gehören also zur Rolipram-sensitiven PDE4-Familie [Marko, 1994]. Die Molekulargewichte wurden bereits 1994 von Marko nach Gelelektrophorese und Silberfärbung als ca. 90 kDa (Peak1) bzw. $35\text{-}37 \text{ kDa}$ (Peak2) bestimmt. Die Proteinbande bei ca. 90 kDa stellt möglicherweise PDE4D3 dar, deren Größe in der Literatur mit $93\text{-}95 \text{ kDa}$ beschrieben wird [Houslay et al., 1999; Méhats et al., 1999]. Eine PDE mit einem Molekulargewicht unter 50 kDa ist bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Weiterhin fand Eyschen im Rahmen ihrer Diplomarbeit (1999), dass in LXFL529-Tumormaterial in der Sequenz der PDE4D3 ein Stop-Codon vorhanden sein könnte, so dass im Tumor die Expression einer am C-Terminus verkürzten Form dieses Proteins zu erwarten wäre. Die Aminosäuresequenz dieser verkürzten Form wurde aus der Lage des Stop-Codons in der DNA auf 396 Aminosäuren bestimmt. Bislang ist jedoch unklar, ob diese trunke PDE in LXFL529-Tumormaterial tatsächlich exprimiert wird, bzw. ob das verkürzte Enzym cAMP-hydrolysierende Aktivität besitzt. Da für Western Blot Analysen inzwischen Antikörper für unterschiedliche Domänen der PDE-Isoenzymfamilie (K110, K116 und M3S1) zur Verfügung standen, sollte nun untersucht werden, ob die von Marko (1994) mittels Silberfärbung detektierten Banden auch mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können, bzw. ob die Bande bei $35\text{-}37 \text{ kDa}$ überhaupt eine PDE darstellt. Die Untersuchungen sollten weiterhin zeigen, ob es sich bei diesem Protein möglicherweise um die verkürzte Form der PDE4D3 handelt, deren Gen das Stop-Codon zu enthalten scheint.

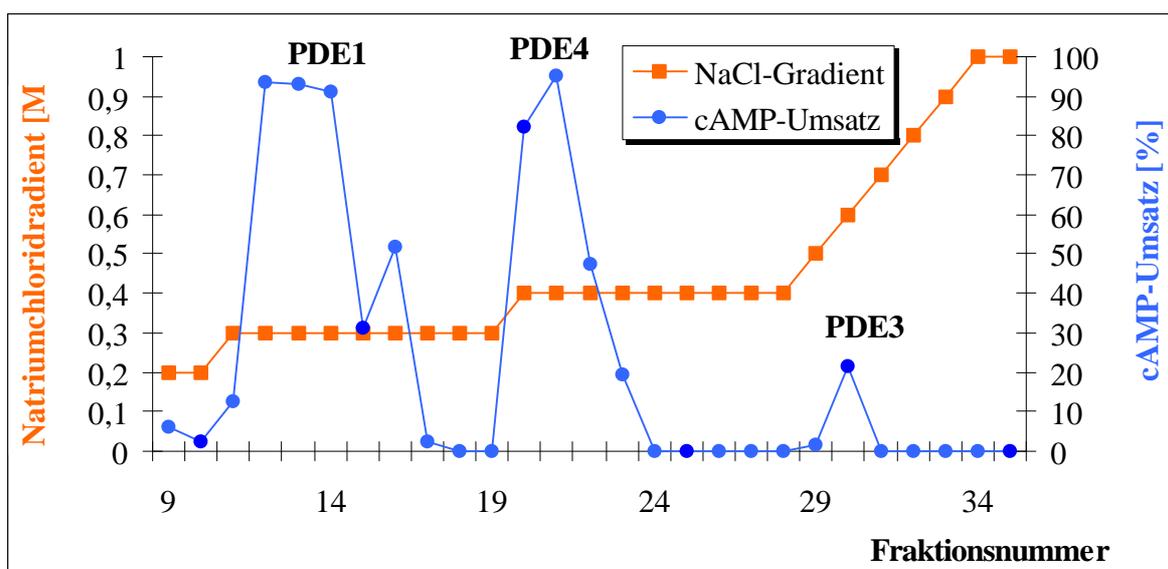


Abb. 41:
Aktivitätsprofil eines Laufs der Anionenaustauschchromatographie.

Wie bereits von Marko (1994) beschrieben, lieferte auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Anionenaustauschchromatographie 3 Aktivitätspeaks, die als PDE1, PDE4 und PDE3 identifiziert wurden. Abb. 41 zeigt ein typisches Aktivitätsprofil eines Anionenaustauschchromatographie-Laufs. Neben dem cAMP-Umsatz der einzelnen Fraktionen ist der stufenweise Natriumchloridgradient aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit beträgt 2 ml/min, gesammelt wurden jeweils 5 ml/Fraktion.

Analog zu den Untersuchungen von Marko (1994) wurde mit den Fraktionen 20-22 des mittleren Peaks (PDE4), die die höchste PDE-Aktivität aufwiesen, eine Silberfärbung durchgeführt (Abb. 42). Die Silberfärbung der 3 Fraktionen mit der höchsten PDE-Aktivität zeigt in Fraktion 20 eine starke Bande bei ca. 60 kDa. Eine schwächere Bande ist bei ca. 90 kDa sowie eine Doppelbande bei ca. 33-34 kDa zu sehen. In Fraktion 21 ist die Bande bei 60 kDa abgeschwächt, die 90er Bande jedoch stärker, während das Signal bei 33-34 kDa nahezu unverändert ist. Fraktion 22 weist ebenfalls Banden bei ca. 90 sowie ca. 33-34 kDa auf; die 60er Bande ist nur noch schwach zu erkennen. Western Blot Analysen sollten klären, ob es sich bei der Doppelbande bei ca. 33-34 kDa um eine native PDE oder eher um ein proteolytisches Fragment handelt. Die Bande bei 60 kDa könnte die verkürzte Form der PDE4D3 darstellen, deren DNA ein Stop-Codon enthält, oder andere kurze PDE-Formen wie z.B. PDE4D1 oder PDE4D2. Möglicherweise handelt es sich jedoch bei den Banden bei ca. 60 und 33-34 kDa um proteolytische Fragmente des 90 kDa großen Proteins.

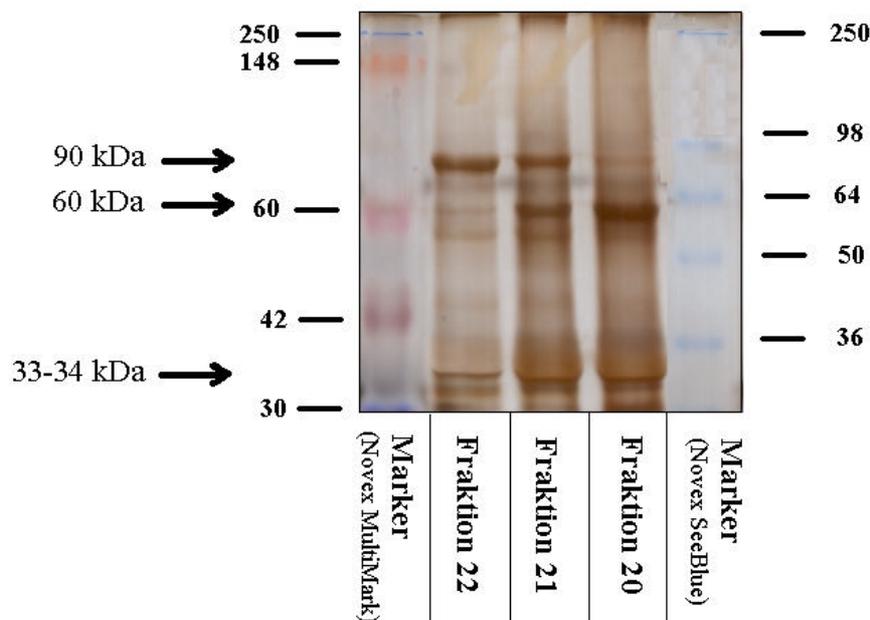


Abb. 42: Silberfärbung des mittleren Peaks des Anionenaustauschchromatographie vom Cytosol des Xenograft-Tumors LXFL529; die detektierten Banden zeigen ein Molekulargewicht von ca. 90, 60 sowie 33 und 34 kDa.

Zur weiteren Untersuchung der PDE-Ausstattung von LXFL529-Tumorgewebe wurden die Fraktionen des mittleren Aktivitätspeaks zur Auftrennung auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels Western Blot detektiert. Die im folgenden dargestellten Western Blots wurden mit den Antikörpern K110 (polyklonal und unspezifisch gegen alle PDE4-Isoenzyme, Epitop in der katalytischen Domäne), K116 (polyklonal und unspezifisch gegen alle PDE4-Isoenzyme mit geringfügiger Präferenz für PDE4D [Conti et al., 1995], Epitop im aminoterminalen Bereich) sowie M3S1 (monoklonal gegen PDE4D, Epitop teilweise in der katalytischen Domäne) durchgeführt (Abb. 43). Diese wurden freundlicherweise von Prof. Conti, Stanford, USA, zur Verfügung gestellt.

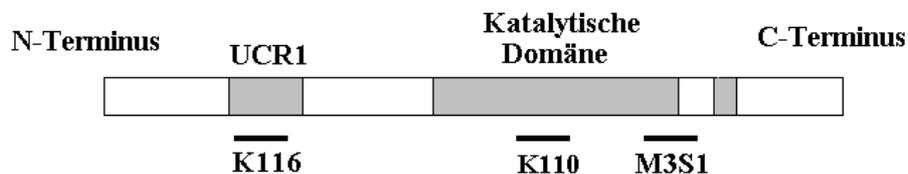


Abb. 43:
Epitope der Antikörper K116 (polyklonal), K110 (polyklonal) und M3S1 (monoklonal) in PDE4 [Iona et al., 1998; Conti et al., 1995; Saldou et al., 1998].

Die Auswahl dieser Antikörper erfolgte nach der Lage der Epitope: Fehlt dem verkürzten Fragment der PDE4D3 aufgrund des Stop-Codons ein carboxyterminaler Teil der katalytischen Domäne, so ist zu erwarten, dass das exprimierte Protein lediglich durch K116 sowie möglicherweise K110 erkannt wird. K116 erkennt weiterhin nur solche PDE4-Formen, die UCR1 enthalten. Im Gegensatz dazu erkennt K110 auch PDE4-Isoenzyme, die keine UCR1 besitzen. M3S1 ist gegen die katalytische Untereinheit gerichtet, das Epitop dieses Antikörpers liegt weiter downstream als die Epitope von K110 und K116. Wenn das PDE4D3-Isoenzym, dessen Sequenz ein Stop-Codon enthält, vom carboxyterminalen Ende her verkürzt wäre, sollte M3S1 das Fragment nicht mehr erkennen, da das Epitop dieses Antikörpers in der trunkierten PDE4D3 nicht mehr vorhanden wäre.

Mit K116 wurde nach der Anionenaustauschchromatographie der in Abb. 44 dargestellte Western Blot erhalten. Deutlich zu erkennen sind die beiden Banden des Markers (Novex MultiMark) bei 148 und 42 kDa. Die nachgewiesenen Proteine zeigen eine Größe von ca. 95, 60 und 30 kDa. In den Fraktionen 20 und 21 zeigen die Banden bei ca. 95 und ca. 30 kDa die größte Intensität. In Fraktion 22 und 23 ist die Bande bei ca. 30 kDa nicht mehr zu erkennen, auch die Intensität derjenigen bei ca. 95 kDa hat deutlich abgenommen. Dort tritt nun eine weitere Proteinbande bei ca. 60 kDa auf.

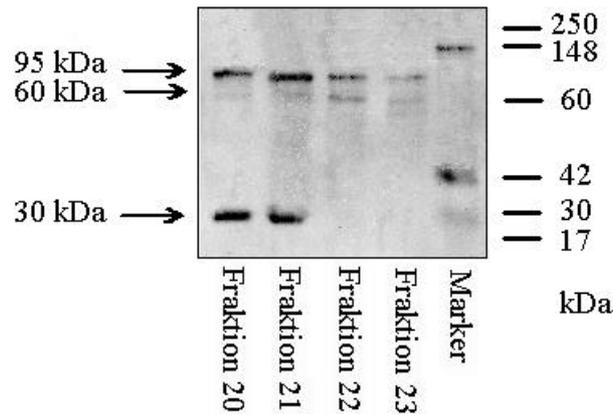


Abb. 44:

Western Blot der Anionenaustauschchromatographieproben mit dem Antikörper K116; die detektierten Banden sind ca. 95, 60 und 30 kDa groß; Marker: Novex MultiMark. Die höchste cAMP-hydrolysierende Aktivität befand sich in Fraktion 20 und 21.

Alle PDEs, die durch den Antikörper K116 erkannt werden, enthalten UCR1. Da kurze Formen der PDE4D (PDE4D1 oder PDE4D2) keine UCR1 enthalten, muss es sich bei den Banden bei ca. 60 kDa um andere PDEs handeln. Dies könnten z.B. kurze PDE4-Formen der Größe von ungefähr 60 kDa sein, die UCR1 enthalten. In der Literatur wurden bislang jedoch keine solchen Formen beschrieben. Weiterhin könnte es sich auch um die trunkeerte Form von PDE4D3 handeln, die aufgrund des Stop-Codons am 3'-Ende verkürzt ist, jedoch UCR1 enthält. Das Protein der Bande bei 30 kDa muss ebenfalls UCR1 enthalten, da es von K116 erkannt wird. Aufgrund des äußerst geringen Molekulargewichts erscheint es demnach unwahrscheinlich, dass dieses Protein auch die vollständige katalytische Domäne enthält und PDE-Aktivität aufweist. Bei diesem Protein handelt es sich möglicherweise nicht um eine native PDE, sondern um ein proteolytisches Fragment des 5'-Endes (z. B. des Proteins mit ca. 60 kDa). Die Banden bei ca. 60 kDa und bei ca. 30 kDa können also nicht proteolytische Fragmente des gleichen Proteins (z.B. PDE4D3) sein; d.h. außer PDE4D3 muss zumindest eine weitere UCR1-enhaltende PDE-Isoform vorliegen.

Auch mit dem Antikörper K110 wurden Western Blots durchgeführt. Abb. 45 zeigt Proteinbanden mit ähnlichen Molekulargewichten, wie sie bereits mit K116 (Abb. 44) detektiert wurden. Fraktion 20 weist nur eine Bande auf, deren Größe bei ungefähr 60 kDa liegt. Fraktion 21 enthält nicht nur eine ca. 60 kDa große PDE, sondern 2 weitere Formen, die ca. 95 und 30 kDa groß sind. In den Fraktionen 22 und 23 wird wieder nur die Bande bei ungefähr 60 kDa sichtbar. Auch hier ist die des Markerbande (Novex MultiMark) bei 42 kDa deutlich zu erkennen.

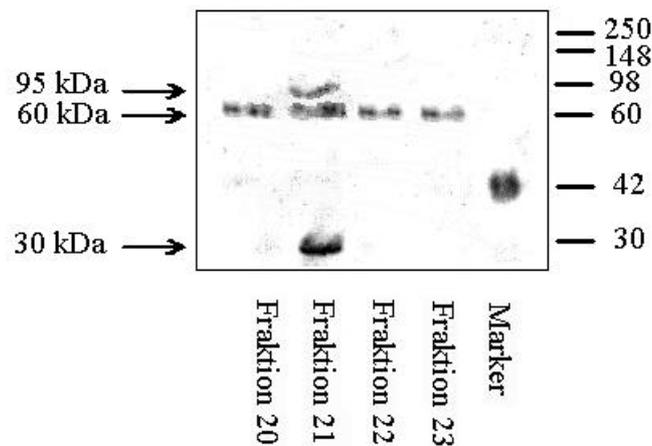


Abb. 45:

Western Blot der Anionenaustauschchromatographie-Proben mit dem Antikörper K110; die detektierten Banden sind ca. 95, 60 und 30 kDa groß; Marker: Novex MultiMark (Bande bei 42 kDa wurde vom Antikörper erkannt). Die höchste cAMP-hydrolysierende Aktivität befand sich in Fraktion 20 und 21.

Bei der Bande bei ca. 95 kDa könnte es sich um PDE4D3 handeln. Eine Proteinbande dieser Größe wurde in der gleichen Fraktion (21) auch mit dem Antikörper K116 detektiert (s. Abb. 44).

Die 60er Bande könnte auch hier wieder durch eine andere kurze Form der PDE4 zustande kommen, allerdings kann sie auch PDE4D1 oder PDE4D2 darstellen, da der Antikörper K110 kurze PDE-Formen erkennt, die keine UCR1 enthalten. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es sich um die am C-Terminus verkürzte PDE4D3 handelt, in deren Sequenz ein Stop-Codon detektiert wurde.

Die Bande bei ca. 30 kDa muss die katalytische Einheit enthalten. Bei diesem Protein handelt es sich möglicherweise nicht um eine native PDE, sondern um ein proteolytisches Fragment (z. B. der ca. 60 kDa großen PDE), das nicht mit dem durch K116 nachgewiesenen Protein bei 30 kDa übereinstimmen muss.

Auch hier wurde bestätigt, dass außer der full-length PDE4D3 mindestens eine weitere PDE4 vorliegen muss, um die erhaltenen Banden erklären zu können.

Zur weiteren Untersuchung wurde mit dem Cytosol von LXFL529-Tumormaterial nach der Anionenaustauschchromatographie ein weiterer Aufreinigungsschritt mittels Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurden die Fraktionen des mittleren Aktivitätspeaks zunächst durch Ultrafiltration aufkonzentriert und anschließend auf eine Gelfiltrationssäule appliziert.

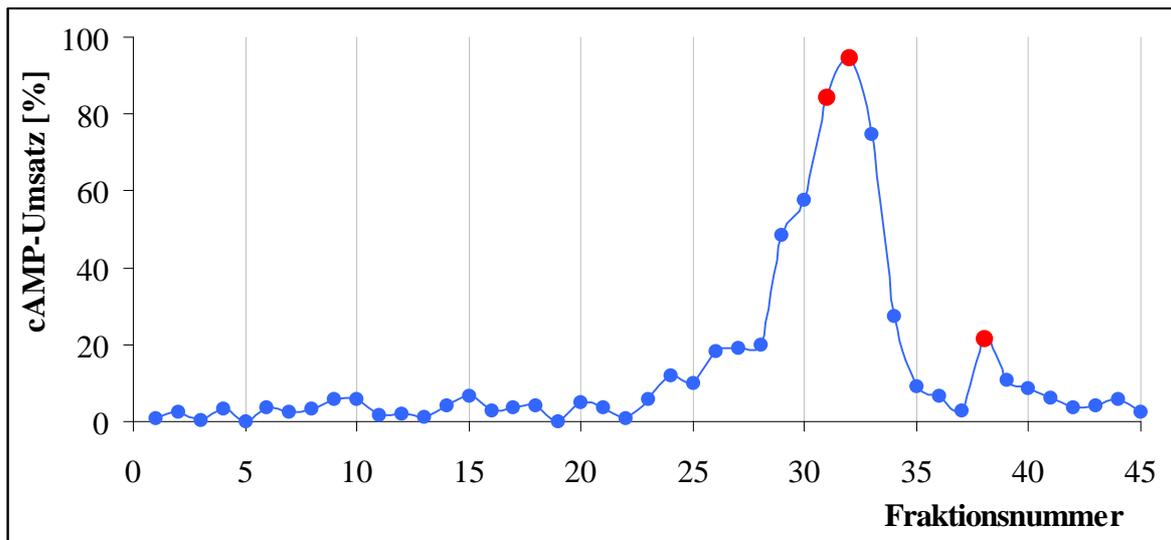


Abb. 46:
Beispiel-Chromatogramm eines Gelfiltrationslaufs. Die rot gekennzeichneten Aktivitätspeaks (Fraktion 31 und 32 sowie Fraktion 38) wurden weiterführend charakterisiert.

Abb. 46 zeigt exemplarisch ein typisches Aktivitätsprofil nach einem Gelfiltrationslauf. Deutlich zu erkennen sind 2 Aktivitätspeaks (rot). Der Hauptpeak liegt in den Fraktionen 31-32, wo sich die höchste cAMP-hydrolysierende Aktivität befindet. In den Fraktion 35-37 ist der cAMP-Umsatz wieder deutlich niedriger. Ein weiterer, im Vergleich zum ersten nur kleiner Aktivitätspeak konnte in Fraktion 38 detektiert werden. Ab Fraktion 42 bleibt der cAMP-Umsatz gering. Bei verschiedenen Gelfiltrationsläufen können leichte Verschiebungen um bis zu 3 Fraktionen auftreten, so dass sich das Aktivitätsprofil ebenfalls verschiebt. Außerdem variiert das Größenverhältnis der beiden Aktivitätspeaks zueinander teilweise stark. Dies kann am Tumormaterial selbst liegen.

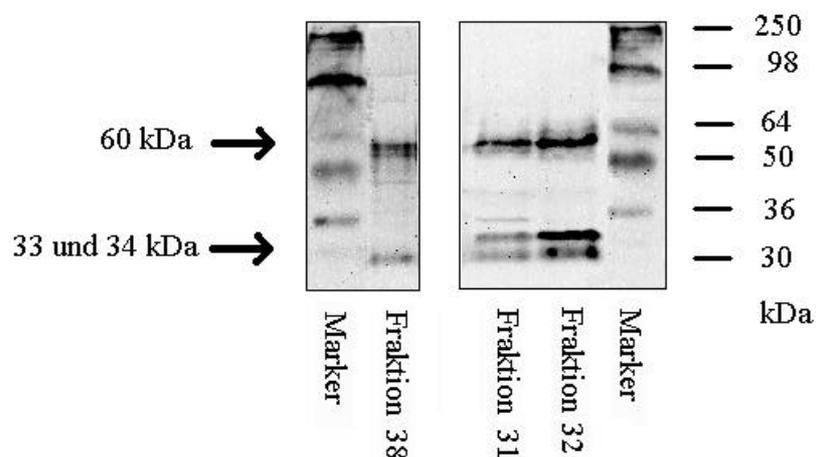


Abb. 47:
Western Blot der Gelfiltrationsproben mit dem Antikörper M3S1; die detektierten Banden sind ca. 60 sowie 33 und 34 kDa groß; benutzter Marker: Novex SeeBlue.

Nach der Gelfiltration wurden mit dem erhaltenen aufgereinigten Protein der Fraktionen 31 und 32 die in Kapitel 5.5. beschriebenen Tests mit verschiedenen Substanzen zur Hemmung des isolierten Enzyms durchgeführt. Weiterhin wurde die aufgereinigte PDE4 für weitere Western Blots eingesetzt.

Abb. 47 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analyse mit dem monoklonalen Antikörper M3S1, der spezifisch gegen PDE4D-Isoenzyme gerichtet ist. Hier wurde keine Bande bei ca. 95 kDa mehr detektiert. Die Bande bei ca. 60 kDa und eine Doppelbande bei ca. 33 und 34 kDa aus den Fraktionen 31 und 32 des ersten Aktivitätspeaks sind deutlich zu erkennen. Ungewöhnlich nach einer Gelfiltration ist das Vorliegen verschieden großer PDEs in der gleichen Fraktion. Möglicherweise lagen die ca. 33 kDa großen Proteine als Dimer vor und eluierten deshalb gleichzeitig mit dem ungefähr doppelt so großen Protein. Im zweiten Aktivitätspeak (Fraktion 38) ist die Doppelbande nicht mehr zu erkennen, es werden lediglich Banden bei ca. 60 kDa und eine einzelne schwache Bande bei ca. 33 kDa detektiert. Alle diese Proteine enthalten also die katalytische Domäne.

Aufgrund der Abwesenheit einer Bande bei ca. 95 kDa kann geschlussfolgert werden, dass keine PDE4D3 mehr in diesen Fraktionen enthalten ist. Möglicherweise wurde das Protein bereits bei der Gelfiltration versehentlich abgetrennt. Eine andere Möglichkeit kann dadurch zustande kommen, dass das gesamte Protein proteolytisch gespalten wurde. Von den beiden resultierenden Fragmenten wird eines durch M3S1 erkannt, dabei könnte es sich um ein Protein der Doppelbande bei ca. 33-34 kDa handeln. Ein Protein dieser Größe wurde bereits mit den Antikörpern K110 und K116 nach der Anionenaustauschchromatographie nachgewiesen. Das Signal bei ca. 60 kDa könnte durch kurze Formen der PDE4D wie z.B. PDE4D1 oder PDE4D2 zustande kommen. Die zweite Bande der Doppelbande bei ca. 33-34 kDa ist dann möglicherweise ein weiteres proteolytisches Fragment dieser kurzen PDE4D.

Sowohl mit dem Antikörpern K116 (Abb. 48) als auch mit K110 (Abb. 49) wurden in den gleichen Fraktionen Proteine bei 60 kDa im ersten Aktivitätspeak der Gelfiltration und bei ca. 60 und 64 kDa im 2. Peak detektiert.

K116 (Abb. 48) erkennt keines der kleinen Fragmente (ca. 30 kDa und 34 kDa) aus Abb. 47, die also keine UCR1 zu enthalten scheinen. Umgekehrt erkennt M3S1 die Bande bei ca. 64 kDa nicht, die deshalb keine PDE4D-Form darstellen kann. Bei der Bande bei ca. 60 kDa könnte es sich um kurze PDE4-Isoformen handeln, die UCR1 enthalten, sowie um ein proteolytisches Fragment von PDE4D3. Weiterhin könnte es sich auch um die verkürzte Form von PDE4D3 handeln. Dabei muss angemerkt werden, dass die Banden bei 60 kDa in Abb. 47, 48 und 49 nicht unbedingt durch das gleiche Protein zustande kommen müssen, möglicherweise handelt es

sich auch um verschiedene Formen. Dies gilt auch für die verschiedenen Banden bei ca. 30 kDa (Abb. 44, 45 und 47).

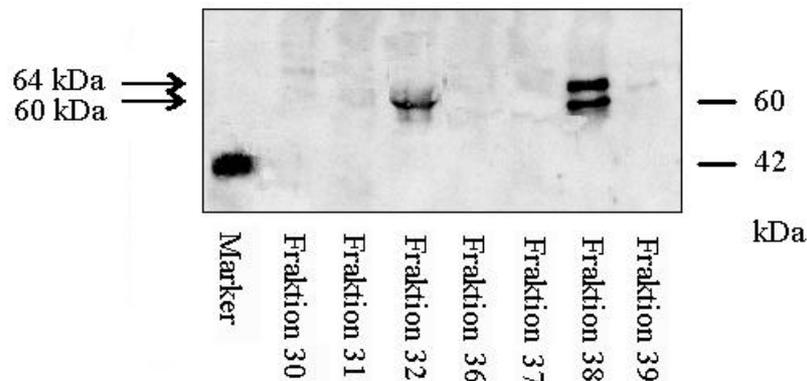


Abb. 48:

Western Blot der Gelfiltrationsproben mit dem Antikörper K116; benutzter Marker: Novex MultiMark (Bande bei 42 kDa wurde vom Antikörper erkannt); die detektierten Banden sind ca. 60 und 64 kDa groß; der erste Aktivitätspeak befand sich in Fraktion 32, der zweite in Fraktion 38.

Für K110 können ähnliche Möglichkeiten zur Erklärung der Proteinbanden herangezogen werden. Da M3S1 keine Bande bei ca. 64 kDa detektiert, muss diese Bande durch eine PDE4-Form mit UCR1 (aufgrund der Detektion durch K116) und nicht durch Spleißvarianten von PDE4D (4D1 oder 4D2) verursacht werden. Außerdem könnte diese Bande ein proteolytisches Fragment von PDE4D3 oder die verkürzte PDE4D3 sein, deren Sequenz das Stop-Codon enthält.

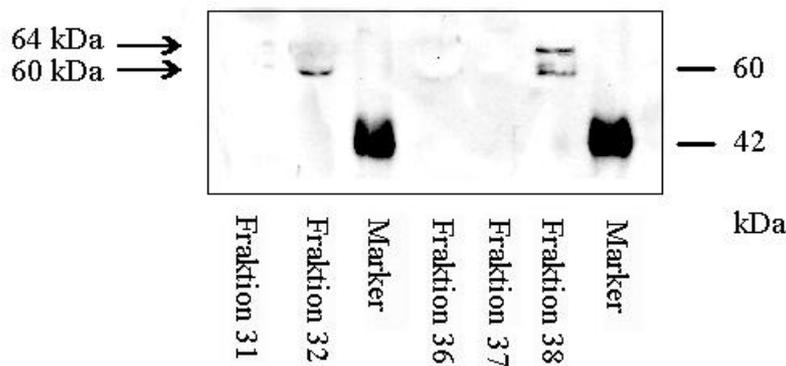


Abb. 49:

Western Blot der Gelfiltrationsproben mit dem Antikörper K110; benutzter Marker: Novex MultiMark (Bande bei 42 kDa wurde vom Antikörper erkannt); die detektierten Banden sind ca. 60 und 64 kDa groß; der erste Aktivitätspeak befand sich in Fraktion 32, der zweite in Fraktion 38.

Da nach der Gelfiltration keine Bande bei ca. 93-95 kDa mehr detektiert wurde, wurde zur Unterstützung der durch Western Blot Analysen erhaltenen Daten mittels RT-PCR das

Vorhandensein von mRNA für die sogenannten „long-forms“ der PDE4D (4D3, 4D4, 4D5) untersucht. Hierzu wurde zunächst mRNA des Tumors präpariert, die dann mit Hilfe einer RT-PCR-Reaktion in DNA umgeschrieben wurde. Durch Benutzen isoform-spezifischer Primer wurde nach Auftragung der verschiedenen PCR-Ansätze auf ein Agarose-Gel das in Abb. 50 dargestellte Ergebnis erhalten.

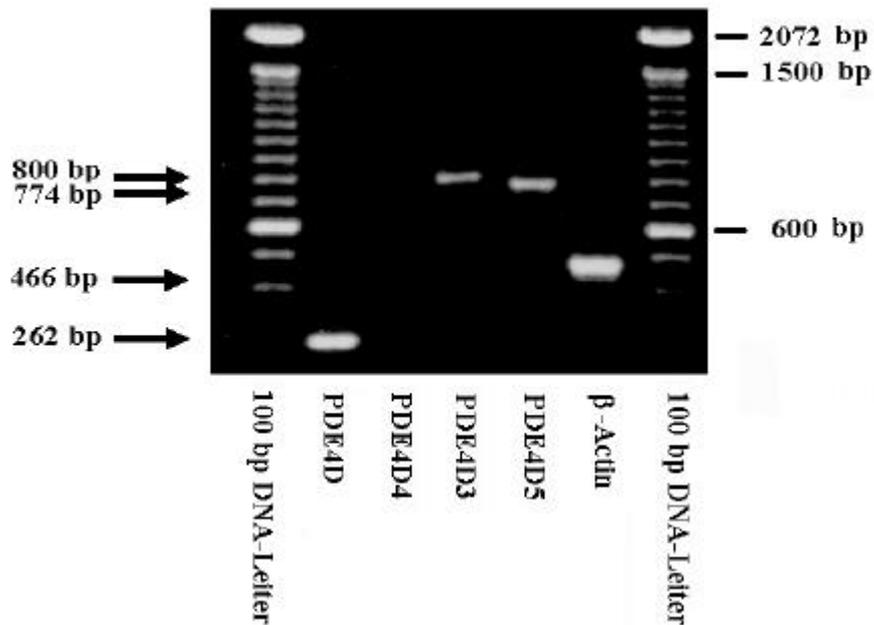


Abb. 50:
Mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose-Gel (1,3%) der RT-PCR von mRNA aus dem Tumor LXFL529.

Als Positivkontrolle diente β -Actin. Die Proben dieser in fast allen Geweben vorkommenden mRNA wurden mitgeführt, um verifizieren zu können, ob die RT-Reaktion bzw. die PCR erfolgreich waren. Mit einem unspezifischen Primer, der alle PDE4D-Formen erkennt, wurde ein Signal bei der erwarteten Größe von 262 bp erhalten, was auf die Anwesenheit von PDE4D hindeutet. Weiterhin wurde in diesem Tumorgewebe auch ein Signal für PDE4D3 (Größe des Amplifikats: 800 bp) sowie PDE4D5 (774 bp) erhalten. Nicht detektiert wurden Transkripte von PDE4D4. Für PDE4D1 und 4D2 stand bei dieser Versuchsdurchführung kein Primer zur Verfügung, auf mRNA dieser Proteine konnte leider nicht getestet werden. Spätere im Arbeitskreis durchgeführte RT-PCRs lieferten jedoch sowohl für PDE4D1 als auch für PDE4D2 ein schwaches Signal, so dass auf die Anwesenheit von mRNA geschlossen werden kann [G. Pahlke, mündliche Mitteilung]. Erwähnenswert ist außerdem, dass bei weiteren, mit anderem Tumormaterial von LXFL529 durchgeführte RT-PCRs nicht bei allen untersuchten Tumoren ein Signal für die PDE4D3 lieferten bzw. das Signal nur sehr schwach war [G. Pahlke, mündliche Mitteilung]. Scheinbar existieren durchaus Unterschiede bezüglich der Isoenzymausstattung zwischen den verschiedenen Tumoren des gleichen Xenografts, dies

wurde auch bei verschiedenen Läufen der Gelfiltration bestätigt, wo das Intensitätsverhältnis der beiden Peaks zueinander in verschiedenen Läufen manchmal stark variierte. Diese Tatsache kann zum z.B. durch spontane Mutationen des Tumors zustande kommen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Tatsache dar, dass die verschiedenen Tumoren Unterschiede bei der Präparation oder der Lagerung erfahren haben könnten, was ein unterschiedliches Isoenzymmuster bewirken könnte.

5.2.1. Diskussion

Nach Anionenaustauschchromatographie und Auftragung der verschiedenen Fraktionen auf ein SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung konnten die Ergebnisse von Marko (1994) bestätigt werden, allerdings wurde noch eine zusätzliche Bande bei ca. 60 kDa detektiert. Diese 3 Banden wurden auch im Western Blot mit den Antikörpern K110 und K116 nachgewiesen.

Tab. 8:

Detektierte Banden nach Anionenaustausch und Gelfiltration; +: Bande wurde detektiert.

	ca. 90-95 kDa	ca. 64 kDa	ca. 60 kDa	ca. 34 kDa	ca. 30 kDa
Anionenaustauschchromatographie, Silberfärbung	+		+	+	+
Anionenaustauschchromatographie, K110	+		+		+
Anionenaustauschchromatographie, K116	+		+		+
Gelfiltration, M3S1			+	Doppelbande bei ca. 33 und 34 kDa	
Gelfiltration, K110		+	+		
Gelfiltration, K116		+	+		

Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt (Gelfiltration) des mittleren Aktivitätspeaks der Anionenaustauschchromatographie, der als PDE4 charakterisiert wurde, konnte mittels Western Blot mit den Antikörpern M3S1, K110 und K116 keine Bande bei ca. 93 kDa nachgewiesen werden. Mit M3S1 wurden Proteinbanden bei ca. 60 und 33-34 kDa detektiert, mit K110 und K116 jeweils eine Bande bei ca. 60 kDa im ersten Aktivitätspeak der Gelfiltration, während im zweiten, kleineren Peak 2 Proteine bei ca. 60 und 64 kDa vorkommen. Weder bei ca. 30-34

noch bei ca. 93 kDa werden mit K110 bzw. K116 Banden detektiert. Zur besseren Übersicht wurden alle detektierten Banden nochmals in Tabelle 8 aufgelistet.

Die Größen verschiedener PDE4D-Spleißvarianten sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9:

Molekulargewichte von PDE4D-Isoformen, die in COS7-Zellen exprimiert wurden [Houslay et al., 1999]. Von Méhats et al. (1999) angegebene abweichende Molekulargewichte der Subtypen, die aus Zellen des Myometriums gewonnen und per Western Blot detektiert wurden, sind in Klammern angegeben.

Isoenzym	Größe [kDa]
PDE4D1	68 (72)
PDE4D2	67
PDE4D3	95 (93)
PDE4D4	119
PDE4D5	105

Mittels RT-PCR konnte die Anwesenheit von mRNA für PDE4D3 in LXFL529-Tumormaterial bestätigt werden. Damit übereinstimmend wurden nach Anionenaustauschchromatographie in der Silberfärbung und im Western Blot mit den Antikörpern K110 und K116 Banden bei 90-95 kDa detektiert.

Als Erklärung für die Tatsache, dass nach der Gelfiltration keine Bande bei ca. 93 kDa detektiert wird, kann eine versehentliche Abtrennung des Proteins bei der Gelfiltration nicht ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist jedoch die Möglichkeit einer Proteolyse von PDE4D3, für die PDEs sehr anfällig sind [Houslay et al., 1999]. Eventuell ist nach der Anionenaustauschchromatographie noch ein geringer Anteil an nativer PDE4 vorhanden, die nach Silberfärbung und Western Blot mit den Antikörpern K110 und K116 eine Bande bei ca. 90-95 kDa ergibt. Nach Gelfiltration ist dann jedoch die gesamte Menge von PDE4D3 proteolytisch gespalten. Aus den erhaltenen Banden der Western Blots mit den verschiedenen Antikörpern kann auf die in Abb. 51 dargestellten proteolytischen Fragmente geschlossen werden.

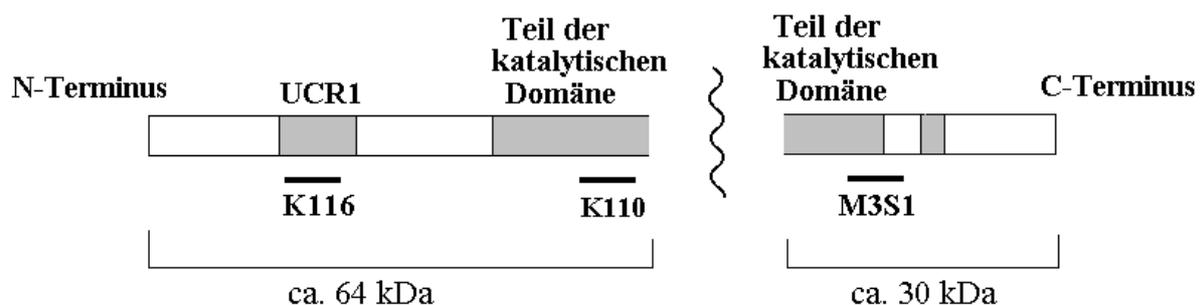


Abb. 51:
Mögliche proteolytische Fragmente von PDE4D3.

Die ebenfalls nach Anionenaustausch mittels Silberfärbung und Western Blot nachgewiesenen Proteine bei ca. 60 kDa und bei ca. 30-34 kDa stellen dann bereits Abbauprodukte dar. Nach der Gelfiltration wurde evtl. das gesamte Protein in die kleineren Fragmente gespalten. Dann erkennen K116 und K110 jeweils ein etwa 64 kDa großes Fragment, während M3S1 eine Bande bei ca. 30 kDa detektiert, was den hier erhaltenen Ergebnissen entspricht. Zu erwähnen ist, dass mit M3S1 ein Antikörper gefunden wurde, der die sogenannte „kleine“ PDE von ca. 34 kDa erkennt.

Weiterhin könnten die Banden bei ungefähr 60-64 kDa kurze Formen der PDE4D wie z.B. PDE4D1 und PDE4D2 darstellen, deren Größen in der Literatur mit 68-72 kDa für PDE4D1 [Houslay et al., 1999; Méhats et al., 1999] sowie 67-68 kDa (PDE4D2) angegeben werden (Tab. 9) [Iona et al., 1998; Conti et al., 1995]. Mittels RT-PCR-Analysen konnte die Anwesenheit von mRNA von PDE4D1 und 4D2 in LXFL529-Tumorgewebe auch bestätigt werden [G. Pahlke, mündliche Mitteilung]. Diese Proteine könnten dann für die Bande bei ca. 60 kDa beim Western Blot mit M3S1 verantwortlich sein. Auch eine der beiden Banden beim Nachweis mit K110 kann durch diese Spleißvarianten des PDE4D-Gens zustande kommen. Bei diesen Proteinen kann ebenfalls eine Proteolyse nicht ausgeschlossen werden, so dass möglicherweise auch hier Fragmente detektiert werden.

Eine der mit K110 und K116 nachgewiesenen Proteinbanden bei ca. 60 kDa und 64 kDa könnte weiterhin durch die bereits von Eyschen (1999) beschriebene verkürzte PDE4D3 zustande kommen. Dies wird ebenfalls nach der Gelfiltration bestätigt. Mit M3S1 kann diese verkürzte Form nicht erkannt werden, während mit K116 und K110 ein Signal detektiert wird.

Außerdem sind möglicherweise weitere PDE4-Formen in LXFL529-Tumorgewebe enthalten, die ca. 60 kDa groß sind, UCR1 enthalten und keine Spleißvarianten des PDE4D-Gens darstellen. Diese liefern dann im Western Blot nach Anionenaustauschchromatographie mit K116 eine Bande bei 60 kDa. Nach Gelfiltration wird mit K116 deshalb nicht nur die 64er Bande (proteolytisches Fragment von PDE4D3), sondern eine weitere Bande bei 60 kDa erhalten, die mit der durch M3S1 erhaltenen bezüglich des Molekulargewichts übereinstimmt. Diese kann nicht durch PDE4D1 oder PDE4D2 zustande kommen, da diese keine UCR1 enthalten. Diese These kann auch durch die mit M3S1 erhaltenen Banden gestützt werden, hier wird keine Doppelbande bei ca. 60-64 kDa detektiert. In der Literatur wurden bislang jedoch keine PDE4-Formen beschrieben, die ca. 60 kDa groß sind und UCR1 enthalten. Möglicherweise handelt es sich um eine neue Form oder um ein weiteres Proteolyseprodukt.

Abschließend bleibt zu sagen, dass die diskutierten Ergebnisse lediglich auf den Western Blots mit den Antikörpern K110, K116 und M3S1 beruhen. Deshalb sollten diese Ergebnisse zunächst mit weiteren Antikörpern, z.B. spezifischen gegen die diskutierten Formen durchgeführt werden. Die PDE4D3-Form aus LXFL529, die ein Stop-Codon enthält, konnte nicht eindeutig identifiziert werden, da von diesem Enzym eine Positivkontrolle für den Western Blot fehlte. Möglicherweise ist eine Bande bei ca. 60-64 kDa auf diese Form

zurückzuführen. Allerdings muss jedoch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die verkürzte Form im Tumor nicht in Protein translatiert wird. Weiterhin ist von Phosphodiesterasen bekannt, dass sie im SDS-Gel ein untypisches Laufverhalten zeigen, das nicht ihrem Molekulargewicht entspricht. So erscheinen die PDEs im SDS-Gel bei anderen Molmassen, als aus ihrer Primärstruktur berechnet wurden. Möglichkeiten wären konformationelle Effekte aufgrund struktureller Motive in der Sequenz der PDEs oder posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen) sowie uneinheitliche Bindung von SDS [Houslay et al., 1999]. So ist nicht auszuschließen, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PDEs eigentlich ein anderes Molekulargewicht besitzen, als es aus dem SDS-Gel hervorgeht.

5.2.2. Zusammenfassung

Die nach Anionenaustauschchromatographie gewonnenen Proben des mittleren Aktivitätspeaks (PDE4) vom Cytosol des Xenograft-Tumors LXFL529 lieferten bei Silberfärbungen und Western Blots mit den Antikörpern K110 und K116 drei Banden bei ca. 30, 60 und 90-95 kDa. Nach weiterer Aufreinigung durch Gelfiltration wurden zwei Aktivitätspeaks erhalten. Nach Silberfärbung und Western Blot-Analysen mit den Antikörpern K110 und K116 wurde nur noch eine Bande bei ca. 60 im ersten Aktivitätspeak und zwei Banden bei ca. 60 und 64 kDa im zweiten Peak detektiert. Mit dem Antikörper M3S1 wurde eine Bande bei ca. 60 kDa sowie eine Doppelbande bei ca. 33-34 kDa nachgewiesen.

In LXFL529-Tumorgewebe scheint PDE4D3-Protein anwesend zu sein, das möglicherweise jedoch sehr leicht proteolytisch gespalten wird. Banden bei der Größe der full-length PDE4D3 und bei potentiellen Proteolyseprodukten konnten mit den Antikörpern M3S1, K110 und K116 nachgewiesen werden. Außerdem wird die Existenz von kurzen Formen des PDE4D-Gens vermutet. Dabei könnte es sich um PDE4D1, PDE4D2 oder die von Eyschen (1999) aus LXFL529-Tumorgewebe isolierte trunkeerte PDE4D3 handeln, deren Sequenz ein Stop-Codon enthält. Außerdem könnte eine kurze Form einer bislang nicht in der Literatur beschriebenen PDE, die nicht zur PDE4D-Isoenzymfamilie gehört, und die bei einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa UCR1 enthält, in diesem Xenograft vorkommen.

5.3. Vergleich solider Tumor-Zelllinie

Bisherige wirkmechanistische Untersuchungen mit PDE4-Hemmstoffen wurden *in vitro* meistens an Permanent-Zelllinien durchgeführt. Dabei stellt sich die Frage, ob die fortwährende Kultivierung zu einer Veränderung der PDE-Ausstattung führt, was eine stark limitierende Übertragbarkeit der *in vitro*-Daten auf die *in vivo*-Situation bedeuten würde. Während Cho-Chung et al. (1991) von möglicherweise erhöhten cAMP-Gehalten in soliden Tumoren im Vergleich zur Zelllinie berichteten, wurde von Marko (1994) für das Cytosol von LXFL529-Tumorgewebe bereits eine deutlich höhere PDE-Aktivität als in der entsprechenden Permanent-Zelllinie beobachtet. Sowohl für den humanen Xenograft-Tumor LXFL529 als auch für LXFS650 stehen entsprechende Permanent-Zelllinien zur Verfügung. Im folgenden wurde die PDE-Ausstattung der Zelllinien LXFL529L und LXFS650L im Vergleich zu solidem Tumorgewebe bestimmt (Tab. 10 und Abb. 52). Diese Untersuchungen sollen Hinweise darauf geben, ob die *in vitro* ermittelten Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragen werden können.

5.3.1. PDE-Aktivität

Tabelle 10:

cAMP-hydrolysierende PDE-Gesamtaktivität der Zelllinien LXFL529L und LXFS650L.

Zelllinie	cAMP-hydrolysierende PDE-Gesamtaktivität [pmol x (min x mg Protein) ⁻¹]	
	Cytosol	Partikular
LXFL529L	122,5 ± 44,2	16,9 ± 7,3
LXFS650L	25,9 ± 7,8	11,8 ± 4,5

Ebenso wie die Tumoren besitzen die Zelllinien den Hauptteil der cAMP-hydrolysierenden Enzymaktivität im Cytosol. In der partikulären Fraktion von LXFL529L-Zellen wird 7 mal weniger PDE-Gesamtaktivität als im Cytosol detektiert, in LXFS650L-Zellen ist der Anteil ungefähr halb so groß wie im Cytosol. Während im Cytosol der LXFL529L-Zellen wesentlich mehr PDE-Gesamtaktivität als in LXFS650L-Zellen gemessen wurde (Faktor 5), liegen die Werte des Partikulars der beiden Zelllinien nun in der gleichen Größenordnung. Die hohe Standardabweichung der PDE-Gesamtaktivität bei LXFL529L kann durch die bereits von Marko (1994) beobachtete Tatsache zustande kommen, dass verschiedene Passagen der

gleichen Zellen oder des gleichen Gewebes häufig stark unterschiedliche PDE-Gehalte aufweisen.

Beide Permanent-Zelllinien besitzen deutlich weniger cAMP-hydrolysierende PDE-Aktivität als die entsprechenden Tumoren. LXFL529L-Zellen weisen im Vergleich zum Xenograft LXFL529 (s. Tab. 6 und Abb. 52) eine stark verringerte PDE-Gesamtaktivität im Cytosol auf, die mit $122,5 \text{ pmol} \times (\text{min} \times \text{mg Protein})^{-1}$ um den Faktor 8 gegenüber dem soliden Tumor erniedrigt ist. Im Partikular wird der Unterschied zwischen diesem Xenograft und der Zelllinie noch deutlicher: Im soliden Tumor ist die PDE-Aktivität ca. 16-fach höher als in der Zelllinie. Die PDE-Aktivität im Cytosol der Zelllinie LXFS650L ist um den Faktor 6 gegenüber dem soliden Tumor erniedrigt. Im Partikular wird hingegen beim Tumor lediglich eine doppelt so hohe PDE-Gesamtaktivität detektiert.

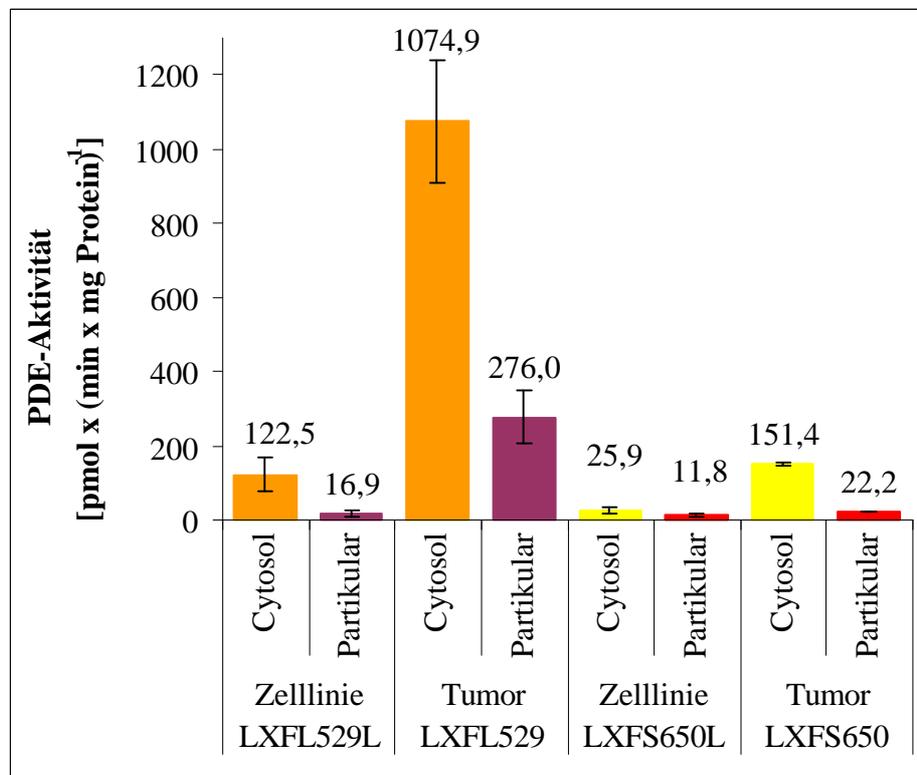


Abb. 52: cAMP-hydrolysierende PDE-Aktivität der Zelllinien LXFL529L und LXFS650L und der Xenograft-Tumoren LXFL529 und LXFS650.

5.3.2. Rolipram-Hemmbarkeit

In Tab. 11 und Abb. 53 ist die Rolipram-Hemmbarkeit der beiden Zelllinien dargestellt, die im folgenden mit der der soliden Tumoren (Tab. 7 und Abb. 53) verglichen werden soll. Auch hier

betrug die Endkonzentration von Rolipram im Reaktionsansatz 10 μM . Getestet wurde am Cytosol und Partikular unbehandelter Zellen nach der Zellaufarbeitung (Proteinpräparation).

Tabelle 11:
Rolipram-Hemmbarkeit der Zelllinien LXFL529L und LXFS650L.

Zelllinie	Rolipram-Hemmbarkeit [%]	
	Cytosol	Partikular
LXFL529L	88,3 \pm 6,4	74,5 \pm 2,5
LXFS650L	74,0 \pm 13,1	85,8 \pm 4,6

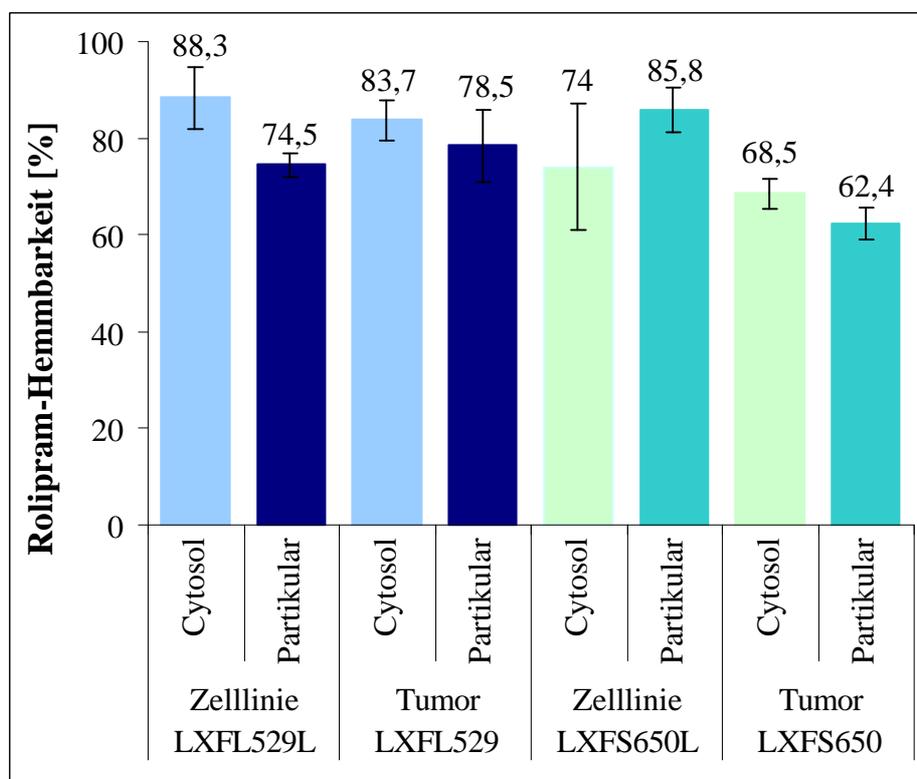


Abb. 53:
Rolipram-Hemmbarkeit der Zelllinien LXFL529L und LXFS650L und der Xenograft-Tumoren LXFL529 und LXFS650.

Der höchste prozentuale Gehalt von Rolipram-hemmbarer PDE wird im Cytosol von LXFL529L-Zellen gefunden. Bei einer Gesamtaktivität von 122,5 pmol x (min x mg Protein)⁻¹ enthalten diese Zellen ungefähr 110 pmol x (min x mg Protein)⁻¹ PDE4-Aktivität.

Das Cytosol von LXFL529-Tumorgewebe (s. Tab. 6 und 7) enthält ca. 900 pmol x (min x mg Protein)⁻¹ PDE4 und weist damit einen vergleichbaren Prozentsatz an Rolipram-hemmbarer PDE auf wie die zugehörige Zelllinie. Der prozentuale Anteil unterscheidet sich nicht signifikant. Auch die Partikulare von Zelllinie und Tumor enthalten nahezu die gleiche

prozentuale Menge an PDE4. Insgesamt weist LXFL529-Tumorgewebe sowohl relativ als auch absolut den höchsten PDE4-Gehalt im Partikular auf.

Während im Cytosol von LXFS650-Zellen und solidem Tumor ebenfalls kein signifikanter Unterschied beobachtet wird, unterscheidet sich das Partikular der Zelllinie von dem des Tumors, da in der Zelllinie wesentlich mehr PDE4 gemessen wird.

5.3.3. Zusammenfassung

Durch Bestimmung der PDE-Aktivität konnte gezeigt werden, dass Tumorgewebe deutlich mehr cAMP-hydrolysierende PDE-Gesamtaktivität enthält als die entsprechenden Zelllinien. Die PDE-Gesamtaktivität (Cytosol und Partikular) von LXFL529L-Zellen ist wesentlich geringer ist als beim entsprechenden Xenograft-Tumor LXFL529, die prozentualen Anteile von Rolipram-hemmbarer PDE liegen jedoch in der gleichen Größenordnung. LXFS650L-Zellen besitzen im Cytosol lediglich ein Fünftel der PDE-Aktivität von LXFL529L-Zellen, während die Werte im Partikular in der gleichen Größenordnung liegen. Auch der Gehalt an Rolipram-hemmbarer PDE liegt bei LXFS650L-Zellen niedriger. Während im Cytosol keine Unterschiede bezüglich der Rolipram-Hemmbarkeit zwischen Zelllinie und Tumor beobachtet wurde, liegt der Gehalt an Rolipram-hemmbarer PDE4 im Partikular der Zelllinie LXFS650 deutlich über dem für den Tumor ermittelten Wert.

5.4. PDE-Hemmung durch DC-TA-46

5.4.1. LXFL529L-Zellen und LXFL529-Xenograft-Tumor

Der potente PDE4-Hemmstoff DC-TA-46 (E481) wurde bereits 1998 von Merz et al. bezüglich seiner Wirkung auf isolierte PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe ($IC_{50} = 0,016 \mu M$) getestet. Untersuchungen zur wachstumshemmenden Wirkung zeigten einen IC_{50} -Wert von $2,3 \mu M$. Um die Diskrepanz zwischen den beiden IC_{50} -Werten zu klären, wurde zuerst untersucht, ob sich PDE-Präparationen aus Tumor und Zelllinie in ihrer Hemmbarkeit durch DC-TA-46 unterscheiden. Hierzu wurde Cytosol bzw. Partikular von Zelllinie und Tumor mit dem Hemmstoff versetzt (im folgenden „Proteinpräparation“ genannt). Dieses Zelllysate ist leichter zugänglich als aufgereinigte PDE4, liefert aber beim Vergleich mit den aus der Zellkultur

gewonnenen Daten wichtige Informationen, ob sich Tumor und Zelllinie bezüglich der Sensitivität gegen DC-TA-46 unterscheiden.

5.4.1.1. Zelllinie LXFL529L

Tab. 12:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular und im Cytosol der Zelllinie LXFL529L; durchgeführt wurden 4 unabhängige Messungen, wobei die Aufarbeitung in Doppelbestimmung erfolgte; die Inkubation mit DC-TA-46 erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Konzentrationen zum Cytosol bzw. Partikular aufgearbeiteter Zellen („Proteinpräparation“).

log[c]	PDE-Hemmung [%]	
	Zelllinie LXFL529L (Cytosol), Inkubation der Proteinpräparation	Zelllinie LXFL529L (Partikular), Inkubation der Proteinpräparation
-5,3	90,7 ± 10,9	69,5 ± 10,3
-6	90,9 ± 9,0	57,3 ± 7,3
-6,3	61,9 ± 12,4	56,7 ± 8,9
-7	48,2 ± 10,5	30,0 ± 9,8
-8	32,4 ± 13,5	15,9 ± 2,2
-9	3,8 ± 5,2	9,8 ± 6,3
IC ₅₀ [µM]	0,22 ± 0,086	0,5 ± 0,25

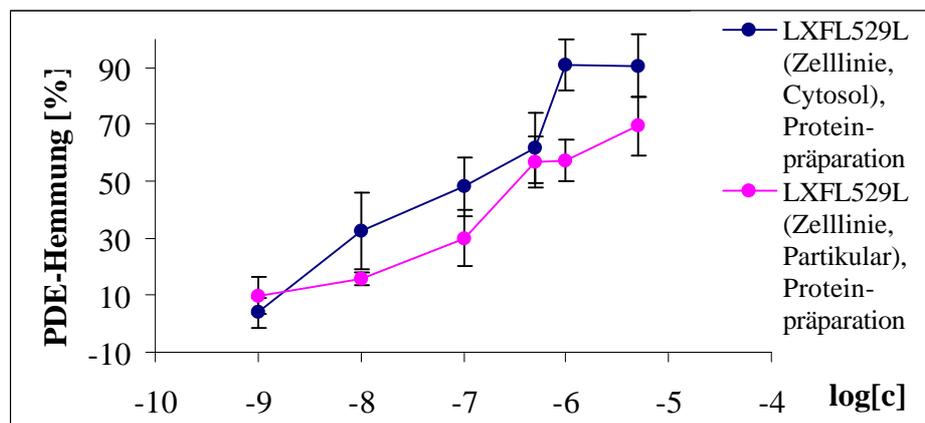


Abb. 54:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol und Partikular der Zelllinie LXFL529L.

Beim Vergleich des Cytosols und des Partikulars von LXFL529L-Zellen ist zu erkennen, dass im Cytosol eine höhere PDE-Hemmung durch DC-TA-46 erzielt werden kann als im Partikular (Abb. 54 und Tab. 12). Die Hemmkurve des Cytosols verläuft stets über der des Partikulars. Lediglich bei Einsatz einer 5×10^{-7} M Hemmstoffkonzentration nähern sich die beiden Kurven

an. Im Cytosol wird bei einer InhibitorKonzentration von 10^{-6} M ein Plateau erreicht, an dem bereits mehr als 90% der PDE-Aktivität gehemmt wurde. Im Partikular wird auch mit der höchsten DC-TA-46-Konzentration nur eine Hemmung von knapp 70% erzielt. Trotzdem unterscheiden sich auch diese Kurven insgesamt nicht signifikant.

5.4.1.2. Xenograft LXFL529

Tabelle 13 und Abb. 55 zeigen die Ergebnisse dieses Versuchsteils: Die Kurve der PDE-Hemmung im Cytosol steigt schon bei niedrigen DC-TA-46-Konzentrationen steil an; so wird bei einer Konzentration von 10^{-8} M bereits eine Hemmung von 41,1% erreicht. Bei höheren Konzentrationen flacht die Kurve allmählich ab und geht in ein Plateau über. Dabei wird bei einer InhibitorKonzentration von 5×10^{-6} M lediglich eine Hemmung von 74,4% erreicht. Im Gegensatz dazu wird die PDE im Partikular des LXFL529-Tumors von niedrigen Konzentrationen (10^{-9} M und 10^{-8} M) nicht gehemmt, eine Inhibition ist erst ab 10^{-7} M zu erkennen. In diesem Bereich steigt die Kurve dann auch stark an; die höchste DC-TA-46-Konzentration vermag 86,9% der partikulären Phosphodiesterase zu hemmen. Für die beiden Hemmkurven kann jedoch insgesamt ebenfalls kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Tab. 13:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular und im Cytosol des Tumors LXFL529; durchgeführt wurden 4 unabhängige Messungen.

log[c]	PDE-Hemmung [%]	
	Tumor LXFL529 (Cytosol)	Tumor LXFL529 (Partikular)
-5,3	74,4 ± 13,8	86,9 ± 8,9
-6	72,9 ± 8,8	83,9 ± 9,5
-6,3	67,2 ± 7,7	73,5 ± 10,5
-7	65,3 ± 14,5	52,7 ± 12,7
-8	41,1 ± 14,2	0,0 ± 0,0
-9	5,6 ± 8,8	0,6 ± 1,2
IC ₅₀ [µM]	0,048 ± 0,011	0,14 ± 0,015

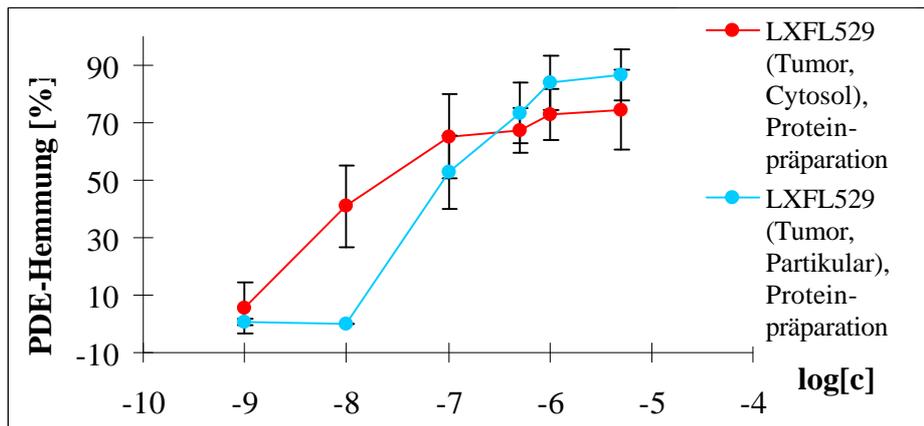


Abb. 55:
Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular und im Cytosol des Tumors LXFL529.

5.4.1.3. Vergleich Tumor LXFL529 – Zelllinie LXFL529L

Wie der Vergleich der Hemmwirkungen von DC-TA-46 bei Zugabe zum Cytosol von LXFL529L-Zelllinie bzw. dem entsprechenden Tumor zeigt (Abb. 56; Werte s. Tab. 12 und 13), besteht zwischen den beiden Kurven kein signifikanter Unterschied. Zwar wird bei der Zelllinie mit der höchsten DC-TA-46-Konzentration auch eine höhere Hemmung erreicht, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich ist. Im Bereich von 10^{-8} - 10^{-9} M verlaufen die Hemmkurven nahezu parallel.

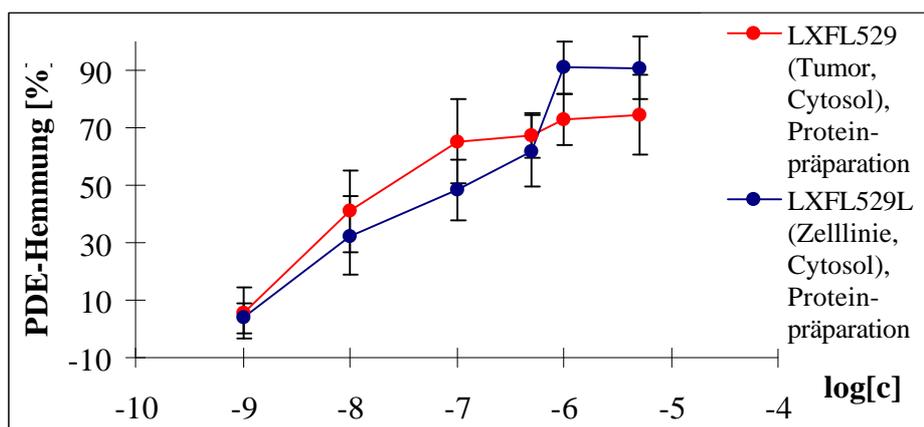


Abb. 56:
Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol des Tumors LXFL529 und der Zelllinie LXFL529L (Inkubation der Proteinpräparation).

Die Hemmkurven des Partikulars zeigen nach Zugabe von verschiedenen DC-TA-46-Konzentrationen (Abb. 57, Werte s. Tab. 12 und 13) nur im Bereich von 10^{-8} M bis 10^{-9} M

signifikante Unterschiede. Beim Tumor kann bei diesen geringen Konzentrationen noch keine Hemmung beobachtet werden, wohingegen die Inhibition der PDE-Aktivität im Partikular der Zelllinie auch bei einer Konzentration von 10^{-9} M immer noch 9,3% beträgt. Bei einer Endkonzentration von 10^{-8} M im Reaktionsansatz werden 15,9% des Enzyms gehemmt. Bei Konzentrationen zwischen 10^{-7} M - 5×10^{-7} M steigt die Hemmkurve des Tumors rasch an, während die Steigung in der Zelllinie nicht so steil ist. Bei hohen Hemmstoffkonzentrationen (10^{-6} M - 5×10^{-6} M) wird im Tumor eine höhere Inhibition als in der Zelllinie erreicht.

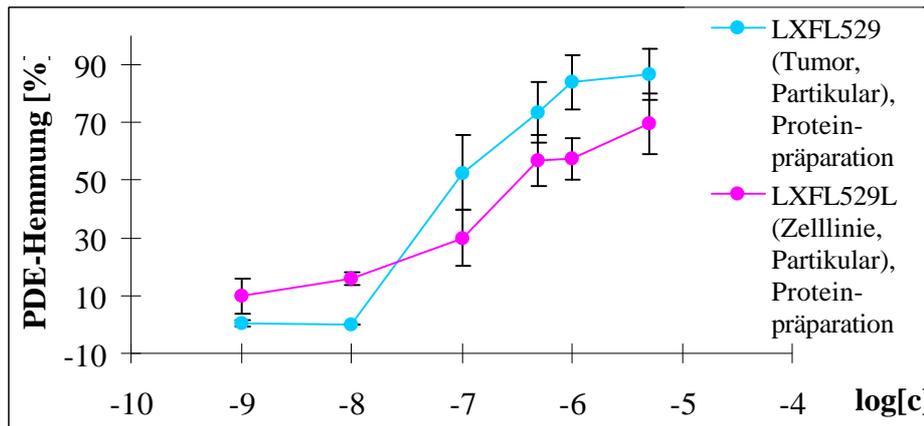


Abb. 57:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular des Tumors LXFL529 und der Zelllinie LXFL529L (Inkubation der Proteinpräparation).

Keines der Ergebnisse kann jedoch die Diskrepanz zwischen den IC_{50} -Werten der Wachstumshemmung und der PDE-Hemmung am isolierten Enzym erklären. Trotz wesentlich höherer PDE-Aktivität im Tumor besteht kein signifikanter Unterschied zwischen LXFL529L-Zellen und LXFL529-Tumorgewebe hinsichtlich der Sensitivität gegen DC-TA-46. Möglicherweise spielen verschiedene pharmakokinetische Parameter wie z.B. Aufnahme und Verteilung in verschiedene zelluläre Kompartimente, Ausscheidung oder Metabolismus eine wichtige Rolle. Deshalb wurde im weiteren untersucht, ob DC-TA-46 auch in der Zelle bei Inkubation in Zellkultur die PDE-Aktivität im Cytosol und Partikular hemmt. Hierzu wurden nun LXFL529L-Zellen 24 h mit DC-TA-46 inkubiert („Zellkultur“), durch Zentrifugation in Cytosol und Partikular getrennt und anschließend die cAMP-hydrolysierende Aktivität bestimmt.

5.4.1.4. LXFL529L-Zellen: Hemmung der PDE-Aktivität in Cytosol und Partikular bei Inkubation in Zellkultur

Tabelle 14:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol und Partikular von LXFL529L-Zellen bei Inkubation in Zellkultur; durchgeführt wurden 4 unabhängige Messungen, wobei die Aufarbeitung in Doppelbestimmung erfolgte.

log[c]	PDE-Hemmung [%]	
	Zelllinie LXFL529L (Cytosol), Inkubation in Zellkultur	Zelllinie LXFL529L (Partikular), Inkubation in Zellkultur
-5,3	72,2 ± 11,2	84,9 ± 10,5
-6	32,8 ± 9,7	70,1 ± 4,7
-6,3	14,9 ± 6,2	50,9 ± 12,8
-7	8,1 ± 10,9	55,3 ± 1,1
-8	6,1 ± 10,6	43,2 ± 7,7
-9	4,7 ± 8,1	5,2 ± 7,8
IC ₅₀ [µM]	2,0 ± 0,46	0,062 ± 0,023

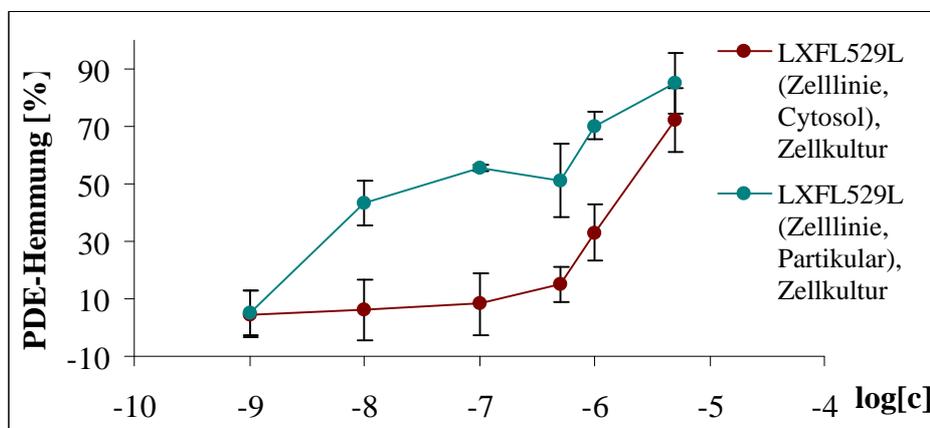


Abb. 58:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol und Partikular von LXFL529L-Zellen bei Inkubation in Zellkultur.

Die in Abb. 58 dargestellten Kurven des Cytosols und Partikulars von LXFL529L-Zellen (Inkubation in Zellkultur, Werte s. Tab. 14) unterscheiden sich sehr deutlich. Die Hemmkurve des Cytosols steigt nur sehr langsam an, bei einer Hemmstoffkonzentration von 5×10^{-7} M wird lediglich eine Hemmung von 14,9% erreicht. Bei höheren Konzentrationen wird die Kurve dann steiler. Erst bei Inkubation mit einer 5×10^{-6} M DC-TA-46-Konzentration wird eine Hemmung von 72% erreicht. Im Partikular hingegen steigt die Kurve bereits bei niedrigen Konzentrationen des Inhibitors steil an. Schon bei der Konzentration von 10^{-8} M im Inkubationsansatz wird eine

Hemmung von über 40% erzielt. Nach einem Plateau im mittleren Bereich steigt die Kurve nochmals an und erreicht bei 5×10^{-6} M DC-TA-46 knapp 85%.

Betrachtet man die Wirkung von DC-TA-46 auf die cytosolische PDE-Aktivität von LXFL529L-Zellen (Abb. 59, Werte s. Tab. 12 und 14), so zeigt sich ein gravierender Unterschied zwischen dem Cytosol von Zellen, die 24 h mit dem Inhibitor inkubiert wurden („Zellkultur“), und dem Cytosol, dem erst nach der Zellaufarbeitung der Hemmstoff zugesetzt wurde. Bei Inkubation in Zellkultur verläuft der Graph des Cytosol verläuft bei niedrigen DC-TA-46-Konzentrationen (10^{-9} M, 10^{-8} M) sehr flach. Auch bei mittleren Konzentrationen wird lediglich 8,1% (10^{-7} M) bzw. 14,9% (5×10^{-7} M) Hemmung erreicht. Nach diesem schleppenden Anstieg kommt ein steilerer Bereich der Hemmkurve, allerdings vermag auch eine DC-TA-46-Konzentration von 10^{-6} M lediglich 32,8% der cytosolischen PDE zu hemmen. Die Inhibition, die mit der höchsten Konzentration (5×10^{-6} M) erreicht wird, liegt bei 72,2%. Im Gegensatz dazu beträgt die Hemmung des nach Aufarbeitung inkubierten Cytosols bei der geringsten Konzentration (10^{-9} M) 3,8%, bei einer Hemmstoffkonzentration von 10^{-8} M wird jedoch bereits eine PDE-Hemmung von 32,4% erreicht. Nach diesem steilen Anstieg des Graphen flacht die Kurve etwas ab, um erneut auf 90,9% steil anzusteigen. Auf diesem hohen Wert der PDE-Inhibition wird ein Plateau erreicht. Beide Hemmkurven unterscheiden sich also in allen Konzentrationsbereichen signifikant: Während bei Inkubation in Zellkultur eine deutliche PDE-Hemmung erst durch hohe DC-TA-46-Konzentrationen ausgelöst wird, und die Kurve bei geringen und mittleren Konzentrationen fast als Parallele zur x-Achse bei einer Hemmung von <10% verläuft, steigt die Kurve bei dem nach Aufarbeitung behandelten Cytosol direkt steil an.

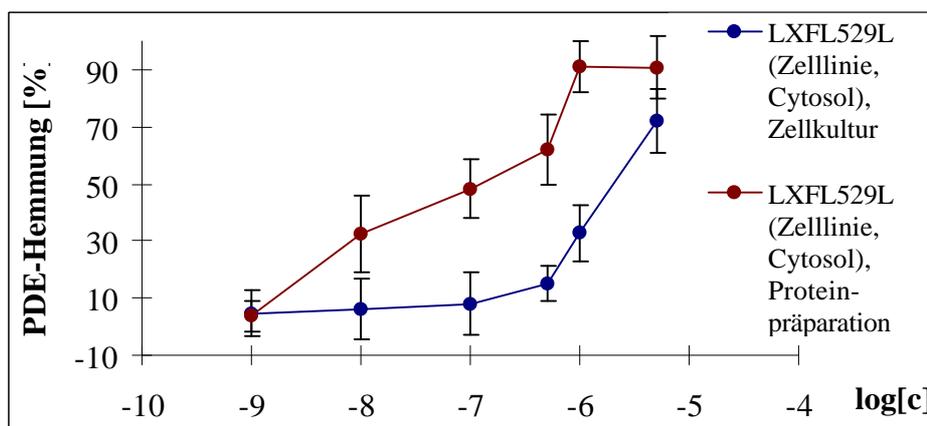


Abb. 59: Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen bei Inkubation der Proteinpräparation und in Zellkultur.

In der partikulären Fraktion zeigt sich genau der entgegengesetzte Effekt: Während beim Partikular, das erst nach der Zellaufarbeitung mit DC-TA-46 (Abb. 38) versetzt wurde, die Hemmkurve nur langsam ansteigt und die PDE-Hemmung bei höchster DC-TA-46-Konzentration (5×10^{-6} M) nur knapp 70% erreicht, steigt die PDE-Hemmung des Partikulars von mit dem Hemmstoff inkubierten LXFL529L-Zellen bereits bei der Konzentration 10^{-8} M auf über 40% an (Abb. 60, Werte s. Tab. 12 und 14). Bei mittleren DC-TA-46-Konzentrationen erreicht die PDE-Hemmkurve ein Plateau, steigt aber bei noch höheren Molaritäten (10^{-6} M, 5×10^{-6} M) nochmals steil an und erreicht bei Inkubation mit einer 5×10^{-6} molaren Lösung ungefähr 85% Hemmung der PDE-Aktivität.

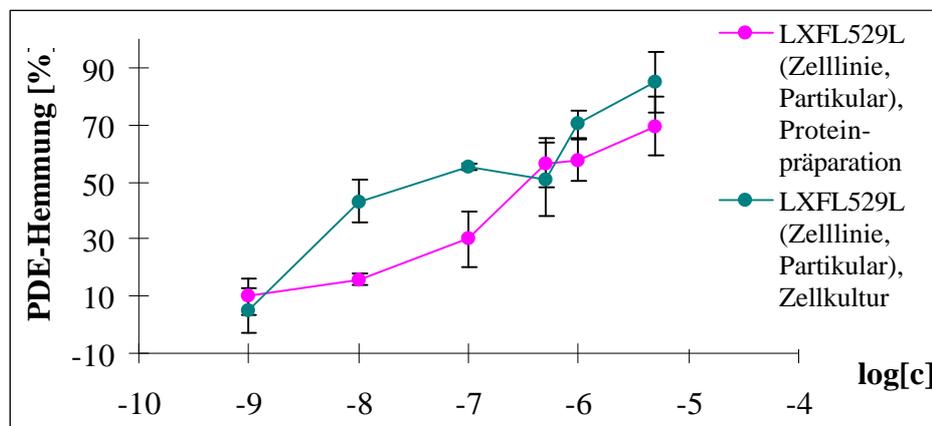


Abb. 60: Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen bei Inkubation der Proteinpräparation und in Zellkultur.

5.4.2. Diskussion

Im Cytosol der Proteinpräparation von LXFL529L-Zellen und LXFL529L-Tumorgewebe verläuft die Hemmkurve der Zellen bei hohen Konzentrationen etwas über der des Xenograft-Tumors (Abb. 56). Im Partikular hingegen wird im Tumor eine größere Hemmung durch hohe DC-TA-46-Konzentrationen erzielt (Abb. 57). Insgesamt wird jedoch weder im Cytosol noch im Partikular ein signifikanter Unterschied zwischen Zelllinie und Tumor beobachtet. Da DC-TA-46 einen potenten Hemmstoff der PDE4-Familie darstellt, war dieses Ergebnis auch zu erwarten, da sich Tumor und Zelllinie in ihrem prozentualen Gehalt an Rolipram-hemmbarer PDE nicht unterscheiden. Durch diese Ergebnisse konnte also die Diskrepanz zwischen PDE-Hemmung und Wachstumshemmung nicht erklärt werden. Deshalb wurde untersucht, ob DC-TA-46 auch in Zellkultur die PDE-Aktivität hemmt. Dort fällt bei der Betrachtung des Cytosols aus der Zellkultur auf, dass die PDE-Hemmung erst bei hohen Konzentrationen einen Wert

> 15% erreicht. Wird DC-TA-46 direkt zum Cytosol unbehandelter Zellen (Proteinpräparation) gegeben, steigt jedoch im Gegensatz dazu die Hemmkurve schnell an (Abb. 59). Im Partikular hingegen wird der umgekehrte Fall beobachtet (Abb. 60). Eine mögliche Erklärung bietet die Tatsache, dass DC-TA-46 bei Inkubation mit LXFL529L-Zellen vor allem ins Partikular aufgenommen wird [Porten, 2000]. An CarB-Zellen (hochmaligne Spindelzellkarzinomlinie der Maus) konnte gezeigt werden, dass DC-TA-46 als lipophile Substanz die Zellmembran schnell passieren und somit in die Zellen eindringen kann. Dabei ist die Aufnahmegeschwindigkeit des Pteridinderivats DC-TA-46 in die partikuläre Fraktion größer als ins Cytosol. Offenbar wird DC-TA-46 sofort nach Durchdringen der Zellmembran aus dem Cytosol an Membranstrukturen des endoplasmatischen Retikulums weitergeleitet [Marko et al., 1997; Merz, 1999]. Dass dies nicht nur bei CarB-, sondern auch bei LXFL529L-Zellen so ist, dafür spricht bereits die Beobachtung, dass bei Aufarbeitung von mit DC-TA-46 behandelten LXFL529L-Zellen die cytosolischen Proben nicht wie DC-TA-46 gelb gefärbt waren, die partikuläre Fraktion jedoch die gleiche Farbe aufwies wie der Inhibitor selbst. Durch konfokale Mikroskopie konnte gezeigt werden [Marko et al., 1997], dass sich das stark fluoreszierende DC-TA-46 im perinuklearen Bereich von LXFL529L-Zellen anreichert. Mit Fluoreszenzmarkern wurde eine Kolo-kalisation mit dem endoplasmatischen Retikulum beobachtet. Die in Teil 5.3. durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass sich jedoch mehr als 80% der PDE4-Isoenzyme bei LXFL529L-Zellen im Cytosol befinden. Zur Inhibierung des Hauptteils der PDE4 scheint demnach nur ein sehr geringer Teil des Hemmstoffs zur Verfügung zu stehen. Für den möglichen Einsatz zu therapeutischen Zwecken stellt diese Tatsache ein Problem dar, da ein Großteil der PDE4, die durch DC-TA-46 gehemmt werden soll, nicht oder nur in sehr geringem Maße erreicht werden kann. Bei Zugabe von DC-TA-46 zu aufgearbeitetem unbehandeltem Cytosol kann der Hemmstoff nicht mehr im Partikular abgefangen werden und steht so vollständig zur Hemmung der cytosolischen PDE4 zur Verfügung, was die schon bei geringen DC-TA-46-Konzentrationen höhere PDE-Hemmung erklärt (Abb. 54). Möglicherweise sind LXFL529L-Zellen also fähig, DC-TA-46 am endoplasmatischen Retikulum regelrecht zu akkumulieren. Obwohl die Endkonzentrationen im Inkubationsmedium bzw. bei Zugabe zur Proteinpräparation eigentlich gleich sind, vermögen die mit dem Hemmstoff inkubierten Zellen im endoplasmatischen Retikulum DC-TA-46 verstärkt einzulagern (Abb. 58) und können so scheinbar aus dem Kulturmedium eine größere Stoffmenge aufnehmen, als bei Inkubation nach der Aufarbeitung für die Hemmwirkung zur Verfügung steht. Dieser Effekt wird ebenfalls durch die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestätigt. Rund um den Zellkern, also am endoplasmatischen Retikulum, werden leuchtendgelbe, vesikelartige Ablagerungen von DC-TA-46 beobachtet, während im Cytosol kein Hemmstoff zu erkennen ist [Marko et al., 1997].

Weitere Tests sollten nun mit der Zelllinie LXFS650L und dem entsprechenden Xenograft LXFS650 durchgeführt werden. Obwohl LXFS650L-Zellen deutlich weniger PDE-

Gesamtaktivität und auch weniger PDE4 enthalten, sind diese Zellen sensitiver gegenüber DC-TA-46. Die Apoptose wird bereits bei niedrigeren Konzentrationen des Inhibitors beobachtet als bei LXFL529L-Zellen und erfolgt aus der G1- und der G2-Phase heraus, während in LXFL529L-Zellen nur Apoptose aus der G1-Phase beobachtet wird [Wagner, 1998]. Hier sollte nun überprüft werden, ob die für LXFL529 erhaltenen Ergebnisse auch für LXFS650L-Zellen und den entsprechenden Xenograft-Tumor gelten.

5.4.3. LXFS650L-Zellen und LXFS650L-Xenograft-Tumor

5.4.3.1. Zelllinie LXFS650L

Tab. 15:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular und im Cytosol der Zelllinie LXFS650L; durchgeführt wurden 4 unabhängige Messungen, wobei die Aufarbeitung in Doppelbestimmung erfolgte; die Inkubation mit DC-TA-46 erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Konzentrationen zum aufgearbeiteten Cytosol bzw. Partikular aufgearbeiteter Zellen.

log[c]	PDE-Hemmung [%]	
	Zelllinie LXFS650 (Cytosol), Inkubation der Proteinpräparation	Zelllinie LXFS650L (Partikular), Inkubation der Proteinpräparation
-5,3	86,4 ± 8,1	78,4 ± 2,0
-6	78,5 ± 10,7	76,9 ± 6,9
-6,3	71,2 ± 4,1	50,4 ± 13,8
-7	53,6 ± 13,5	24,0 ± 8,0
-8	17,9 ± 11,6	7,8 ± 4,8
-9	0,3 ± 0,6	5,4 ± 4,1
IC ₅₀ [µM]	0,33 ± 0,12	0,58 ± 0,11

Auch bei LXFS650L-Zellen verläuft die Hemmkurve des Cytosols über der des Partikulars (Abb. 61 und Tab. 15), d.h. im Cytosol wird bereits durch geringere Konzentrationen des Inhibitors eine größere Hemmung erzielt. Die cytosolische Kurve verläuft im mittleren Teil, d. h. im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-8} und 10^{-6} M, relativ kontinuierlich, in diesem Teil unterscheiden sich die beiden Kurven auch signifikant. Erst bei Inkubation mit einer 5×10^{-6} molaren Inhibitorkonzentration flacht die Hemmkurve der cytosolischen Proben ab. Im Partikular wird bei Einsatz niedriger Konzentration (10^{-9} M, 10^{-8} M) des Pteridinderivats DC-TA-46 fast keine Hemmung beobachtet, der Graph verläuft nahezu parallel zur Abszisse.

Das bereits beim Cytosol erwähnte Abflachen der Kurve bei hohen Inhibitorkonzentrationen wird auch hier beobachtet.

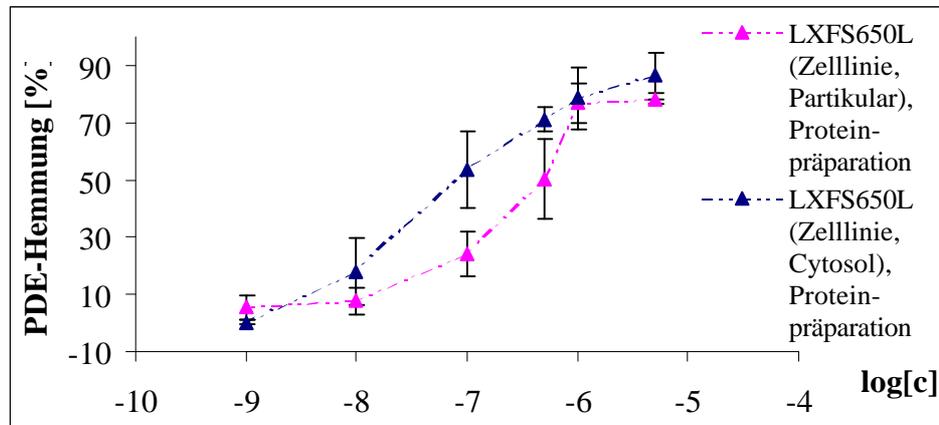


Abb. 61:
Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol und Partikular der Zelllinie LXFS650L.

5.4.3.2. Xenograft LXFS650

Tab. 16:
Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular und im Cytosol des Tumors LXFS650; durchgeführt wurden 5 unabhängige Messungen.

log[c]	PDE-Hemmung [%]	
	Tumor LXFS650 (Cytosol)	Tumor LXFS650 (Partikular)
-5,3	83,8 ± 14,9	78,8 ± 10,1
-6	64,0 ± 11,3	60,9 ± 12,9
-6,3	56,7 ± 11,3	40,8 ± 7,8
-7	45,5 ± 7,3	29,0 ± 7,4
-8	26,8 ± 12,1	11,1 ± 8,8
-9	4,5 ± 4,5	1,6 ± 2,4
IC ₅₀ [µM]	0,23 ± 0,045	0,58 ± 0,16

Die cytosolischen und partikulären Proben des Tumors LXFS650 (Tab. 16 und Abb. 62) unterscheiden sich nur geringfügig hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber DC-TA-46. Bis hin zu einer Konzentration von 5×10^{-7} M verläuft die Hemmkurve des Partikulärs nahezu parallel unterhalb der des Cytosols. Bei Inkubation mit einer 10^{-6} molaren Lösung wird sowohl im Cytosol als auch im Partikular eine ähnliche Hemmung erreicht, und auch bei Einsatz der

höchsten DC-TA-46-Konzentration (5×10^{-6} M) sind die erzielten Hemmungen der PDE-Aktivität im LXFS650-Tumor ähnlich: Im Cytosol werden ungefähr 84%, im Partikular ca. 79% gehemmt.

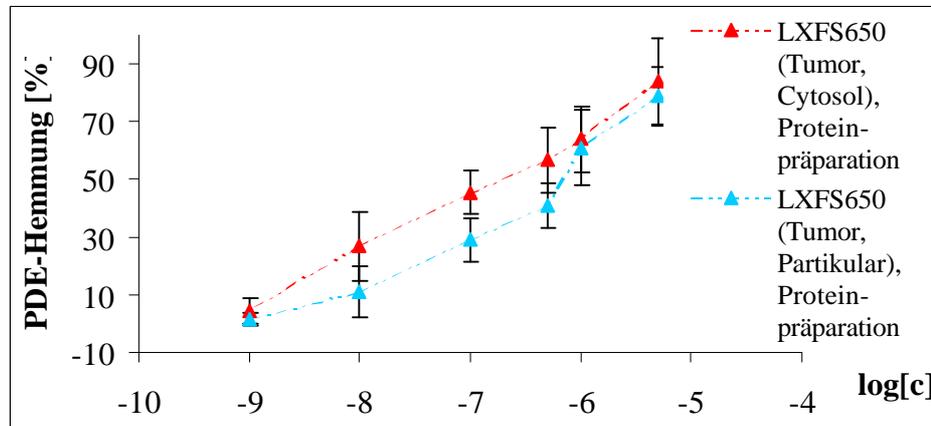


Abb. 62: Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular und im Cytosol des Tumors LXFS650.

5.4.3.3. Vergleich Zelllinie-Xenograft

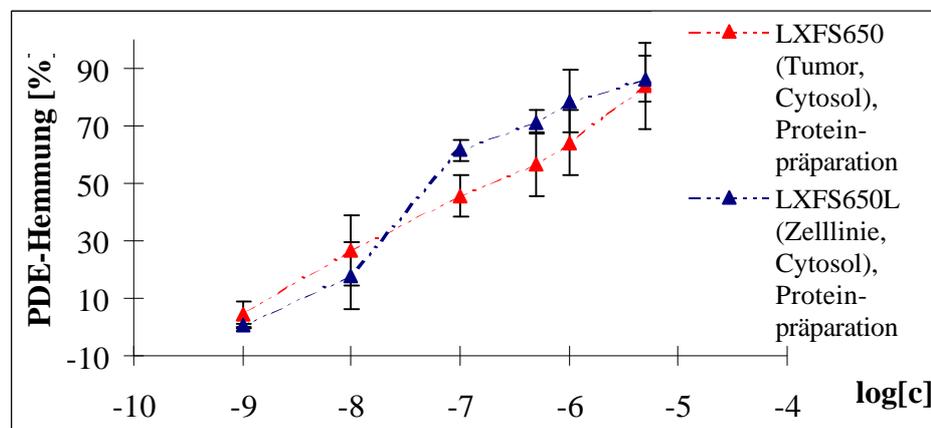


Abb. 63: Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol des Tumors LXFS650 und der Zelllinie LXFS650L (Inkubation der Proteinpräparation).

Bezüglich des Cytosols von LXFS650 herrscht im Tumor und der Zelllinie kein großer Unterschied (Abb. 63, Werte s. Tab. 15 und 16), lediglich im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-7} M und 10^{-6} M verläuft die Hemmkurve der Zelllinie oberhalb des Tumors. Bei Einsatz einer 10^{-7} molaren DC-TA-46- Lösung wird in der Zelllinie eine Hemmung von

61,4%, im Tumor dagegen lediglich von 45,5% erreicht. Die Werte der 5×10^{-7} M Lösung unterscheiden sich nicht signifikant.

Auch die Hemmkurven des Partikulars unterscheiden sich kaum (Abb. 64, Werte s. Tab. 15 und 16). Bei beiden Versuchen wurde mit den Konzentrationen 10^{-9} sowie 10^{-8} M lediglich eine geringe Hemmung ($\leq 11,1\%$) erzielt. Im Konzentrationsbereich von 10^{-7} M bis 10^{-6} M steigen beide Kurven bei nahezu identischem Verlauf stark an. Vor allem im Partikular der Zelllinie, aber auch in geringerem Maße beim Tumor, ist dann bei der höchsten Konzentration ein deutliches Abflachen der Kurve zu beobachten, was auf einen Übergang in ein Plateau hindeuten könnte.

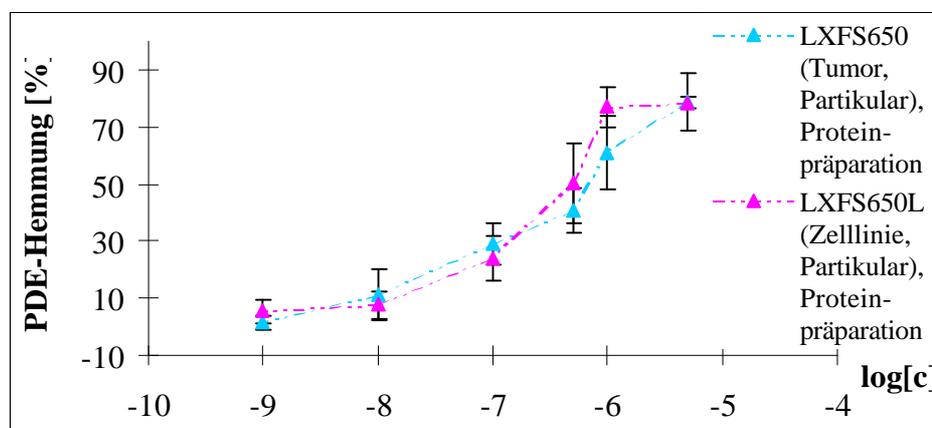


Abb. 64:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular des Tumors LXFS650 und der Zelllinie LXFS650L (Inkubation der Proteinpräparation).

5.4.3.4. LXFS650L-Zellen: Vergleich Cytosol und Partikular bei Inkubation in Zellkultur

Die Hemmkurven des Cytosols und Partikulars von LXFS650L-Zellen, die 24 h mit DC-TA-46 inkubiert wurden, unterscheiden sich bezüglich ihrer PDE-Aktivität kaum. Die cytosolische Hemmkurve flacht bereits bei niedrigen Konzentrationen ab und scheint ein Plateau zu erreichen. Bei Inkubation mit 5×10^{-6} M werden lediglich 63,4% des PDE gehemmt. Die Hemmkurve des Partikulars verläuft bei mittleren und hohen Inhibitorkonzentrationen oberhalb der des Cytosols. Bei 5×10^{-6} M DC-TA-46 erreicht die partikuläre Kurve 85,7% PDE-Hemmung, weist jedoch eine relativ hohe Standardabweichung auf, so dass der Unterschied zur cytosolischen nicht signifikant ist.

Tabelle 17:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol und Partikular von LXFS650L-Zellen -Zellen bei Inkubation in Zellkultur; durchgeführt wurden 4 unabhängige Messungen, wobei die Aufarbeitung in Doppelbestimmung erfolgte.

log[c]	PDE-Hemmung [%]	
	Zelllinie LXFS650L (Cytosol), Inkubation in Zellkultur	Zelllinie LXFS650L (Partikular), Inkubation in Zellkultur
-5,3	62,4 ± 12,2	85,7 ± 16,5
-6	61,4 ± 5,5	73,6 ± 11,6
-6,3	51,0 ± 0,1	64,4 ± 1,7
-7	51,6 ± 9,7	58,9 ± 7,2
-8	41,1 ± 9,1	27,5 ± 8,5
-9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
IC ₅₀ [µM]	0,13 ± 0,04	0,046 ± 0,005

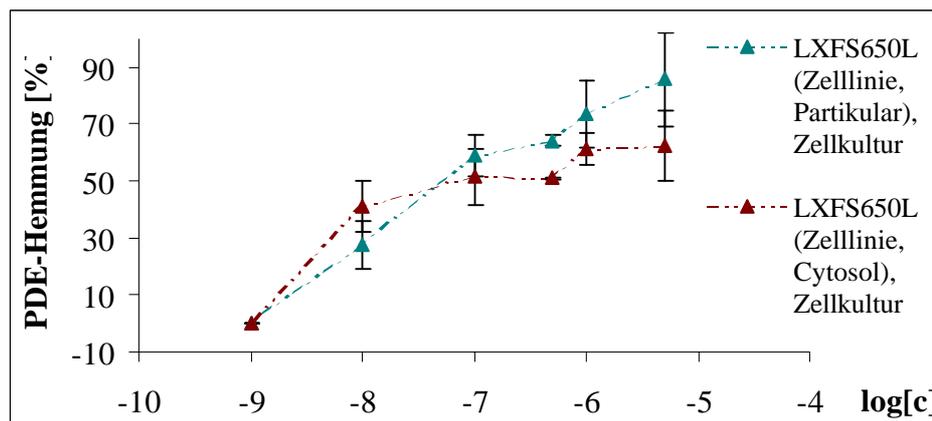


Abb. 65:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol und Partikular von LXFS650L-Zellen bei Inkubation in Zellkultur.

5.4.3.5. Vergleich Proteinpräparation und Inkubation in Zellkultur

Bei Inkubation nach der Zellaufarbeitung ist ein kontinuierlicher Anstieg der PDE-Hemmung durch DC-TA-46 zu verzeichnen. Mit einer 5×10^{-6} M Endkonzentration wird eine recht hohe Hemmung von 86,4% erreicht. In diesem Konzentrationsbereich wird der Kurvenverlauf auch etwas flacher. Im Gegensatz dazu steigt die Kurve im Cytosol von mit DC-TA-46 inkubierten Zellen schon bei einer 10^{-8} M Konzentration auf 41,1% PDE-Hemmung an. Bei höheren Konzentrationen wird jedoch nur noch eine geringere Steigerung der Hemmung bis auf 62,4% bei 5×10^{-6} M DC-TA-46 im Inkubationsansatz beobachtet, die Kurve wird deutlich flacher und

erreicht ein Plateau. Beide Hemmkurven unterscheiden sich nicht signifikant. Lediglich bei hohen Inhibitorkonzentrationen wird bei nach der Aufarbeitung behandeltem Cytosol eine höhere Hemmung beobachtet, während bei Inkubation der Zellen im Cytosol ein Plateau erreicht wird (Abb. 66, Werte s. Tab. 15 und 17).

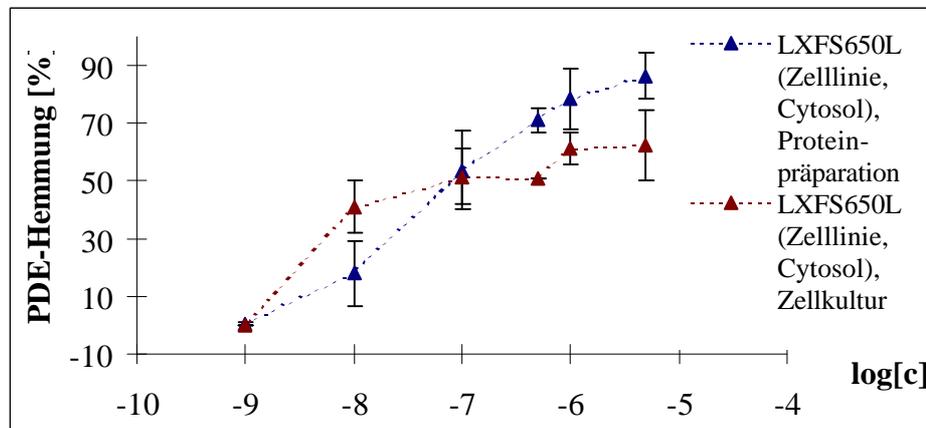


Abb. 66: Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol von LXFS650-Zellen bei Inkubation der Proteinpräparation und in Zellkultur.

Die Hemmkurven der beiden unterschiedlich inkubierten Partikulare der Zelllinie LXFS650L unterscheiden sich deutlich (Abb. 67, Werte s. Tab. 15 und 17): Während die Hemmkurve der nach der Aufarbeitung mit DC-TA-46 versetzten Proben nur relativ langsam ansteigt (bei 10^{-7} M DC-TA-46 lediglich 24% Hemmung) und bei einer 5×10^{-6} M DC-TA-46-Lösung ein Plateau bei knapp 80% Hemmung erreicht, steigt der Graph des Partikulars (Zellkultur) bei niedrigen DC-TA-46-Konzentrationen stärker an, bereits bei 10^{-7} M wird eine PDE-Hemmung von 58,9% beobachtet. Der Wert, der mit der höchsten Inhibitorkonzentration erreicht wird, liegt jedoch in der gleichen Größenordnung wie bei der Proteinpräparation, nämlich bei ca. 85%.

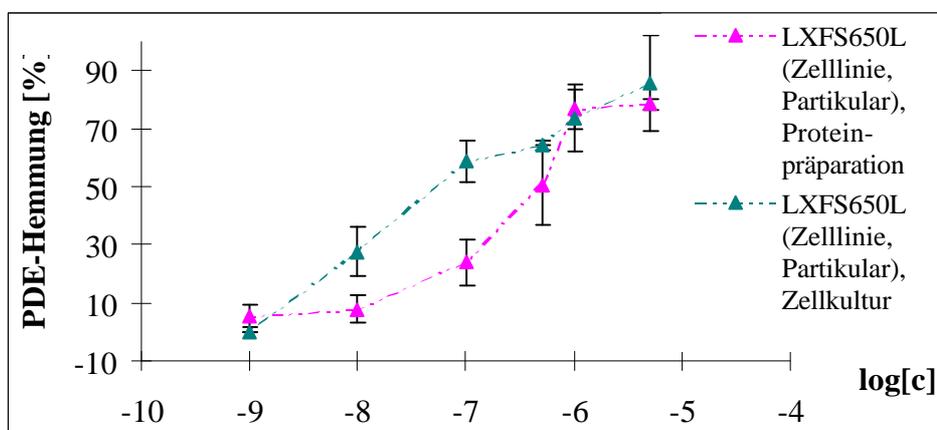


Abb. 67: Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular von LXFS650L-Zellen bei Inkubation der Proteinpräparation und in Zellkultur.

5.4.3.6. Vergleich Zelllinien LXFL529L und LXFS650L

5.4.3.6.1. PROTEINPRÄPARATON

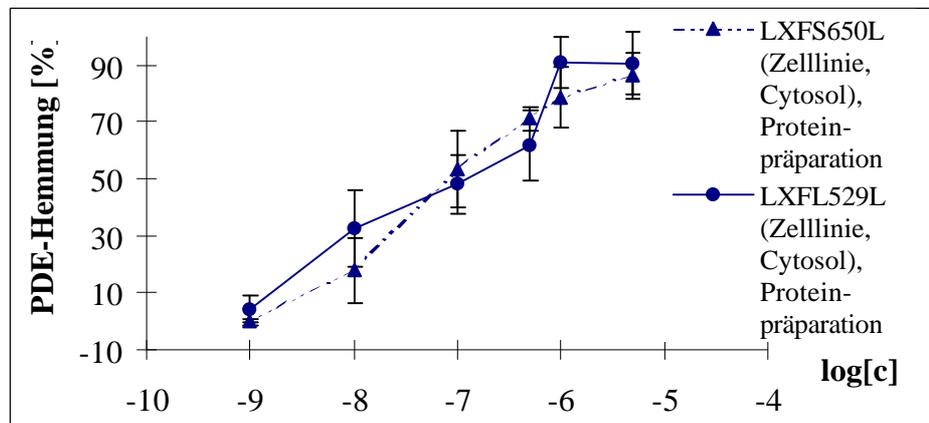


Abb. 68: Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol der Zelllinien LXFS650L und LXFL529L bei Inkubation der Proteinpräparation.

Bei Vergleich der Cytosole, die erst nach Aufarbeitung der beiden Zelllinien mit den verschiedenen DC-TA-46-Konzentrationen versetzt wurden (Abb. 68, Werte s. Tab. 12 und 15), ist kein deutlicher Unterschied zu beobachten. Die beiden Kurven zeigen nahezu den gleichen Verlauf. Im Cytosol von LXFL529L-Zellen wird bei hohen Hemmstoffkonzentrationen (10^{-6} sowie 5×10^{-6} M) ein Plateau erreicht, dieser Effekt kann bei LXFS650L-Zellen nicht mit der gleichen Deutlichkeit beobachtet werden, allerdings wird auch diese Hemmkurve bei hohen Konzentrationen flacher. Die PDE-Hemmungen, die bei Einsatz einer 5×10^{-6} M Lösung beobachtet werden, unterscheiden sich ebenfalls nicht voneinander und liegen bei 86,4% für das Cytosol von LXFS650L- bzw. 90,7% für LXFL529L-Zellen.

Die PDE-Hemmkurven der erst nach der Aufarbeitung mit DC-TA-46 behandelten Partikulare der beiden Zelllinien LXFL529L sowie LXFS650L weisen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 69, Werte s. Tab. 12 und 15). Im Konzentrationsbereich von 10^{-9} M - 5×10^{-7} M verlaufen die Kurven nahezu parallel, wobei die PDE-Hemmung bei LXFL529L immer geringfügig höher ist als bei LXFS650L. Erst bei hohen DC-TA-46-Konzentrationen tritt eine Abweichung des analogen Kurvenverlaufs auf: Während die Hemmkurve von LXFL529L-Zellen bei hohen Konzentrationen flacher wird (56,7% bei 5×10^{-7} M, 57,3% bei 10^{-6} M) und einen Wert von 69,5% bei der höchsten DC-TA-46-Konzentration von 5×10^{-6} M erreicht, steigt der Graph von LXFS650L nochmals steil an (von

50,4% bei 5×10^{-7} M auf 76,9% bei 10^{-6} M) und erreicht ein Plateau bei 78,4% Hemmung bei 5×10^{-6} M DC-TA-46.

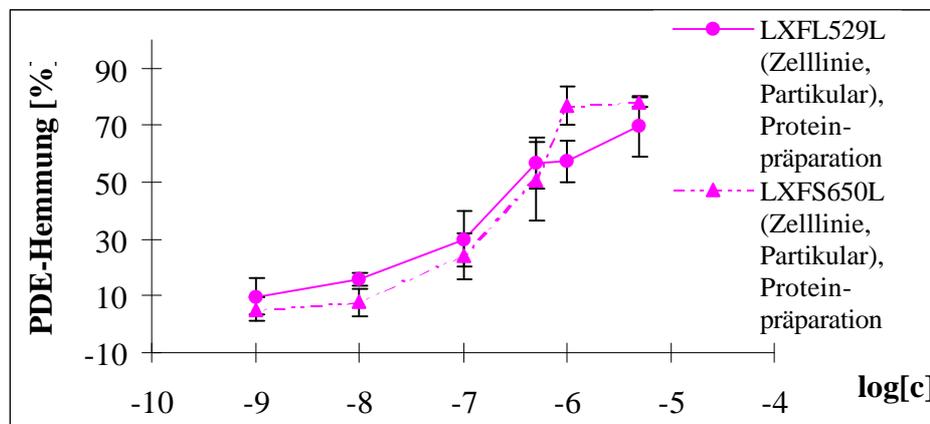


Abb. 69:

Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular der Zelllinien LXFS650L und LXFL529L bei Inkubation der Proteinpräparation.

5.4.3.6.2. ZELLKULTUR

Beim Vergleich der beiden Zelllinien bezüglich der PDE-Hemmung im Cytosol von mit DC-TA-46 behandelten Zellen wird ein signifikanter Unterschied deutlich (Abb. 70, Werte s. Tab. 14 und 17): Dem exponentiellen Verlauf der PDE-Hemmkurve des Cytosols von LXFL529L mit sehr niedrigen Werten der PDE-Hemmung bei niedrigen und mittleren DC-TA-46-Konzentrationen (14,9% bei 5×10^{-7} M) steht ein wesentlich steilerer Anstieg von 0,0% Hemmung bei 10^{-9} M auf 41,1% bei 10^{-8} M bei LXFS650L gegenüber. Der Graph von LXFS650L erreicht nun ein Plateau, und auch bei hohen DC-TA-46-Konzentrationen wird lediglich eine Hemmung von 62,4% (bei 5×10^{-6} M) erreicht. Im Gegensatz dazu steigt die Hemmung von LXFL529L nach geringen Werten (bis zu einer Konzentration von 5×10^{-7} M nahezu paralleler Verlauf zur x-Achse) nun auf 32,5% bei 10^{-5} M DC-TA-46 an. Auch der letzte Teil der Hemmkurve bleibt steiler als der Bereich bei geringen Konzentrationen; die Inhibition, die mit der höchsten Konzentration (5×10^{-6} M) erreicht wird, liegt bei 72,2% und damit höher als bei LXFS650L (62,4%).

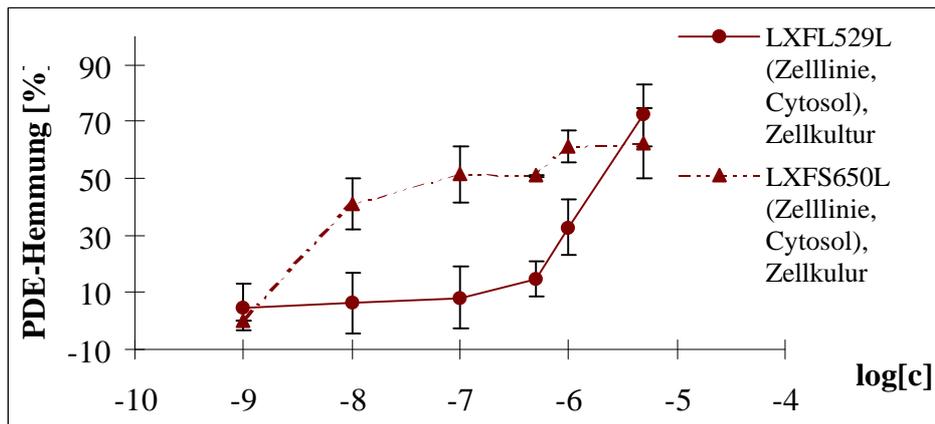


Abb. 70:
Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Cytosol der Zelllinien LXFS650L und LXFL529L bei Inkubation in Zellkultur.

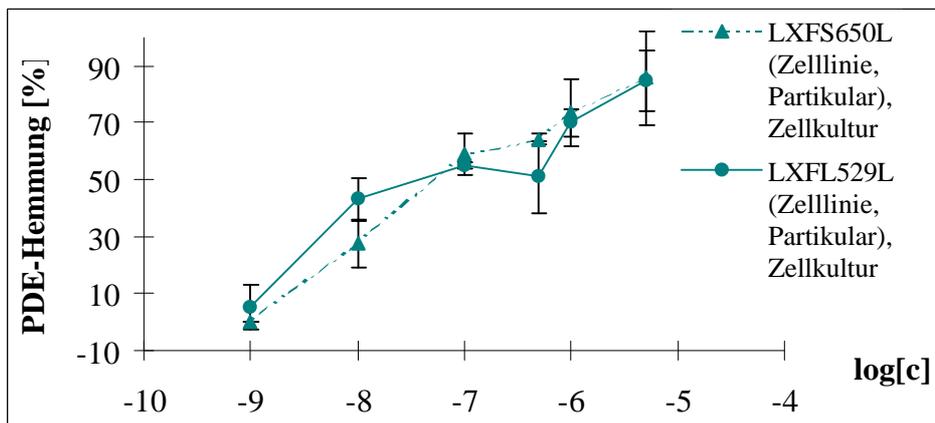


Abb. 71:
Durch DC-TA-46 induzierte PDE-Hemmung im Partikular der Zelllinien LXFS650L und LXFL529L bei Inkubation in Zellkultur.

Im Partikular beider Zelllinien, die vor ihrer Aufarbeitung 24 h mit DC-TA-46 inkubiert wurden, besteht kein signifikanter Unterschied in der PDE-Hemmung zwischen LXFS650L und LXFL529L (Abb. 71, Werte s. Tab. 14 und 17). Eine geringe Differenz zeigt sich bei niedrigen DC-TA-46-Konzentrationen, wo der Graph des Partikulars von LXFL529L-Zellen etwas schneller von 5,2% bei 10^{-9} M auf 43,2% bei 10^{-8} M ansteigt, während bei LXFS650 der Anstieg etwas flacher verläuft (von 0,0% bei 10^{-9} M auf 27,5% bei 10^{-8} M). Die Kurve von LXFL529L erreicht dann jedoch ein Plateau, während die von LXFS650L weiterhin ansteigt. Die Hemmungen der partikulären PDE-Aktivität liegt bei einer 10^{-7} M DC-TA-46-Konzentration fast bei dem gleichen Wert. Während die PDE-Hemmung in LXFS650L-Zellen auch bei hohen Konzentrationen weiterhin nahezu linear ansteigt, verläuft die Kurve für

LXFL529L-Zellen immer noch auf einem Plateau. Allerdings ist der Unterschied der PDE-Hemmung auch hier nicht signifikant. Bei beiden Linien beträgt die Hemmung der PDE durch die höchste InhibitorKonzentration (5×10^{-6} M) nahezu 85%.

5.4.4. Diskussion

Betrachtet man die Hemmwirkung von DC-TA-46 am Cytosol und Partikular der Zelllinie LXFS650L und dem entsprechenden Tumor, so kann kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb. 63 und 64). Trotz der deutlich höheren PDE-Gesamtaktivität im Tumor (s. Tab. 7 und 11) liegt die durch DC-TA-46 erzielte prozentuale Hemmung der PDE-Aktivität sowohl im Cytosol als auch im Partikular im gleichen Bereich. Da sich die cytosolische Fraktion von Zellen und Xenograft bezüglich der Rolipram-Hemmbarkeit nicht signifikant unterscheiden, ist dieses Ergebnis für das Cytosol nicht überraschend. Im Partikular liegt jedoch in LXFS650L-Zellen deutlich mehr Rolipram-hemmbar PDE (PDE4) vor. Aus diesem Grund wäre in LXFS650L-Zellen eine höhere Hemmung durch DC-TA-46 als im Tumor zu erwarten gewesen. Möglicherweise kommt die ebenso hohe Hemmung der PDE-Gesamtaktivität im Xenograft wie in den Zellen durch Inhibition anderer cAMP-hydrolysierender PDE-Isoenzyme zustande. In LXFS650L-Zellen wird nach Inkubation in Zellkultur im Partikular der gleiche Effekt wie bereits bei LXFL529L-Zellen beobachtet: Auch diese Zellen sind offenbar in der Lage, den Hemmstoff in der Membran einzulagern, so dass bei Inkubation in der Zellkultur im Partikular schon bei niedrigen Konzentrationen eine größere Stoffmenge an Hemmstoff für die PDE-Hemmung zur Verfügung steht (s. Abb. 67). Mit der PDE-Hemmung im Cytosol von LXFS650L-Zellen verhält es sich jedoch deutlich anders als bei LXFL529L-Zellen (s. Abb. 70). Hier steigt die Hemmkurve der in der Zellkultur behandelten Proben wesentlich schneller an als bei LXFL529L-Zellen. Möglicherweise werden in LXFS650L-Zellen andere Isoformen im Cytosol exprimiert, die durch DC-TA-46 stärker gehemmt werden. Die höhere Hemmwirkung im Cytosol von LXFS650L-Zellen (Zellkultur) scheint mit der höheren Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von DC-TA-46 im Sulforhodamin B-Test zu korrelieren [Wagner, 1998].

5.5. Hemmwirkung substituierter Pteridine

Das Pteridinderivat DC-TA-46 ist ein potenter Hemmstoff der cAMP-spezifischen Isoenzymfamilie PDE4 (Drees, 1992; Merz et al., 1998). Da bislang keine Kristallstrukturanalysen von PDE4 und PDE4-Inhibitor-Komplexen existieren, ist das Wissen über strukturelle Erfordernisse von Inhibitoren sehr begrenzt. Zur Durchführung von Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen wurden deshalb sowohl die Substituenten als auch das Grundgerüst der Leitsubstanz DC-TA-46 modifiziert. An isolierter PDE4 aus solidem Xenograft-Tumorgewebe des humanen Lungenkarzinoms LXFL529 wurde die Wirkung der Modifikationen auf die Hemmung der cAMP-Hydrolyse untersucht. Darüber hinaus wurde die wachstumshemmende Wirkung der Substanzen im Sulforhodamin B-Assay bestimmt. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen und PDE-Hemmung an isolierter PDE4 aus LXFL529-Xenograft-Gewebe abgeleitet werden. Mögliche Gründe für die fehlende Korrelation können in der Aufnahme, der Verteilung, dem Metabolismus und der Ausscheidung, der Beeinflussung anderer zellulärer Targets bzw. der subzellulären Lokalisation bedingt sein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Diskrepanz zwischen der durch DC-TA-46 induzierten PDE-Hemmung am isolierten Zellextrakt und der Hemmwirkung auf die cAMP-Hydrolyse in LXFL529L-Zellen in Zellkultur besteht (Kapitel 5.4.). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die durch die Pteridinderivate induzierte Hemmung der intrazellulären PDE-Aktivität untersucht werden. Von besonderem Interesse war hierbei, ob die Hemmung der intrazellulären PDE-Aktivität mit der Hemmung des Tumorzellwachstums korreliert und damit eine wichtige Messgröße bei der Entwicklung neuer potentieller Hemmstoffe darstellt.

Neben den bereits von Merz et al. (1998) an isolierter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe untersuchten Derivaten standen eine Reihe neuer, hinsichtlich ihrer Hemmwirkung bislang nicht untersuchter Verbindungen zur Verfügung. Für diese Substanzen sollte neben der intrazellulären Hemmwirkung auch die Hemmung der cAMP-Hydrolyse an isolierter PDE4 bestimmt werden. Die Ergebnisse der Einzelmessungen sowie die vollständigen Strukturformeln sind im Anhang dargestellt.

5.5.1. Ergebnisse

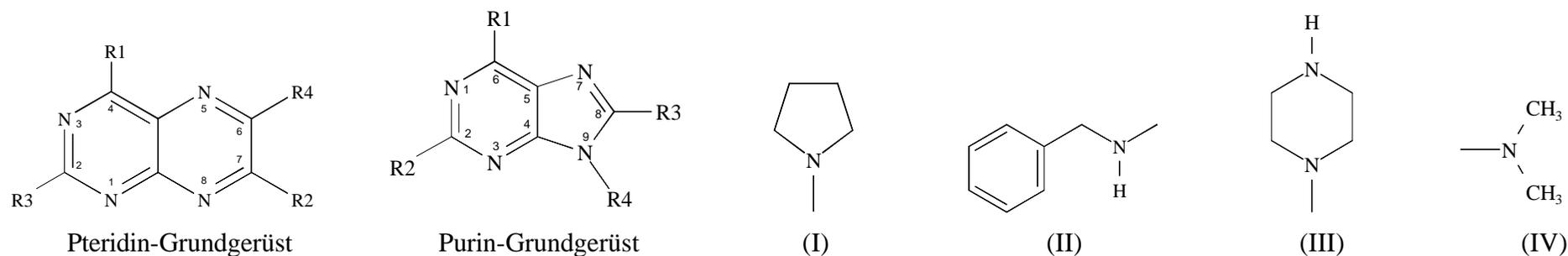
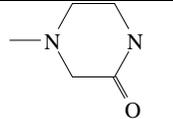
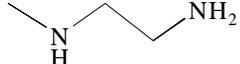
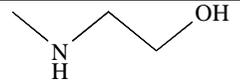
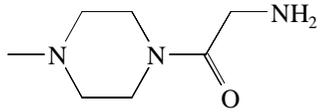
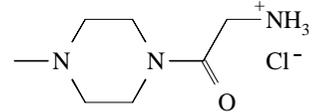


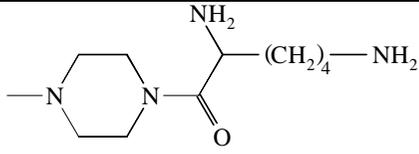
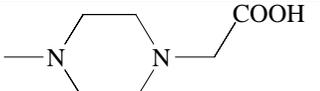
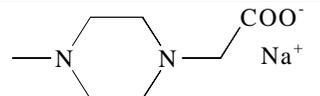
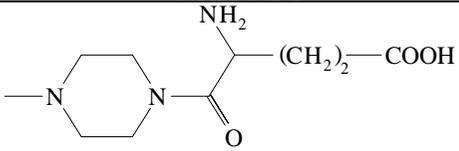
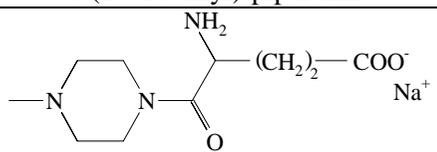
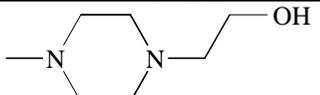
Abb. 72:
Pteridin- und PurinGrundgerüst sowie verwendete Substituenten.

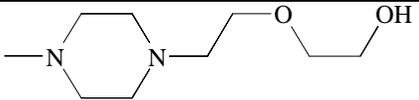
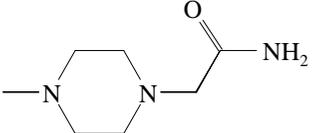
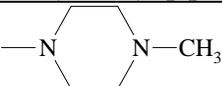
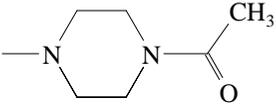
Tabelle 18:

Übersicht über die getesteten Substanzen. Aufgeführt ist die Struktur und die IC_{50} -Werte der Wachstumshemmung im SRB-Test an LXFL529L-Zellen sowie der PDE-Hemmung an hochaufgereinigter PDE4 und im Cytosol von LXFL529L-Zellen; *: Messung nur einmal durchgeführt (Dreifachbestimmung); **: Merz et al., 1998; ***: Müller, 2000; n.b.: nicht bestimmung; -: Aufgrund der zu geringen Hemmwirkung ist kein IC_{50} -Wert bestimmbar.

Nr.	Grundgerüst	R1	R2	R3	R4	Wachstumshemmung, IC_{50} [μ M]	PDE-Hemmung (isoliertes Enzym), IC_{50} [μ M]	PDE-Hemmung (LXFL529L-Zellen), IC_{50} [μ M]
DC-TA-46 (E481)	Pteridin	(I)	(II)	(III)	-Cl	$2,3 \pm 0,3$ **	$0,016 \pm 0,005$ **	$2,0 \pm 0,46$
E482	Pteridin	(II)	(I)	(III)	-Cl	$4,0 \pm 0,2$ **	$0,083 \pm 0,037$ **	$3,3 \pm 0,08$
E499	Pteridin	(I)	(I)	(III)	-Cl	$3,1 \pm 0,1$ **	$0,059 \pm 0,005$ **	$0,1 \pm 0,02$
E581	Pteridin	(IV)	(IV)	(III)	-Cl	> 20 **	$1,2 \pm 0,5$ **	> 5 ($43,9 \pm 8,3$ % PDE-Hemmung bei 5μ M)
E582	Pteridin	(I)	(IV)	(III)	-Cl	$5,8 \pm 0,4$ **	$0,046 \pm 0,006$ **	$0,7 \pm 0,08$

Nr.	Grundgerüst	R1	R2	R3	R4	Wachstumshemmung, IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung (isoliertes Enzym), IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung (LXFL529L-Zellen/529L-Zellen), IC ₅₀ [μM]
E583	Pteridin	(IV)	(II)	(III)	-Cl	5,9 ± 0,6 **	0,30 ± 0,14 **	4,5 ± 2,2
E483	Pteridin	(I)	(II)	 3-Oxopiperazino	-Cl	9,5 ± 2,2 **	4,2 ± 0,5 **	- (0,7 ± 1,0 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E495	Pteridin	(I)	(II)	 Morpholino	-Cl	> 20 **	2,5 ± 0,4 **	- (4,3 ± 6,0 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E497	Pteridin	(I)	(II)	(IV)	-Cl	11,8 ± 0,8 **	1,8 ± 1,2 **	- (6,5 ± 7,8 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E584	Pteridin	(I)	(II)	 2-Aminoethylamino	-Cl	3,2 ± 0,4 **	3,7 ± 0,5 **	- (4,1 ± 5,8 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E585	Pteridin	(I)	(II)	 2-Hydroxyethylamino	-Cl	15,2 ± 1,4 **	2,8 ± 0,1 **	- (2,6 ± 5,1 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E276	Pteridin	(I)	(II)	(III)	-CH ₃	4,1 ± 0,3 ***	0,5 ± 0,16	1,8 ± 0,5
E586	Pteridin	(I)	(II)	(III)	-H	7,3 ± 0,7 **	0,36 ± 0,09 **	> 10 (48,5 ± 9,1 % PDE-Hemmung bei 10 μM)
E272	Pteridin	(I)	(II)	 4-Glycylpiperazino	-Cl	5,2 ± 0,6 ***	22,5 ± 2,3	- (4,2 ± 5,9 % PDE-Hemmung bei 5 μM) <u>Partikular:</u> > 5 (36,5 ± 9,4 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E272a	Pteridin	(I)	(II)	 4-Glycylpiperazino	-Cl	4,0 ± 0,4 ***	17,1 ± 0,5	n.b.

Nr.	Grundgerüst	R1	R2	R3	R4	Wachstumshemmung, IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung (isoliertes Enzym), IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung (LXFL529L-Zellen/529L-Zellen), IC ₅₀ [μM]
E273	Pteridin	(I)	(II)	 4-Lysylpiperazino	-Cl	n.b.	21,7 ± 2,2	> 5 (35,0 ± 5,5 % PDE-Hemmung bei 5 μM) <u>Partikular:</u> > 5 (22,1 ± 8,1 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E274	Pteridin	(I)	(II)	 4-Carboxymethylpiperazino	-Cl	41,7 ± 4,2 ***	1,8 ± 0,1	2,5 ± 0,65 <u>Partikular:</u> 3,8*
E274a	Pteridin	(I)	(II)	 4-Carboxymethylpiperazino	-Cl	> 75 ***	2,8 ± 0,2	> 5 (44,4 ± 6,7 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E275	Pteridin	(I)	(II)	 4-(1-Glutamyl)-piperazino	-Cl	15,7 ± 2,1 ***	32,9 ± 5,5	- (keine PDE-Hemmung bei 5 μM) <u>Partikular:</u> - (2,7 ± 5,3 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E275a	Pteridin	(I)	(II)	 4-(1-Glutamyl)-piperazino	-Cl	> 75 ***	8,1 ± 1,5	> 5 (31,6 ± 3,4 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E278	Pteridin	(I)	(II)	 4-(2-Hydroxyethyl)	-Cl	8,6 ± 0,6 ***	27,6 ± 5,8	- (6,2 ± 8,7 % PDE-Hemmung bei 5 μM)

Nr.	Grundgerüst	R1	R2	R3	R4	Wachstumshemmung, IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung (isoliertes Enzym), IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung (LXFL529L-Zellen), IC ₅₀ [μM]
E279	Pteridin	(I)	(II)	 <p>4-[2-(2-Hydroxy-ethoxy)-ethyl]-piperazino</p>	-Cl	13,3 ± 0,6 ***	> 100	- (keine PDE-Hemmung bei 5 μM)
E280	Pteridin	(I)	(II)	 <p>4-carbamoylmethyl-piperazino</p>	-Cl	18,5 ± 1,7 ***	27,3 ± 0,7	n.b.
E493	Pteridin	(I)	(II)	 <p>4-N-Methylpiperazino</p>	-Cl	6,5 ± 0,5 **	3,1 ± 0,7 **	- (keine PDE-Hemmung bei 10 μM)
E494	Pteridin	(I)	(II)	 <p>4-N-Acetyl-piperazino</p>	-Cl	13,0 ± 1,1 **	5,9 ± 1,1 **	3,6 ± 1,3
E277	Purin	(I)	(III)	-Cl	-H	27,0 ± 4,0 ***	1,8 ± 0,6	- (2,6 ± 4,9 % PDE-Hemmung bei 5 μM)
E496	Pteridin	(III)	(II)	(I)	-Cl	4,7 ± 1,1 **	> 10 **	- (keine PDE-Hemmung bei 5 μM)

Tab. 18 gibt alle Ergebnisse in zusammengefasster Form wieder. Die vollständigen Messwerte zur Wachstumshemmung, zur PDE-Hemmung an isolierter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe und an LXFL529L-Zellen sowie die Strukturformeln sind dem Anhang zu entnehmen.

Abb. 73 zeigt den Zusammenhang zwischen den IC_{50} -Werten der PDE-Hemmung am isolierten Enzym und der Wachstumshemmung. Die gemäß der Struktur eingeteilten Gruppen wurden in verschiedenen Farben dargestellt. Weitere Diagramme werden innerhalb der verschiedenen Gruppen diskutiert.

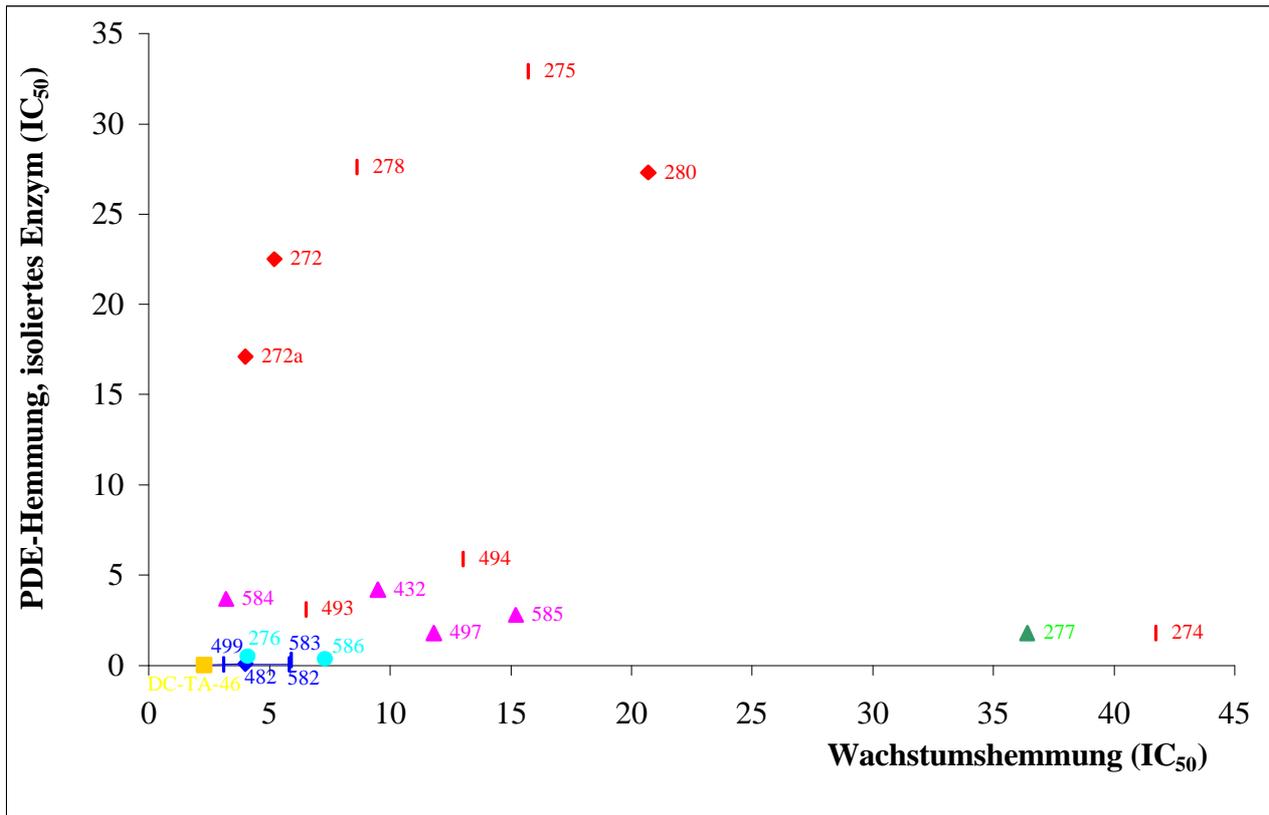


Abb. 73:

Vergleich der IC_{50} -Werte der PDE-Hemmung am isolierten Enzym und der Wachstumshemmung; **gelb**: DC-TA-46 (E481), **pink**: Modifikationen in 2-Position, **blau**: Modifikationen in 4- und 7-Position, **türkis**: Modifikationen in 6-Position, **rot**: Modifikationen in 4'-Position, **grün**: sonstige Modifikationen. Es fehlen die Verbindungen, für die kein IC_{50} -Wert angegeben werden konnte.

Erste Untersuchungen zur PDE-Hemmung an isolierter PDE4 und der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen zeigten keine Korrelation (s. auch Abb. 73). Bei guter Korrelation hätten die Messpunkte durch eine Gerade verbunden werden können. Dies ist auch innerhalb der einzelnen Gruppen nicht möglich. Allerdings ist im Diagramm erkennbar, dass die Verbindungen in 2 Gruppierungen unterteilt werden können: Für die erste Gruppierung scheint eine Korrelation zu bestehen. Alle Messpunkte weisen IC_{50} -Werte $< 10 \mu\text{M}$ bezüglich der PDE-Hemmung an isolierter PDE4 sowie IC_{50} -Werte < 20 bezüglich der Wachstumshemmung auf. Diese Messpunkte könnten durch eine Regressionsgerade verbunden werden. Bei allen anderen Verbindungen scheint kein

Zusammenhang zwischen ihrer Fähigkeit zu bestehen, Wachstumshemmung zu induzieren, und die isolierte PDE4 zu hemmen. Diese Verbindungen können nicht durch eine Regressionsgerade verbunden werden. Die Ergebnisse sind uneinheitlich und spiegeln die Änderungen in der Hemmung am isolierten Enzym nicht unbedingt wieder. Neben Unterschieden in der Aufnahme in die Zelle und der Verteilung zwischen den verschiedenen zellulären Kompartimenten spielt zumindest bei einigen Derivaten vermutlich die Wirkung auf andere Targets als die PDE eine Rolle. Die Wachstumshemmung kommt dann evtl. eher durch die Beeinflussung dieser anderen Zielproteine als durch die Hemmung von PDE4 in der Zelle zustande [Merz et al., 1998].

Deshalb wurde die PDE-Hemmung in der Zelle als zusätzlicher Testparameter eingeführt. Die drei erhaltenen IC₅₀-Werte sollen nun miteinander verglichen werden. Der Vergleich der PDE-Hemmung in der Zelle und der Wachstumshemmung kann einen Aufschluss darüber geben, ob möglicherweise andere Targets als PDE4 durch DC-TA-46 beeinflusst werden. Im folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Verbindungen kurz erläutert.

DC-TA-46 selbst (Verbindung E481) ist ein sehr potenter Hemmstoff der PDE4. Der IC₅₀-Wert der PDE-Hemmung an isolierter, hochaufgereinigter PDE4 aus dem Cytosol von LXFL529-Tumorgewebe liegt bei 16 nM. Die Hemmung der intrazellulären PDE-Aktivität im Cytosol bei 24-stündiger Inkubation mit LXFL529L-Zellen ist mit einem IC₅₀-Wert von 2,0 µM ungefähr 125 mal schlechter. Dies kann durch eine bereits in 5.4. diskutierte Tatsache zustande kommen: DC-TA-46 wird zwar aufgrund seiner Lipophilie bei 3-tägiger Inkubation zu 29% in die Zellen aufgenommen, wobei die Metabolisierungsrate des aufgenommenen Anteils 21% beträgt [A. Müller, mündliche Mitteilung]. DC-TA-46 gelangt jedoch nach der Aufnahme in die Zellen nur zu einem geringen Prozentsatz ins Cytosol, wo der Großteil der PDE4 lokalisiert ist und kann deshalb dort vermutlich wenig Hemmwirkung entfalten (s. Teil 5.4.). Der Großteil der aufgenommenen Substanzmenge von DC-TA-46 wird im Partikular angereichert [Marko et al., 1997]. Für die durch DC-TA-46 induzierte Wachstumshemmung konnte ein IC₅₀-Wert von 2,3 µM bestimmt werden, was gut mit der Hemmung der intrazellulären PDE-Aktivität übereinstimmt. Für DC-TA-46 selbst scheint also eine Korrelation zwischen der Hemmung des Zellwachstums im Sulforhodamin B-Test und der PDE-Hemmung in der Zelle zu existieren, was für die PDE-Hemmung an isolierter PDE4 und die Wachstumshemmung im SRB-Test nicht erkennbar war. Um eine geeignete Aussage über die Hemmwirkung von Derivaten treffen zu können, ist es also wichtig, auch die Hemmwirkung in der Zelle mit einzubeziehen.

Die verschiedenen Pteridinderivate können gemäß der Position der Substitution (bezogen auf DC-TA-46) in Gruppen unterteilt werden.

Modifikation der Leitsubstanz DC-TA-46 in 4- und 7-Position:

Durch Variation der Substituenten dieser Positionen erhält man die Pteridinderivate E482, E499, E581, E582 und E583. Alle Verbindungen werden im folgenden einzeln erläutert.

E482: Bei dieser Verbindung wurden die Substituenten R1 und R2 von DC-TA-46 vertauscht. E482 trägt an 4-Position also einen Benzylaminrest und 7-Position einen Pyrrolidinrest. Die durch Substanz E482 induzierte Hemmung der PDE4-Aktivität bei 24-stündiger Inkubation ist lediglich um den Faktor 1,6 geringer als DC-TA-46, was auch sehr gut mit einer zwar um den Faktor 5 schlechteren, aber immer noch akzeptablen Hemmung des isolierten Enzyms übereinstimmt. Die Fähigkeit zur Wachstumshemmung hat jedoch bei E482 im Vergleich zu DC-TA-46 um den Faktor 2 nachgelassen.

E499: Das Derivat E499, das zwei Pyrrolidinreste an 4- und 7-Position des Pteridingrundgerüsts trägt, besitzt eine etwas verminderte Fähigkeit, Wachstumshemmung zu induzieren, und auch die PDE-Hemmung am isolierten Enzym ist etwas geringer (Faktor 3,7) als die von DC-TA-46 selbst. Trotzdem ist die Hemmung der PDE-Aktivität in LXFL529L-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von 0,1 μM um den Faktor 20 höher. Diese Substanz weist diesbezüglich den niedrigsten IC_{50} -Wert aller getesteten Derivate auf und stellt in der Zelle den besten aller getesteten Inhibitoren dar. Möglicherweise wird E499 zu einem geringeren Prozentsatz an Zellmembranen sequestriert, und es kann ein größerer Anteil der Verbindung ins Cytosol gelangen und dort aktiv werden. Die bessere PDE-Hemmung bei geringerer Wachstumshemmung im Vergleich zu DC-TA-46 kann durch verschiedene Prozesse zustande kommen. Möglicherweise hemmt diese Verbindung zwar die zelluläre PDE sehr wirksam, stimuliert jedoch ein anderes Target. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass die bei DC-TA-46 beobachtete Wachstumshemmung nicht nur durch die Hemmung der PDE, sondern durch eine Hemmung mehrerer Targets zustande kommt. Evtl. hemmt E482 eines dieser weiteren Targets schlechter als DC-TA-46, was eine reduzierte Wachstumshemmung bewirken könnte.

E581: Dieses Derivat ist an 4- und 7-Position mit je einem Dimethylamin-Rest substituiert. Während für verschiedene andere Substanzen dieser Gruppe (E482, E499, E582 und E583) die Wachstumshemmung im Vergleich zu DC-TA-46 geringer ist, jedoch immer noch als recht gut angesehen werden kann, ist bei E581 die Fähigkeit zur Wachstumshemmung im SRB-Test (IC_{50} -Wert $> 20 \mu M$) stark reduziert. E581 ist auch bezüglich der PDE-Hemmung am isolierten Enzym mit einem IC_{50} von 1,2 μM um den Faktor 75 schlechter als DC-TA-46. Für die PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen konnte kein genauer IC_{50} -Wert bestimmt werden, da die Hemmung in dem benutzten Konzentrationsbereich zu schwach war. Für eine optimale Hemmung der cytosolischen PDE von LXFL529L-Zellen werden eventuell größere Substituenten an 4-Position des Pteridingrundkörpers benötigt, die mehr Raum beanspruchen als Dimethylamin.

E582: E582 trägt anstelle des Benzylaminrestes von DC-TA-46 an 7-Position des Pteridin-Ringsystems eine Dimethylaminogruppe. Mit diesem Derivat verhält es sich ähnlich wie mit E499: Verglichen mit DC-TA-46 selbst hat die PDE-Hemmung am isolierten Enzym geringfügig nachgelassen (Faktor 2,9). Auch die Wachstumshemmung ist niedriger (Faktor 2,5). Bei der Inkubation von LXFL529L-Zellen mit der Substanz und anschließender PDE-Bestimmung ist E499 jedoch ein sehr potenter Hemmstoff; der IC_{50} beträgt 0,7 μM . E582 ist damit um den Faktor 2,8 wirksamer als DC-TA-46. Wie auch für E499 kann für E582 angenommen werden, dass dies durch

bessere Aufnahme ins Cytosol der Zellen zustande kommt. Auch hier existieren die bereits bei E499 erwähnten Erklärungen für den Zusammenhang zwischen PDE-Hemmung und Wachstumshemmung. **E583:** Die Substanz E583 trägt wie auch E582 einen Dimethylaminrest, allerdings wurde hier der Pyrrolidinrest in 4-Position gegen die Dimethylaminogruppe substituiert. Verbindung E583 stellt einen „Grenzfall“ zwischen DC-TA-46, E482, E499 und E582 sowie den weiteren getesteten Pteridinderivaten dieser Gruppe dar: Die PDE-Hemmung am isolierten Enzym hat mit einem IC_{50} -Wert von $0,3 \mu\text{M}$ im Vergleich zu DC-TA-46 stark abgenommen (Faktor 20). Auch in LXFL529L-Zellen ist die induzierte Hemmung deutlich schlechter (Faktor 2,3). Trotz der Abnahme der PDE-Hemmung (in der Zelle und am isolierten Enzym) zeigt E583 immer noch eine akzeptable Wachstumshemmung, die gegenüber DC-TA-46 lediglich um den Faktor 2,6 geringer ist, und die genauso groß ist wie die durch E582 induzierte. Eventuell wirkt E583 auf andere zelluläre Targets als PDE4, was eine gute Wachstumshemmung erklären könnte.

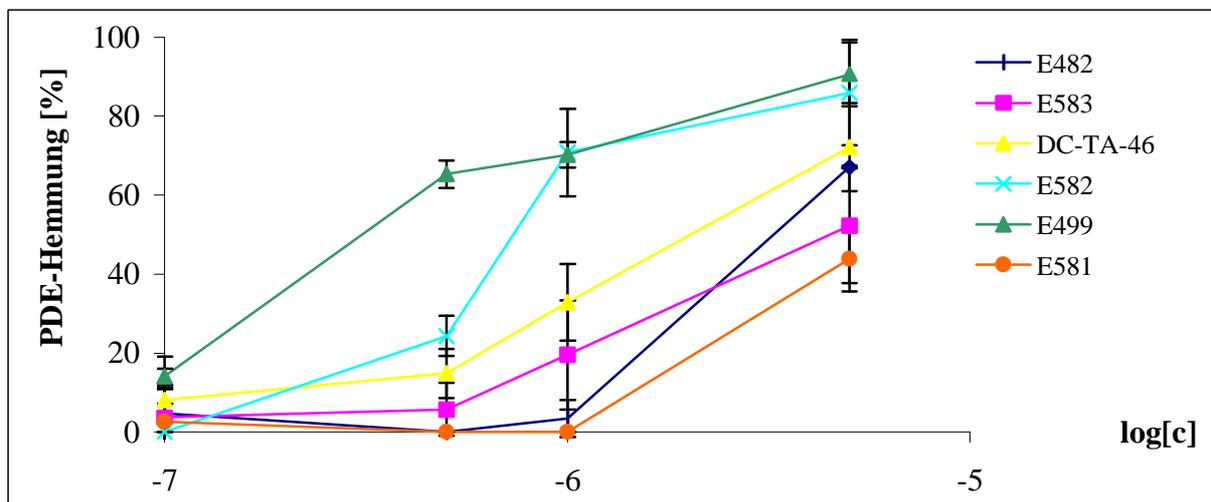


Abb. 74:

Vergleich der Hemmwirkung von DC-TA-46 mit in 4- und 7-Position substituierten Pteridinderivaten (E482, E499, E581, E582, E583) im Cytosol von LXFL529L-Zellen.

In Abb. 74 ist die PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen graphisch dargestellt, die durch die in 4- und 7-Position substituierten Derivate sowie die Leitsubstanz induziert werden konnte. Die besten Inhibitoren stellen die Verbindungen E499 und E582 dar, diese hemmen zelluläre PDEs besser als DC-TA-46. Alle weiteren in 4- und 7-Position substituierten Derivate induzieren eine Hemmung, die in der Größenordnung der Leitsubstanz bzw. deutlich darunter liegt.

Im Vergleich zu DC-TA-46 ist die Fähigkeit der Verbindungen E482, E499 und E582 zur Hemmung isolierter PDE4 aus Tumorgewebe zwar geringer (Faktor 3-5), dennoch können diese Substanzen immer noch als potente Inhibitoren isolierter PDE betrachtet werden. Auch die Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen liegt in der gleichen Größenordnung wie bei DC-TA-46. Dabei kommt E499 mit einem IC_{50} -Wert von $3,1 \mu\text{M}$ DC-TA-46 ($IC_{50} = 2,3 \mu\text{M}$) am nächsten [Merz et al., 1998].

Die durch die Verbindungen E482, E499 und E582 induzierte PDE4-Hemmung in LXFL529L-Zellen ist ebenfalls gut. Während DC-TA-46 lediglich um den Faktor 1,6 besser hemmt als E482, induzieren E499 und E582 sogar eine höhere zelluläre PDE-Hemmung als DC-TA-46.

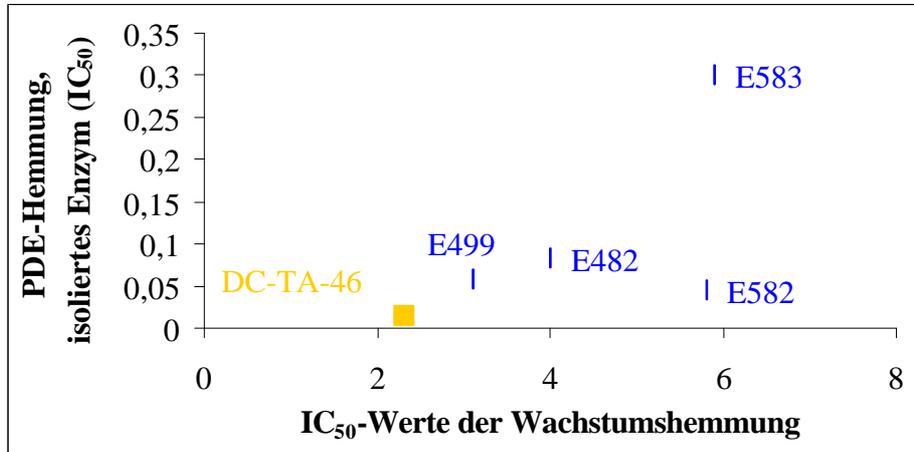


Abb. 75:

Vergleich der IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung am isolierten Enzym und der Wachstumshemmung für die Gruppe der an **4- und 7-Position** substituierten Derivate E482, E499, E582 und E583. Zum Vergleich wurde auch **DC-TA-46** aufgetragen. Es fehlt E581, da der IC₅₀-Wert der Wachstumshemmung aufgrund fehlender Wirksamkeit nur als > 20 angegeben werden konnte.

Zur Untersuchung der Korrelationen zwischen den drei Parametern wurden diese in Abb. 75 graphisch dargestellt. Dabei wurden nur diejenigen Verbindungen eingezeichnet, von denen ein IC₅₀-Wert bestimmt werden konnte.

Wie aus Abb. 75 hervorgeht, scheint für DC-TA-46, E482, E499 und E582 bezüglich der Wachstumshemmung und der PDE-Hemmung des isolierten Enzyms eine Korrelation zwischen PDE-Hemmung an hochaufgereinigter PDE4 und der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen zu bestehen. Bei ähnlicher Hemmung isolierter PDE4 unterscheiden sie sich bezüglich der Wachstumshemmung lediglich um den Faktor 2. Alle Mitglieder dieser Gruppe liegen fast auf einer Geraden. Aufgrund der Skalierung kann auch die von den anderen Substanzen etwas abweichende Verbindung E583 noch dazugezählt werden. Dies geht auch aus Abb. 73 deutlich hervor.

Verglichen mit DC-TA-46 scheint eine Reduktion der Fähigkeit zur Hemmung isolierter PDE4 stets ein zumindest geringes Nachlassen der Wachstumshemmung zu verursachen.

Abb. 76 zeigt den Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und PDE-Hemmung an LXFL529L-Zellen. Zwischen der Fähigkeit, zelluläre PDEs zu hemmen, und der Wachstumshemmung im SRB-Test scheint nur für die Verbindungen DC-TA-46, E482 und E583 ein linearer Zusammenhang zu bestehen, da diese durch eine Regressionsgerade verbunden werden könnten. Für E499 und E582, die die zelluläre PDE deutlich besser hemmen als die anderen untersuchten Verbindungen, scheint keine Korrelation mit den anderen 3 Verbindungen zu existieren.

Mögliche Gründe für eine geringere Wachstumshemmung als DC-TA-46, jedoch besserer Hemmung zellulärer PDE, wurden bereits bei der Vorstellung der Ergebnisse beider Substanzen diskutiert (Stimulation eines anderen Targets bei guter Hemmung zellulärer PDEs, geringere Hemmung zusätzlicher, evtl. zur Wachstumshemmung beitragender Targets als DC-TA-46).

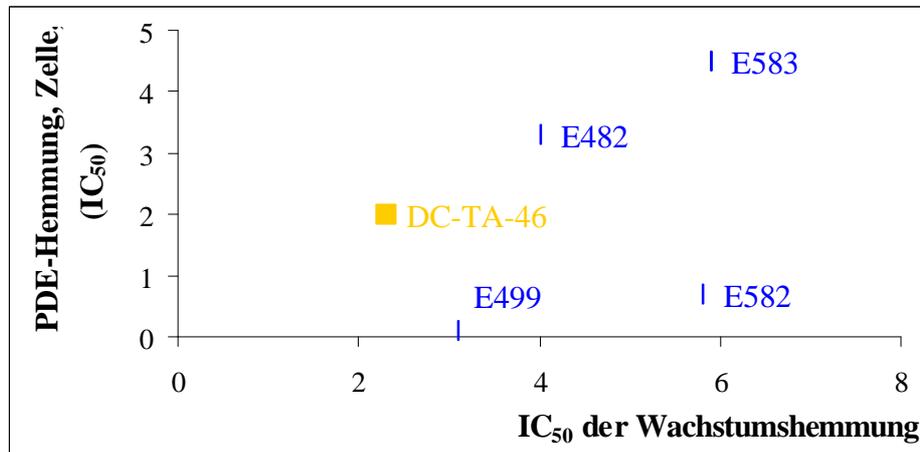


Abb. 76:

Vergleich der IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen und der Wachstumshemmung für die Gruppe der an **4- und 7-Position** substituierten Derivate E482, E499, E582 und E583. Zum Vergleich wurde auch **DC-TA-46** aufgetragen. Es fehlt E581, da der IC₅₀-Wert der Wachstumshemmung aufgrund fehlender Wirksamkeit nur als > 20 angegeben werden konnte.

Abb. 77 gibt den Zusammenhang zwischen PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen und der PDE-Hemmung an isolierter PDE4 wieder: Alle Verbindungen, die sich am isolierten Enzym als potente Hemmstoffe erwiesen (DC-TA-46, E482, E499, E582 und E583), weisen auch in der Zelle relativ gute IC₅₀-Werte auf.

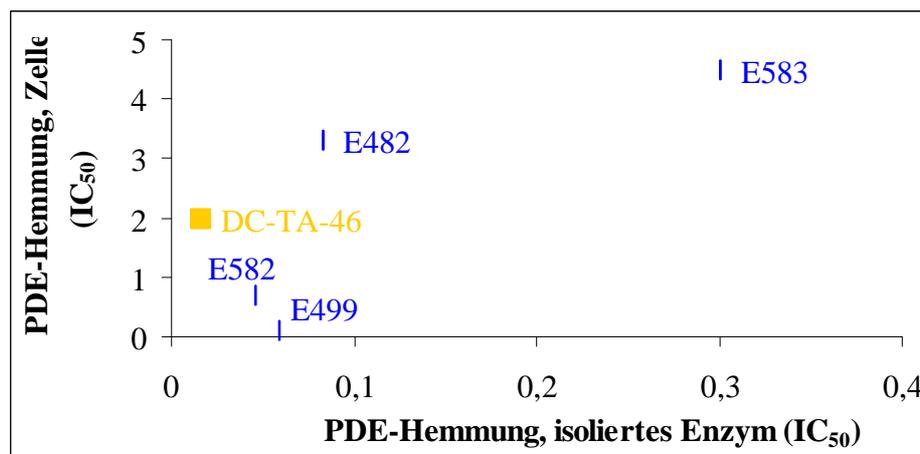


Abb. 77:

Vergleich der IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung am isolierten Enzym und in LXFL529L-Zellen aufgetragen wurde die Gruppe der an **4- und 7-Position** substituierten Derivate E482, E499, E582 und E583. Zum Vergleich wurde auch **DC-TA-46** aufgetragen. Es fehlt E581, da der IC₅₀-Wert der PDE-Hemmung in der Zelle aufgrund fehlender Wirksamkeit nur als > 5 angegeben werden konnte.

Modifikation der Leitsubstanz DC-TA-46 in 2-Position:

Zu den Pteridinderivaten, die an 2-Position modifiziert wurden, zählen die Verbindungen E495, E483, E584, E585, und E497. Diese werden in folgenden einzeln erläutert:

E483: In diesem Derivat wurde der Piperazinrest durch Einführung einer Carbonylgruppe in 3-Position so modifiziert, dass zwar die Basizität des 4'-Stickstoffes verloren ging, aber seine Fähigkeit, als Wasserstoffdonor zu wirken, erhalten blieb. Die PDE-Hemmung am isolierten Enzym ist schlecht, auch die durch E483 induzierte Wachstumshemmung ist nur noch gering. Die Hemmwirkung der PDE in LXFL529L-Zellen ist so schwach, dass kein IC_{50} -Wert bestimmt werden konnte. Selbst in der höchsten getesteten Konzentration von 5×10^{-6} M wird keine Hemmung durch E483 detektiert.

E495 trägt anstelle des Piperazinrestes einen Morpholinrest an 2-Position des Grundgerüsts. Bei diesem Derivat wurde die Wasserstoffdonorfunktion des H-substituierten Stickstoffs durch eine Akzeptorfunktion (Sauerstoffatom des Morpholinrings) ersetzt. Bei biologischen Tests fiel Verbindung E495 sowohl durch PDE-Hemmung als auch durch fehlende Fähigkeit zur Wachstumshemmung auf. Die PDE-Hemmung am isolierten Enzym ist mit einem IC_{50} -Wert von 2,5 μ M ca. 160-fach schlechter als DC-TA-46 selbst. In der Zelle ist ebenfalls keine PDE-Hemmung mehr zu beobachten.

Sowohl E495 als auch E493 induzieren keine PDE-Hemmung (isoliertes Enzym und Zellkultur). Der Ersatz der H-Donorfunktion hat scheinbar einen wesentlichen Effekt auf die PDE-Hemmung in der Zelle.

E497: Das komplette Entfernen des basischen Zentrums an 4'-Position sowie der Verlust der H-Donorfunktion durch Substitution des Piperazin- gegen einen Dimethylaminorest liefert Verbindung E497. Hier kann der Stickstoff nicht mehr als Wasserstoff-Donor fungieren. Die PDE-Hemmung am isolierten Enzym weist einen IC_{50} -Wert von 1,8 μ M auf. Auch in der Zelle ist E497 kein guter PDE-Inhibitor. Die durch E497 induzierte Wachstumshemmung ist ebenfalls gering.

E584: Die Substitution des Piperazinrestes an 2-Position von DC-TA-46 durch einen 2-Aminoethylamin-Rest führt zu Verbindung E584. Dieser Substituent kann freier im Raum rotieren, während das basische Zentrum in ungefähr dem gleichen Abstand zum Pteridin-Ringsystem liegt wie das von DC-TA-46. Diese Substanz ist weder in der Zelle noch am isolierten Enzym ein PDE-Hemmstoff. Während für die Hemmung an LXFL529L-Zellen aufgrund der fehlenden Hemmung bei den verwendeten Konzentrationen kein IC_{50} angegeben werden konnte, wurde am isolierten Enzym ein IC_{50} -Wert von 3,7 μ M gefunden. Dies ist um den Faktor 230 schlechter als DC-TA-46 und liegt in der Größenordnung der anderen an 2-Position substituierten Derivate. Im Gegensatz zur verminderten PDE-Hemmung sowohl an isolierter PDE4 als auch in LXFL529L-Zellen wird für Verbindung E584 der drittniedrigste IC_{50} -Wert der Wachstumshemmung beobachtet ($IC_{50} = 3,2 \mu$ M). Stärkere Hemmstoffe im SRB-Test stellen lediglich die Leitsubstanz DC-TA-46 selbst sowie E499 dar. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass hier nicht die PDE das eigentliche Target darstellt.

E585 ist mit E584 nahe verwandt. Bei Derivat E585 wurde der Piperazinrest an 2-Position von DC-TA-46 ebenfalls durch einen aliphatischen Rest ersetzt. Im Vergleich zu E584 wurde hier eine 2-Hydroxyethylaminogruppe eingeführt. Die resultierende PDE-Hemmung am isolierten Enzym ist ähnlich wie die durch E584 induzierte und damit deutlich schlechter als die der Leitsubstanz DC-TA-46. Auch in der Zelle erzielt E585 keine PDE-Hemmung. Die Wachstumshemmung ist jedoch verglichen mit E584 stark reduziert, sie beträgt nur noch 20% von E584 bzw. ist um den Faktor 6,6 niedriger als DC-TA-46.

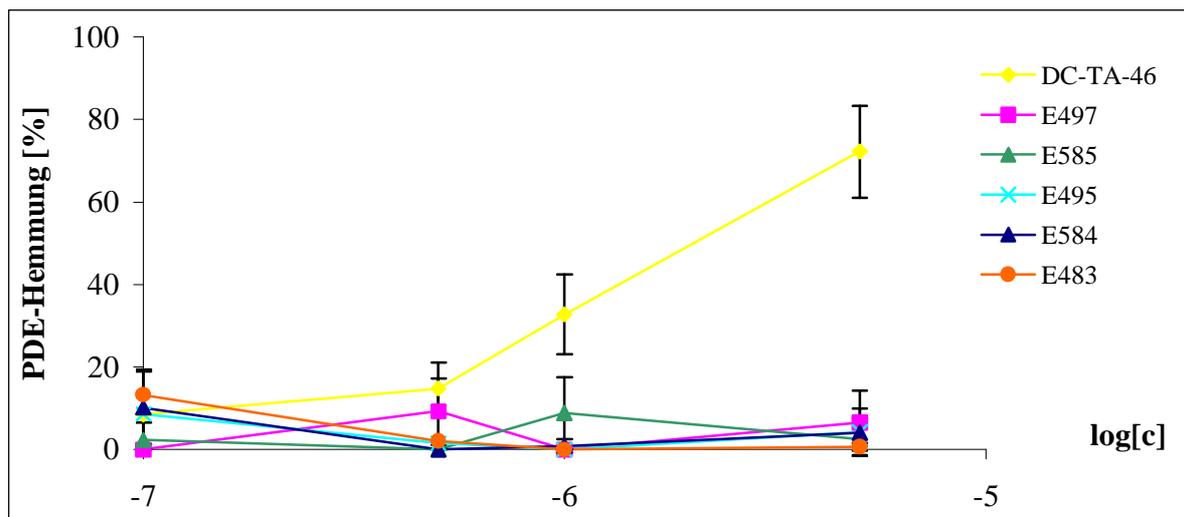


Abb. 78: Vergleich der Hemmwirkung von DC-TA-46 mit in 2-Position substituierten Pteridinderivaten (E495, E497, E483, E584, E585) im Cytosol von LXFL529L-Zellen.

Auch die PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen von in 2-Position substituierten Derivaten wurde graphisch dargestellt und mit der Leitsubstanz verglichen. Wie aus Abb. 78 deutlich hervorgeht, induziert keine dieser Verbindungen eine mit DC-TA-46 vergleichbare effektive Hemmung der intrazellulären PDE.

Für die in Abb. 79 dargestellten Verbindungen dieser Gruppe kann zwischen der Hemmung des isolierten Enzyms und der Wachstumshemmung kein Zusammenhang festgestellt werden. Die Ergebnisse der SRB-Tests sind uneinheitlich und spiegeln die Änderung der Hemmung isolierter PDE4 nicht wieder. Auch hier spielt die Beeinflussung anderer zellulärer Targets möglicherweise eine Rolle. Leider konnten für diese Substanzgruppe keine Diagramme zur intrazellulären PDE-Hemmung erstellt werden, da alle Verbindungen in der Zelle nur sehr geringe Hemmwirkung zeigten.

Scheinbar ist ein Substituent von der Größe des Piperazins, der die gleichen sterischen Anforderungen besitzt, wichtig für die PDE-Hemmung in der Zelle. Eine wesentliche Rolle spielen außerdem die Basizität und die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen.

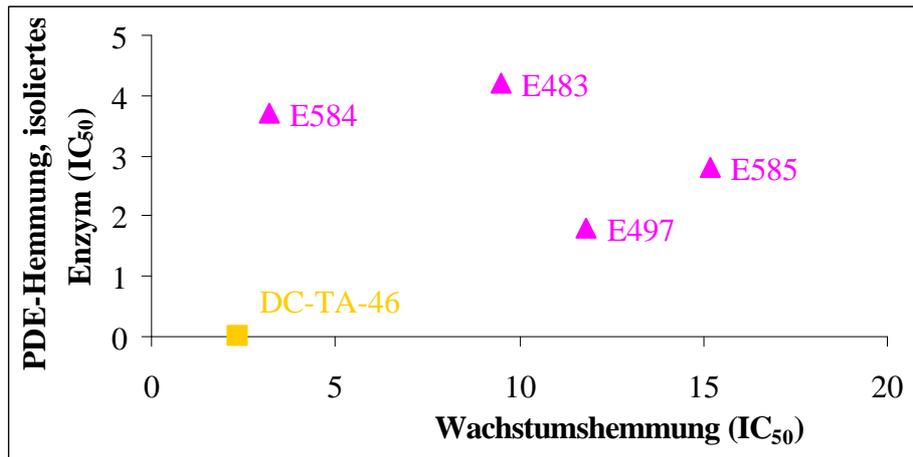


Abb. 79:

Vergleich der IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung am isolierten Enzym und der Wachstumshemmung für die Gruppe der an **2-Position** substituierten Derivate E483, E497, E584 und E585. Zum Vergleich wurde auch **DC-TA-46** aufgetragen. Es fehlt E495, da der IC₅₀-Wert der Wachstumshemmung aufgrund fehlender Wirksamkeit nur als > 20 angegeben werden konnte.

Modifikation der Leitsubstanz DC-TA-46 in 6-Position:

E276: Diese Verbindung besitzt im Vergleich zu DC-TA-46 anstelle des Chloratoms eine Methylgruppe. Der IC₅₀-Wert der PDE-Hemmung durch E276 am isolierten Enzym beträgt 0,5 µM und ist damit um den Faktor 30 schlechter als DC-TA-46. E276 ist jedoch bei Inkubation mit LXFL529L-Zellen in der Lage, die cytosolische PDE mit einem IC₅₀-Wert von 1,8 µM zu hemmen; und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie DC-TA-46. Die durch E276 induzierte Wachstumshemmung ist um den Faktor 2 niedriger als diejenige von DC-TA-46 selbst.

E586: Beim Austausch des Chloratoms von DC-TA-46 in 6-Position des Pteridin-Grundkörpers gegen ein Wasserstoffatom resultiert E586. Diese Verbindung besitzt anstelle der voluminöseren Methylgruppe von E276 ein kleineres H-Atom. Durch diese Substitution lässt die PDE4-Hemmung am isolierten Enzym im Vergleich zu DC-TA-46 stark nach. Der IC₅₀-Wert von E586 liegt bei 0,36 µM und ist um den Faktor 23 höher als DC-TA-46. Obwohl diese Verbindung in der Zelle nicht zu den potenten PDE-Hemmstoffen gezählt werden kann, wird bei Inkubation mit einer 10 µM Hemmstoffkonzentration immerhin 48,5% der intrazellulären PDE-Aktivität gehemmt. Im Gegensatz zur im Vergleich zu DC-TA-46 reduzierten PDE-Hemmung ist die Wachstumshemmung von E586 lediglich 3-fach geringer. PDE-Hemmung in der Zelle und Wachstumshemmung liegen für diese Verbindung wie auch für DC-TA-46 ungefähr in der gleichen Größenordnung.

In Abb. 80 ist die durch in 6-Position substituierten Derivate induzierte PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen dargestellt. Dabei zeigt sich deutlich, dass Verbindung E276 zelluläre PDE genauso wirkungsvoll hemmt wie DC-TA-46, während E586 eine schlechtere Hemmwirkung zeigt.

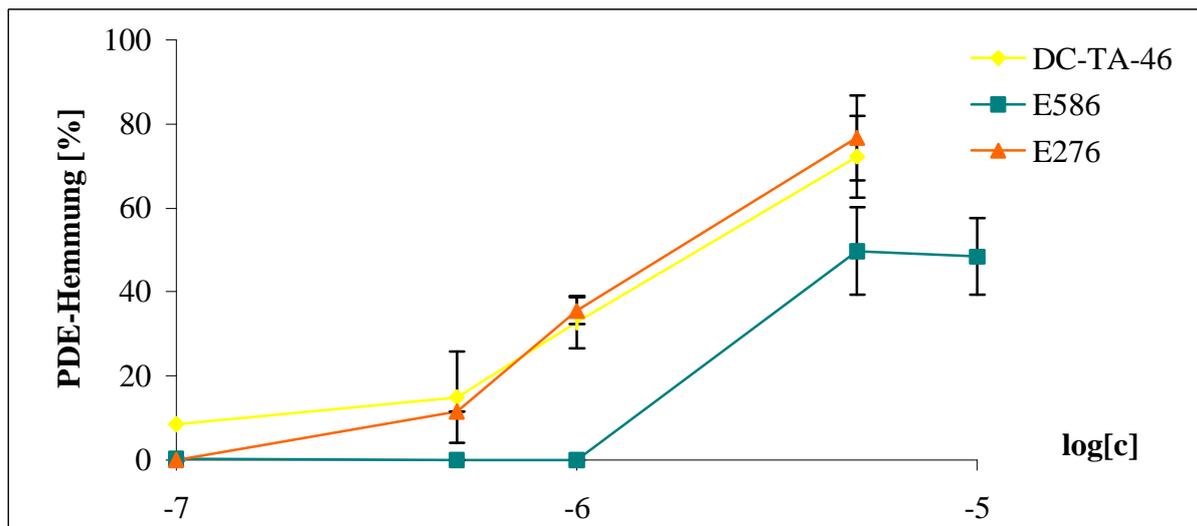


Abb. 80:

Vergleich der Hemmwirkung von DC-TA-46 mit in 6-Position substituierten Pteridinderivaten (E276 und E586) im Cytosol von LXFL529L-Zellen.

Für die Hemmung isolierter PDE4 scheint also das Chloratom wichtig zu sein. Für die Hemmung zellulärer PDEs gilt das von Merz (1999) aufgestellte Postulat, dass das Chloratom wichtig für eine optimale PDE-Hemmung sei, jedoch nicht. Bis auf die verminderte Fähigkeit, isolierte PDE4 zu hemmen, ist E276 durchaus mit DC-TA-46 vergleichbar. Für die Hemmung zellulärer PDE spielt möglicherweise die Größe des Substituenten an 6-Position eine wichtige Rolle. Ein H-Atom wie in E586 ist nicht voluminös genug, während Chlor- (DC-TA-46) bzw. Methylreste (E276) durch ihre Größe eine bessere Hemmung induzieren können. Da die Freisetzung von DC-TA-46 aus E276 in der Zelle wohl ausgeschlossen werden kann, kommt die Diskrepanz zwischen der durch E276 induzierten PDE-Hemmung in der Zelle und am isolierten Enzym möglicherweise durch unterschiedliche pharmakokinetische Parameter zustande. So könnte E276 z.B. besser in die Zellen aufgenommen werden. Außerdem ist die Bildung eines weiteren Metaboliten in der Zelle möglich, der als potenter Hemmstoff in Frage kommt.

Auch aus Abb. 81 geht keine Korrelation zwischen PDE-Hemmung am isolierten Enzym und der Wachstumshemmung für die Gruppe der an 6-Position substituierten Verbindungen hervor.

Da für die Gruppe der an 6-Position modifizierten Derivate nur E276 eine ausreichende PDE-Hemmung (sowohl in der Zelle als auch an hochaufgereinigter PDE4) zeigt, wurde auf die Darstellung verzichtet. Es soll jedoch nochmals erwähnt werden, dass diese Verbindung mit DC-TA-46 bezüglich Wachstumshemmung und PDE-Hemmung in der Zelle verglichen werden kann, nur am isolierten Enzym ist die Hemmwirkung geringer. Wahrscheinlich ist ein Substituent mit den gleichen chemischen Eigenschaften wie das Chloratom (Größe, H-Akzeptor) für die Inhibition hochaufgereinigter PDE4 wesentlich.

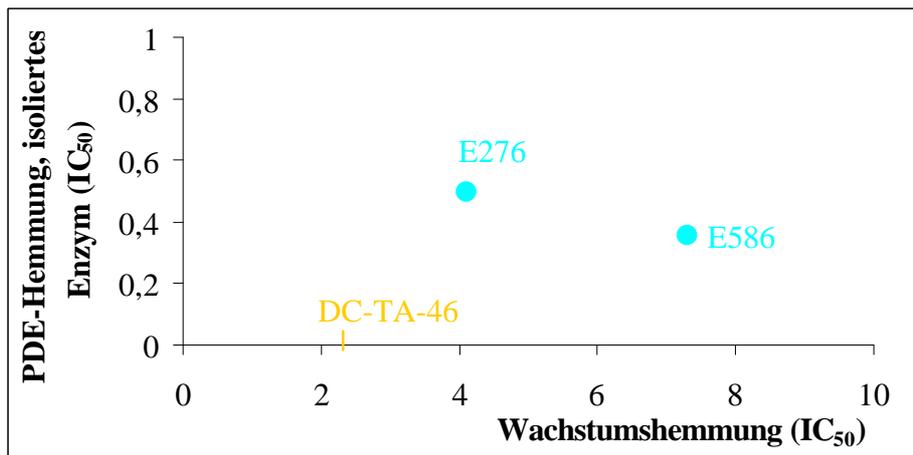


Abb. 81:

Vergleich der IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung am isolierten Enzym und der Wachstumshemmung für die Gruppe der an **6-Position** substituierten Derivate (E276, E586). Zum Vergleich wurde auch **DC-TA-46** selbst aufgetragen. Es fehlen die Verbindungen, für die aufgrund fehlender Wirksamkeit kein IC₅₀-Wert angegeben werden konnte.

Sonstige Modifikationen:

E277 ist das einzige Derivat, bei dem das Grundgerüst modifiziert wurde. Bislang wurden die verschiedenen Reste des Pteridingrundgerüsts variiert, um Struktur-Aktivitätsuntersuchungen durchführen zu können. Im Fall von E277 wurde nun anstelle des Pteridingrundkörpers ein Purin-Ringsystem verwendet. PDE4-Inhibitoren mit einem Purin-Grundgerüst wie z.B. Arofyllin (Abb. 28) werden bereits für klinische Testungen eingesetzt [de Brito et al., 1997]. Der potentielle Inhibitor E277 wurde ebenfalls auf PDE-Hemmung am isolierten Enzym und in der Zelle sowie Wachstumshemmung in LXFL529L-Zellen getestet. Die Fähigkeit von E277, die PDE4 in LXFL529L-Zellen zu hemmen, ist nahezu völlig reduziert. Auch bezüglich Hemmung isolierter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe und der Wachstumshemmung von LXFL529L-Zellen zeigt E277 keine Wirkung. Scheinbar hat die Verkleinerung des Ringsystems wesentliche Folgen für alle 3 Parameter, da dann auch der Chlorsubstituent eine etwas andere Orientierung einnimmt.

E496: Bei Verbindung E496 wurden im Vergleich zu DC-TA-46 die beiden Substituenten in 2- (Piperazinrest) bzw. 4-Position (Pyrrolidinrest) gegeneinander vertauscht. Daraus resultiert eine extrem verringerte Hemmung von hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe (IC₅₀ = 1,8 µM). Die PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen ist ebenfalls nicht mehr messbar. Vermutlich ist das Fehlen des basischen Zentrums in 4'-Position für diese Reduktion verantwortlich. Im Gegensatz dazu ist die Wachstumshemmung nur um den Faktor 2 schlechter als die von DC-TA-46 selbst. Die Wachstumshemmung liegt damit in der Größenordnung von Verbindung E482, bei der ebenfalls eine Substitution in 4-Position durchgeführt wurde. Auch hier wird wahrscheinlich ein anderes Target als PDE4 beeinflusst.

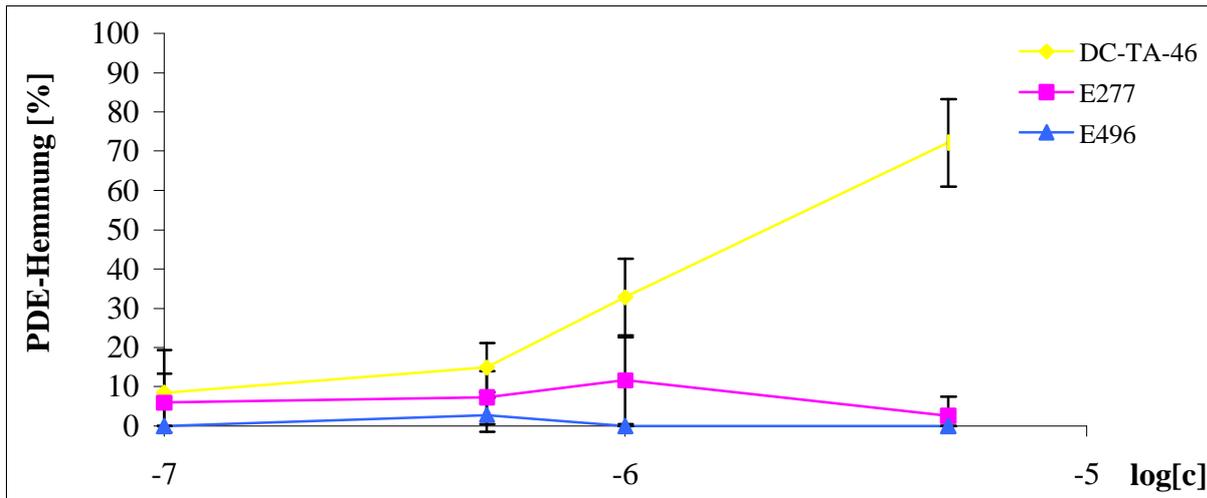


Abb. 82:
Vergleich der Hemmwirkung von DC-TA-46 mit den Verbindungen E277 und E496 im Cytosol von LXFL529L-Zellen.

Abb. 82 zeigt auch für die Verbindungen E277 und E496 die ermittelte PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen in Abhängigkeit von der Endkonzentration im Inkubationsansatz. Die Verbindungen E496 und E277 erwiesen sich leider im Vergleich zu DC-TA-46 als wenig wirksam, die erzielte PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen ist auch in der höchsten getesteten Konzentration < 10%.

Modifikation der Leitsubstanz DC-TA-46 in 4'-Position des Piperazinrings:

An dieser Position wurden die meisten Modifikationen durchgeführt. Das angestrebte Ziel war dabei in erster Linie eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit zur Erhöhung der cytosolischen Lokalisation der Verbindungen. Dies resultiert in den Verbindungen E493, E494, E272 und E272a, E273, E274 und E274a, E275 und E275a, E278, E279 sowie E280.

Verbindung **E272** resultiert aus der Verknüpfung von DC-TA-46 mit der Aminosäure Glycin. Dabei reagiert Glycin mit dem H-Atom an 4'-Position von DC-TA-46, da dieses reaktiver ist als das N-ständige Wasserstoffatom am Benzylaminrest in 6-Position. Das Glycinamid kann nicht mehr als H-Donor wirken, und auch die Basizität wird durch die benachbarte Carbonylgruppe stark reduziert. Diese Verbindung ist deutlich polarer als die Leitsubstanz. Obwohl die Wachstumshemmung nur unwesentlich schlechter als die der Leitsubstanz ist (Faktor 2,3), hat die PDE-Hemmung sowohl am isolierten Enzym als auch in der Zellkultur stark nachgelassen. Die Verbindung ist kaum noch zur Hemmung des isolierten Enzyms befähigt, der IC_{50} -Wert ist um das 1400-fache höher als der von DC-TA-46. Auch im Cytosol von LXFL529L-Zellen kommt keine PDE-Hemmung zustande. Wie Untersuchungen im Arbeitskreis zeigten, wird diese Verbindung sehr gut in LXFL52L-Zellen aufgenommen. Mittels HPLC konnte nachgewiesen werden, dass 65% dieses Derivats in die Zelle gelangt. Eine Freisetzung von DC-TA-46 wurde jedoch nicht detektiert, auch eine Metabolisierung wurde bei 3-tägiger Inkubation nur zu 2% gemessen [Porten, 2000]. Aufgrund der guten Aufnahme

wurde von dieser Substanz auch die Hemmwirkung der PDE-Aktivität im Partikular der Zellen untersucht. Obwohl im Partikular eine wesentlich größere Hemmung als in den cytosolischen Proben gemessen konnte (36,5% bei 5 μM), erzielte diese Verbindung auch bei 24-stündiger Inkubation der Zellen mit einer Konzentration von 5×10^{-6} M keine 50%ige PDE-Hemmung. Da die Substanzen in hohen Konzentrationen jedoch zytotoxisch auf die Zellen wirken, konnten keine höheren Konzentrationen getestet werden. Die im Vergleich zum Cytosol verbesserte Hemmwirkung im Partikular könnte möglicherweise durch eine Anreicherung der großen aufgenommenen Menge dieses Derivats im Partikular von LXFL529L-Zellen zustande kommen. Diese Sequestrierung im Partikular konnte für DC-TA-46 bereits nachgewiesen werden (s. Kapitel 5.4.2). Ob die hohe Wachstumshemmung bei fehlender PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an isolierter PDE4 durch die Hemmung der PDE im Partikular zustande kommt, oder ob E272 außer der PDE weitere Target beeinflusst, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

E272a: Weitere Tests wurden mit dem polareren Hydrochlorid (E272a) von Verbindung E272 durchgeführt. Bei dieser Substanz ist die Polarität und damit die Wasserlöslichkeit nochmals erhöht. E272a zeigt eine im Vergleich zu E272 nochmals verbesserte Wachstumshemmung im SRB-Test und hemmt damit das Zellwachstum lediglich um den Faktor 1,7 schlechter als DC-TA-46. Die Hemmwirkung am isolierten Enzym hat sich zwar im Vergleich zu E272 selbst leicht verbessert, ist jedoch trotzdem um den Faktor 1000 niedriger als DC-TA-46. Da die PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen aus Zeitgründen jedoch nicht bestimmt werden konnte, ist keine genaue Aussage möglich.

E273: Hier wurde DC-TA-46 mit einer weiteren Aminosäure (Lysin) verknüpft. In dieser Verbindung gibt es nun ein zweites basisches Zentrum, und die Seitenkette an 4'-Position ist länger. Durch die Substitution verbessert sich die Fähigkeit zur PDE4-Hemmung in der Zelle im Vergleich zu E272 beträchtlich: Obwohl auch bei dieser Verbindung im untersuchten Konzentrationsbereich keine 50%ige Hemmung erreicht wurde, wird nun bei Inkubation mit einer 5×10^{-6} molaren Lösung immerhin 35% der intrazellulären cytosolischen PDE-Aktivität gehemmt. Möglicherweise hat die Kettenlänge des Restes einen Einfluss auf diesen Parameter. Die Hemmwirkung von E273 am isolierten Enzyms ist jedoch niedrig ($\text{IC}_{50} = 21,7 \mu\text{M}$). Auch für dieses Derivat wurde die Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen untersucht. Im Gegensatz zu E272 ist bei E273 die Hemmung der partikulären PDE deutlich geringer als die der cytosolischen, trotzdem werden mit der höchsten Konzentration (5×10^{-6} M) noch 22,1% des Enzyms gehemmt.

E274: Durch Einführen einer sauren Carboxylgruppe konnte die Polarität im Vergleich zu der Leitsubstanz erhöht werden. Dies sollte ebenfalls die Wasserlöslichkeit verbessern bzw. die cytosolische Lokalisation erhöhen. Das basische Zentrum von DC-TA-46 wurde nun in ein saures umgewandelt. Durch E274 kann nur in sehr beschränktem Maß Wachstumshemmung induziert werden, was ein IC_{50} -Wert von $41,7 \mu\text{M}$ belegt. Demgegenüber steht, dass die PDE4-Hemmung am isolierten Enzym zwar im Vergleich zu DC-TA-46 um den Faktor 110 geringer ist, trotzdem stellt diese Substanz einen der wirksamsten Hemmstoffe der PDE-Aktivität in LXFL529L-Zellen von allen in 4'-Position substituierten Substanzen dar ($\text{IC}_{50} = 2,5 \mu\text{M}$). Bei Inkubation von E274 in LXFL529L-Zellen wird ein IC_{50} -Wert gemessen, der fast dem der Leitsubstanz DC-TA-46 ($\text{IC}_{50} =$

2,0 μM) entspricht. Auch für dieses Derivat wurde die Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen untersucht, dort wirkt E274 ebenfalls als potenter Inhibitor. Die Hemmung ist im Partikular zwar etwas niedriger als im Cytosol, der IC_{50} -Wert ist jedoch mit 3,8 μM nur ungefähr um den Faktor 2 geringer als der von DC-TA-46. Mit der Tatsache, dass E274 schlecht in LXFL529L-Zellen aufgenommen wird [Müller, 2000], kann die reduzierte Fähigkeit zur Wachstumshemmung begründet werden. Im Gegensatz dazu kann mit dem jetzigen Kenntnisstand nicht erklärt werden, warum ein Derivat bei schlechter Aufnahme in die Zellen und fehlender Fähigkeit, Wachstumshemmung zu induzieren, eine hohe PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen verursachen kann.

E274a: Verbindung E274a stellt das Natriumsalz der Verbindung E274 dar. Dieses Derivat ist sehr polar. Die Substanz wird wahrscheinlich aufgrund ihrer Hydrophilie relativ schlecht in die Zellen aufgenommen [Müller, 2000]. Es resultiert ein völliger Verlust der Fähigkeit, das Wachstum von Zellen zu hemmen. Auch am isolierten Enzym ist E274a 175-fach weniger wirksam als die Leitsubstanz DC-TA-46. Die PDE-Hemmung des Enzyms in LXFL529L-Zellen konnte im Vergleich zu E274 nur extrapoliert werden, da keine 50%ige Hemmung erreicht wurde. Es wird zwar eine Hemmung beobachtet, die jedoch auch bei Einsatz einer Konzentration von 5×10^{-6} M 44,4% nicht übersteigt. Auch für E274a kann jedoch nicht erklärt werden, wie die Substanz bei fehlender Induktion von Wachstumshemmung ein Hemmstoff der zellulären PDE sein kann.

E275: Diese Verbindung trägt einen Glutaminsäurerest an 4'-Position. Die Modifikation diene ebenfalls zum Erhöhen der Polarität und führt zum Verlust der Basizität des 4'-N-Atoms durch die benachbarte Carbonylgruppe. Glutamat sollte in der Zelle eine Transportfunktion für das Molekül übernehmen, das dann zu DC-TA-46 metabolisiert werden könnte. Leider bringt diese Veränderung nahezu den kompletten Verlust aller erwünschten Eigenschaften mit sich. E275 zeigt sowohl in der Zelle als auch an hochaufgereinigter PDE4 eine extrem verringerte Hemmwirkung. In der Zelle wird durch keine der eingesetzten Konzentrationen eine Hemmung erzielt. Für dieses Derivat wurde auch die Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen untersucht. Dort kann E275 ebenfalls keine Hemmwirkung erzielen, selbst bei 24-stündiger Inkubation mit einer Konzentration von 5×10^{-6} M wird keine Inhibition detektiert. Auch am isolierten Enzym ist E275 unwirksam. Die durch E275 induzierte Wachstumshemmung ist jedoch verglichen mit DC-TA-46 lediglich um den Faktor 7 geringer. Obwohl dies mittels HPLC zunächst nicht bestätigt werden konnte, besteht auch die Möglichkeit, dass Glutamat in geringen Mengen abgespalten werden könnte. Eventuell kann mit den zur Verfügung stehenden Analysemethoden die geringe Menge jedoch nicht detektiert werden. Möglicherweise sind LXFL529L-Zellen auch durch ihre geringe metabolische Aktivität nicht in der Lage, Glutamat in größeren Mengen abzuspalten. Weiterhin könnte auch hier ein anderes zelluläres Target beeinflusst werden.

E275a stellt das Natriumsalz von Verbindung E275 dar. Durch weitere Erhöhung der Hydrophilie im Vergleich zu E275 erfolgt eine Verschlechterung der wachstumshemmenden Eigenschaften. E275a ist nicht mehr zur Wachstumshemmung befähigt. Der IC_{50} -Wert (8,1 μM) der Inhibition hochaufgereinigter PDE4 ist um den Faktor 500 schlechter als DC-TA-46. In der Zelle zeigt E275a

jedoch bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M immerhin 31,6% Hemmung. Die Hemmwirkung konnte im Vergleich zu E275 also deutlich verbessert werden. Möglicherweise kommt dies durch eine verbesserte cytosolische Lokalisation zustande. Durch die sehr hohe Polarität wird diese Verbindung nur schlecht in die Zellen aufgenommen. Untersuchungen mittels HPLC in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass lediglich 4% dieser Verbindung in die Zellen gelangt, vermutlich bedingt durch die hohe Hydrophilie. Von der aufgenommenen Stoffmenge werden innerhalb von 3 Tagen 17% zu DC-TA-46 sowie weitere 13% zu einer anderen, bislang unbekanntem Verbindung metabolisiert [Müller, 2000]. Die PDE-Hemmung an Zellen könnte durch die geringe Menge an freigesetztem DC-TA-46 zustande kommen. Dies würde auch erklären, warum an isolierter PDE4 keine Hemmung induziert wird. Auch für dieses Derivat kann zur Zeit nicht erklärt werden, wieso bei fehlender Wachstumshemmung eine wenn auch geringe Hemmung intrazellulärer PDE-Aktivität beobachtet wird. Auch hier kann die Stimulation weiterer Targets, möglicherweise auch durch den mittels HPLC detektierten Metaboliten, oder die Freisetzung geringer Mengen an Glutamat nicht ausgeschlossen werden.

E278: Ersetzt man in DC-TA-46 das H-Atom in 4'-Position des Piperazinrestes durch einen 2-Hydroxyethylrest, so resultiert daraus Verbindung E278. Die Basizität des Stickstoff ist in dieser Verbindung höher als bei E275 bzw. E275a. Die Substanz ist bezüglich ihrer Fähigkeit zur Wachstumshemmung lediglich um den Faktor 4 schlechter als DC-TA-46. Demgegenüber steht der nahezu völlige Verlust der PDE-Hemmung: Am isolierten Enzym wurde ein IC_{50} -Wert von $27,6 \mu\text{M}$ gemessen. E278 vermag kaum noch PDE-Hemmung zu induzieren. Dies wird auch bei Messungen in der Zelle bestätigt; hier kann aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur PDE-Hemmung kein IC_{50} -Wert ermittelt werden. Auch hier muss also vermutlich ein anderes Target für die Wachstumshemmung verantwortlich gemacht werden. Scheinbar hat die Abwesenheit einer Carbonylgruppe kombiniert mit einem längeren polaren Rest an 4'-Position einen positiven Einfluss auf die Fähigkeit, Wachstumshemmung zu induzieren.

E279: Das Derivat E279 trägt einen Hydroxyethoxyethylrest am Stickstoffatom des Piperazins. Im Vergleich zu den mit Aminosäure- bzw. dem Acetamidrest substituierten Derivaten ist diese Verbindung unpolarer. Auch dieser aliphatische Rest bewirkt keine Verbesserung der PDE-hemmenden Eigenschaften. So hat E279 die Fähigkeit zur PDE-Hemmung vollständig verloren. Dies zeigt sich sowohl am isolierten Enzym, wo diese Substanz als einzige aller getesteten Derivate selbst bei Einsatz einer $100 \mu\text{molaren}$ -Lösung keine 50% des hochaufgereinigten Enzyms zu hemmen vermag, als auch in LXFL529L-Zellen, wo keine PDE-Hemmung gemessen werden konnte. Möglicherweise ist das freie Elektronenpaar des Ether-Sauerstoffs oder die Kettenlänge des Restes an 4'-Position dafür verantwortlich. Demgegenüber steht die durch E279 induzierte Wachstumshemmung, die zwar geringer als die von DC-TA-46 selbst ist, jedoch lediglich um den Faktor 6. Bei dieser Substanz kann ebenfalls die Wirkung auf andere zelluläre Targets für die wachstumshemmenden Eigenschaften verantwortlich sein.

E280 trägt einen Acetamidrest an 4'-Position des Piperazinringes. E280 wurde bezüglich der PDE-Hemmung lediglich an hochaufgereinigter PDE4 getestet und weist einen IC_{50} -Wert von $27,3 \mu\text{M}$

auf. Für die Wachstumshemmung wurde ein IC_{50} -Wert von 18,5 μM ermittelt. Verglichen mit dem Carboxylat E274, das eine Wasserstoffakzeptor und eine Wasserstoffdonor-Funktion in der gleichen Seitenkette vereinigt, weist E280 eine verringerte Fähigkeit zur Hemmung isolierter PDE4 auf, während bei E274 die Wachstumshemmung geringer ist als bei E280. Scheinbar ist das bei pH 7,2-7,4 vorliegende negative Zentrum bei E274 ($-\text{COO}^-$ -Gruppe) an dieser Position günstiger als die Säureamidgruppe von E280. Dies könnte evtl. durch die Nukleophilie des Sauerstoffs (E274) erklärt werden, die zwar relativ gering ist, jedoch höher als die des Stickstoffs in E280.

E493: Durch den Austausch des N-ständigen Wasserstoffatoms am Piperazinrest gegen eine Methylgruppe geht die H-Donorfunktion verloren. Gleichzeitig wird eine starke Reduktion der PDE-Hemmung beobachtet. Diese ist sowohl am isolierten Enzym ($IC_{50} = 3,1 \mu\text{M}$) als auch in LXFL529L-Zellen stark vermindert bzw. nicht mehr messbar. In LXFL529L-Zellen gehört E493 zu den Derivaten, die auch in der höchsten Konzentration von 10^{-5} M keine Hemmung zeigen. Wahrscheinlich kommt die starke Abnahme der PDE-Hemmung durch die Tatsache zustande, dass der 4'-Stickstoff des Piperazinrestes nicht mehr als H-Donor fungieren kann. Durch Austausch des N-ständigen Wasserstoffatoms gegen eine Methylgruppe geht diese Fähigkeit verloren [Merz et al., 1998]. Auch sonst ist kein benachbartes Atom ein Wasserstoffdonor, so dass mit diesem Molekülteil keine Wasserstoffbrückenbindung eingegangen werden kann. Der Wert der Wachstumshemmung dieses Derivates liegt bei einem IC_{50} -Wert von 6,5 μM und damit im Bereich der an 7- und 4-Position substituierten Substanzen E582 und E583, deren PDE-Hemmung aber deutlich besser ist. Deshalb wird die Wachstumshemmung wahrscheinlich durch Wirkung von E493 auf ein anderes Target als PDEs induziert.

E494 trägt einen Acetylrest am N4' des Piperazinrestes. Das Stickstoffatom kann nun wie auch in Verbindung E493 nicht mehr als Wasserstoffdonor wirken, der Unterschied zu E493 liegt jedoch darin, dass durch die elektronenziehenden Eigenschaften (-i-Effekt) des benachbarten Carboxyl-Sauerstoffs auch die Basizität des N-Atoms verloren geht. Das Resultat dieser N-Acetylierung ist eine stark verminderte Wachstumshemmung ($IC_{50} = 13,0 \mu\text{M}$) und eine stark reduzierte PDE-Hemmung am isolierten Enzym ($IC_{50} = 5,9 \mu\text{M}$). Auffällig ist hier jedoch, dass die Hemmung der PDE-Aktivität in LXFL529L-Zellen gut ist, so liegt der IC_{50} -Wert von E494 nur 1,8-fach über dem von DC-TA-46 selbst. Die Tatsache, dass der IC_{50} -Wert des Derivats E494 bei Inkubation in Zellkultur mit 3,6 μM niedriger liegt als am isolierten Enzym, kann erklärt werden, wenn die Fähigkeit von Zellen, Substanzen zu metabolisieren, in Betracht gezogen wird. So wurde bei HPLC-Messungen in unserer Arbeitsgruppe herausgefunden, dass zwar bei 36-stündiger Inkubation von LXFL529L-Zellen lediglich 12% des Derivats E494 in die Zellen aufgenommen wird, aus der aufgenommenen Menge werden jedoch 20% DC-TA-46 sowie 52% eines weiteren, nicht identifizierten Metaboliten freigesetzt [Müller, 2000]. Möglicherweise zeigt dieser Metabolit wie auch das ebenfalls freigesetzte DC-TA-46 eine gute Fähigkeit zur Hemmung zellulärer PDEs. Die PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen sowie die Wachstumshemmung könnten durch diese Metaboliten von E494 zustande kommen. Da bei Untersuchungen an isolierter PDE4 kein metabolisierendes System vorliegt, wird

dort kein DC-TA-46 freigesetzt, die Hemmung bleibt aus, da E494 selbst ein schlechter Inhibitor zu sein scheint.

Zur besseren Übersicht wurden die in 4'-Position substituierten Verbindungen bei der graphischen Darstellung nach ihrer Wirksamkeit in 2 Gruppen eingeteilt. Die wirksameren Derivate E494, E273, E274, E274a und E275a sind in Abb. 83 dargestellt, in Abb. 84 werden die schlechter hemmenden Verbindungen (E493, E272, E275, E278 und E279) mit der Leitsubstanz verglichen.

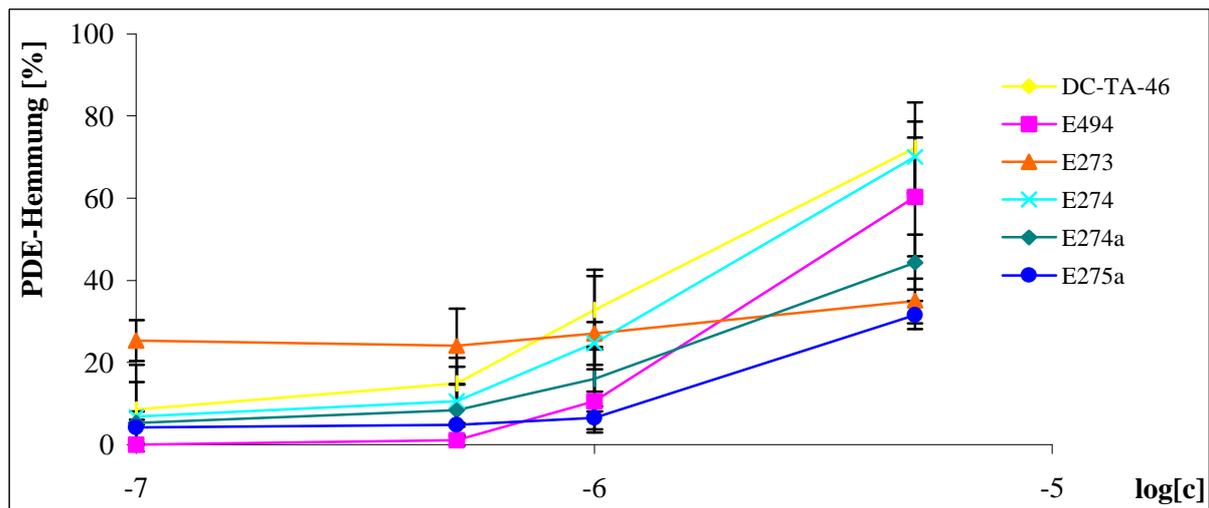


Abb. 83:

Vergleich der Hemmwirkung von DC-TA-46 mit den Verbindungen E494, E273, E274, E274a und E275a (an 4'-Position substituierte Pteridinderivate) im Cytosol von LXFL529L-Zellen.

Während E274 genauso wirksam ist wie die Leitsubstanz, können E274a, E275a und E273 nur eine wesentlich geringere PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen induzieren. Interessant an der Verbindung E273 ist dabei, dass sie bei niedrigen Konzentrationen (10^{-7} M, 5×10^{-7} M) eine deutlich höhere Hemmung als alle anderen Verbindungen verursacht ($> 20\%$), die jedoch bei Einsatz höherer Konzentrationen kaum noch gesteigert werden kann. E494 ist im unteren Konzentrationsbereich unwirksam, beim Einsatz höherer Konzentrationen nimmt die Kurve der induzierten Inhibition dann jedoch stark zu und liegt nur wenig unter DC-TA-46.

Die weiteren an 4'-Position substituierten Pteridinderivate E493, E272, E275, E278 und E279 (Abb. 84) erwiesen sich als extrem unwirksame PDE-Inhibitoren in der Zelle. Auch bei Einsatz höherer Konzentrationen konnte keines der Pteridine die PDE-Aktivität in LXFL529L-Zellen hemmen.

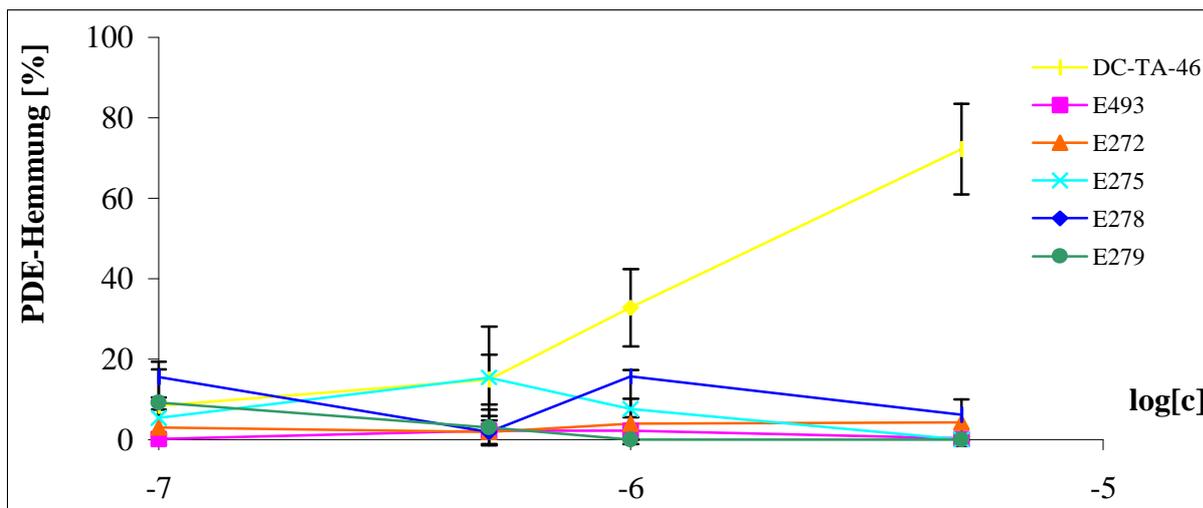


Abb. 84:

Vergleich der Hemmwirkung von DC-TA-46 mit den Verbindungen E493, E272, E275, E278 und E279 (an 4'-Position substituierte Pteridinderivate) im Cytosol von LXFL529L-Zellen.

Für die in 4'-Position substituierten Derivate wurde ebenfalls versucht, durch graphische Auftragung eine Korrelation zwischen den drei Testparametern zu erkennen. Bei Auftragung der IC_{50} -Werte der PDE-Hemmung am isolierten Enzym und der Wachstumshemmung zeigte sich jedoch keine Korrelation (Abb. 85).

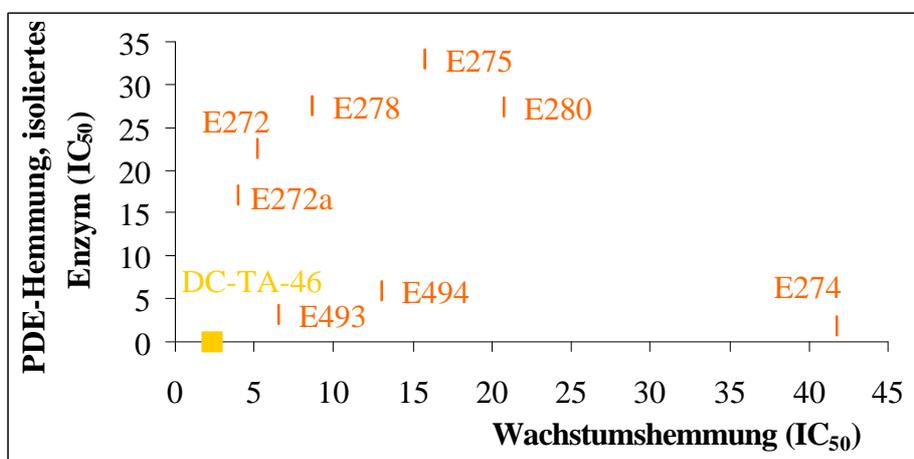


Abb. 85:

Vergleich der IC_{50} -Werte der PDE-Hemmung am isolierten Enzym und der Wachstumshemmung für die Gruppe der an 4'-Position substituierten Derivate E272, E272a, E274, E275, E278, E280, DC-TA-46 (E481), E493 und E494. Zum Vergleich wurde auch DC-TA-46 selbst aufgetragen. Es fehlen E273, E274a, E275a und E279, da der IC_{50} -Wert der Wachstums- bzw. PDE-Hemmung aufgrund fehlender Wirksamkeit nicht genau angegeben werden konnte.

Von den in 4'-Position substituierten Substanzen sind lediglich E274 und E494 zur PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen befähigt. Beide Substanzen unterscheiden sich jedoch so stark in ihrer

Fähigkeit, Wachstumshemmung zu induzieren, dass kein Zusammenhang festgestellt werden kann (Abb. 86).

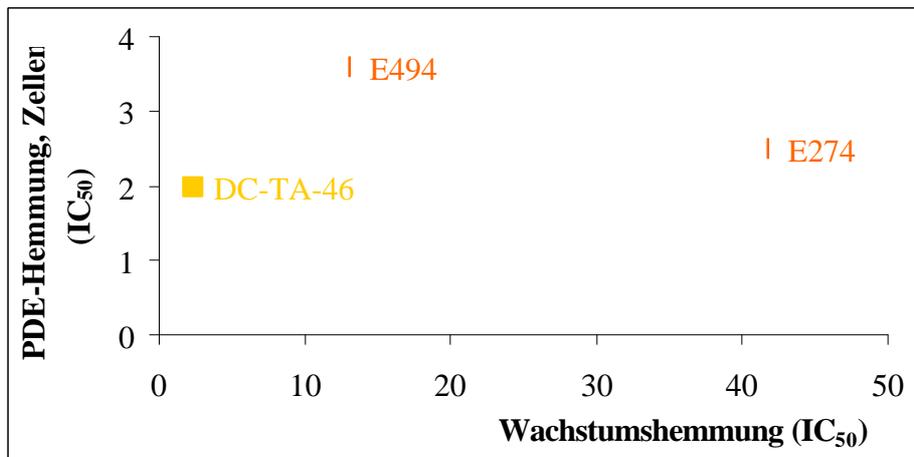


Abb. 86:

Vergleich der IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen und der Wachstumshemmung für die Gruppe der an **4'-Position** substituierten Derivate. Zum Vergleich wurde auch **DC-TA-46** selbst aufgetragen. Es fehlen die Verbindungen, für die der IC₅₀-Wert der PDE-Hemmung aufgrund fehlender Wirksamkeit nicht genau angegeben werden konnte.

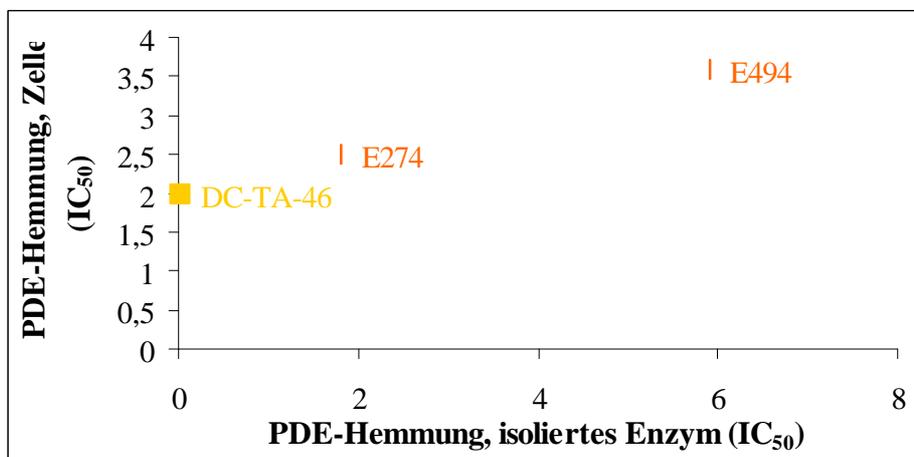


Abb. 87:

Vergleich der IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen und am isolierten Enzym für die Gruppe der an **4'-Position** substituierten Derivate. Zum Vergleich wurde auch **DC-TA-46** selbst aufgetragen. Es fehlen die Verbindungen, für die der IC₅₀-Wert der PDE-Hemmung aufgrund fehlender Wirksamkeit nicht genau angegeben werden konnte.

Abb. 87 zeigt den Vergleich zwischen den IC₅₀-Werten der PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen und am isolierten Enzym für E274 und E494. Für diese Verbindungen scheint bezüglich der Fähigkeit, isolierte PDE4 bzw. zelluläre PDE-Aktivität zu hemmen, eine Korrelation zu bestehen. Die Verbindungen können durch eine Regressionsgerade verbunden werden.

Ein von Merz (1999) entwickeltes Pharmakophormodell bezüglich der Hemmung des isolierten Enzyms erklärt strukturelle Erfordernisse der potentiellen PDE4-Hemmstoffe. Da zwischen dem Pteridingrundgerüst von DC-TA-46 und dem Purinringsystem des natürlichen Substrats cAMP wesentliche Gemeinsamkeiten bestehen, ist eine ähnliche Bindung der Substanzen an das katalytische Zentrum der PDE4 denkbar. Nach dem Modell von Kleinman et al. (1998) kommt dem N1-Atom im Adeninteil von cAMP eine besondere Bedeutung als H-Akzeptor zu. Bei einer Adenin-entsprechenden Bindung des Pteridingrundkörpers entspricht das N1-Atom von cAMP dem Pteridin-N3-Atom. Weitere mögliche Pharmakophore lassen sich durch Überlagerung von DC-TA-46 und Rolipram erkennen; dabei werden die beiden Sauerstoffatome der Methoxy- und Cyclopentyloxyreste von Rolipram mit dem Pteridin-N3-Atom und dem Pyrrolidin-N-Atom von DC-TA-46 übereinander gelegt. Dadurch kommen der Pyrrolidin- und der Cyclopentyloxyrest in eine räumlich ähnliche Position, was darauf hindeutet, dass auch dieser Rest in DC-TA-46 wichtig für eine optimale PDE4-Hemmung ist. Durch diese Überlagerung kommen weiterhin das Cl-Atom in 6-Position von DC-TA-46 und der Carbonyl-Sauerstoff von Rolipram, die beide H-Akzeptoren darstellen, in eine ähnliche räumliche Orientierung. Auch die NH-Gruppe des Benzylamins in DC-TA-46 und die NH-Gruppe des Lactamrings von Rolipram, beides H-Donatoren, weisen nur einen sehr geringen Abstand auf. Der Piperazinring von DC-TA-46 hat bei dieser Superposition kein Pendant. Der Vergleich von DC-TA-46 mit cAMP zeigt, dass auch hier kein dem Piperazinring entsprechender Substituent vorhanden ist. Die heterozyklischen N-Atome sind praktisch identisch, das Adenin-N6-Atom entspricht dem Pyrrolidin-N-Atom, der lipophile Rest in 4-Position von DC-TA-46 ist jedoch bei cAMP nicht vorhanden. Wie bereits gezeigt werden konnte, sind vor allem die Substanzen in der Lage, eine hohe PDE-Hemmung am isolierten Enzym zu erzielen, die in Position 2 des Pteridingrundgerüsts einen Substituenten mit basischem Stickstoffatom an 4'-Position besitzen. Dies ist in DC-TA-46 und auch in verschiedenen anderen Derivaten durch einen Piperazinrest verwirklicht [Merz et al., 1998].

PDE4-Inhibitoren mit einem Purin-Grundgerüst sind strukturell mit den Xanthinen verwandt und weisen ebenfalls strukturelle Ähnlichkeiten mit DC-TA-46 auf. So sind die beiden N-Atome sowie die Substituenten des 6-Rings von Verbindung E277 mit einem Puringrundgerüst identisch mit diesem Molekülteil von DC-TA-46, ebenso sind zwei weitere N-Atome im 5-Ringsystem sowie ein Chlorsubstituent als H-Akzeptor vorhanden.

Bei der Hemmung zellulärer PDE spielen pharmakokinetische Parameter wie Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung eine große Rolle. Verschiedene Verbindungen gelangen in unterschiedlichem Maß in die Zelle, so dass auch die intrazelluläre Konzentration unterschiedlich ist. Möglicherweise kann deshalb ein eigentlich potenter Inhibitor aufgrund schlechter Aufnahme nur eine geringe Hemmung erzielen bzw. umgekehrt. Ein weiterer Parameter, der die Erstellung eines solchen Modells erschwert, sind metabolische Prozesse der Zelle (wie z.B. bei Verbindung E494 deutlich zu beobachten). So kann der eigentliche Wirkstoff bei einigen Verbindungen erst in der Zelle freigesetzt werden, während andere selbst für die PDE-Hemmung verantwortlich sind. Trotzdem kann für die untersuchten Verbindungen vorsichtig geschlussfolgert (s. Abb. 88) werden, dass das H-Atom an 4'-Position des Piperazinrings wichtig zu sein scheint, da bis auf das DC-TA-46-

freisetzende Derivat E494 und E274 keine an 4'-substituierte Verbindung einen guten Hemmstoff in LXFL529L-Zellen darstellt. An 6-Position wird ein größerer Substituent als Wasserstoff benötigt, z.B. ein Chloratom oder eine Methylgruppe. Modifikationen an 4- und 7-Position können die Hemmwirkung im Vergleich zur Leitsubstanz am ehesten verbessern (z.B. E499 und E582). Dabei verbessert ein Substituent mit tertiärem basischen Stickstoff (Pyrrolidin, Dimethylamin) an 7-Position die Hemmwirkung, während sich ein Dimethylaminrest an 4-Position negativ auswirkt. Dieser Substituent sollte also größer sein als Dimethylamin und z.B. aus Benzylamin oder Pyrrolidin wie bei DC-TA-46 selbst bestehen. Ein Puringrundgerüst wirkt sich negativ aus. Auch Variationen an 2-Position bewirken eine Erniedrigung der Hemmwirkung. Dort ist also ein Substituent von der Größe des Piperazins vorteilhaft, der die gleichen sterischen Anforderungen sowie eine vergleichbare Basizität besitzt. Auch die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen scheint eine wichtige Rolle zu spielen.

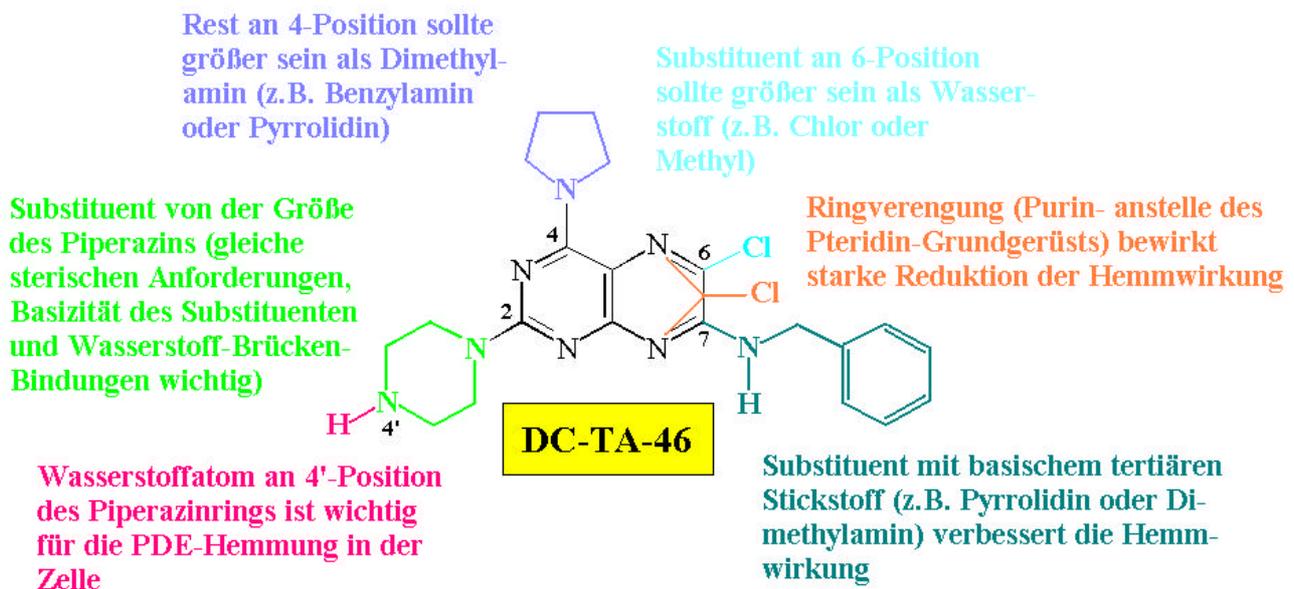


Abb. 88:
Strukturelle Anforderungen für eine optimale Hemmung zellulärer PDEs.

5.5.2. Zusammenfassung

Keines der neuen Derivate erwies sich bezüglich der PDE-Hemmung an isolierter PDE4 so wirksam wie die Leitsubstanz DC-TA-46. Hemmwirkung zeigten dort lediglich einige in 4- und 7-Position substituierte Verbindungen. Dabei konnte der IC_{50} -Wert von DC-TA-46 jedoch nicht erreicht werden. In der Zelle wurde ebenfalls eine gute Hemmung durch verschiedene an 4- und 7-Position

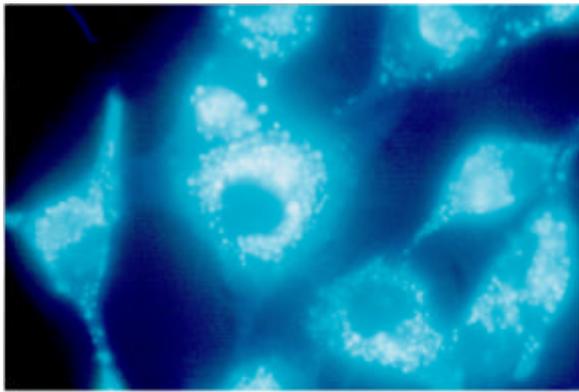
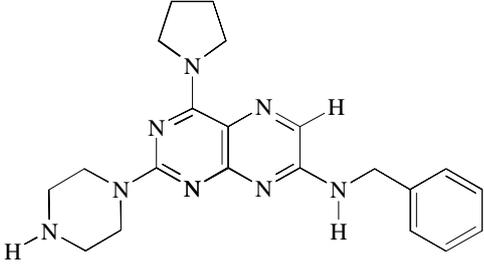
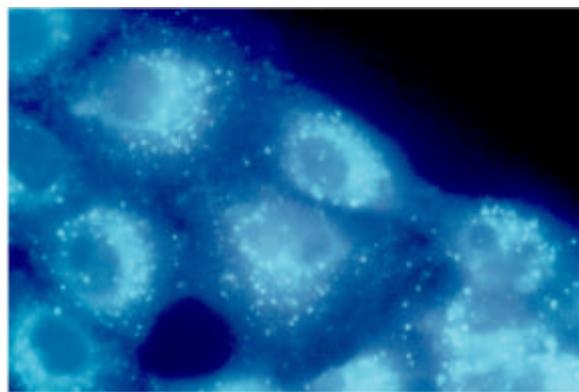
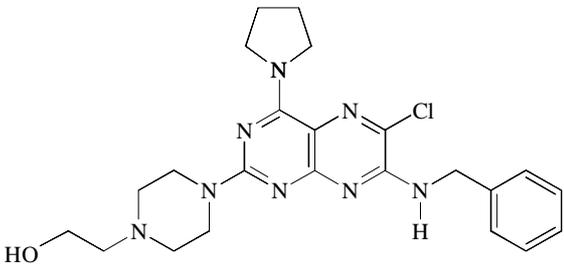
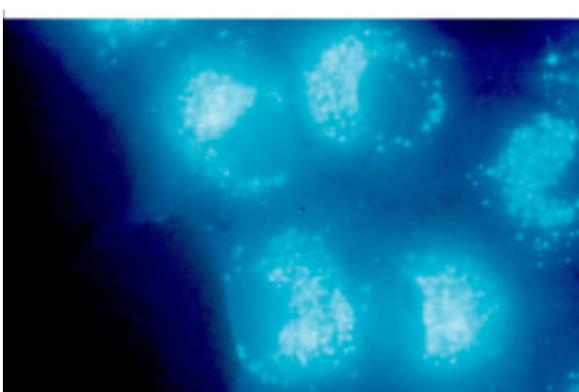
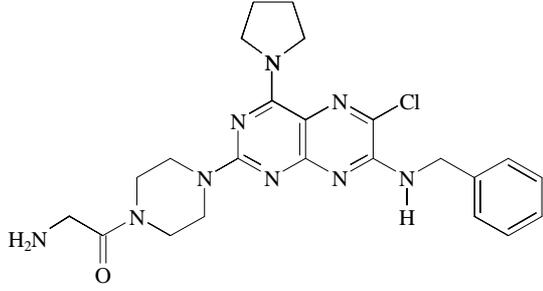
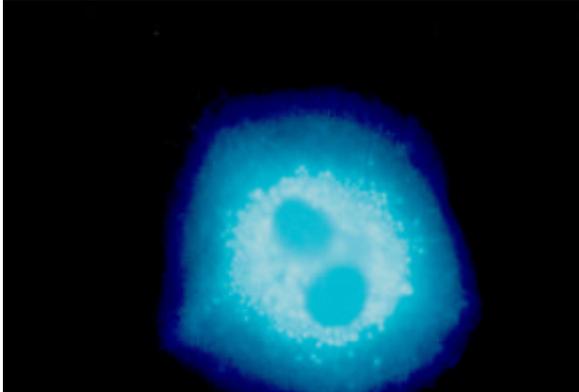
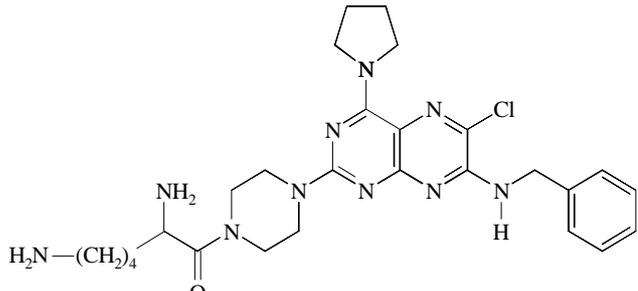
substituierte Verbindungen (E482, E499, E582, E583) erzielt. Dabei wiesen die an 7-Position substituierten Derivate E499 und E582 mit tertiärem basischem Stickstoff sogar niedrigere IC₅₀-Werte als DC-TA-46 auf. Eine Möglichkeit wäre, dass diese Verbindungen nur zu einem geringeren Prozentsatz im Partikular angereichert werden. Ein an 6-Position substituiertes Derivat, das eine Methylgruppe trägt, weist auch sehr gute Hemmeigenschaften auf zelluläre PDEs auf (E276). Für die Hemmung zellulärer PDE scheint also ein größerer Rest an 6-Position als Wasserstoff wichtig zu sein. Die meisten der an 4'-Position substituierten Verbindungen erwiesen sich als unwirksam, lediglich zwei Verbindungen können intrazellulär die PDE-Aktivität hemmen. Dabei handelt es sich um E274 und E494. Während die Wirkung des Derivats mit einer Carbonsäuregruppe (E274) nicht erklärt werden kann (schlechte Aufnahme und fehlende Wachstumshemmung), wirkt die Verbindung mit einem Acetylrest an 4'-Position (E494) vermutlich über die Freisetzung von DC-TA-46. Bei Untersuchungen neuer Verbindungen bezüglich ihrer Wirkung auf PDE4 sollte stets nicht nur am isolierten Enzym, sondern auch in Zellen getestet werden, da nur so pharmakologische Parameter wie z.B. Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung und metabolische Aktivierung der Substanzen mit einbezogen wird.

Verglichen mit der Leitsubstanz DC-TA-46 verursacht eine Abnahme der PDE-Hemmung am isolierten Enzym immer ein zumindest geringes Nachlassen der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen im SRB-Test. Einige Verbindungen zeigen eine gute Wachstumshemmung, aber nur wenig PDE-hemmende Eigenschaften. Diese Substanzen beeinflussen vermutlich andere Targets in der Zelle.

5.6. Subzelluläre Lokalisation der Pteridinderivate

Fluoreszenzmikroskopische Messungen des PDE-Hemmstoffs DC-TA-46 (Abb. 38) zeigten, dass ein Großteil der aufgenommenen Menge des Pteridinderivats am endoplasmatischen Retikulum von LXFL529L-Zellen lokalisiert ist [Marko et al., 1997]. Aus diesem Grund steht nur ein geringer Teil für die PDE-Hemmung im Cytosol zur Verfügung, wo in LXFL529L-Zellen mehr als 80 % der PDE4 lokalisiert ist (s. Ergebnisteil 5.4.1.4). Bei der Synthese neuer Derivate stand eine Erhöhung der Hydrophilie im Vordergrund, um eine verstärkte Lokalisierung im Cytosol zu erreichen. Um erste Anhaltspunkte für die Lokalisierung der bereits in Teil 5.4. bezüglich PDE- und Wachstumshemmung getesteten Derivate zu erhalten, wurden LXFL529L-Zellen mit diesen Verbindungen inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Inkubationszeit betrug 1h sowie 24h, als Endkonzentrationen der Substanzen im Inkubationsansatz wurden 5 µM und 10 µM gewählt. Zum Sichtbarmachen der Zellkerne wurde stets ein Objektträger mit DAPI angefärbt (Abb. 90), während ein weiterer die nicht gefärbten Zellen zeigt (Abb. 89).

Zur besseren Übersicht wurden in Abb. 89 und Abb. 90 nur ausgewählte Photographien dargestellt.

	<p>7-Benzylamino-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridin (E586), 5 μM, 24 h</p> 
	<p>7-Benzylamino-6-chloro-2-[4-(2-hydroxy-ethyl)-piperazino]-4-pyrrolidinopteridin (E278), 10 μM, 24 h</p> 
	<p>7-Benzylamino-6-chloro-2-(4-glycylpiperazino)-4-pyrrolidinopteridin (E272), 1 μM, 24h</p> 
	<p>7-Benzylamino-6-chloro-2-(4-lysyl-piperazino)-4-pyrrolidinopteridin (E273), 10 μM, 24h</p> 

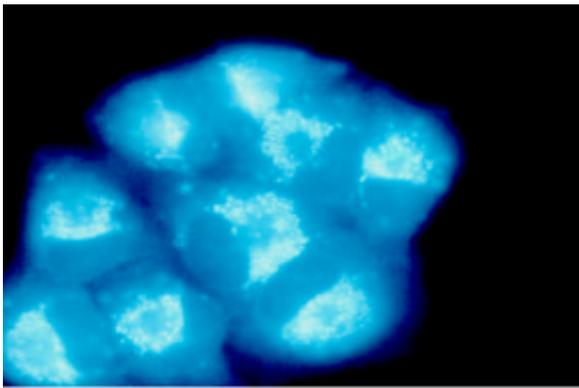
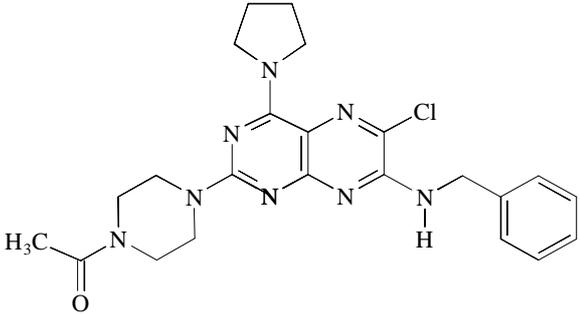
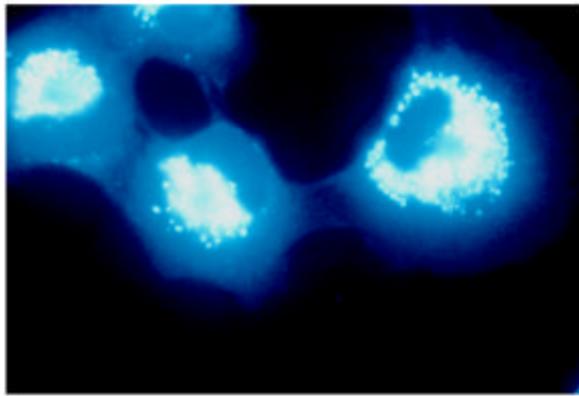
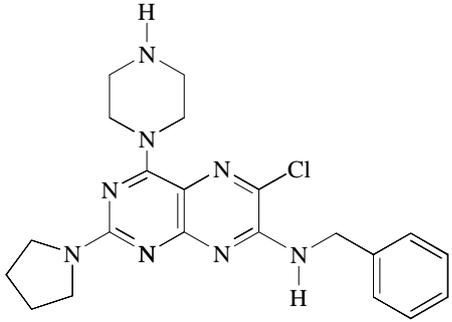
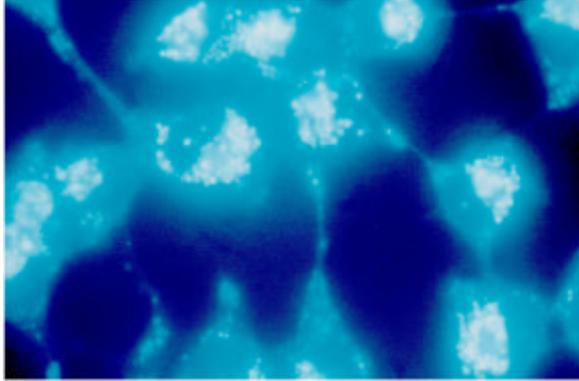
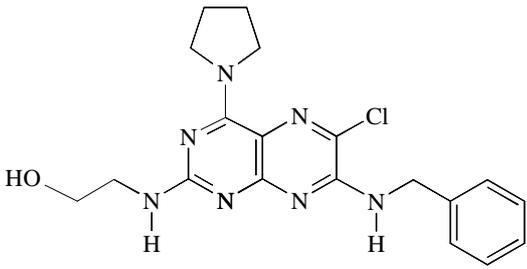
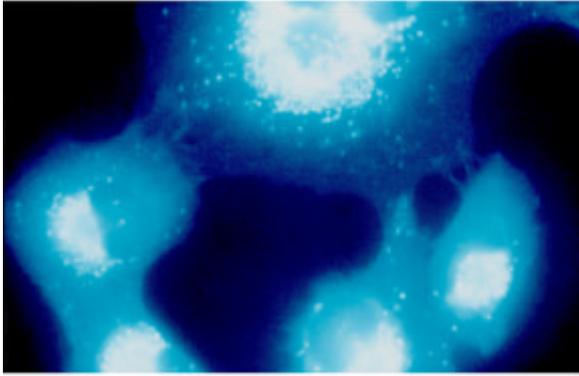
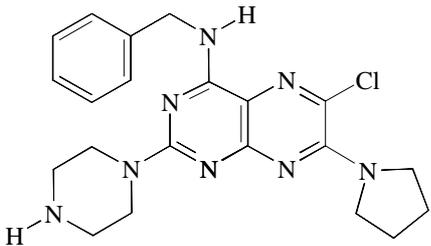
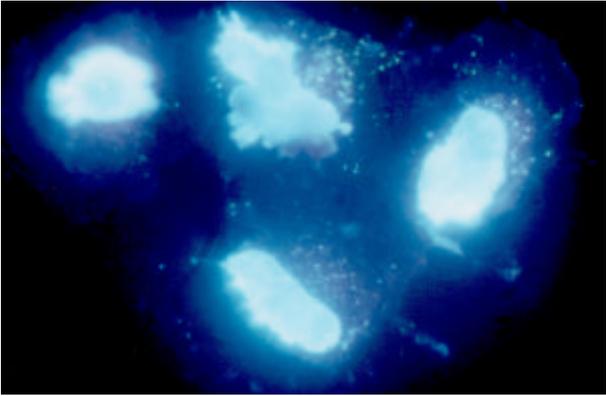
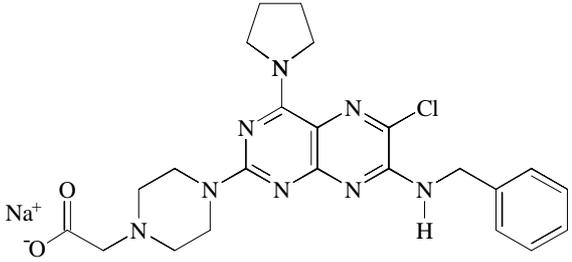
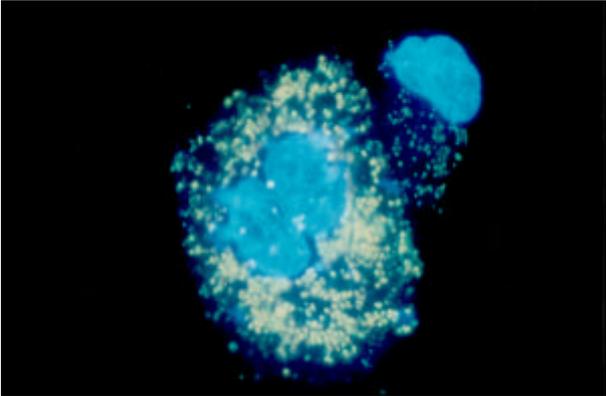
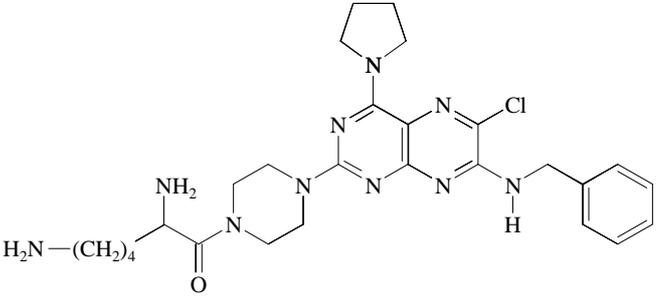
	<p>2-(4-Acetylpiperazino)-7-Benzylamino-6-chlor-4-pyrrolidinopteridin (E494) , 5 μM, 24 h</p> 
	<p>7-Benzylamino-6-chlor-4-piperazino-2-pyrrolidinopteridin (E496), 5 μM, 24h</p> 
	<p>7-Benzylamino-6-chlor-2-(2-Hydroxyethyl-amino)-4-pyrrolidinopteridin (E585), 10 μM, 24 h</p> 
	<p>4-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-7-pyrrolidinopteridin (E482), 5 μM, 24h</p> 

Abb. 89:

Ausgewählte Beispiele von mit verschiedenen Pteridinderivaten inkubierten LXFL529L-Zellen; 630-fache Vergrößerung.

Werden LXFL529L-Zellen mit dem verschiedenen Pteridinderivaten inkubiert, so kann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass sich alle getesteten Verbindungen in der perinuklearen Region anlagern. Weder im Cytosol noch im Zellkern können die Verbindungen detektiert werden. Außer dem Purinderivat, das nicht fluoresziert, konnten alle Substanzen aufgrund ihrer Fluoreszenz in den Zellen detektiert werden.

Bei Anfärbung der Zellen mit DAPI können die Zellkerne sichtbar gemacht werden (ausgewählte Beispiele s. Abb. 90). Je ein Objektträger der mit den verschiedenen Verbindungen inkubierten Zellen wurde mit dieser Methode angefärbt. Dabei zeigt sich, dass die Zellkerne bei 24-stündiger Inkubation mit den Derivaten eine abnormale Form aufweisen: Die Kerne sind nicht mehr regelmäßig und oval wie in der unbehandelten Kontrolle, sondern weisen deutliche Abschnürungen auf.

	<p>[7-Benzylamino-2-(4-carboxymethyl-piperazino)-6-chloro-4-pyrrolidinopteridin]-Natriumsalz (E274a), 10 μM, 24h</p> 
	<p>7-Benzylamino-6-chloro-2-(4-lysyl-piperazino)-4-pyrrolidinopteridin (E273), 10 μM, 24h</p> 

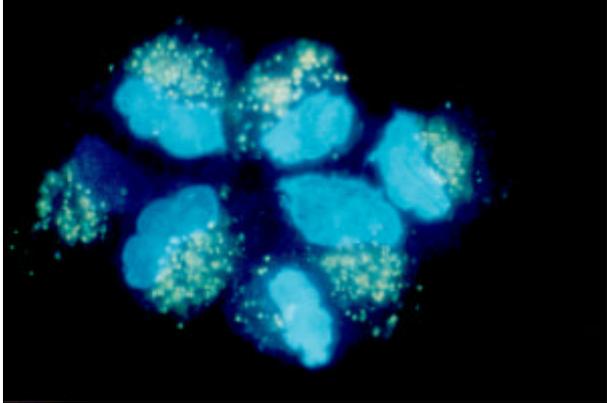
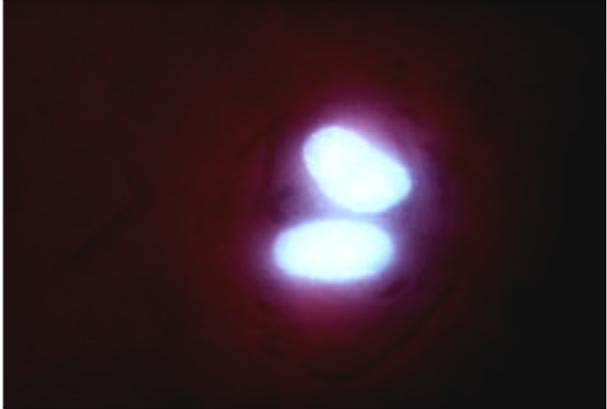
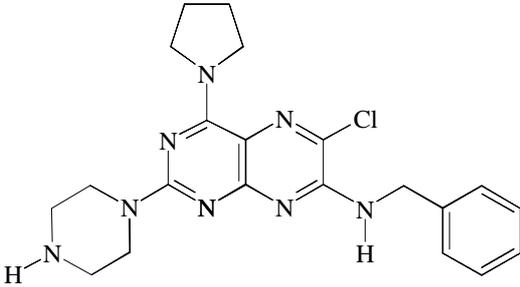
	<p>DC-TA-46, 7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin (E481), 10 μM, 24h</p>
	<div style="text-align: center;">  </div>
<p>unbehandelte LXFL529L-Zellen</p>	

Abb. 90:

Ausgewählte Beispiele von mit verschiedenen Pteridinderivaten inkubierten LXFL529L-Zellen. Zur Anfärbung des Zellkerns wurde mit DAPI gegengefärbt; 630-fache Vergrößerung.

5.6.1. Diskussion

Sowohl nach 1- als auch nach 24-stündiger Konzentration konnten alle Substanzen in den Zellen detektiert werden. Dabei wurden die Verbindungen in der perinuklearen Region nachgewiesen. Höchstwahrscheinlich werden die verschiedenen Pteridinderivate wie auch die Leitsubstanz DC-TA-46 v.a. am endoplasmatischen Retikulum von LXFL529L-Zellen sequestriert. Keine Akkumulation wird im Kern bzw. im Cytosol beobachtet. Scheinbar verhalten sich alle getesteten Derivate bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation weitestgehend gleich.

Bereits nach einstündiger Inkubation konnten die Verbindungen in den Zellen detektiert werden. Dabei wurde bei der höheren Konzentration (10 μ M) eine stärkere Fluoreszenz beobachtet als bei Inkubation mit einer 5 μ M Endkonzentration. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Verbindungen konnte bei allen Verbindungen eine nochmals verstärkte Fluoreszenz als nach 1h beobachtet werden. Bei den meisten Verbindungen konnte nun kaum noch ein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen festgestellt werden. Obwohl mit dieser Methode keine genaue Quantifizierung

durchgeführt werden kann, kann beobachtet werden, dass die verschiedenen Derivate in unterschiedlichem Maß in die Zellen aufgenommen werden. Dies liegt an ihrer Struktur und den damit einhergehenden physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Bei der Anfärbung der Zellkerne mit DAPI zeigt sich, dass die Zellkerne bei 24-stündiger Inkubation mit den Derivaten eine abnormale Form aufweisen: Die Kerne sind nicht mehr regelmäßig und oval wie in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 90D), sondern weisen deutliche Abschnürungen auf, die auf das Einleiten von Apoptose hindeuten. Dies war bei 1-stündiger Inkubation noch nicht so deutlich zu erkennen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DC-TA-46 in verschiedenen Zelllinien wie in CarB (hochmalignes Spindelzellkarzinom), LXFL529L (großzelliges Lungenkarzinom) und LXFS650L (kleinzelliges Lungenkarzinom) Apoptose induziert [Marko et al, 1998; Wagner, 1998]. Dies scheint auch für die weiteren Pteridinderivate der Fall zu sein. Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, müssten jedoch durchflußzytometrische Messungen vorgenommen werden.

5.7. Oszillation der PDE-Aktivität während des Zellzyklus

Während des Zellzyklus werden in verschiedenen Zelllinien Oszillationen des cAMP-Gehaltes beobachtet [Gottesmann & Fleischmann, 1986; Millis et al., 1974]. Wie bereits in Abb. 15 dargestellt, wird in humanen lymphoiden RPMI 8866-Zellen während der G1- und der G2-Phase ein erhöhter cAMP-Spiegel nachgewiesen. Behandlung von LXFL529L-Zellen mit dem PDE-Inhibitor DC-TA-46 führt zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels und einer Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus [Wagner, 1998]. Deshalb stellt sich nun die Frage, ob im Zellzyklus auch der umgekehrte Fall gilt, d.h. ob beispielsweise in der G1-Phase von Zellen eine niedrigere PDE-Aktivität vorliegt als in anderen Phasen. Weiterhin sollte eine mögliche Oszillation der PDE-Aktivität in den verschiedenen Zellkompartimenten (Cytosol, Partikular) im Laufe des Zellzyklus untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb nun untersucht werden, ob die PDE-Aktivität in LXFL529L-Zellen während des Zellzyklus periodischen Schwankungen unterliegt. Zu diesem Zweck wurden LXFL529L-Zellen synchronisiert. Dabei wurden 2 verschiedene Synchronisationsmethoden angewandt, um feststellen zu können, ob die Art der Synchronisation einen Einfluss auf die PDE-Aktivität hat. Bei der Synchronisation mittels 16-stündiger Nocodazol-Behandlung wird ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase induziert. Nach Absaugen des nocodazolhaltigen Mediums und Zugabe von frischem serumhaltigen Medium („Release“) nehmen die Zellen den Zellzyklus als synchrone Kultur wieder auf. Bei längerer Inkubation mit Nocodazol kann zwar die Synchronität der Kultur noch weiter erhöht werden, allerdings steigt die Mortalität ebenfalls an, da viele Zellen durch Nocodazol geschädigt werden. Die zweite Synchronisationsmethode besteht aus 48-stündigem Serumentzug. Dabei werden die Zellen „ausgehungert“ und arretieren vorwiegend in G1/G0. Nach erneuter Zugabe von serumhaltigen RPMI-Medium erfolgt der Eintritt in den Zellzyklus aus dieser

Phase heraus. Die beiden Methoden zur Synchronisierung unterscheiden sich vor allem darin, in welcher Zellzyklus-Phase die Zellen arretiert werden, allerdings ist die Synchronisation durch Serumentzug wesentlich schonender für die Zellen. Diese werden durch Nocodazol möglicherweise geschädigt, was auch einen Einfluss auf die PDE-Ausstattung und -Aktivität haben könnte.

5.7.1. Arretierung durch Nocodazol

5.7.1.1. Durchflußzytometrie

Der Erfolg der Synchronisation lässt sich mit Hilfe der Durchflußzytometrie überprüfen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. 19 sowie Abb. 91 dargestellt.

Tabelle 19:
Durchflußzytometrische Messung zur Synchronisation von LXFL529L-Zellen mit Nocodazol.

Zeitpunkt der Probennahme	% G1	% G2	% S	% Debris
vor Arretierung, n = 4	69,7 ± 2,1	7,5 ± 1,2	22,9 ± 1,8	1,6 ± 0,4
t = 0 h nach Release, n = 4	15,3 ± 2,1	64,8 ± 1,4	19,9 ± 0,7	6,8 ± 1,1
t = 6 h nach Release, n = 4	45,2 ± 2,6	29,8 ± 2,2	28,4 ± 6,4	10,9 ± 3,6
t = 24 h nach Release, n = 3	52,3 ± 5,4	27,1 ± 4,0	20,6 ± 1,4	2,8 ± 1,3
t = 30 h nach Release, n = 4	62,5 ± 3,1	16,2 ± 1,6	21,4 ± 2,1	3,5 ± 1,9

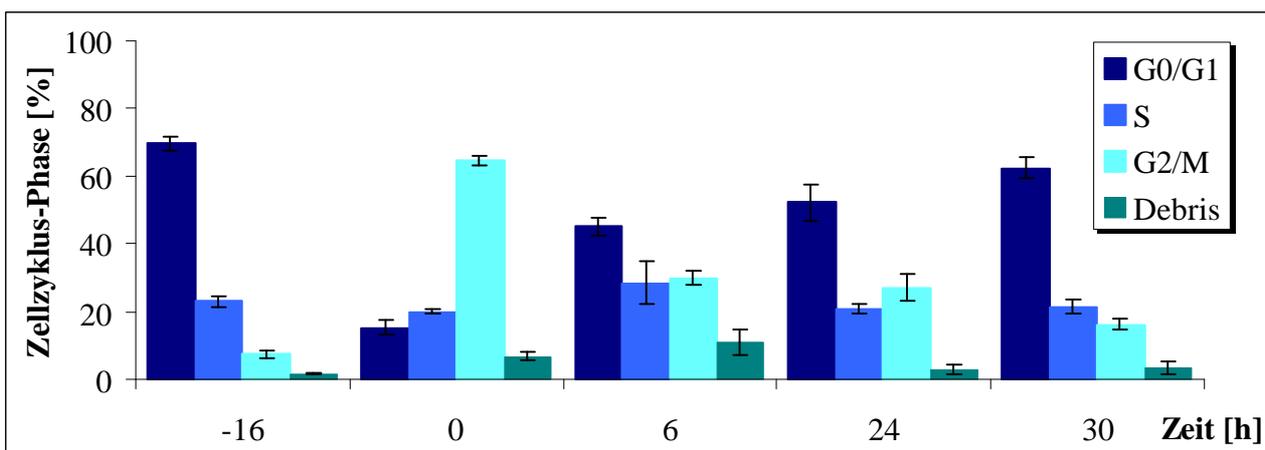


Abb. 91:
Ergebnisse der Durchflußzytometrie-Messungen von durch Nocodazol arretierten LXFL529-Zellen; der Wert vor der Synchronisation wurde als -16 h definiert.

Wie in Abb. 91 deutlich zu erkennen ist, findet man vor Beginn der Nocodazol-Behandlung ($t = -16$ h) eine unsynchrone Kultur, bei der die Zellen statistisch über die Zellzyklus-Phasen verteilt sind. Da die G1-Phase die längste Phase des Zellzyklus darstellt, befindet sich auch der Großteil der Zellen in G1. Viele Zellen sind außerdem in der S-Phase anzutreffen. Direkt nach der Nocodazolbehandlung, d.h. nach Zugabe von frischem Medium („Release“, $t = 0$ h), sind die meisten Zellen in der G2-Phase anzutreffen, die Synchronisation war erfolgreich. Wie zu erwarten war, findet sich hier eine erhöhte Menge an Debris, da die Zellen durch die Nocodazolbehandlung z.T. geschädigt wurden. 6 h nach Wiederaufnahme des Zellzyklus befinden sich erneut mehr Zellen in der G1-Phase und weniger in G2 als direkt nach Zugabe von nocodazolfreiem Medium, was durch das Fortschreiten des synchron begonnenen Zellzyklus zustande kommt. 24 h nach Wiederaufnahme des Zellzyklus hat die Menge der Zellen in der G1-Phase erneut zugenommen, während die Anzahl derer, die sich in G2 befindet, nochmals reduziert ist. Die gleiche Beobachtung wird auch nach 30 h gemacht, wo lediglich 16% der Zellen in der G2-Phase ist. Die in der G1-Phase befindlichen Zellen bereiten sich nun auf die S-Phase vor.

5.7.1.2. Bestimmung der PDE-Aktivität

Zur Untersuchung der möglichen Oszillation der Gesamt-PDE-Aktivität wurde diese nach Aufarbeitung der Zellen und Präparation des Cytosols bzw. Partikulars mit Hilfe eines PDE-Assays bestimmt [Pöch, 1972; Marko et al., 1998]. Die PDE-Aktivitäten sind in Tabelle 20 zu sehen. Zur besseren Veranschaulichung wurden auch diese Werte in Abb. 92 graphisch dargestellt.

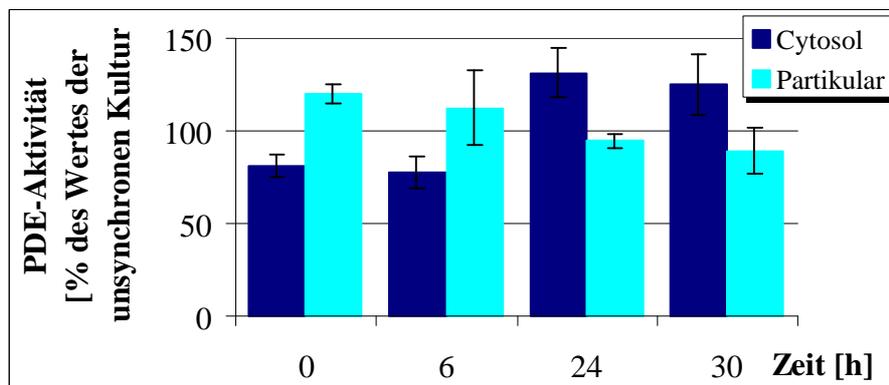


Abb. 92:

PDE-Aktivität von LXFL529L-Zellen bei der Synchronisation durch 16-stündige Nocodazolbehandlung. Alle Werte beziehen sich auf die PDE-Aktivität vor der Synchronisation, die 100% gesetzt wurde.

Tabelle 20:

PDE-Aktivität von durch Nocodazolbehandlung arretierten LXFL529L-Zellen; Anzahl der Messungen: 6 (Cytosol) bzw. 4 (Partikular).

Zeit [h]	PDE-Aktivität der LXFL529L-Zellen bezogen auf die PDE-Aktivität vor der Arretierung [%]; Cytosol	PDE-Aktivität der LXFL529L-Zellen bezogen auf die PDE-Aktivität vor der Arretierung [%]; Partikular
0	80,9 ± 5,7	119,8 ± 5,2
6	77,8 ± 8,6	112,5 ± 20,6
24	131,2 ± 13,4	94,6 ± 3,7
30	125,0 ± 16,1	89,1 ± 12,7

Wie in Abb. 92 zu erkennen ist, fällt direkt nach der Synchronisation die PDE-Aktivität des Cytosols deutlich auf 80,9% ($\pm 5,7$) des Wertes vor der Synchronisation ab. Auch nach 6 h Inkubation mit Medium, das kein Nocodazol mehr enthält, ist der Wert der PDE-Aktivität noch nicht angestiegen, sondern liegt bei lediglich 77,8% ($\pm 8,6$) des Ausgangswertes. Nach 24 h ist jedoch ein deutlicher Anstieg der cAMP-Hydrolyse auf 131,2% ($\pm 13,4$) zu beobachten. Auch der 30-Stunden-Wert ist gegenüber des Wertes vor der Synchronisation mit 125,0% ($\pm 16,1$) immer noch erhöht, hat jedoch im Vergleich zu 24 h nach Release etwas abgenommen.

Im Partikular wird ein genau gegenläufiger Kurvenverlauf beobachtet, dies ist ebenfalls in Abb. 92 dargestellt: Direkt nach der Synchronisation ($t = 0$ h) ist die PDE-Aktivität auf 119,8% ($\pm 5,2$) des Ausgangswertes angestiegen. Auch 6 h nach Release ist die Aktivität mit 112,5 ($\pm 20,6$) noch erhöht, nach 24 h ist jedoch fast wieder der Ausgangswert erreicht (94,6 $\pm 3,7$). Ein weiteres Absinken der Enzymaktivität ist auch 30 h nach Release zu beobachten, hier wird ein Wert von 89,1% ($\pm 12,7$) gemessen.

5.7.1.3. PDE-Hemmung durch Rolipram

Um zu überprüfen, ob die Isoenzymfamilie PDE4 während des Zellzyklus in unterschiedlichem Maße aktiv ist, wurde mit zu verschiedenen Zeitpunkten nach Wiederaufnahme des Zellzyklus mit aufgearbeitetem Cytosol und Partikular ein Modulatorentest durchgeführt. Die Endkonzentration beträgt für Rolipram 10 μM . Die Ergebnisse des Modulatorentests mit dem PDE4-spezifischen Inhibitor sind in Abb. 93 und Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21:

Rolipram-Hemmbarkeit von LXFL529L-Zellen, die durch 16-stündige Nocodazolbehandlung arretiert wurden; Anzahl der Messungen: 4 (sowohl Cytosol als auch Partikular); der Wert vor der Synchronisation wurde als -16 definiert.

t [h]	Rolipram-Hemmbarkeit [%], Cytosol	Rolipram-Hemmbarkeit [%], Partikular
-16	88,5 ± 5,6	82,2 ± 1,4
0	78,6 ± 7,2	65,6 ± 10,6
6	75,7 ± 9,3	87,4 ± 11,4
24	89,1 ± 9,2	69,5 ± 12,3
30	75,7 ± 4,7	67,7 ± 5,0

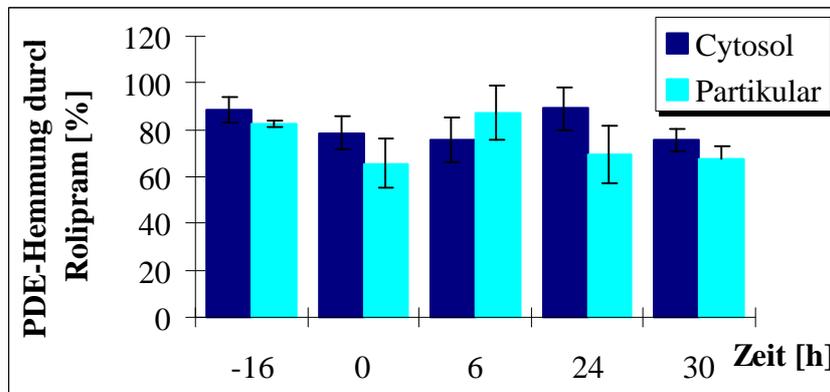


Abb. 93:

Rolipram-Hemmbarkeit von LXFL529L-Zellen, die durch 16-stündige Nocodazolbehandlung arretiert wurden; der Wert vor der Synchronisation wurde als -16 h definiert.

Auffällig am in Abb. 93 dargestellten Graph der Rolipram-Hemmbarkeit im Cytosol ist die Ähnlichkeit mit dem Graphen der PDE-Aktivität im Cytosol. Nach einem Absinken der Rolipram-Hemmbarkeit 0 h bzw. 6 h nach Release erreicht der Anteil der Rolipram-hemmbarer PDE4 nach 24 h wieder den Ausgangswert, um dann erneut abzusinken. Allerdings muss angemerkt werden, dass eine Überprüfung der Werte mit dem Student'schen t-Test keinen signifikanten Unterschied der ersten 4 Messpunkte (vor der Synchronisation sowie t = 0h, 6h und 24h) ergab. Alle Werte liegen zwischen 75,7-89,1% Rolipram-hemmbarer PDE, durch die Standardabweichungen lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage bezüglich Schwankungen bzw. Oszillation der PDE4 ausmachen. Lediglich die Werte der Rolipram-Hemmbarkeit 24 h und 30 h nach Wiederaufnahme des Zellzyklus unterscheiden sich signifikant.

Wie auch bezüglich der PDE-Aktivität im Cytosol und Partikular ein gegenläufiger Effekt beobachtet werden kann, so verhalten sich die Rolipram-Hemmbarkeiten in der cytosolischen und der partikulären Fraktion nicht gleich. In Abb. 93 ist der Verlauf der PDE4-Hemmung durch Rolipram im Partikular zu verschiedenen Zeiten nach Wiederaufnahme des Zellzyklus dargestellt. Der Graph

der Rolipram-Hemmbarkeit verläuft nahezu analog zu der PDE-Aktivität im Partikular. Obwohl die Aktivität bzw. die Menge der PDE4 im Partikular direkt nach Release etwas vermindert ist, steigt die Aktivität nach 6 h auf 87,4% an, erreicht also einen etwas höheren Wert als vor der Synchronisation. Auch hier wurden die Werte mit Hilfe des Student'schen t-Tests auf signifikante Unterschiede überprüft. Aufgrund der geringen Differenzen der PDE-Aktivität bzw. teilweise relativ hoher Standardabweichungen unterscheiden sich lediglich die Werte bei $t = 0$ h und $t = 6$ h signifikant voneinander.

5.7.2. Arretierung durch Serumentzug

5.7.2.1. Durchflußzytometrie-Daten

Aus Abb. 94 sowie Tabelle 22 geht hervor, dass die Methode des 48-stündigen Serumentzugs wesentlich schonender als die Nocodazolbehandlung ist. Dies zeigt sich anhand des niedrigen Debris-Anteil auch nach der Synchronisation, es tritt keine Schädigung der Zellen auf. Wie bereits vor der Synchronisation befinden sich direkt nach Release die meisten Zellen in der G1-Phase ($74,5\% \pm 1,3$). Auch 6 h nach Wiedereintritt in den Zellzyklus stellt die G1-Phase die größte Zellpopulation dar. 24 h nach erneuter Zugabe von Serum ins Medium ist die Menge an Zellen in der G1- und der S-Phase fast gleich; nach 30 h ist auch hier die Zellzyklus-Verteilung annähernd wie vor der Synchronisation.

Tabelle 22:

Durchflußzytometrische Messungen zur Arretierung durch Serumentzug; *: Messung nur einmal durchgeführt.

Zeitpunkt der Probenahme	% G1	% G2	% S	% Debris
vor Arretierung	$69,7 \pm 2,1$	$7,5 \pm 1,2$	$22,9 \pm 1,8$	$1,6 \pm 0,4$
$t = 0$ h nach Release	$74,5 \pm 1,3$	$5,6 \pm 0,5$	$20,0 \pm 1,8$	$3,9 \pm 3,3$
$t = 6$ h nach Release	$71,2 \pm 7,1$	$5,7 \pm 0,6$	$23,2 \pm 6,4$	$4,1 \pm 0,6$
$t = 24$ h nach Release	$42,6 \pm 1,2$	$17,1 \pm 1,7$	$40,4 \pm 2,9$	$6,4 \pm 2,4$
$t = 30$ h nach Release	$62,3 *$	$15,7 *$	$22,0 *$	$0,0 *$

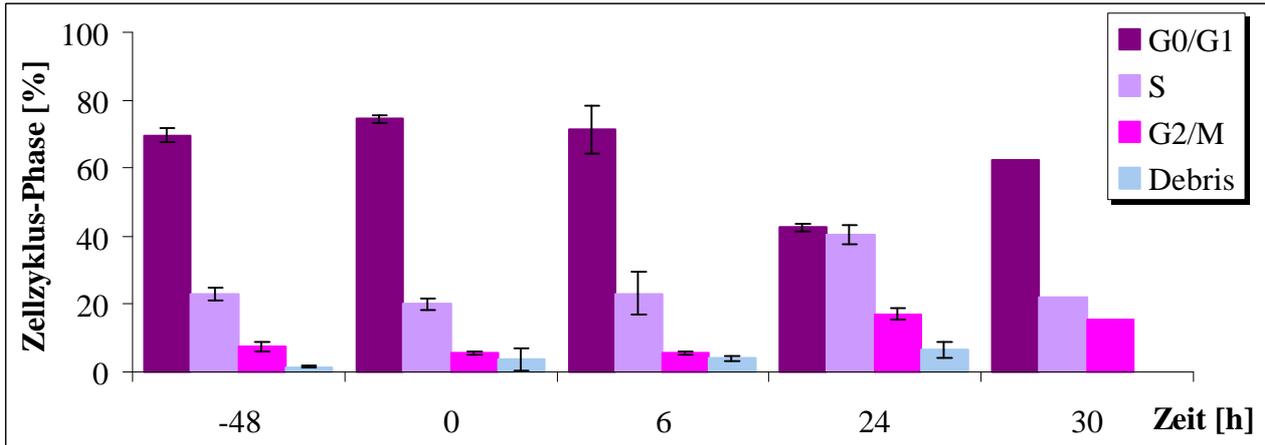


Abb. 94:

Ergebnisse der Durchflußzytometrie von durch Serumentzug arretierten LXFL529L-Zellen; der Wert vor der Synchronisation wurde als -48 h definiert.

5.7.2.2. PDE-Aktivität

Analog zum ersten Teil der Versuche, wo die PDE-Aktivität der aufgearbeiteten LXFL529L-Zellen nach Synchronisation durch Nocodazolbehandlung gemessen wurde, wird dies für die PDE-Aktivität nach Serumentzug durchgeführt. Die Aktivitäten des cAMP-hydrolysierenden Enzyms im Cytosol und Partikular sind in Tabelle 23 zu sehen. Auch hier werden die ermittelten Ergebnisse zur besseren Veranschaulichung graphisch dargestellt, dies zeigt Abb. 95.

Tabelle 23:

PDE-Aktivität von durch Serumentzug arretierten LXFL529L-Zellen; Anzahl der Messungen: 2 (sowohl Cytosol als auch Partikular).

Zeit [h]	PDE-Aktivität der LXFL529L-Zellen bezogen auf die PDE-Aktivität vor der Arretierung [%]; Cytosol	PDE-Aktivität der LXFL529L-Zellen bezogen auf die PDE-Aktivität vor der Arretierung [%]; Partikular
0	100,1 ± 12,8	54,6 ± 0,2
6	78,7 ± 3,7	65,4 ± 0,0
24	121,8 ± 25,5	97,3 ± 2,9
30	196,4 ± 48,0	100,7 ± 17,0

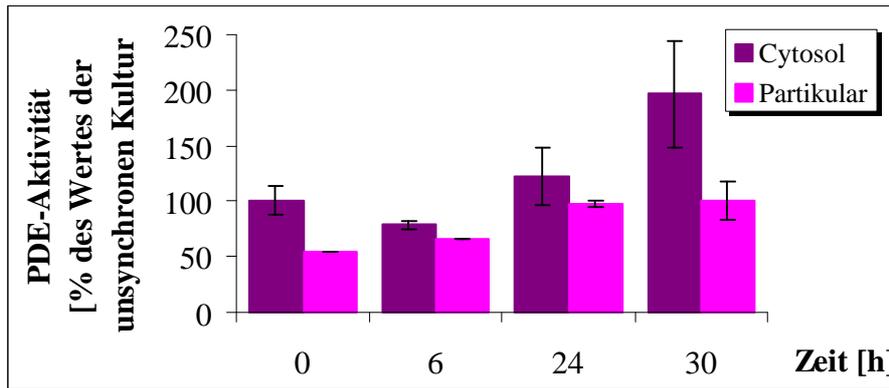


Abb. 95:

PDE-Aktivität von LXFL529L-Zellen, die durch Serumentzug arretiert wurden. Alle Werte beziehen sich auf die PDE-Aktivität vor der Synchronisation, die 100% gesetzt wurde.

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessung des Cytosols sind in Abb. 95 dargestellt. Direkt nach Wiederaufnahme des Zellzyklus ($t = 0$ h) hat sich an der Aktivität nichts geändert, der Wert liegt mit 100,1% ($\pm 12,8$) genau wie vor der Synchronisation. Nach 6 h wird ein Abfall auf 78,7% beobachtet, nach 24 h liegt der Wert allerdings bereits bei 121,8% ($\pm 25,5$) und steigt bei 30 Stunden nach Release nochmals auf 196,4% ($\pm 48,0$) an.

Auch bei der Arretierung durch Serumentzug ist im Partikular ein anderer Effekt zu beobachten als im Cytosol. Nach Release wird eine Aktivität gemessen, die nur noch bei 54,6% ($\pm 0,2$) des Ausgangswertes liegt. Diese stark erniedrigten Werte werden auch noch 6 h nach Release gefunden (65,4% $\pm 0,0$); nach 24 h ist mit 97,3% fast der Wert vor der Synchronisation erreicht. Nach 30 h beträgt die PDE-Aktivität wieder 100,7% ($\pm 17,0$) und ist damit genauso hoch wie vor der Synchronisation durch 48-stündigen Serumentzug.

5.7.2.3. PDE-Hemmung durch Rolipram

Die Endkonzentration von Rolipram beträgt auch in diesem Versuchsteil 10 μ M.

Direkt nach Wiederaufnahme des Zellzyklus ist die Rolipram-Hemmbarkeit des Cytosols auf 70,0% abgesunken (Abb. 96 und Tab. 24); vor der Synchronisation betrug sie 88,5%. Dies ist ein signifikanter Unterschied. Nach einer Zunahme auf 82,3% sinkt der Anteil an PDE4 nochmals ab und erreicht sein niedrigstes Niveau (61%), während der Wert nach 30 h wieder bei 70,7% liegt.

Während in der unsynchronen Kultur des Partikulars PDE4 82,2% der Gesamt-PDE-Aktivität darstellt, steigt dieser Wert direkt nach der Synchronisation auf 100% an. Dieser hohe Gehalt an PDE4 wird auch zum Zeitpunkt $t = 6$ h gemessen. 24 h nach Wiedereintritt der LXFL529L-Zellen in den Zellzyklus ist die PDE-Aktivität nun stark abgesunken; der prozentuale Anteil von PDE4 zur Gesamt-PDE beträgt lediglich 59,6%. Dieses signifikante Nachlassen der Enzymaktivität wird auch

nach 30 h detektiert, allerdings steigt hier die Aktivität bereits wieder leicht an, und der Wert beträgt 68,1%.

Tabelle 24:

Rolipram-Hemmbarkeit von LXFL529L-Zellen, die durch Serumentzug arretiert wurden; Anzahl der Messungen: n = 4 (-48h) bzw. n = 2 (0, 6, 24, 30 h).

t [h]	Rolipram-Hemmbarkeit [%],	
	Cytosol	Partikular
-48	88,5 ± 5,6	82,2 ± 1,4
0	70,0 ± 11,5	100,0 ± 0,0
6	82,3 ± 8,8	100,0 ± 1,9
24	61,0 ± 0,3	59,6 ± 2,1
30	70,7 ± 9,3	68,1 ± 8,0

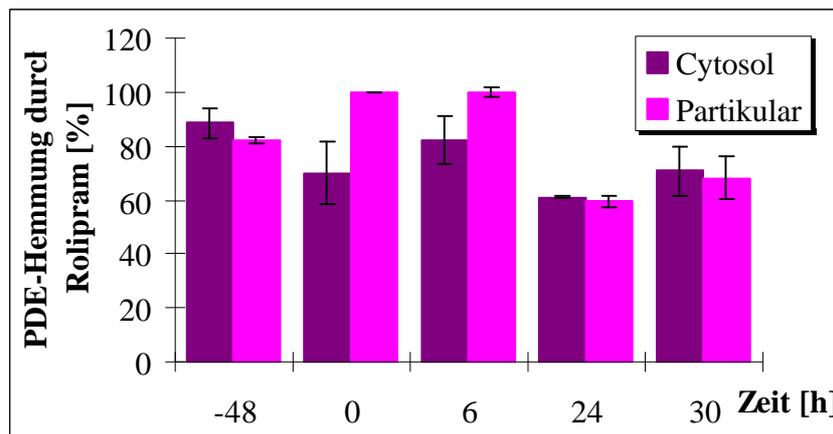


Abb. 96:

Rolipram-Hemmbarkeit im Cytosol und Partikular von LXFL529L-Zellen, die durch 48-stündigen Serumentzug arretiert wurden; der Wert vor der Synchronisation wurde als -48 h definiert.

5.7.3. Diskussion

Da bekannt ist, dass der cAMP-Spiegel in verschiedenen Zelllinien während des Zellzyklus oszillieren kann und dann ein Maximum in der G1- und G0-Phase sowie ein Minimum in der S-Phase erreicht [Millis et al., 1974], sollte untersucht werden, ob auch die PDE-Aktivität in LXFL529L-Zellen während des Zellzyklus periodische Schwankungen aufweist. Da durch Erhöhung des cAMP-Spiegels durch den PDE-Hemmstoff DC-TA-46 ein G1-Arrest erzeugt werden kann [Wagner, 1998], wurde eine erniedrigte PDE-Aktivität in der G1-Phase erwartet. Da DC-TA-46 aufgrund seiner subzellulären Verteilung vor allem die PDEs im Partikular hemmen kann, was für einen G1-Arrest

jedoch ausreichend zu sein scheint, sollte bei einer großen Zellpopulation in der G1-Phase eine niedrige partikuläre PDE-Aktivität vorliegen.

Arretierung durch Nocodazol

Bei Austausch des nocodazolhaltigen gegen frisches Medium ohne Nocodazol („Release“) nehmen die Zellen geschlossen aus der G2-Phase heraus den Zellzyklus wieder auf.

Cytosol: Hier wird direkt nach Wiedereintritt in den Zellzyklus eine geringere PDE-Aktivität als vor der Synchronisation beobachtet (s. Abb. 92). Dies kann entweder durch eine Herunterregulation der cytosolischen PDEs oder durch den Stress, dem die Zellen während der Nocodazolbehandlung ausgesetzt sind, zustande kommen. Die PDE-Aktivität ist auch nach weiteren 6h noch erniedrigt; hier befinden sich jedoch bereits nahezu die Hälfte aller Zellen wieder in der zeitmäßig längsten Phase des Zellzyklus, der G1-Phase. 24 h nach Release sind 50% der Zellen in der G1-Phase (s. Abb. 91) und die cytosolische PDE-Aktivität ist stark angestiegen. Auch 30 h nach Wiederaufnahme des Zellzyklus, wo sich nun die meisten Zellen in der G1-Phase befinden, wird eine hohe PDE-Aktivität detektiert. Die hohen Aktivitäten nach 24 h können sowohl durch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung (Kurzzeit-Anschaltung der PDE) zustande kommen, als auch durch *de-novo*-Synthese des cAMP-hydrolysierenden Enzyms. Mit den durchgeführten Messungen kann zwischen diesen Prozessen nicht unterschieden werden. Insgesamt geht die PDE-Aktivität im Cytosol von LXFL529L-Zellen erst zurück, dann wird ein Überschuss gemessen. Diese Überaktivität geht (t= 30 h) wieder zurück und nähert sich dem Ausgangswert an. Auffällig ist die Übereinstimmung der Kurven zwischen der Anzahl der Zellen in der G1/G0-Phase (s. Abb. 91) und der PDE-Aktivität im Cytosol der LXFL529L-Zellen (s. Abb. 92). Scheinbar korreliert im Cytosol eine hohe PDE-Aktivität mit einem hohen Prozentsatz an Zellen in der G1-Phase. Wird der Anteil an G1-Phase-Zellen durch Zugabe von Nocodazol ins Kulturmedium erniedrigt, so sinkt auch die PDE-Aktivität im Cytosol.

Partikular: In der partikulären Fraktion kann deutlich beobachtet werden, dass die PDE-Aktivität dann hoch ist, wenn sich wenige Zellen in der G1-Phase befinden (s. Abb. 91 und 92). Umgekehrt sinkt die PDE-Aktivität ab, wenn die Anzahl der G1-Phase-Zellen ansteigt. Dies passt sehr gut zu den bereits von Wagner (1998) beobachteten Ergebnissen, dass bei Hemmung der PDE durch DC-TA-46 ein G1-Arrest erzielt wird. In Teil 5.4.1.4 konnte bereits gezeigt werden, dass DC-TA-46 fast ausschließlich partikulär vorliegt und so überwiegend dort für eine PDE-Hemmung sorgen kann. Eine Hemmung partikulärer PDEs scheint also ausreichend für einen G1-Arrest zu sein. Hier konnte gezeigt werden, dass auch der umgekehrte Fall zu gelten scheint: Eine niedrige partikuläre PDE-Aktivität korreliert negativ mit dem Anteil der Zellen in der G1-Phase. Statt dessen wird eine positive Korrelation zwischen der PDE-Aktivität und der Anzahl der Zellen in der G2/M-Phase beobachtet: Wird der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase erhöht, so erhöht sich auch die PDE-Aktivität im Partikular.

Im Partikular wird also genau der gegenläufige Effekt wie im Cytosol beobachtet. Anscheinend unterliegen partikulär vorliegende PDE-Isoenzyme anderen Einflüssen als die cytosolischen. Diese Ergebnisse können durch verschiedene Mechanismen zustande kommen, z.B. durch Translokation

von bestimmten Isoenzymen oder unterschiedliche Regulation sowie möglicherweise auch durch die Kompartimentierung des cAMP-Signalwegs. Im Falle einer Translokation werden die PDE-Isoenzyme abhängig von der vorliegenden Zellzyklus-Phase zwischen cytosolischer und partikulärer Fraktion hin- und hertransportiert. Ein solcher Mechanismus ist allerdings in der Literatur bislang nicht beschrieben und relativ unwahrscheinlich, da die Membranassoziation verschiedener Isoenzyme wahrscheinlich über den spezifischen N-Terminus zustande kommt [Houslay, 1998], der sich vermutlich während des Zellzyklus nicht ändert. Außerdem sind die gemessenen absoluten PDE-Aktivitäten im Cytosol stets wesentlich höher als im Partikular (s. auch Ergebnisteil 5.3.1). Durch die Kompartimentierung der cAMP-Signalübertragung können spezielle PDE-Formen genauestens reguliert werden [Houslay et al., 1997]. Möglicherweise besteht so die Möglichkeit, auf das Vorliegen einer bestimmten Zellzyklus-Phase differenziert zu reagieren. Eventuell wird in der G0/G1-Phase eine höhere cytosolische PDE-Aktivität der LXFL529L-Zellen benötigt, während zum korrekten Durchlaufen der G2/M-Phase eine höhere cAMP-hydrolysierende Enzymaktivität im Partikular vorliegen muss.

Durch den Einsatz von Rolipram wurde untersucht, ob die Isoenzymfamilie PDE4 während des Zellzyklus unterschiedlich aktiv ist. Auffällig am Graph der Rolipram-Hemmbarkeit im Cytosol (s. Abb. 93) ist die Ähnlichkeit mit dem Graphen der PDE-Aktivität im Cytosol und damit auch am Anteil an G1-Phase-Zellen (s. Abb. 91 und 92): Direkt nach Release sinkt die PDE4-Aktivität ab; erst 24 h nach gemeinsamer Aufnahme des Zellzyklus wird wieder ungefähr der Ausgangswert erreicht, bevor die Aktivität erneut niedriger wird. Im Partikular wird zwar zum Zeitpunkt $t = 0$ h, d.h. direkt nach Austausch des nocodazolhaltigen Mediums durch frisches Medium, die niedrigste PDE4-Aktivität gemessen (s. Abb. 93), ansonsten ist auch dieser Kurvenvergleich sehr gut mit dem der Gesamt-PDE-Aktivität im Partikular vergleichbar. Dass direkt nach Wiederaufnahme des Zellzyklus die PDE4-Aktivität relativ niedrig ist, kann an der Nocodazolbehandlung liegen, eventuell wird PDE4 durch diese Substanz gehemmt. Insgesamt lässt sich also sagen, dass der relative Anteil der PDE4 im Verhältnis zur Gesamt-PDE-Aktivität gleich bleibt, während sich der Absolutwert der Aktivität während des Zellzyklus verändert.

Arretierung durch Serumentzug

Durch Serumentzug werden die Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert.

Cytosol: Obwohl sich die Graphen des Anteils an G0/G1-Phase-Zellen (Abb. 94) und der PDE-Aktivität im Cytosol etwas unterscheiden (Abb. 95), kann auch hier eine positive Korrelation zwischen der cytosolischen PDE-Aktivität und der Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase beobachtet werden. Direkt nach Wiedereintritt in den Zellzyklus ($t = 0$ h) bleiben sowohl die Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase als auch die PDE-Aktivität nahezu unverändert. 30 h nach Release ist sowohl die PDE-Aktivität als auch der Anteil der G0/G1-Phase-Zellen im Vergleich zum Wert nach 24 h stark angestiegen.

Die Unterschiede zwischen der Anzahl der G0/G1-Phase-Zellen und der cytosolischen PDE-Aktivität werden v.a. 6 h nach Wiedereintritt in den Zellzyklus deutlich: Zu diesem Zeitpunkt ist zwar die

Anzahl der Zellen in G0/G1 immer noch nahezu unverändert, die PDE-Aktivität ist jedoch abgesunken. Zeitversetzt dazu, d.h. zum Zeitpunkt $t = 24$ h, nimmt auch der Anteil der G0/G1-Phase-Zellen stark ab. Scheinbar beginnt die PDE-Aktivität etwas früher abzusinken, wenn sich die Zellen zwar noch in der G1-Phase aufhalten, jedoch bereits kurz vor dem Eintritt in die S-Phase sind. Zum Zeitpunkt $t = 24$ h steigen sowohl die cytosolische PDE-Aktivität als auch die Anzahl der G1-Phase-Zellen an. Wie auch bereits bei der Synchronisation durch Nocodazolbehandlung beobachtet wurde, existiert scheinbar eine Korrelation zwischen dem PDE4-Gehalt im Cytosol (Abb. 96) und dem Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase (Abb. 94). Lediglich direkt nach Ersatz des serumfreien Mediums durch serumhaltiges zeigen die beiden Graphen einen abweichenden Verlauf, da zu diesem Zeitpunkt die PDE4-Aktivität erniedrigt ist. Dies kann jedoch durch den Prozess der Synchronisation zustande kommen, der einen Stressfaktor für die Zellen darstellt, was sich möglicherweise auf die PDE-Aktivität auswirken kann.

Partikular: Hier ist die PDE-Aktivität direkt nach Release stark abgesunken (Abb. 95). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich viele Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (Abb. 94). Bei fortschreitender Inkubation mit frischem, serumhaltigen Medium steigt die Aktivität wieder an, während der Anteil der Zellen in der G1-Phase absinkt. Nach 30 h haben beide Parameter wieder annähernd den Ausgangswert erreicht. Auch bei dieser Synchronisationsmethode kann also die negative Korrelation zwischen partikulärer PDE-Aktivität und Anzahl der Zellen in der G1-Phase beobachtet werden. Es existiert ein Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der Zellen in der G2/M-Phase und der PDE-Aktivität im Partikular: Zum Zeitpunkt $t = 0$ h sowie $t = 6$ h sind sowohl die partikuläre PDE-Aktivität als auch der Anteil der G2/M-Phase-Zellen niedrig; 24 h bzw. 30 h steigt sowohl die PDE-Aktivität als auch die Menge an G2/M-Zellen stark an.

Überraschenderweise korreliert der PDE4-Anteil im Partikular (Abb. 96), der durch selektive Hemmung dieses Isoenzym bestimmt wurde, bei Synchronisation durch Aushungern der Zellen nicht mit der Gesamt-PDE-Aktivität im Partikular (Abb. 95) bzw. dem Anteil der Zellen in der G2-Phase (Abb. 94). Im Gegensatz zur Arretierung der Zellen in der G2-Phase durch Nocodazol wird ein deutlicher Zusammenhang mit der G1-Phase detektiert. Das gleiche Ergebnis wurde bereits für den PDE4-Anteil im Cytosol nach Synchronisation durch Serumentzug beobachtet. Scheinbar ist es nicht gleichgültig, auf welche Art die Zellen synchronisiert werden, zumindest auf die PDE4-Ausstattung der Zellen hat die Methode einen Einfluss. Möglicherweise ist die PDE4-Familie sensitiver gegenüber der Synchronisationsmethode als andere Isoenzyme.

5.7.4. Zusammenfassung

Durch Synchronisation einer Zellpopulation von statistisch über alle Zellzyklus-Phasen verteilten LXFL529L-Zellen konnte eine positive Korrelation zwischen der PDE-Aktivität im Cytosol und dem Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus detektiert werden. Im Partikular hingegen ist ein

deutlicher Zusammenhang zwischen der PDE-Aktivität und dem Gehalt von G2/M-Phase-Zellen zu sehen. Gleichzeitig existiert eine negative Korrelation zwischen partikulärer PDE-Aktivität und dem Anteil der G1-Phase-Zellen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Wagner (1998) überein, wo ein durch den PDE-Hemmstoff DC-TA-46 induzierter G1-Arrest beschrieben wurde. Da DC-TA-46 aufgrund seiner subzellulären Lokalisation hauptsächlich im Partikular wirksam ist, scheint v.a. die Hemmung der partikulären Isoenzyme für den G1-Arrest wesentlich zu sein. Hier konnte nun umgekehrt gezeigt werden, dass in LXFL529L-Zellen in der G1-Phase eine relativ geringe partikuläre PDE-Aktivität vorliegt. Bei der Synchronisation der LXFL529L-Zellen durch Nocodazolbehandlung korrelierte der Anteil der Rolipram-hemmbareren PDE4 im Cytosol mit der Populationsgröße der G0/G1-Phase-Zellen und im Partikular mit dem Anteil an G2/M-Phase-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde bei Arretierung des Zellzyklus in der G0/G1-Phase, der durch Serumentzug erreicht wurde, sowohl im Cytosol als auch im Partikular ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von PDE4 und dem prozentualen Gehalts von Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus gemessen. Da dieses Ergebnis für die PDE4-Aktivität im Partikular abweichend von dem Resultat der Nocodazolbehandlung ist, kann geschlossen werden, dass die Methode der Synchronisation einen wesentlichen Einfluss auf die PDE4-Aktivität hat.

5.8. Wirkung von DC-TA-46 auf die CKIs p21^{cip1} und p27^{kip1}

Durch Erhöhung des cAMP-Spiegels kann in verschiedenen Zelllinien ein Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase induziert werden [Kato et al., 1994; Gjertsen et al., 1994]. Marko et al. zeigten 1998 an der malignen Mauskeratinozyten-Zelllinie CarB, dass durch Inkubation der Zellen mit dem Pteridinderivat DC-TA-46 (Verbindung E481) der cAMP-Spiegel erhöht werden kann. Die Zellen arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus und zeigen die Induktion von Apoptose. Auch in den humanen Tumorzelllinien LXFL529L und MCF-7 wurde nach Behandlung mit DC-TA-46 ein dosis- und zeitabhängiger Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus sowie Apoptoseinduktion beobachtet [Wagner, 1998]. Endogen gebildete Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (CKIs) der p21-Familie wie p21^{cip1} und p27^{kip1} spielen eine wichtige Rolle an den Restriktionspunkten der G1-Phase. p21^{cip1} und p27^{kip1} sind dort in der Lage, vor allem G1-Phase-Cyclin-CDK-Komplexe (CyclinD/CDK4+6; Cyclin E/CDK2), in geringerem Maße auch Cyclin B/cdc2-Komplexe zu hemmen. Die Hemmung kommt durch die Bindung der CKIs an Cyclin-CDK-Komplexe zustande, wodurch ein G1-Arrest verursacht wird [Morgan, 1996]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch Behandlung mit DC-TA-46 die Expression der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs) p21^{cip1} und p27^{kip1} beeinflusst wird.

Zur Untersuchung und Quantifizierung von p21^{cip1} und p27^{kip1} wurden LXFL529L-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit der Substanz zunächst aufgearbeitet. Aus dem Zellysate wurden durch Immunpräzipitation die Proteine p21^{cip1} bzw. p27^{kip1} gewonnen. Dazu wurde sowohl für p21^{cip1} als auch für p27^{kip1} jeweils der gleiche Antikörper benutzt, der auch für den anschließenden Western Blot verwendet wurde. Die Stocklösung des Antikörpers (Konzentration 200 µg/ml) wurde 1:200 verdünnt, so dass die eingesetzte Konzentration 1 µg/ml betrug. Eine Negativkontrolle, bei der lediglich das Zellysate, nicht jedoch der spezifische Antikörper zugegeben wurde, rief keine Banden auf der Nitrozellulosemembran hervor. Die Ergebnisse der anschließenden Western-Blot Analysen sind in Abb. 97 und Abb. 98 dargestellt:

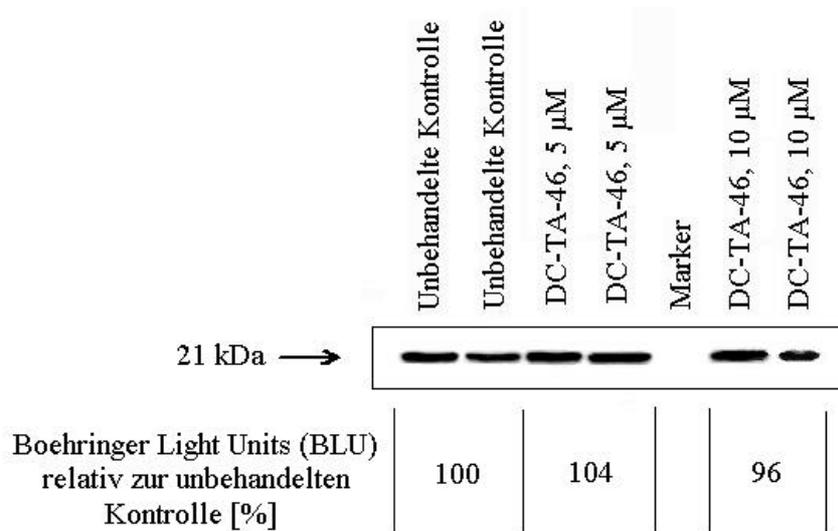


Abb. 97:
Western Blot von p21^{cip1}.

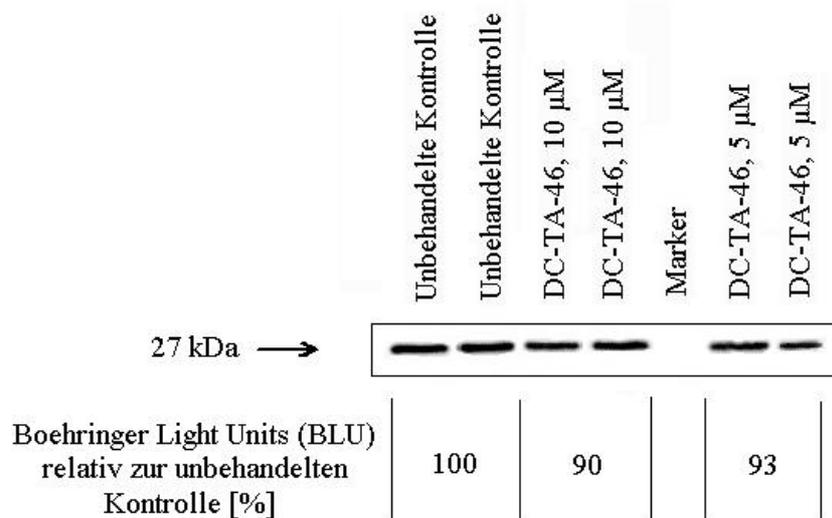


Abb. 98:
Western Blot von p27^{kip1}.

Wie anhand der Banden im Western Blot zu erkennen ist, wird weder $p21^{cip1}$ (Abb. 97) noch $p27^{kip1}$ (Abb. 98) durch DC-TA-46 induziert. Die Quantifizierung der Banden als Boehringer Light Units (BLU) ergab bezüglich $p21^{cip1}$ einen Wert von 104% (5 μM DC-TA-46, 24 h) der mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Bei Inkubation der Zellen mit einer 10 $\mu\text{molaren}$ DC-TA-46-Lösung wurden 96% Lichtintensität bezüglich der unbehandelten Kontrolle gemessen.

Bei $p27^{kip1}$ nimmt die Intensität des Signals ebenfalls nicht zu; im Gegenteil wird ein leichtes Nachlassen der Intensität detektiert. So liegt der Wert der 5 $\mu\text{molaren}$ DC-TA-46-Lösung bei 93% und der der 10 $\mu\text{molaren}$ DC-TA-46-Lösung bei 90% des Wertes der unbehandelten Kontrolle.

5.8.1. Diskussion

Trotz der Tatsache, dass DC-TA-46 einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase verursacht und den cAMP-Spiegel durch Hemmung der PDE4 erhöht, wird keine Beeinflussung der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren $p21^{cip1}$ und $p27^{kip1}$ detektiert. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, da Kato et al. (1994) herausfanden, dass der Zellzyklusarrest, den cAMP in der G1-Phase von BAC1.2F5A-Makrophagen induziert, durch $p27^{kip1}$ vermittelt wird.

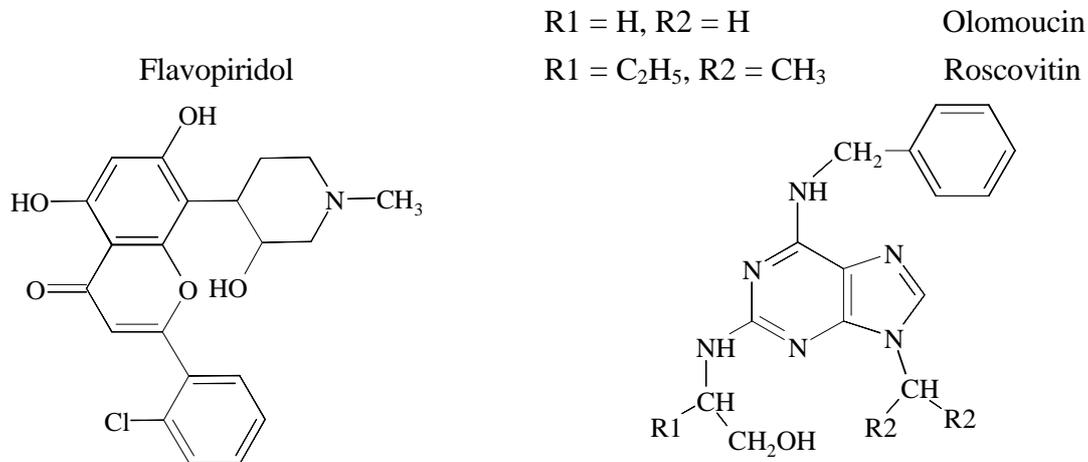


Abb. 99:

Strukturformeln der chemischen Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren Flavopiridol, Olomoucine und Roscovitine.

Möglicherweise beeinflusst DC-TA-46 jedoch nicht die Kinase-Inhibitoren $p21^{cip1}$ und $p27^{kip1}$ selbst, sondern wirkt direkt auf die Cyclin-abhängigen Kinasen oder vorgeschaltete Signalelemente. Eine direkte Wirkung auf die CDKs wurde z.B. für Olomoucine, Roscovitine und Flavopiridol beschrieben, deren Strukturformeln in Abb. 99 zu sehen sind. Ebenso wie die natürlichen Inhibitoren konkurrieren diese chemischen Hemmstoffe um die ATP-Bindungsstelle der CDKs, was durch Kristallstrukturanalysen gezeigt werden konnte [Meijer, 1996; Meijer et al., 1997]. Hinzuzufügen ist allerdings, dass diese Möglichkeit relativ unwahrscheinlich ist, weil DC-TA-46 bereits an CDK1

getestet wurde und an dieser Kinase keine Hemmwirkung zeigt [Marko, mündliche Mitteilung]. Da sich CDK1 und CDK2 relativ ähnlich sind, wird eigentlich auch für CDK2 keine Hemmung durch DC-TA-46 erwartet.

Weiterhin könnte der Effekt von DC-TA-46 auch durch Inhibitoren der INK4-Familie vermittelt werden, von denen bekannt ist, dass sie eine große Spezifität für D-Typ-Cycline zeigen. So kann z.B. auch das Tumorsuppressorgen p16 einen G1-Arrest induzieren. Außerdem könnte das 3. Mitglied der p21-Familie, p57, den G1-Arrest vermitteln.

Der Zellzyklus-Arrest könnte weiterhin zustande kommen, indem DC-TA-46 die Cyclinbindung an die CDKs verhindert oder die Cyclinexpression negativ beeinflusst. So wurde nach Inkubation von T-Lymphozyten, humanen diploiden Fibroblasten und Makrophagen mit cAMP-Analoga die Hemmung der Cyclin D1-Expression beobachtet, was zu einem G1-Arrest führte [Vairo et al., 1990].

Außerdem können Proteine, die für die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Kinasen verantwortlich sind, von der Wirkung des Pteridinderivats betroffen sein. Solche Proteine könnten z.B. wee1 oder cdc25 sein: Bei einer Aktivierung von wee1 wird der Cyclin-CDK-Komplex verstärkt an inhibitorischen Aminosäureresten phosphoryliert, während bei einer Hemmung von Phosphatasen der cdc25-Familie die aktivierende Dephosphorylierung dieser Reste blockiert wird. Lopez-Girona et al. (1999) berichteten, dass cdc25 nach einem DNA-Schaden aus dem Kern ausgeschleust und damit von seinem Substrat (CyclinB/CDK1) abgetrennt wird. Dadurch bleibt die hemmende Phosphorylierung, die durch wee1 vorgenommen wurde, erhalten, und der Cyclin/CDK-Komplex verbleibt im inaktiven Zustand. Auch der in Daudi Burkitt-Lymphomzellen durch Interferon- α induzierte G1-Arrest kommt durch Eliminierung von cdc25 zustande [Shackelford et al., 1999].

Eine andere Möglichkeit, wie DC-TA-46 seine Wirkung in LXFL529L-Zellen vermittelt, könnte die Wirkung auf Proteine bzw. Gene sein, die downstream von p21^{cip1} bzw. p27^{kip1} und den CDKs liegen: Eventuell wird pRB oder der Transkriptionsfaktor E2F so beeinflusst, dass E2F nicht freigesetzt werden kann. Außerdem könnte E2F auch nach der Freisetzung inaktiviert werden, so dass die Expression von Genen, die für den G1/S-Übergang verantwortlich sind, nicht zustande kommt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem kleinen Spektrum humaner Xenograft-Tumoren exemplarisch die cAMP-hydrolysierende PDE-Aktivität untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich Tumoren unterschiedlichen Gewebeerstammes stark in ihrer cAMP-hydrolysierenden PDE-Aktivität unterscheiden können, aber dass auch bei verschiedenen Tumoren des gleichen Gewebes die PDE-Aktivität ebenfalls stark variiert. Gleichzeitig wurden große Unterschiede im prozentualen Anteil an PDE4 gefunden. In nahezu der Hälfte der untersuchten Xenografts stellen Isoenzyme der PDE4-Familie weniger als 50% an der Gesamt-PDE-Aktivität dar.

Bei Untersuchungen des großzelligen humanen Lungenxenografts LXFL529, der verglichen mit allen anderen untersuchten Tumoren die höchste PDE-Aktivität aufweist, konnte gezeigt werden, dass dieses Tumorgewebe PDE4D3 zu enthalten scheint, die jedoch sehr leicht proteolytisch gespalten wird. Außerdem wurden kurze Formen des PDE4D-Gens detektiert. Dabei könnte es sich um PDE4D1, PDE4D2 oder die von Eyschen (1999) aus LXFL529-Tumorgewebe isolierte trunkierte PDE4D3 handeln. Möglicherweise wird in LXFL529-Xenograftgewebe auch eine kurze Form einer nicht zur PDE4D-Isoenzymfamilie gehörenden PDE exprimiert. Zur genauen Bestimmung müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Bislang wurden wirkmechanistische Untersuchungen mit PDE4-Hemmstoffen ausschließlich an Permanent-Zelllinien durchgeführt. Um Aussagen über die Übertragbarkeit der Ergebnisse *in vitro* auf die *in vivo*-Situation zu ermöglichen, wurde Tumorgewebe zweier unterschiedlicher Lungentumor-Xenografts, LXFL529 und das humane kleinzellige Lungenkarzinom LXFS650, bezüglich seiner cAMP-hydrolysierenden PDE-Aktivität und dem Gehalt an PDE4 mit den entsprechenden Permanent-Zelllinien verglichen. Dabei wiesen beide Zelllinien eine wesentlich niedrigere PDE-Gesamtaktivität als die entsprechenden soliden Xenograft-Tumoren auf. Der Anteil an PDE4 liegt in LXFL529L-Zellen und soliden Tumor in der gleichen Größenordnung. Auch im Cytosol von LXFS650 (Zelllinie und Tumor) wird der gleiche Prozentsatz PDE4 nachgewiesen, während er im Partikular der Zelllinie deutlich höher liegt im entsprechenden Tumor.

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit waren Untersuchungen zum Wirkmechanismus des potenten PDE4-Inhibitors DC-TA-46. Dieser Hemmstoff zeigt große Unterschiede in den IC₅₀-Werten der Hemmung isolierter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe (0,016 µM) bzw. der Wachstumshemmung von LXFL529L-Zellen (2,3 µM). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Verteilung des Hemmstoffs vermutlich eine wesentliche Rolle spielt.

Die PDE-Aktivität von Proteinpräparationen aus LXFL529L-Zellen wird durch DC-TA-46 mit IC₅₀-Werten von 0,22 µM (Cytosol) und 0,5 µM (Partikular) gehemmt und unterscheidet sich in der Sensitivität damit nicht von Proteinpräparationen aus solidem Tumorgewebe. Inkubiert man jedoch LXFL529L-Zellen mit der Substanz, so erreicht man erst bei Konzentrationen > 10⁻⁶ M eine Hemmung der cytosolischen PDE-Aktivität. Im Partikular der Zellen zeigt sich hingegen durch die Anreicherung von DC-TA-46 in Membranstrukturen eine deutliche Erhöhung der Hemmwirkung im

Vergleich zur entsprechenden isolierten Proteinpräparation. Die Hemmung der intrazellulären PDE-Aktivität scheint dabei auch zelltyp-spezifisch zu sein.

Analoge Versuche mit LXFS650L-Zellen zeigten eine deutlich höhere Hemmung der cytosolischen PDE im Vergleich zu LXFL529L-Zellen. Dies scheint mit der höheren Sensitivität von LXFS650L-Zellen gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von DC-TA-46 im Sulforhodamin B-Test zu korrelieren. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Bestimmung der intrazellulären Hemmwirkung eine wesentliche Messgröße zur Untersuchung potentieller PDE-Hemmstoffe darstellt.

Deshalb wurde für die bislang in unserem Arbeitskreis zur Verfügung stehenden Pteridinderivate die Hemmung der intrazellulären PDE untersucht. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an LXFL529L-Zellen ergaben keine Anhaltspunkte für Unterschiede in der subzellulären Lokalisation der verschiedenen Derivate. Alle Substanzen scheinen sich ebenso wie DC-TA-46 in Membranstrukturen in der perinuklearen Region anzureichern. Die Derivate unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Hemmung. Durch Variation der Substituenten in 4- und 7-Position bzw. an 6-Position konnte am ehesten eine gute PDE-Hemmung erreicht werden. Zwei an 7-Position substituierte Derivate mit basischem Stickstoff ohne H-Donorfunktion zeigten sogar eine bessere Inhibition der zellulären PDE als DC-TA-46. Durch Variationen der Substituenten in 2-Position des Grundgerüsts kann keine bzw. nur geringe Hemmung zellulärer PDE erreicht werden. Die meisten Veränderungen an 4'-Position konnten keine PDE-Hemmung erzielen. Für die Hemmung zellulärer PDE scheint also ein größerer Rest an 6-Position als Wasserstoff wichtig zu sein bzw. eine Wasserstoffdonorfunktion des basischen Stickstoffs in 4'-Position. Lediglich eine an 4'-Position mit einem Acetylrest substituierte Verbindung war in LXFL529L-Zellen ein potenter PDE-Hemmstoff, nicht jedoch am isolierten Enzym, was auf die Freisetzung der Leitsubstanz DC-TA-46 durch metabolische Prozesse in der Zelle zurückzuführen sein kann. Deshalb sollte bei zukünftigen biologischen Testungen nicht nur am isolierten Enzym, sondern auch in Zellen getestet werden sollte, da nur so pharmakologische Prozesse einbezogen werden.

In vitro führt die Behandlung von Tumorzellen mit DC-TA-46 zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase des und zur Induktion von Apoptose [Wagner, 1998; Marko et al., 1998]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Zellzyklus-Arrest nicht durch die Wirkung des Pteridinderivats auf die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21^{cip1} und p27^{kip1} zustande kommt.

Der cAMP-Gehalt von Zellen kann während des Zellzyklus periodischen Schwankungen unterliegen [Millis et al., 1974]. In LXFL529L-Zellen konnte eine positive Korrelation zwischen der PDE-Aktivität im Cytosol und dem Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus detektiert werden. Im Partikular hingegen ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen der PDE-Aktivität und des Gehalts von G2/M-Phase-Zellen bzw. eine negative Korrelation zwischen partikulärer PDE-Aktivität und dem Anteil der G1-Phase-Zellen zu sehen. Da DC-TA-46 aufgrund seiner subzellulären Lokalisation hauptsächlich im Partikular wirksam ist, scheint v.a. die Hemmung der partikulären Isoenzyme für den G1-Arrest wesentlich zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun umgekehrt gezeigt werden, dass in LXFL529L-Zellen in der G1-Phase eine geringe partikuläre PDE-Aktivität vorliegt.

7. MATERIAL

Geräte:

Analysenwaage	AE 163 (Mettler)
Pipetten	Multipipette (Eppendorf)
	Pipettierhilfe Pipettus Akku (Technorama)
	Mikropipetten (Eppendorf, Gilson)
pH-Meter pH 521	WTW
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultra-Turrax T25	Janke und Kunkel, Ka.-Labortechnik
Vortex	Heidolph; Janke und Kunkel MS1 Minishaker
Potter	Pottervorrichtung (Schütt)
Durchflußzytometrie	Particle Analyzer System 3 (Partec)
Proteinaufreinigung	L-6210 Intelligent Pump (Merck Hitachi)
	Anionenaustauschsäule (Pharmacia)
	Gelfiltrationssäule HiLoad [16/60] Superdex TM
	200 Prep Grade (Pharmacia)
	Kollektor (Pharmacia)
	Ultraschallbad Sonorex RB255 (Bandelin) und
	Labsonic 2000 (Braun)
Schüttelbad	Kottermann
Zentrifugen	Ultrazentrifuge Centrikon T-2055 (Kontron)
	Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf)
Zellkultur	
Kühlschränke / Gefriertruhen	Biofreezer (Labotect)
	Kühl-Gefrierkombination (Liebherr)
Photometrie	Photometer Uvikon 810 (Kontron)
Beta Counter	Betamatic (Kontron)
PCR	PT C-100 TM Programmable Thermal
	Controller (M J Research Inc.)
	Eagle Eye (Stratagene)
	Gelelektrophoresekammer (MWG Biotech)
 <u>Elektrophorese und Western-Blot Analysen</u>	
Mini-Protean II	Bio-Rad
Gel Dryer Modell 543	Bio-Rad
Blotting-Kammer Semi-Phor	Hoefler Scientific Instruments
Spannungsgerät Power Pac 300	Bio-Rad

Nitrocellulose Membran Hybond C	Amersham
LumiGlo	New England BioLabs
Lumi-Imager	Boehringer
<u>Antikörper</u>	
p21 (187) mouse monoclonal IgG1, 200 µg/ml	Santa Cruz Biotech
p27 (F-8) mouse monoclonal IgG1, 200 µg/ml	Santa Cruz Biotech
sekundärer Antikörper anti-mouse POD (from goat)	Boehringer
sekundärer Antikörper anti-mouse POD (from goat)	Boehringer
K110 (polyklonal und unspezifisch gegen alle PDE4-Isoenzyme, Epitop in der katalytischen Domäne)	freundlicherweise von Prof. Conti, Stanford, USA, zur Verfügung gestellt
K116 (polyklonal und unspezifisch gegen alle PDE4-Isoenzyme mit geringfügiger Präferenz für PDE4D, Epitop im aminoterminalen Bereich)	freundlicherweise von Prof. Conti, Stanford, USA, zur Verfügung gestellt
M3S1 (monoklonal gegen PDE4D, Epitop teilweise in der katalytischen Domäne)	freundlicherweise von Prof. Conti, Stanford, USA, zur Verfügung gestellt
<u>Mikroskopie</u>	
Durchlicht/Fluoreszenz-Mikroskop, Typ Axioskop	Zeiss
Fluoreszenz-Filtereinsatz 365; FT 395, LP 420 (Farbgläser mit Breitband Charakter, UV-Anregung Filter 365/366 nm), Fluoreszenz-Filtereinsatz BP 450- 490; FT 510; LP 520	Zeiss
Objektiv Plan Aporchromat 63x1,25 Oil	Zeiss
Okular P1 10x/20	Zeiss
Farbkamera MC-3309	Zeiss
Immersionsöl	Zeiss
<u>Zellkultur</u>	
Zellkulturmaterial	Greiner, Falcon, Sarstedt, Nunc
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Life Technology

Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technology
Penicillin/Streptomycin (10000 I.E./1000 µg)	Life Technology
Sterilbank Laminair Air HLB 2472 BS	Heraeus
Brutschrank Cytoperm	Heraeus
Lichtmikroskop Labovert	Leitz
Zählkammer zur Zellzahlbestimmung	Neubauer
Biofreezer	Forma
Vakuumsaugpumpe	KNF-Neuberger
Varioklav-Dampfsterilisator 500 E	H+P Labortechnik
Trockenschrank	Memmert

Radioaktivitätsmessungen

Röhrchen	Mini Vials 2002 (Zinsser) [2,8- ³ H]-cAMP (Amersham)
Photometrie	Einwegküvetten (Plastibrand)

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Biorad, Boehringer Mannheim, Fluka, Gibco, ICN, Pharmacia, Promega, Riedel de Haen, Roche, Roth, Serva und Sigma in p.A. Qualität bezogen.

7.1. Zellkultur

7.1.1. Zelllinien

Die humanen Tumorzelllinien LXFL529L (Lung Xenograft Fiebig Large, großzelliges Lungenkarzinom) und LXFS650 (Lung Xenograft Fiebig Small, kleinzelliges Lungenkarzinom) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Fiebig, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt.

7.1.2. Kultivierung von Zellen

Die Zellkultivierung erfolgt in einem Inkubator bei 37°C und einem 5%igen CO₂-Gehalt sowie einer Luftfeuchtigkeit von 80%.

Alle verwendeten Zelllinien werden in sterilem RPMI 1640 Medium kultiviert, dem nachträglich 10% fetales Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben werden.

Das fetale Kälberserum wird vor Verwendung 20 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

7.1.3. Passagieren von Zellen

Alle Zellen werden je nach ihrer Wachstumsgeschwindigkeit zwei bis dreimal pro Woche mit frischem Medium und Wachstumsfaktoren versorgt.

Zu diesem Zweck wird bei der Suspensionszelllinie LXFS650L ungefähr 80% des verbrauchten Mediums abgeschüttet und die gleiche Menge an frischem Medium wieder hinzugefügt. Um die toten Zellen zu entfernen, werden einmal pro Woche alle Zellen in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und 10 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Dabei verbleiben die leichteren toten Zellen im Überstand; das Pellet wird in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Monolayerzellen werden zum Passagieren vom Boden der Kulturflasche abgelöst und mit frischem Medium verdünnt. Hierzu wird das verbrauchte Medium abpipetiert und der Zellrasen einmal mit 5 ml sterilem PBS abgespült. Anschließend werden 2 ml einer sterilen gebrauchsfertigen Trypsinlösung auf den Monolayer gegeben, 20 s einwirken gelassen und abgeschüttet. Nachdem sich die Zellen abgelöst haben, wird das Trypsin durch Zugabe von Medium, welches FKS enthält, inaktiviert, die Zellen auf ca. 20 % ihres ursprünglichen Volumens verdünnt und wieder frisches Medium nachgefüllt.

Bei Suspensionszellen muss ebenso wie bei Monolayer-Zellen bei der Kultivierung beachtet werden, dass sich mit sehr hohen Passagenzahlen die physiologischen Eigenschaften der Zellen sehr stark verändern können. Deshalb sollten die Zelllinien nicht öfter als 15 mal passagiert werden. Anschließend werden die Zellen verworfen und neue in Kultur genommen.

7.1.3.1. Reagenzien

PBS-Puffer (Phosphate buffered saline):

NaCl	:	10	g
Na ₂ HPO ₄	:	1,44	g
KCl	:	0,25	g
KH ₂ PO ₄	:	0,25	g

pH = 7,2-7,3;

mit Bidest auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

Trypsinlösung:

50,12 g Trypsin (Rinderpankreas; 2,4 IU/mg)

25 mg EDTA

mit PBS auf 100 ml auffüllen, über Nacht im Eisbad rühren und anschließend sterilfiltrieren.

7.1.4. Zählen von Zellen

Nach Abtrypsinieren von adhären Zellen werden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus dem Mittelwert M verschiedener Zählungen nach folgender Formel:

$$M \times 2 \times 10^4 = \text{Zellen pro ml Lösung}$$

7.1.5. Untersuchung auf Mykoplasmenkontaminationen

Mykoplasmen sind bakterienähnliche Kleinstlebewesen, die parasitär in enger Vergesellschaftung mit Tier- und Pflanzenzellen leben [Alberts et al., 1995].

Adhären Zellen werden in mittleren Petrischalen auf Objektträger ausgestreut (5000 Zellen/Objektträger) und 24 h anwachsen gelassen. Zur Fixierung der Zellen werden die Objektträger in eiskaltes Methanol überführt und mindestens 15 min bei -20 °C inkubiert. Zum Sichtbarmachen der Mykoplasmen wird nach Abtrocknen des Methanols ein Gemisch aus Antifade-Puffer und den Farbstoffen DAPI und Propidiumjodid auf den Objektträger pipettiert. Die Färbung der Zellen und der Mykoplasmen kann nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Ortholux, Anregung: 380 nm, Emission: 488 nm) beobachtet werden, wobei die DNA blau und Cytoplasmaproteine rot erscheinen. Da Mykoplasmen zum Großteil aus DNA bestehen, können sie als kleine Punkte im Zytoplasma und im Interzellularraum erkannt werden.

Im Falle einer Kontamination mit Mykoplasmen werden die befallenen Zellen mindestens eine Woche mit Mykoplasmen-Entfernungs-Reagenz (MRA) behandelt. Nach weiterem zweimaligen Passagieren kann mit den Zellen wieder gearbeitet werden.

7.1.5.1. Reagenzien:

Antifade-Puffer:

100 mg Phenylendiamin-Dihydrochlorid werden in 10 ml PBS gelöst, der pH-Wert wird mit 0,5 M Carbonat-Dicarbonat-Puffer auf 8,0 eingestellt und mit Glycerin auf 100 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

Farbstofflösungen:

1 mg DAPI auf 1 ml Bidest;

1 ml Propidiumjodid auf 1 ml Bidest.

DAPI/Propidiumiodid/Antifade-Lösung:

Je 1 µl der Farbstofflösungen auf 1 ml Antifade-Puffer.

7.1.6. Einfrieren von Zellen

Um im Falle einer Bakterien-, Pilz- oder Mykoplasmenkontamination bzw. dem Erreichen einer zu hohen Passagenzahl auf neue Zellen einer niedrigen Passage zurückgreifen zu können, werden Zellen in Kryoröhrchen bei -180 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Hierzu werden adhärente Zellen abtrypsiniert, das Trypsin durch Zugabe von Medium abgestoppt, die Zellsuspension abzentrifugiert (1000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Pellet mit Medium resuspendiert, so dass pro ml Zellsuspension etwa 10^6 Zellen enthalten sind. Je 0,5 ml dieser Suspension werden in Kryoröhrchen pipettiert und mit 1 ml einer 30 %igen Lösung von DMSO in fetalem Kälberserum (FKS) als Gefrierschutz versetzt. Nach vorsichtigem Mischen werden die Zellen zunächst für 24 h bei -72°C im Biofreezer eingefroren und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

7.1.7. Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen werden aus dem flüssigen Stickstoff herausgenommen und bei 37 °C schnell aufgetaut, um eine Schädigung der Zellen durch DMSO zu verhindern. Nach Zugabe von

vortemperiertem Medium wird die Zellsuspension abzentrifugiert (10 min, 110 g, RT), um DMSO-Reste zu entfernen. Das Pellet wird in Medium resuspendiert und in sterile Kulturflaschen überführt; die Zellen können nun im Brutschrank kultiviert werden.

7.1.8. Synchronisation von Zellen

Um bestimmte Untersuchungen durchführen zu können, z.B. die Überprüfung der PDE-Aktivität zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus, ist eine synchron wachsende Kultur erforderlich.

Zur Kontrolle werden zwei verschiedene Methoden zur Synchronisierung angewandt, die sich vor allem darin unterscheiden, in welcher Zellzyklus-Phase die Zellen arretiert werden.

Der Erfolg der Synchronisation lässt sich mit Hilfe der Durchflußzytometrie überprüfen.

7.1.8.1. Arretierung der Zellen mit Nocodazol

Bei einer logarithmisch wachsenden Kultur wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit Medium versetzt, das 0,5 µg Nocodazol ([5-(Thiophen-2-carbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]-

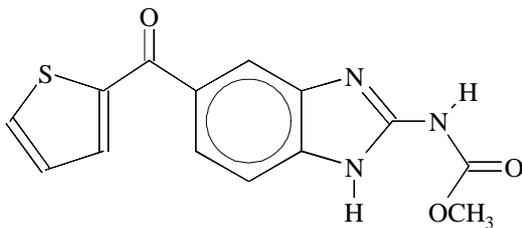


Abb. 100:
Strukturformel von Nocodazol

carbamidsäuremethylester, s. Abb. 100) pro ml Medium enthält. Die Zellen werden 16 h mit Nocodazol inkubiert, dann wird das Medium abgesaugt und durch frisches, Nocodazol-freies Medium ersetzt. Die Kultur befindet sich nun in der G2/M-Phase und nimmt geschlossen den Zellzyklus wieder auf.

7.1.8.2. Arretierung durch Serumentzug

Die Synchronisation einer asynchronen Kultur durch Serumentzug stellt eine schonendere Methode als die Synchronisierung durch Nocodazol-Behandlung dar. Insgesamt werden die Zellen wesentlich weniger geschädigt, was in der Durchflußzytometrie durch einen niedrigeren Debrisanteil zum Ausdruck kommt.

Bei einer ebenfalls logarithmisch wachsenden Kultur wird das Medium abgesaugt und durch serumfreies ersetzt, das als Zusatz lediglich 1 % Penicillin/Streptomycin enthält. Die Zellen werden nun 48 h inkubiert. Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren werden die Zellen „ausgehungert“ und stellen das Durchlaufen des Zellzyklus ein. Der Arrest erfolgt im Gegensatz zur Behandlung mit Nocodazol nicht in der G2-Phase, sondern in G1/G0.

Nach 48 h wird das Medium wieder durch serumhaltiges ersetzt, nach diesem Release erfolgt eine geschlossene Wiederaufnahme des Zellzyklus.

7.1.9. Morphologiebestimmung

Um die Lokalisation von fluoreszierenden Substanzen und eventuell damit einhergehende morphologische Veränderungen der Zellen untersuchen zu können, werden 1×10^4 Zellen in Quadripermschalen mit sterilen Objektträgern ausgestreut. Nach 24 h wird das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt, in dem die zu untersuchende Substanz in der gewünschten Konzentration gelöst wurde. Wichtig ist, dass die Endkonzentration von DMSO, das als Lösungsmittel der meisten Substanzen verwendet wird, 1% nicht überschreitet, da ansonsten die Zellen beeinflusst werden können.

Nach weiteren 24 h können die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert werden. Um eine mögliche Auswaschung der Substanzen aus den Zellen zu vermeiden, wird auf eine Fixierung mit Methanol verzichtet. Von jeder Substanzkonzentration wird eine Doppelbestimmung durchgeführt, ein Objektträger wird mit 50 μ l DAPI/SRB101 versetzt, um morphologische Veränderungen der Zellen detektieren zu können, der andere bleibt ungefärbt, um die Einlagerung der fluoreszierenden Substanzen in bestimmte Zellkompartimente zu untersuchen.

7.1.10. Durchflußzytometrische Messungen

Zur Untersuchung von apoptoseinduzierenden oder cytotoxischen Wirkung von Substanzen oder zur Überprüfung der Synchronisation einer Zellkultur stellt die Durchflußzytometrie eine geeignete Methode dar. Nach erfolgter Synchronisation wird das gesamte Medium abgeschüttet und in ein 50 ml-Röhrchen überführt, in das auch die Flüssigkeit der folgenden Waschvorgänge mit je 2 ml PBS gegeben wird. Die Zellen werden abtrypsiniert und die Petrischale gründlich mit PBS nachgespült; auch diese Lösungen werden aufgefangen. Nach Zentrifugation (10 min, 150 g, RT) wird das Pellet mit PBS gewaschen, mit 1 ml 70%igem Ethanol versetzt und bei -20°C gelagert.

Für die durchflußzytometrische Messung werden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min, 150 g, RT) und 10 min in 500 μ l Kernisolationspuffer (KIL) lysiert. Die anschließende Färbung der Zellkerne erfolgt durch Zugabe eines Gemischs aus DAPI und Sulforhodamin 101. Nach 30-minütiger Inkubation kann die Fluoreszenz im Durchflußzytometer gemessen werden.

7.1.10.1. Reagenzien:

DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung:

Tris/HCl, pH 7,6	:	0,2	M
NaCl	:	0,2	M
DAPI	:	8	μ M
Sulforhodamin 101	:	50	μ M

7.2. Versuche zur PDE-Hemmung durch verschiedene Substanzen an Zellen

Die Zellen werden in Petrischalen der Fläche 28 cm² ausgestreut und mindestens 24 h anwachsen gelassen. Wenn sich die Zellen in der logarithmische Wachstumsphase befinden, wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit Medium versetzt, das die zu testende Substanz in der gewünschten Konzentration enthält. Nach 24-stündiger Inkubation werden die Zellen wie in 6.3. beschrieben aufgearbeitet.

7.3. Zellaufarbeitung

Die Zellen sollen sich zum Zeitpunkt des Aberntens in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und einen 70-90%igen Monolayer aufweisen. Es werden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

Alle Arbeitsschritte der Aufarbeitung werden auf Eis durchgeführt und sind im Folgenden aufgelistet:

- 1) Medium abpipettieren,
- 2) 2 x mit 5 ml eiskaltem PBS waschen und Puffer verwerfen,
- 3) 500 µM Probenpuffer hinzu pipettieren, Zell-Monolayer mit Hilfe eines Gummischabers ablösen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen,
- 4) (3) wiederholen,
- 5) Volumen genau bestimmen,
- 6) Zellen durch 2-maliges Einfrieren in N₂ liq. cracken,
- 7) Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 14000),
- 8) Überstand (= Cytosol) in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und bei -80 °C lagern,
- 9) Pellet in 500 µl Triton X-100-Puffer gründlich resuspendieren,
- 10) (7) wiederholen,
- 11) Überstand (= Partikular) in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und bei -80 °C lagern.

Auch die Zellen der Suspensionszelllinie LXFS650L werden nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase aufgearbeitet. Zur Untersuchung müssen jedoch einige der Schritte modifiziert werden:

- 1) Zellen bei 200 g für 5 min zentrifugieren,
- 2) Zellpellet 1x mit 5 ml eiskaltem PBS waschen und erneut 5 min bei 200 g zentrifugieren,
- 3) Zellpellet in 500 µl resuspendieren und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen,
- 4) (3) wiederholen, um keine Zellen zu verlieren,
- 5) ab (5) verfahren wie oben.

7.3.1.1. Reagenzien:

Probenpuffer:

Tris / HCl (pH 7,4)	:	50	mM
Trypsininhibitor (aus Sojabohnen)	:	10	mg/l
Pepstatin A	:	1	μ M
Leupeptin	:	1	μ M
PMSF	:	0,5	mM
β -Mercaptoethanol	:	0,5	μ M
EDTA	:	0,1	mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	:	10	mM

„Partikular“- oder Triton X-100-Puffer:

Probenpuffer + 0,5 % Triton X 100

7.4. Tumoraufarbeitung

Alle im folgenden beschriebenen Schritte werden auf Eis durchgeführt.

Das Tumorgewebe, das bei -78 °C gelagert wurde, wird gewogen und mit der 4-fachen Menge an Homogenisationspuffer versetzt. Bevor die eigentliche Homogenisation in einem Potter-Elvejem beginnt, wird das Gewebe mit einem Skalpell schon grob zerkleinert.

Cytosol: Das Homogenat wird in Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und bei 4 °C und 40000 rpm (100000 g) eine Stunde zentrifugiert. Die auf dem Überstand schwimmende Fettschicht wird vorsichtig abgesaugt, die Lösung abdekantiert und auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wird mit der 2-fachen Menge Homogenisationspuffer resuspendiert, durch Pottern homogenisiert und erneut zentrifugiert. Nach Absaugen der Fettschicht wird dieser Überstand mit dem ersten vereinigt und das Cytosol nach Aliquotieren bei -80 °C gelagert.

Partikular: Um die membranassoziierte PDE zu solubilisieren, wird dem Homogenisationspuffer 0,5 Vol% des Detergenz Triton X-100 zugesetzt. Das Pellet der Cytosolpräparation wird nun mit der 2-fachen Menge dieses Triton-Puffers versetzt, durch Pottern homogenisiert und bei 4 °C und 40000 rpm (100000 g) eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand enthält nach Absaugen der Fettschicht die solubilierte PDE und wird nach vorsichtigem Abdekantieren auf Eis gelagert. Da das Pellet immer noch größere Mengen des Enzyms enthalten kann, ist ein weiterer Homogenisationsschritt nötig, der analog dem ersten erfolgt. Auch hier werden die Überstände vereinigt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Rest: Das Pellet der Partikularpräparation wird nochmals mit der 2-fachen Menge an Triton-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Mit einem Aliquot von Cytosol, Partikular und Rest wird sofort ein PDE-Assay und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

7.4.1.1. Lösungen und Puffer:

Homogenisationspuffer:

Tris / HCl (pH 7,4)	:	50	mM
EDTA	:	0,1	mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	:	10	mM
Benzamidinhydrochlorid	:	5	mM
Trypsininhibitor (aus Sojabohnen)	:	10	mg/l
Pepstatin A	:	1	µM
Leupeptin	:	1	µM
PMSF	:	0,5	mM
β-Mercaptoethanol	:	0,5	µM
EGTA	:	0,1	mM

„Partikular“- oder Triton X 100-Puffer:

Homogenisationspuffer + 0,5 % Triton X 100

7.5. Bestimmung der PDE-Aktivität

Die Messung der enzymatischen Aktivität erfolgt in Anlehnung an die Methode von Pösch und wird in Substratumsatz pro Zeiteinheit und mg Protein angegeben [Pösch, 1972; Marko et al., 1998].

Der cAMP-Umsatz im Assay sollte immer ca. 20 % betragen; aus diesem Grund wird stets zuerst ein Vortest mit unterschiedlichen Verdünnungen der Enzymlösung durchgeführt.

Ein Reaktionsansatz enthält jeweils 50 µl der entsprechend verdünnten Probe, 50 µl Puffer bzw. Hemmstofflösung und 50 µl „cAMP-Mix“. Um die Umsatzrate berechnen zu können, wird stets eine Kontrolle mitgeführt, die kein Enzym, sondern lediglich 100 µl Puffer und 50 µl cAMP-Mix enthält. Sollen Hemmstofftests durchgeführt werden, so muss auch immer eine Probe mitgeführt werden, die anstelle der Hemmstofflösung 50 µl Puffer enthält, um den Umsatz ohne Inhibitor angeben zu können.

Der Inhalt der Eppendorf-Reaktionsgefäße wird durch kurzes Vortexen durchmischt und in einem Inkubator für Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 37 °C für die im Vortest ermittelte Zeit inkubiert. Anschließend wird die Enzymreaktion abgestoppt, indem mit einer Multipette je 250 µl einer gesättigten Zinksulfat- und Bariumhydroxid-Lösung hinzu pipettiert werden. Durch den entstehenden

Bariumsulfatniederschlag wird vorhandenes [^3H]-5'-AMP mitgerissen und die Reaktion beendet, die übrigen Nukleotide verbleiben im Überstand. Nach Mischen durch Vortexen und Abzentrifugieren (14000 rpm, 3 min, RT) werden 450 μl des Überstandes in 4,5 ml Szintillationscocktail (Beckmann, Ready-Safe) gegeben und im β -Counter für 1 min vermessen. Die gemessenen Zerfälle pro min (cpm) sind proportional zur verbliebenen [^3H]-cAMP-Konzentration in den zum Szintillationscocktail pipettierten 450 μl der Probe. Die Umsatzraten der einzelnen Ansätze ergeben sich aus der Differenz zwischen Kontrolle und Probenwert.

7.5.1.1. Lösungen und Puffer:

„cAMP-Grundmix:“

Tris / HCl (pH 7,4)	:	50	mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	:	10	mM
AMP	:	3	mM
cAMP	:	3	μM

Mit Bidest auf 250 ml auffüllen, in 5 ml Portionen aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Aus dieser Vorschrift ergibt sich eine cAMP-Konzentration von 1 μM im Reaktionsansatz.

ZnSO₄-Lösung:

ZnSO ₄ x 7H ₂ O	:	0,266	M
---------------------------------------	---	-------	---

Mit Bidest auf 1 l auffüllen.

Ba(OH)₂-Lösung:

Ba(OH) ₂ x 8H ₂ O	:	0,266	M
---	---	-------	---

Mit Bidest auf 1 l auffüllen.

„cAMP-Mix:“

cAMP-Grundmix	:	5	ml
[^3H]-cAMP	:	10	μl

Immer erst kurz vor Versuchsbeginn ansetzen.

7.6. PDE-Hemmtest

Rolipram ist ein PDE4-spezifischer Inhibitor, der alle PDE4-Isoenzyme mit einem IC₅₀-Wert zwischen 1-5 μM hemmt. Die Endkonzentrationen der Inhibitoren sind in Tab. 25, die zu pipettierenden Mengen in Tab. 26 dargestellt. Die Berechnung der Isoenzymverteilung ergibt sich dann wie in Tab. 27 dargestellt.

Tab. 25:
Konzentrationen des PDE4-Hemmstoffs Rolipram.

	PDE-Spezifität	Endkonzentration im Ansatz
Rolipram	Hemmung der PDE4	10 μ M

Tab. 26:
Pipettierschema der zu untersuchenden Proben sowie des Puffers und der Modulatoren im PDE-Assay.

Bestimmung von	Probe [μl]	Modulatorenlösung [μl]		Puffer [μl]	cAMP-Mix [μl]
Kontrolle	-	-	-	100	50
Leerwert	50	-	-	50	50
PDE4	50	Rolipram	25	25	50

Die Berechnung der Isoenzymausstattung ergibt sich wie folgt:

Tab. 27:
Berechnung der Isoenzymverteilung für PDE4.

Zu bestimmendes PDE-Isoenzym	Berechnung
PDE4	Kontrolle - Rolipram

7.6.1.1. Lösungen und Puffer:

Rolipram:

Stocklösung:

3 mM in DMSO; aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Direkt vor Gebrauch werden 200 μ l der Stocklösung mit 9800 μ l Puffer versetzt.

7.7. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung aller Proben erfolgt nach der Methode von Bradford [Bradford, 1976]. Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm hin zu 595 nm verschiebt, was sich in einem Anstieg der Absorption bei 595 nm äußert. Da die Ausbildung des Farbstoffkomplexes nach 5 min abgeschlossen

ist und dieser eine Stunde stabil bleibt, kann in diesem Zeitraum gemessen werden. Zur Bestimmung werden 50 µl der Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und bei 595 nm im Photometer vermessen. Als Referenz dienen Rinderserumalbumin (BSA)-Lösungen der Konzentrationen 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml und 1000 µg/ml; anhand dieser Eichgerade können die Proteingehalte der Probe bestimmt werden.

7.7.1.1. Reagenzien:

Bradford-Lösung:

Coomassie Brilliant Blue G250	:	0,1	g
50% Ethanol (Vol.%)	:	50	ml
85%ige Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	:	100	ml

mit Bidest auf 250 ml auffüllen. 4 Wochen dunkel stehen lassen,
4 Teile Bidest hinzufügen und abfiltrieren.

7.8. Anionenaustausch-Chromatographie

Zur Gewinnung von hochaufgereinigter PDE4 wird das Cytosol der Tumorpräparation von LXFL529 auf eine saure Anionenaustauschchromatographie-Säule appliziert. Das Säulenmaterial besteht aus Q-Sepharose FF.

7.8.1.1.1. PACKEN DER SÄULE:

Die FPLC-Säule HR 10/2 wird an die Anlage angeschlossen, das alte Säulenmaterial entfernt und 5 ml frische Q-Sepharose, die zuvor in 15 ml Laufpuffer suspendiert und entgast wurde, mit Hilfe des Einfüllstutzens eingefüllt. Nach Absetzenlassen des Säulenmaterials und Verschließen der Säule wird diese 5 min mit einem Flow von 2 ml/min und weitere 5 min bei 4 ml/min gepackt. Das anschließende Equilibrieren erfolgt mit 30 ml Laufpuffer bei einem Flow von 2 ml/min. Wichtig ist beim Packen und Betreiben der Säule, dass keinesfalls Luftblasen in das Säulenmaterial gelangen.

7.8.1.1.2. PROBENAUFTRAG UND TRENNUNG:

Während des Auftragens mit Laufpuffer verbleiben im Cytosol enthaltene PDEs auf der Säule, während ein Großteil aller anderen Proteine die Säule unretardiert passiert. Die Auftrennung der einzelnen PDE-Isoenzyme erfolgt durch stufenweise Elution mit Hilfe eines Natriumchlorid-

Gradienten. Dieser Gradient ist abhängig vom Gewebeursprung bzw. Isoenzymgehalt. Für LXFL529-Tumorgewebe wird der in Tabelle 28 dargestellte Gradient benutzt [Marko, 1994]:

Tabelle 28:
HPLC-Programm der Anionenaustauschchromatographie.

Zeit [min]	Konzentration Laufpuffer [%]	Konzentration Elutionspuffer [%]
0	100	0
10	100	0
12,5	80	20
32,5	80	20
35	70	30
55	70	30
57,5	60	40
77,5	60	40
92,5	0	100
107,5	0	100
108,5	100	0
114,7	100	0
Fließgeschwindigkeit: 2 ml/min;		

Pro Lauf werden 6 ml aufgearbeitetes Cytosol des Tumors LXFL529 auf die Säule appliziert, das zuvor zur Abtrennung von eventuell enthaltenen Feststoffen nochmals kurz zentrifugiert wurde (5 min, 4 °C, 14000 rpm). Der Trennung bei einem Flow von 2 ml/min folgt die Elution durch einen stufenweisen Natriumchloridgradienten, der während des Laufs von 0 auf 100% ansteigt. Die Fraktionsgröße beträgt 5 ml. Nach Beendigung des Laufs wird die Säule mit 100% Elutionspuffer gespült.

Von den gesammelten Fraktionen wird die PDE-Aktivität bestimmt, um herauszufinden, in welchen Fraktionen sich die Isoenzyme befinden. Von den erhaltenen Aktivitätspeaks wird zur Identifizierung der PDE4 die Rolipram-Hemmbarkeit bestimmt.

7.8.1.2. Lösungen und Puffer:

Alle verwendeten Puffer und Lösungen werden vor Gebrauch mit Hilfe eines Ultraschallbades entgast, um eine Verunreinigung der Säule zu verhindern.

Laufpuffer:

Tris / HCl (pH 7,4)	:	50	mM
EDTA	:	0,1	mM
Benzamidinhydrochlorid	:	5	mM
Trypsininhibitor (aus Sojabohnen)	:	10	mg/l
Pepstatin A	:	1	μ M
Leupeptin	:	1	μ M
PMSF	:	0,5	mM
β -Mercaptoethanol	:	0,5	μ M

Mit Bidest auf 1l auffüllen und nach Entgasen auf Eis aufbewahren.

Elutionspuffer:

NaCl	:	1	M
------	---	---	---

Mit Laufpuffer auffüllen auf 1l.

7.9. Ultrafiltration

Die durch Anionenaustauschchromatographie erhaltenen Isoenzymfraktionen werden durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Die hierfür benutzten Membranen besitzen ein Ausschlußmolekulargewicht von >3000 Da (YM3), d.h. alle Moleküle, die größer als 3000 Da sind, werden zurückgehalten. Die Membran wird vor der Verwendung über Nacht in Bidest gelegt, um Konservierungsstoffe zu entfernen. Nach Einbau der Membran in die Ultrafiltrationszelle wird weitere 5 min mit Bidest bei 3,7 bar (Stickstoff) gespült.

Die Probe wird unter Stickstoff bei 3,7-4,7 bar auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufkonzentriert.

7.10. Gelfiltration

Die Aufreinigung von PDE-Isoenzymen erfolgt mit einer Hiload 16/60 Superdex 200-Säule, die bei einem Flow von 1 ml/min mit 120 ml Gelfiltrationspuffer equilibriert wurde. Wichtig ist, dass der Druck 3 bar (bzw. kurzzeitig 4 bar) nicht überschreitet. Das durch Ultrafiltration eingegangte Konzentrat, das die Isoenzyme enthält, wird bei einem Flow von 0,5 ml/min auf die Säule aufgebracht und entsprechend ihrer Stoke'schen Radien aufgetrennt. Die Fraktionsgröße beträgt 2 ml, es werden 70 Fraktionen gesammelt und mit Hilfe des PDE-Assays der Umsatz bestimmt, um die Isoenzym-enthaltenden Fraktionen zu detektieren.

7.10.1.1. Lösungen und Puffer:

Auch hier werden alle verwendeten Puffer und Lösungen vor Gebrauch mit Hilfe eines Ultraschallbades entgast.

Gelfiltrationspuffer:

Glycerin	:	0,435	M
NaCl	:	0,5	M
Tris / HCl (pH 7,4)	:	50	mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	:	10	mM
EDTA	:	0,1	mM

Mit Bidest auf 1 l auffüllen.

7.11. Acetonfällung von Proteinen

Die Lösung des zu fällenden Proteins wird mit einem 3-fachen Überschuss an eiskaltem Aceton p.A. versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Anschließend werden die Proben zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipetiert und Acetonreste abdampfen gelassen. Das Pellet wird in SDS-Probenpuffer resuspendiert, und nach Kochen (5 min, 95 °C) kann die Probe in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt werden. Nichtgelöste Bestandteile wie z.B. DNA können durch sehr kurzes Zentrifugieren abgetrennt werden.

7.11.1.1. Lösungen und Puffer:

SDS-Probenpuffer:

Tris/HCl (0,5 M)	:	50	ml
Glycerin	:	40	ml
β-Mercaptoethanol	:	5	%
SDS	:	1,24	g
Bromphenolblau	:	0,16	g

pH 6,8; mit Bidest auf 100 ml auffüllen.

7.12. Immunpräzipitation

Die Methode der Immunpräzipitation dient zur selektiven Abtrennung des zu untersuchenden Proteins aus Zellysaten und ermöglicht die anschließende Detektion mittels SDS-Page und Western Blotting, auch wenn nur sehr geringe Proteinmengen im Lysat vorliegen.

Zur Gewinnung des Proteins wird zunächst ein spezifischer Antikörper an G-Sepharose gebunden. Nach Zugabe des Zellysats erkennt der Antikörper das Protein und bindet es, während alle anderen Proteine in den darauffolgenden Waschschritten entfernt werden. Schließlich wird das Protein mit Hilfe eines SDS-Puffers eluiert, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und kann nach 5-minütigem Kochen zur Denaturierung auf ein SDS-Gel aufgetragen werden.

Für die anschließende Western-Blot-Analyse kann erneut der gleiche oder ein anderer spezifischer Antikörper eingesetzt werden.

Die zu untersuchenden Zellen werden in mittlere Petrischalen ausgestreut, 2 Tage anwachsen gelassen, 2x mit PBS gespült und 2x mit je 200 µl Präzipitationspuffer abgeschabt. Nach Aufbrechen der Zellmembran durch Pottern wird das Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Das Abtrennen der Membranbestandteile erfolgt durch 10-minütige Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C).

Um später in jedem Ansatz die gleiche Gesamtproteinmenge einzusetzen, wird nun eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Pro Versuchsansatz werden nun 50 µl Protein-G-Sepharose benötigt, die zuvor aktiviert werden muss. Hierzu wird die entsprechende Menge an Protein-G-Sepharose mit der 2-fachen Menge PBS vermischt, gevortext und 10 min bei 14000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Waschschrift wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet mit der 1,5-fachen PBS-Menge versetzt.

Nun werden 50 µl gut resuspendierte Protein-G-Sepharose in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und 2,5 µl Antikörper zugegeben. Die Suspension wird 1 h auf Eis geschüttelt, um den Antikörper an die Sepharose zu binden. Nach Zugabe von 500 µg Gesamtprotein, wobei das Gesamtvolumen 1 ml nicht überschreiten darf, wird erneut 1 h auf Eis inkubiert.

Nach Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, 4 °C) wird der Überstand verworfen und mit 400 µl PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird dieser Waschschrift noch 2x wiederholt.

Die Elution des Antigens erfolgt durch Zugabe von 30 µl PBS/SDS-Puffer. Nach 15-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wird die Protein-G-Sepharose abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Es werden 7,5 µl SDS-Ladepuffer (6x) zugegeben; das Protein kann jetzt bei -20 °C gelagert werden.

7.12.1.1. Lösungen und Puffer:

Präzipitationspuffer (2x)

Triton-X100	:	1	% (v/v)
NaCl	:	150	mM
Tris (pH 7,4)	:	10	mM
Na ₂ EDTA/EDTA	:	1	mM
EGTA	:	1	mM
Igepal / NP-40	:	0,5	% (v/v)

Puffer vor Gebrauch 1:1 verdünnen,

dann Zugabe von

Natriumvanadat	:	0,2	mM
PMSF	:	0,2	mM

PBS / 1%-SDS-Puffer:

1,5 ml 10%ige SDS-Lösung

13,5 ml PBS (1x)

7.13. Western-Blot-Analyse

Proteine, die nur in sehr geringen Mengen in einer Lösung wie z.B. Körperflüssigkeit oder Zellysat vorliegen, können sehr spezifisch und sensitiv durch die Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Für diese Technik werden spezielle Antikörper benötigt, die das nachzuweisende Protein, das zuvor einer SDS-Page unterworfen und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert („geblottet“) wurde, spezifisch erkennen und daran binden. Durch selektive Bindung eines Sekundärantikörpers, der an eine Peroxidase gekoppelt ist, kann der Komplex aus Protein und Primärantikörper sichtbar gemacht werden; bei Zugabe des Substrats der Peroxidase kommt es zu einer Chemolumineszenz, die eine Schwärzung auf einem Röntgenfilm hervorruft oder mit Hilfe eines Lumi-Imagers (Boehringer) detektiert werden kann. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Software. Dabei wird die Chemolumineszenz als Boehringer Light Units (BLU) detektiert.

7.13.1. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page) ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Analytik von Proteinen und Nukleinsäuren. Die Proteine werden vor ihrer Trennung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Die speziellen Nettoladungen der Proteine, die aus den Seitenkettenladungen der einzelnen Aminosäuren resultieren, werden durch die negative Nettoladung

des Detergenz überdeckt. Führt man die Denaturierung mit SDS bei 95 °C in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol durch, so werden alle Disulfidbrücken der Proteine gespalten, und man erhält ein Proteingemisch, das aus aufgefalteten separaten und ausschließlich negativ geladenen Polypeptidketten besteht. Die Ladungsmenge ist nun direkt proportional zur Molekülgröße, und die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zeigt eine lineare Korrelation zur Molekülgröße.

Die hier verwendete Methode basiert auf der Vorschrift von Laemmli (1970). Die Lösung des Trenngels wird am Vortag des Versuchs bis ca. 1 cm unter den Rand der Glasplatten gegossen und mit n-Butanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Am Versuchstag wird das n-Butanol abgeschüttet und das Sammelgel gegossen. Durch Hineinstecken von Kämmen in die Gelapparatur erhält man Taschen, in die nach der Polymerisation des Gels und Entfernen der Käme die Proben unmittelbar vor der Elektrophorese hineinpipettiert werden können.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in Elektrophoresepuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V.

7.13.1.1. Lösungen und Puffer:

Acrylamid-Lösung (fertig vorhanden von Roth):

Acrylamid : 30 %
Bisacrylamid : 0,8 %

APS-Lösung:

APS (10%) : 0,5 g

Mit Bidest auf 5 ml auffüllen.

Trenngelpuffer:

Tris / HCl (pH 8,8) : 1,5 M

Trenngel (Mengen für 2 Gele):

Tabelle 29:

Pipettierschema für das Trenngel der SDS-Gelelektrophorese.

Konzentration des Gels:	10 %		12 %		14 %	
H ₂ O Bidest	4,1	ml	3,44	ml	2,78	ml
Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,44	ml	2,46	ml	2,46	ml
Acrylamid (30%)	3,3	ml	3,94	ml	4,6	ml
SDS (10%)	98,4	μ l	98,4	μ l	98,4	μ l
APS (10%)	49,2	μ l	49,2	μ l	49,2	μ l
TEMED	4,92	μ l	4,92	μ l	4,92	μ l

Sammelgelpuffer:

Tris / HCl (pH 6,8) : 0,5 M

Sammelgel (Mengen für 2 Gele):

H₂O Bidest : 2,4 ml
Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8) : 1,0 ml
Acrylamid (30%) : 0,5 ml
SDS (10%) : 40 µl
APS (10%) : 40 µl
TEMED : 4 µl

Elektrophorese-Laufpuffer:

Glycin : 200 mM
Tris : 25 mM
SDS : 0,1 %

Mit Bidest auf 1 l auffüllen.

7.13.2. Elektroblotting

Die Übertragung und Fixierung der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Amersham-Nitrocellulose-Membran (Hybond C) erfolgt nach der semi-dry-Methode [Towbin et al.; 1979]. Nach Equilibrierung des Gels sowie der Membran und sämtlicher Filterpapiere in Blotting-Puffer wird die Apparatur wie folgt zusammengesetzt:

Anode
2 Filterpapiere
Nitrozellulosemembran
SDS-Gel
2 Filterpapiere
Kathode

Die Abwesenheit von Luftblasen ist für den einwandfreien Transfer der Proteine sehr wichtig. Pro Gel beträgt die Stromstärke 50 mA, geblottet wird 90 min.

7.13.2.1. Lösungen und Puffer:

Blotting-Puffer:

MeOH	:	20	%
SDS-Na-Salz	:	0,0037	%
Glycin	:	39	mM
Tris	:	48	mM

TBS:

NaCl	:	8	g
Tris	:	2,42	g

Mit Bidest auf 1l auffüllen

TBS-Tween:

TBS-Puffer mit 0,3 Vol.% Tween;

7.13.3. Immunoblotting

Nach Beendigung des Proteintransfers auf die Nitrocellulosemembran wird die Membran 15 min in TBS-Tween (0,3 %) geschüttelt (Puffer mehrmals wechseln). Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wird die Membran über Nacht (4 °C) mit einer 5%igen BSA/TBS-Tween-Lösung inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte ergeben sich wie folgt:

Membran 10 min mit TBS-Tween waschen (Puffer mehrmals wechseln),

Membran zusammen mit 1 ml des Primärantikörpers in Folie einschweißen und 1 h im Überkopfschüttler inkubieren. Der Primärantikörper kann mehrmals verwendet werden und wird deshalb möglichst quantitativ rückgewonnen und steril filtriert (weitere Aufbewahrung im Kühlschrank),

Membran 1 h in TBS-Tween schütteln (Puffer mehrmals wechseln),

Membran 1 h mit 5 ml Sekundärantikörper im Überkopfschüttler inkubieren.

Membran 1 h in TBS-Tween schütteln (Puffer mehrmals wechseln).

Im Anschluss an diese Arbeitsschritte erfolgt die Detektion der Proteine.

Die Western Blot Analysen wurden mit den polyklonalen Antikörpern K110 (unspezifisch gegen alle PDE4-Isoenzyme, Epitop in der katalytischen Domäne) und K116 (unspezifisch gegen alle PDE4-Isoenzyme, Epitop im aminoterminalen Bereich) durchgeführt. Von K116 wurde das bleed 1.4, von K110 das 3. bleed benutzt. Bei der Präparation von Antikörpern, die zwischen PDE4A-D unterscheiden können, werden Proteine bei der Immunisierung der Tiere benutzt, die die unterschiedliche carboxy-terminale Region von PDE4A-D beinhalten. Der hier benutzte monoklonale und für PDE4D spezifische Antikörper M3S1 (Epitop teilweise in der katalytischen Domäne) ist ein

IgG1-Isotyp [Iona et al., 1998; Conti et al., 1995; Saldou et al., 1998]. Zum Nachweis von p21^{cip1} und p27^{kip1} wurden ebenfalls monoklonale Antikörper der Firma Santa Cruz benutzt.

7.13.3.1. Reagenzien:

Primär-Antikörper:

Antikörper	:	10	µl
Ziegsenserum	:	10	µl
BSA	:	0,1	%
TBS-Tween	:	980	µl

Sekundär-Antikörper:

Antikörper	:	1	µl
BSA	:	0,15	g
TBS-Tween	:	5	ml

7.13.3.2. Detektion

Zum Sichtbarmachen der Proteine wird die Membran 1 min in LumiGlo-Reagenz geschwenkt. Dabei werden aufgrund der Reaktion mit der Peroxidase, die an den sekundären Antikörper gebunden ist, Lichtsignale ausgesandt, die mit Hilfe eines Lumi-Imagers (Boehringer) detektiert werden können.

7.13.4. Silberfärbung von SDS-Gelen

Anstelle von Western-Blot-Analysen können Proteine, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auch mit Silbersalzen angefärbt werden. Dabei erfolgt eine Reduktion von Silberionen, die zuvor an die Seitenketten der Aminosäuren gebunden wurden. Im Gegensatz zur Methode des ElektrobloTTings und anschließender Detektion mit spezifischen Antikörpern für ein spezielles Protein werden hier alle Proteine im Gel detektiert. Aus diesem Grund müssen Zellysate vorher zumindest partiell aufgereinigt werden. Mit dieser Färbung können 0,1-1 ng Protein detektiert werden. Dabei wird das Gel nach der SDS-Page bei Raumtemperatur mit verschiedenen Lösungen behandelt [Maniatis et al., 1989].

Fixieren:

Ethanol p.a. / Essigsäure / Bidest (30:10:60)

Gel über Nacht in 100 ml der Fixierlösung sanft schütteln.

Waschen:

30% Ethanol: Gel 30 min in 100 ml Waschlösung sanft schütteln,
Lösung wechseln und erneut 30 min inkubieren.

Waschen:

Bidest: Gel 10 min in 100 ml schütteln;
diesen Schritt 4 mal wiederholen.

Färben:

0,1% AgNO₃
30 min schütteln.

Waschen:

Bidest
Beide Gelseiten je 20 s unter fließendem Bidest waschen.

Entwickeln:

2,5% Na₂CO₃
0,02% Formaldehyd
In 100 ml des Entwicklers sanft schütteln, bis die Banden erscheinen.

Stoppen:

1% Essigsäure
10 min schütteln.

Waschen:

Bidest
10 min. Schütteln, 3 mal wiederholen.

Anschließend kann das Gel in einem Getrockner getrocknet werden.

7.14. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente können mit Hilfe der Polymerase-chain-reaction (PCR) *in vitro* in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Die gesamte Reaktion basiert auf 3 Teilschritten bei unterschiedlichen Temperaturen, die ständig wiederholt werden. Bei 90-94 °C trennen sich die beiden Stränge der Doppelstrang-DNA. Im nächsten Schritt (50-55 °C) hybridisieren die Einzelstränge mit den beiden Primern. Bei 74 °C kommt es zur Kettenverlängerung in 5'-3'-Richtung. Diese Reaktion wird durch die hitzestabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* unter Verwendung zugesetzter dNTPs katalysiert. Ausgehend von jedem der beiden Primer wird nun ein neuer DNA-Strang synthetisiert, der seinerseits im nächsten Zyklus wieder als Matrize dienen kann. Mehrfaches Wiederholen der 3 Schritte führt zu einer Amplifizierung der DNA. Die einzustellenden Temperaturprogramme sind abhängig von der Enzym- und der Ionenkonzentration (z.B. Mg²⁺), der

Konzentration der Desoxynukleotide sowie dem pH-Wert, weitere Bedingungen ergeben sich durch die zu amplifizierende DNA und die Länge der Primer [Gasser et al.].

Die Möglichkeiten der PCR sind nicht nur auf die Vervielfältigung von DNA beschränkt. Mit Hilfe der RT-PCR kann zuerst durch eine Reverse Transkriptase aus dem *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV) von mRNA eine cDNA hergestellt werden. Diese kann dann ihrerseits mittels PCR amplifiziert werden [Stryer, 1994].

7.14.1. mRNA-Präparation

Eukaryontische Zellen enthalten nur einen sehr geringen Prozentsatz an mRNA. Diese stellt nur ungefähr 1-5% der Gesamt-RNA dar. Bei der mRNA-Präparation ist darauf zu achten, dass endogene Ribonukleasen (RNasen) schnell und wirksam gehemmt werden, um einen Abbau der mRNA zu verhindern.

Alle im folgenden beschriebenen Schritte werden auf Eis durchgeführt. Es werden stets Handschuhe getragen und nur autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße benutzt.

Von LXFL529-Tumorgewebe wird in gefrorenem Zustand ein Stück der Masse 100-150 mg abgeschnitten und eingewogen. In einem Pottergefäß, das zuvor gründlich mit Extraktionspuffer und DEPC-Wasser gespült wurde, wird das Gewebe sofort mit 400 µl Extraktionspuffer (enthält Guanidin-Thiocyanat zur Lysierung der Zellen und der Denaturierung von Proteinen) versetzt und zu einer gleichmäßigen Suspension homogenisiert. Durch Zugabe von 800 µl Elutionspuffer wird die Suspension verdünnt. Das Homogenat wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit dem „QuickPrep Micro Purification Kit“ (Pharmacia Biotech) aufgearbeitet. Dazu wird 1 ml der Oligo(dT)-Cellulose-Lösung der Kits in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Beide Lösungen werden 1 min (14000 rpm bei RT) zentrifugiert (Abtrennung der genomischen DNA). Das Oligo(dT)-Cellulose-Pellet wird nun mit 1 ml klarem Tumorhomogenat resuspendiert. Da die mRNA einen 50-200 Basen langen Poly-A-Schwanz besitzt, bindet sie dabei an die Oligo(dT)-Cellulose. Nach Zentrifugation von 10 s bei RT und 14000 rpm wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml „High Salt Buffer“ aus dem Kit resuspendiert sowie erneut 10 s (14000 rpm, RT) zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt 5x wiederholt. Anschließend wird das Pellet mit 1 ml „Low Salt Buffer“ des Kits resuspendiert und 10 s (14000 rpm, RT) zentrifugiert. Auch dieser Schritt wird 2x durchgeführt. Nach dem erneuten Resuspendieren in 300 µl „Low Salt Buffer“ wird die Lösung auf eine Mikrospin-Säule des Kits appliziert, welche dann in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 5 s (14000 rpm, RT) zentrifugiert wird. Dieser Durchlauf wird verworfen, es werden 500 µl „Low Salt Buffer“ auf die Säule gegeben und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Schritt wird insgesamt 3x wiederholt. Dann wird die Säule in ein neues

Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl auf 65 °C temperiertem Elutionspuffer versetzt und für 5 s (14000 rpm, RT) zentrifugiert.

Die Lösung enthält nun die eluierte mRNA und wird sofort auf Eis aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

7.14.2. RT-PCR

Tab. 30:
Temperaturprogramm für die PCR mit mRNA aus LXFL529-Tumorgewebe.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Beschreibung
1.	94	2 min	Initiale Denaturierung
2.	94	0,5 min	Denaturierung
3.	50 bzw. 55	1 min	Hybridisierung
4.	68	3 min	Kettenverlängerung
Schritt 2.-4. 10x wiederholen			
5.	94	0,5 min	Denaturierung
6.	50 bzw. 55	1 min	Hybridisierung
7.	68	3 min + 5 s Zyklusverlängerung für jeden Zyklus	Kettenverlängerung
Schritt 5.-7. 25x wiederholen			
8.	68	7 min	Kettenverlängerung im ersten Zyklus
9.	4		Ende der Reaktion

Die Anzahl der Zyklen (hier 35) ist abhängig von der Menge der jeweiligen mRNA. Die erhaltene DNA kann bei –20 °C gelagert werden.

Pro Testansatz werden je 25 µl Mastermix 1 und 25 µl Mastermix 2 in ein dünnwandiges PCR-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, sorgfältig vermischt und auf Eis aufbewahrt. Zur RT-Reaktion wird die Probe schließlich in den auf 50 °C vortemperierten Thermocycler gestellt und 30 min inkubiert. Während dieser Zeit wird von dem mRNA-Strang eine DNA-Matrize erstellt. Nach Beendigung wird das zur PCR benötigte Temperaturprogramm (Tab. 30) aktiviert.

7.14.2.1. Puffer und Lösungen:

DEPC-Wasser:

Diethylpyrocarbonat : 0,1 %

in Bidest über Nacht rühren und anschließend autoklavieren.

Mastermix 1: (Angaben pro Ansatz)

DEPC-Wasser	:	10	µl
dNTP-Mix (10 mM)	:	1	µl
upstream Primer („sense“, 5 µM)	:	3	µl
downstream Primer („antisense“, 5 µM)	:	3	µl
Dithiothreitol-Lösung (DTT, 100 mM)	:	2,5	µl
RNase Inhibitor	:	0,5	µl
mRNA aus dem Tumorgewebe (ungefähr 150 ng)	:	5	µl

Insgesamt enthält der Reaktionsansatz 25 µl.

Mastermix 2: (Angaben pro Ansatz)

DEPC-Wasser	:	14	µl
RT-PCR-Reaktionspuffer (5x, mit 7,5 mM MgCl ₂ und DMSO)	:	10	µl
Enzym-Mix (AMV und „Expand High Fidelity Enzym-Mix“ aus Taq- und Pwo DNA-Polymerase)	:	1	µl

Insgesamt enthält der Reaktionsansatz 25 µl.

7.14.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient als Standardmethode zur Auftrennung und Identifizierung von Nukleinsäuren. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert DNA in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zum Logarithmus der Molmasse, d.h. kleine Fragmente wandern schneller als große. Zur Größenbestimmung werden sogenannte 100 bp DNA-Leitern als Marker mitaufgetragen. Zur Trennung von DNA in der Größenordnung von 0,2 bis 6 kb wird üblicherweise ein 1-1,5%iges Agarosegel benutzt. Die nach der Elektrophorese voneinander getrennten DNA-Fragmente können durch Ethidiumbromid, einem unter UV-Licht fluoreszierenden Farbstoff, der zwischen die DNA-Basen interkaliert, sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Das Gel wird durch Aufkochen der Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Nach Abkühlen wird das Ethidiumbromid hinzugefügt, und die Lösung wird sofort in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die Taschen zum Beladen werden durch Kämme geformt, die nach Abkühlen vorsichtig herausgezogen werden. Zur Elektrophorese wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet.

Die Proben werden mit Gelladungspuffer versetzt und pro Tasche wird zwischen 50-800 ng DNA auf das Gel aufgetragen (maximal 20 μ l). Von dem 100 bp-Marker wird 1 μ l in die Tasche gegeben. Die Auftrennung der Proben erfolgt bei einer Spannung von 30-70 V.

7.14.3.1. Puffer und Lösungen:

Ethidiumbromid-Stocklösung:

10 mg / ml in Bidest,
lichtgeschützt lagern.

Agarose-Gel (1,3%ig):

Agarose	:	1,3 g
TAE-Puffer	:	100 ml
Ethidiumbromid-Stocklösung	:	4,2 μ l

TAE-Puffer 10 x:

Tris Base	:	400 mM
Natriumacetat	:	200 mM
EDTA	:	10 mM

pH 7,2 mit Essigsäure einstellen, vor Gebrauch 1:10 verdünnen.

Gelladungspuffer 6x:

Bromphenol-Blau	:	0,25 %
Sucrose	:	40 %

In Bidest lösen.

8. VERÖFFENTLICHUNGEN

D. Marko, N. Tarasova, **C. Kunz**, K. H. Merz and G. Eisenbrand; cAMP-specific phosphodiesterase type 4 as a target for cancer therapy;

Gordon Research Conferences on Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases, University of Rhode Island, West Kingston, 12.-14.06.1998.

C. Kunz, G. Eisenbrand and D. Marko; Intracellular localization of 7-benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridine in membrane structures impedes the inhibition of cytosolic cAMP phosphodiesterase;

Neue molekulare Targets, Substanzen und Konzepte in Onkologie und Hämatologie; Symposium der Phase I und II Studiengruppe, der APOH und der AWO der Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie in der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Freiburg, 02.-04.07.1998.

9. LITERATUR

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.; Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, Garland Publishing Inc., New York, 1995.

Alessandrini A., Chiaur D.S., Pagano M.; Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation; *Leukemia* 11; 1997, 342-345.

Andrisani O.M.; CREB-mediated transcriptional control; *Critical reviewsTM* in eukaryotic gene expression 9 (1), 1999, 19-32.

Arriola E.L., Rodriguez Lopez A., Chresta C.M.; Differential regulation of p21^{waf-1/cip-1} and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-mdm2 autoregulatory feedback loop; *Oncogene* 18, 1999, 1081-1091.

Ashton M.J., Cook D.C., Fenton G., Karlsson J.A., Palfreyman M.N., Raeburn D., Ratcliffe A.J., Souness J.E., Thurairatnam S., Vicker N.; Selective type IV phosphodiesterase inhibitors as antiasthmatic agents. The synthesis and biological activities of 3-(cyclopentyloxy)-4-methoxybenzamides and analogues; *J. Med. Chem.* 37, 1994, 1696-1703.

Beavo, J.A.; Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional Implications of Multiple Isoforms; *Physiol. Rev.* 75, 1995, 725-748.

Beavo J.A., Conti M., Heaslip R.J.; Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases; *Mol Pharmacol* 46, 1994, 399-405.

Beavo J.A., Reifsnnyder D.H.; Primary sequence of cyclic nucleotide Phosphodiesterase isoenzymes and the design of selective inhibitors; *Trends in pharmacological science* 11, 1990, 150-155.

Bradford M.M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding; *Analytical Biochemistry* 72, 1976, 248-254.

Bolger G.; Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: A diverse family of regulatory enzymes; *Cell. Signal.* 6, 1994, 851-859.

Bolger G., Michaeli T., Martins T., St. John T., Steiner B., Rodgers L., Riggs M. Wigler M., Ferguson K.; A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs; *Mol. Cell Biol.* 13, 1993, 6558-6571.

Bolger G.B., McPhee I., Houslay M.D.; Alternative Splicing of cAMP-specific phosphodiesterase mRNA transcripts. Characterisation of a novel tissue-specific isoform, RNPDE4A8; *J. Biol. Chem.* 271, 1996, 1065-1071.

Bolger G.B., Rodgers L., Riggs M.; Differential CNS expression of alternative mRNA isoforms of the mammalian genes encoding cAMP-specific phosphodiesterases; *Gene* 149, 1994, 237-244.

de Brito F.B., Souness J.E., Warne P.J.; Type 4 phosphodiesterase inhibitors and their potential in the treatment of inflammatory disease; *Emerging Drugs* 2, 1997, 249-268.

Burgering B.M.T., Bos J.L.; Regulation of Ras-mediated signalling: More than one way to skin a cat; *TIBS* 20, 1995, 18-22.

Cann M.J., Levin L.R.; Genetic Characterization of Adenylyl Cyclase Function; *Advances in second messenger and phosphoprotein research* 32, 1998, 121-135.

Charbonneau H.; Structure-function relationships among cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: *Cyclic nucleotide phosphodiesterases* (J. Beavo and M.D. Houslay, eds.), 1990, 2267-2298, John Wiley, Chichester.

Cheng J.B., Cooper K., Duplantier A.J., Egger J.F., Kraus K.G., Marshall S.C., Marfat A., Masamune H., Shirley J.T., Tickner J.E. Umland J.P.; Synthesis and in vitro profile of a novel series of catechol benzimidazoles. The discovery of potent, selective Phosphodiesterase type IV inhibitors with greatly attenuated affinity for the [³H]Rolipram binding site; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5; 1995, 1969-11972.

Chiarugi V., Magnelli L., Cinelli M., Basi G.; Apoptosis and the cell cycle; *Cellular and molecular biology* 40, 1994, 603-612.

Cho-Chung Y.S., Clair T., Tortora G., Yokozaki H.; Role of site-selective cAMP-analogs in the control and reversal of malignancy; *Pharmac-Ther.* 50, 1991, 1-33.

Cho-Chung Y.S.; Differentiation therapy of cancer targeting the RI α regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase; *Int. J. Onco.* 3, 1993, 141-148.

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.* 278, 1996, 1356-1361.

Concise encyclopedia of biochemistry, 1983, de Gruyter.

Conti M., Iona S., Cuomo M., Swinnen J., Odeh J., Svoboda M.E.; Characterization of a hormone-inducible, high affinity adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate Phosphodiesterase from the rat sertoli cell; *Biochemistry* 34, 1995, 7979-7987.

Conti M., Jin S.L.C.; The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases; *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 63, 2000, 1-38.

Dauwalder B., Davis R.L.; Conditional rescue of the dunce learning/memory and female fertility defects with *Drosophila* or rat transgenes; *J. Neurosci.* 15, 1995, 3490-3499.

Davis R.L.; Mutational analysis of phosphodiesterase in *Drosophila*; *Methods Enzymol.* 159, 1988, 786-792.

Davis R.L., Davidson N.; The memory gene *dunce*⁺ encodes a remarkable set of RNA's with internal heterogeneity; *Mol. Cell. Biol.* 6, 1986, 1464-1470.

- Della Fazia M.A., Servillo G., Sassone-Corsi P.;** Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM; *FEBS Letters* 410, 1997, 22-24.
- Drees M.;** 3',5'-Zyklisches Nukleotid Phosphodiesterase als neues Target der antineoplastischen Therapie; Dr. rer. nat. Thesis, Universität Kaiserslautern, 1992, 182 p.
- Drees M., Zimmermann R., Eisenbrand G.;** 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in tumor cells as potential target for growth inhibition; *Cancer Res.* 53, 1993, 3058-3061.
- Eisenbrand G., Metzler M.;** Toxikologie für Chemiker; Georg Thieme Verlag, 1994.
- Engels P., AbdelAl S., Hulley P., Lubbert H.;** Brain distribution of four rat homologues of the *Drosophila dunce* cAMP phosphodiesterase; *J. Neurosci. Res.* 41, 1995, 169-178.
- Erdogan S., Houslay M.D.;** Challenge of human Jurkat T-cells with the adenylate cyclase activator forskolin elicits major changes in cAMP phosphodiesterase (PDE) expression by up-regulating PDE3 and inducing PDE4D1 and PDE4D2 splice variants as well as down-regulating a novel PDE4A splice variant; *Biochem. J.* 321, 1997, 165-175.
- Eyschen D.;** Klonierung und Charakterisierung humaner PDE4D3 aus dem Lungentumor-Xenograft LXFL529; 1999, Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit.
- 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. USA* 97, 2000, 3702-3707.
- Fentiman I.S., Duhig T., Griffiths A.B., Taylor Papadimitriou T.;** Cyclic AMP inhibits the growth of human breast cancer cells in defined medium; *Mol. Biol. Med.* 2, 1984, 81-88.
- Fiebig H.H., Berger D.P., Dengler W.A., Wallbrecher E., Winterhalter B.R.;** Combined *in vitro* / *in vivo* test procedure with human xenografts for new drug development; *Contrib. Oncol., Immunodeficient mice in oncology*, Basel, Karger, 42, 1992, 321-351.
- Fisher D.A., Smith J.F., Pillar J.S., St. Denis S.H., Cheng J.B.;** Isolation and Characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246, 1998a, 570-577.
- Fisher D.A., Smith J.F., Pillar J.S., St. Denis S.H., Cheng J.B.;** Isolation and Characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase; *The Journal of Biological Chemistry* 273, 1998b, 15559-15564.
- Fleischhacker W.W., Hinterhuber H., Bauer H., Pflug B., Berner P., Simhandl C.;** A multicenter double-blind study of three different doses of the new cAMP-phosphodiesterase inhibitor rolipram in patients with major depressive disorder; *Neuropsychobiology* 26, 1992, 59-64.
- Francis S.H., Colbran J.L., McAllister-Lucas L.M., Corbin J.D.;** Zinc interactions and conserved motifs of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase suggest that it is a zinc hydrolase; *J. Biol. Chem.* 269, 1994, 22477-22480.
- Friedman D.L., Johnson R.A., Zeilig C.E.;** The role of cyclic nucleotides in the cell cycle; *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 7, 1976, 69-114.

- Galaktionov K., Beach D.;** Specific activation of cdc25 tyrosin phosphatases by B-type cyclins: Evidence for multiple roles of mitotic cyclins; *Cell* 67, 1991, 1181-1194.
- Garrett M.D., Fattaey A.;** CDK inhibition and cancer therapy; *Current opinion in genetics & development* 9, 1999, 104-111.
- Gasser, Sachse, Schulte;** PCR-Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion, Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Giembycz M.A., Corrigan C.J., Seybol J., Newton R., Barnes P.J.;** Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3,4 and 7 in human CD4+ and CD8+-T-Lymphocytes: Role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2; *Br. J. Pharmacol.* 118, 1996, 1945-1958.
- Gillett, C.E., Barnes, D.M.;** Demystified...Cell Cycle; *Journal of clinical Pathology* 51, 1998; 310-316.
- Gilman A.G.;** G-Proteine und die Regulation der Adenylat-Cyclase; *Angew. Chemie* 107, 1995, 1533-1548.
- Gjertsen B.T., Cressey L.I., Ruchaud S., Houge G., Lanotte M., Døskeland S.O.;** Multiple apoptotic death types triggered through activation of separate pathways by cAMP and inhibitors of protein phosphatase in one (IPC leukemia) cell line; *Journal of cell science* 107, 1994, 3363-3377.
- Gottesman M.M., Fleischmann R.D.;** The role of cAMP in tumor cell growth; *Cancer Surv.* 5, 1986, 291-308.
- Harper, J.W.;** Cyclin dependent kinase inhibitors; *Cancer Surveys*, Vol. 29: Checkpoint controls and cancer; 1997, 91-107.
- Hickie R.A., Walker C.M., Croll G.A.;** Decreased basal cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in morris hepatoma5123 t.c. (h) *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 59, 1974, 167-173.
- Horton Y.M., Sullivan M., Houslay M.D.;** Correction: Molecular cloning of a novel splice variant of human type IV(A) (PDE-IV(A)) cyclic AMP phosphodiesterase and localization of the gene to the p13.1-q12 region of human chromosome 19 (*Biochem. J.*, 308, 1995, 683-691); *Biochem. J.* 312, 1995a, 991.
- Horton Y.M., Sullivan M., Houslay M.D.;** Molecular cloning of a novel splice variant of human type IV(A) (PDE-IV(A)) cyclic AMP phosphodiesterase and localization of the gene to the p13.1-q12 region of human chromosome 19, *Biochem. J.* 308, 1995b, 683-691.
- Houslay M.D., Milligan G.;** Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity; *TIBS* 22, 1997, 217-224.
- Houslay M.D., Sullivan M., Bolger G.B.;** The Multienzyme PDE4 Cyclic Adenosine Monophosphate-Specific Phosphodiesterase Family: Intracellular Targeting, Regulation, and Selective Inhibition by Compounds Exerting Anti-inflammatory and Antidepressant Actions; *Advances in Pharmacology* 44, 1998, 225-342.

- Hsieh T., Juan G., Darzynkiewicz Z., Wu J.M.;** Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21^{waf1/cip1}, and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2; *Cancer Research* 59, 1999, 2596-2601.
- Hughes B., Hewat D., Lisle H., Holbrook M., James T., Gozzard N., Blease K., Hughes P., Kingaby R., Warrelow G., Alexander R., Head J., Boyd E., Eaton M., Perry M., Wales M., Smith B., Owens R., Higgs G., et al.;** The inhibition of antigen-induced eosinophilia and bronchoconstriction by CDP840, a novel stereo-selective inhibitor of phosphodiesterase type 4; *Br. J. Pharmacol.* 118, 1996, 1183-1191.
- Huston E., Pooley L., Julien J., Scotland G., McPhee I., Sullivan N., Bolger G., Houslay M.D.;** The human cyclic phosphodiesterase PDE-4B (HSPDE4A4B) expressed in transfected COS7 cells occurs as both particulate and cytosolic species which exhibit distinct kinetics of inhibition by the anti-depressant rolipram; *J. Biol. Chem.* 271, 1996, 31334-31344.
- Igarashi M., Nagata A., Jinno S., Suto K., Okayama H.;** Wee1+ - like gene in human cells; *Nature* 353, 1991, 80-83.
- Imanishi T., Sawa A., Ichimaru Y., Miyashiro M., Kato S., Yamamoto T., Ueki S.;** Ameliorating effects of rolipram on experimentally induced impairment of learning and memory in rodents; *Eur. J. Pharmacol.* 321, 1997, 273-278.
- Iona S., Cuomo M., Bushnik T., Naro F., Sette C., Hess M., Shelton E.R., Conti M.;** Characterization of the rolipram-sensitive, cyclic AMP-specific phosphodiesterases: Identification and differential expression of immunologically distinct forms in the rat brain; *Molecular Pharmacology* 53, 1998, 23-32.
- Jakobitz S., McLaughlin M.M., Livi G.P., Burman M., Torphy T.J.;** Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: Structural requirements for catalytic activity and rolipram binding; *Mol. Pharmacol.* 50, 1996, 891-899.
- Janik P., Assaf A., Bertram J.S.;** Inhibition of growth of primary and metastatic Lewis lung carcinoma cells by phosphodiesterase inhibitor Isobutylmethylxanthine; *Cancer Res.* 40, 1980, 1950-1954.
- Jastorff B., Maronde E., Van Bemmelen M.X.P., Zorn M., Sörrman R.;** Cyclic nucleotide metabolism as a target in chemotherapy; In: Shugar D., Rode W., Borowski E. (eds.); *Molecular aspects of chemotherapy*; Springer Verlag, Berlin, 1991, 73-103.
- Jiang X., Li J., Paskind M., Epstein P.M.;** Inhibition of calmodulin-dependent phosphodiesterase induces apoptosis in human leukemic cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1996, 11236-11241.
- Johnson D.G., Walker C.L.;** Cyclins and cell cycle checkpoints; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 1999, 295-312.
- Jordan J.D., Iyengar R.;** Modes of interactions between signaling pathways; *Biochemical pharmacology* 55, 1998, 1347-1352.
- Kakkar R., Raju R.V.S., Sharma R.K.;** Calmodulin-dependent cyclic nucleotide Phosphodiesterase (PDE1); *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1999, 1164-1186.

Kato J., Matsouka M., Polyak K., Massagué J., Sherr C.J.; Cyclic AMP induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation; *Cell* 79, 1994, 487-496.

Kelly J.J., Barnes P.J., Giembycz M.A.; Phosphodiesterase 4 in macrophages: Relationship between cAMP accumulation, suppression of cAMP hydrolysis and inhibition of [³H]-R(-)-Rolipram binding by selective inhibitors, *Biochem. J.* 318, 1996, 425-436.

Khanna A.K., Hosenpud J.D.; Cyclosporine induces the expression of the cyclin inhibitor p21; *Transplantation* 67, 1999, 1262-1268.

Kleinman E.F., Campbell E., Giordano L.A., Cohan V.L., Jenkinson T.H., Cheng J.B., Shirley J.T., Pettipher E.R. Salter E.D., Hibbs T.A., DiCapua F.M., Bordner J.; Striking effect of hydroxamic acid substitution on the phosphodiesterase type 4 (PDE4) and TNF α inhibitory activity of two series of rolipram analogues: Implications for a new active site model of PDE4; *J. Med. Chem.* 41, 1998, 266-270.

Krauss, G.; *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*; (Ed: Krauss, G.) Viley-VCH, Weinheim, 1997.

Laemmli U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* 227, 1970, 680-685.

Lando M., Abemayor E., Verity M.A., Sidell N.; Modulation of intracellular cAMP-level and the differentiation response of human neuroblastoma cells; *Cancer Res.* 50, 1990, 722-727.

Lania L., Majello B., Napolitano G.; Transcriptional Control by cell-cycle regulators: A review; *Journal of cellular physiology* 179, 1999, 134-141.

Lees, E.; Cyclin dependent kinase regulation, *Current opinion in Cell Biology* 7; 1995, 773-780.

Levenberg S., Yarden A., Kam Z. Geiger B.; p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry; *Oncogene* 18, 1999, 869-876.

Lieberman D.A., Hoffman B., Steinman R.A.; Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways; *Oncogene* 11, 1995, 199-210.

Lim J., Pahlke G., Conti M.; Activation of the cAMP-specific PDE4D3 by phosphorylation; *Journal of biological chemistry* 274, 1999, 19677-19685.

Lloyd R.V., Erickson L.A., Jin L., Kulig E., Qian X., Cheville J.C., Scheithauer B.W.; p27^{Kip1}: A multifunctional Cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers; *American Journal of Pathology* 154(2), 1999, 313-323.

Lopez-Girona A., Furnari B., Mondesert O., Russell P.; *Nature* 397, 1999, 172-175.

Loubat A., Rochet N., Turchi L., Rezzonico R., Farahi Far D., Auberger P., Rossi B., Ponzio G.; Evidence for a p23 caspase-cleaved form of p27^{Kip1} involved in G1 growth arrest; *Oncogene* 18, 1999, 3324-3333.

Lowe J.A., Cheng J.B.; The PDE IV family of calcium independent phosphodiesterase enzymes; *Drugs Future* 17, 1992, 799-807.

Lowe J.A., Archer R.L., Chapin D.S., Cheng J.B., Helweg D., Johnson J.L., Koe B.K., Lebel L.A., Moore P.F., Nielsen J.A., Russo L.L., Shirley J.T.; Structure-activity relationship of quinazolinone inhibitors of calcium-independent phosphodiesterase; *J. Med. Chem.* 34, 1991, 624-628.

Malarkey K., Belham C.M., Paul A., Graham A., McLees A., Scott P.H., Plevin R.; The regulation of tyrosine signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors; *Biochem J.* 309, 1995, 361-375.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.; *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Vol. I-III, second edition, Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.

Marchmont R.J., Ayad S.R., Houslay M.D.; Purification and properties of the insulin-stimulated cyclic AMP phosphodiesterase from rat liver plasma membranes; *Biochem. J.* 195, 1981, 645-652.

Marchmont R.J., Houslay M.D.; An intrinsic and a peripheral protein constitute the cyclic AMP phosphodiesterase activity of rat liver plasma membranes; *Biochem J.* 187, 1980, 904-906.

Marko D.; Zur Bedeutung cAMP-spezifischer Phosphodiesterasen für Tumorwachstum und Therapie; Universität Kaiserslautern, 1994, Dissertation.

Marko D., Merz K.H., Tarasova N., Eisenbrand G.; Subcellular localization of a pteridine-based inhibitor of cyclic adenosine monophosphate specific phosphodiesterase; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123; Suppl. 1, 1997, 11.

Marko D., Romanakis K., Zankl H., Fürstenberger G., Steinbauer B., Eisenbrand G.; Induction of Apoptosis by an inhibitor of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE) in malignant murine carcinoma cells overexpressing PDE activity in comparison to their nonmalignant counterpart; *Cell. Biochem. Biophys.* 28, 1998, 75-101.

Martinez A., Castro A., Gil C., Miralpeix M., Segarra V., Domenech T., Belata J., Palacios J.M., Ryder H., Miro X., Bonet C., Casacuberta J.M., Azorin F., Pina B., Puigdomenech P.; Benzyl derivatives of 2,1,3-benzo- and benzothieno[3,2-a]thiadiazine 2,2-dioxides: first Phosphodiesterase 7 inhibitors; *J. Med. Chem.* 43, 2000, 683-689.

Masamune H., Cheng J.B., Cooper K., Egger F., Marfat A., Marsh S.C., Shirley J.Z., Tickner J.E., Umland J.P., Vasquez E.; Discovery of micromolar PDE IV inhibitors that exist much reduced affinity for the [3H]rolipram binding site: 3-norbornyloxy-4-methoxyphenylmethylene oxindoles; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 1995, 1965-1968.

McConkey D.J., Jondal M., Orrenius S.; Cellular signalling in thymocyte apoptosis; *Semin. Immunol.* 4, 1992, 371-377.

McConkey D.J., Orrenius S., Jondal M.; Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes; *J. Immunol.* 145 (4), 1990, 1227-1230.

Méhats C., Tanguy G., Dallot E., Robert B., Rebourcet R., Ferré F., Leroy M.J.; Selective up-regulation of Phosphodiesterase-4 cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-specific

Phosphodiesterase variants by elevated cAMP content in human myometrial cells in culture; *Endocrinology* 140, 1999, 3228-3237.

Meiers S.; Untersuchungen zum Wirkmechanismus von 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin (DC-TA-46); Universität Kaiserslautern, 1996, Diplomarbeit.

Meijer L.; Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases; *Trends in cell biology* 6, 1996, 393-397.

Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J.P.J., Blow J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J.G., Moulinoux J.P.; Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5; *European Journal of Biochemistry* 243, 1997, 527-536.

Merz K.H.; Struktur-Aktivitätsuntersuchungen an alkylaminosubstituierten Pteridinen und Chinoxalinen: Hemmung cAMP-spezifischer Phosphodiesterasen und des Wachstums von Tumorzellen; Universität Kaiserslautern, 1999, Dissertation.

Merz K.H., Marko D., Regiert T., Reiss G., Frank W., Eisenbrand G.; Synthesis of 7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridine and novel derivatives free of positional isomers. Potent inhibitors of cAMP-specific phosphodiesterase and of malignant tumor cell growth; *J. Med. Chem.* 41, 1998, 4733-43.

Michaeli T., Bloom T.J., Martins T., Loughney K., Ferguson K., Riggs M., Rodgers L., Beavo J.A., Wigler M.; Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*; *J. Biol. Chem.* 268, 1993, 12925-12932.

Milatovich A., Bolger G., Michaeli T., Francke U.; Chromosome localizations of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse; *Somat. Cell Mol. Genet.* 20, 1994, 75-86.

Milczarek G.J., Chen W., Gupta A., Martinez J.D., Bowden G.T.; Okadaic acid mediates p53 hyperphosphorylation and growth arrest in cells with wild-type p53 but increases aberrant mitoses in cells with non-functional p53; *Carcinogenesis* 20, 1999, 1043-1048.

Millis A.J.T., Forrest G., Pious D.A.; Cyclic AMP-dependent regulation of mitosis in human lymphoid cells; *Exp. Cell Res.* 83, 1974, 335-343.

Monaco L., Lamas M., Tamai K., Lalli E., Zazopoulos E., Penna L., Nantel F., Foulkes N.S., Mazzucchelli C., Sassone-Corsi P.; Coupling transcription to signalling pathways: cAMP and nuclear factor cAMP-responsive element modulator; *Signal transduction in health and disease, advances in second messenger and phosphoprotein research* 31, 1997, 63-74.

Montminy M.; Transcriptional regulation by cyclic AMP; *Annu. Rev. Biochem.* 66, 1997, 807-822.

Morgan D.O.; Principles of cdk regulation; *Nature* 374, 1995, 131-134.

Morgan D.O.; The dynamics of cyclin dependent kinase structure; *Current opinion in Cell Biology* 8, 1996, 767-772.

- Müller A.;** Struktur-Aktivitätsuntersuchungen an Hemmstoffen der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase PDE4 mit 7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridin (DC-TA-46) als Leitsubstanz; Universität Kaiserslautern, 2000; Dissertation.
- Muller T., Engels P., Fozard J.R.;** Subtypes of the type 4 cAMP phosphodiesterases: Structure, regulation and selective inhibition; Trends Pharmacol. Sci. 17, 1996, 294-298.
- Murray A.W.;** Creative blocks: Cell cycle checkpoints and feedback controls; Nature 359, 1992, 599-604.
- Nicholson C.D., Challiss R.A.J., Shahid M.;** Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide Phosphodiesterase isoenzymes; Trends in Biological science 12, 1991, 19-27.
- Nighorn A., Healy M.J., Davis R.L.;** The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil; Neuron 6, 1991, 455-467.
- Oberholte R., Ratzliff J., Baecker P.A., Daniels D.V., Zuppan P., Jarnagin K., Shelton E.R.;** Biochim. Biophys. Acta 1353, 1997, 287-297.
- O'Donnell J.M., Frith S.;** Behavioral Effects of family-selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases, Pharmacology, Biochemistry and Behavior 63, 1999, 185-192.
- Otten J., Johnson G.S., Pastan I.H.;** Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate; J. Biol. Chem. 247, 1972, 7082-7087.
- Ou Y.C., Thompson S.A., Ponce R.A., Schroedder J., Kavanagh T.J., Faustman E.M.;** Induction of the cell cycle regulatory gene p21 (waf1, cip1) following methylmercury exposure *in vitro* and *in vivo*; Toxicology and applied pharmacology 157, 1999, 203-212.
- Palfreyman M.N., Souness J.E.;** Phosphodiesterase type IV inhibitors; Prog. Med. Chem. 33, 1996, 1-52.
- Pastan I., Johnson G.S., Anderson W.B.;** Role of cyclic nucleotides in growth control; Annu. Rev. Biochem. 44, 1975, 491-522.
- Podzuweit T., Nennstiel P., Müller A.;** Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin; Cellular signalling 7, 1995, 733-738.
- Pösch N.;** Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3',5'-AMP as substrate; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268, 1972, 272-299.
- Pooley L., Shakur Y., Rena G., Houslay M.D.;** Intracellular localization of the PDE4A cAMP-specific phosphodiesterase splice variant RD1 (RNPDE4A1A) in transfected human thyroid carcinoma FTC cell lines; Biochem. J. 271, 1997, 177-185.
- Porten E.;** Pharmakokinetische Untersuchungen von Alkyl-Aminosubstituierten Pteridinen; Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, 2000.

Prasad K.N.; Involvement of cyclic nucleotide formation; In: *The transformed cell*; ed. Cameron I.C., Pool T.B.; 1981, Academic Press, New York, 235-266.

Pucci B., Giordano A.; Cell cycle and cancer; *Clin. Ther.* 150, 1999, 135-141.

Raeburn D., Souness J.E., Tomkinson A., Karlsson J.A.; Isozyme-selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: Biochemistry, pharmacology and therapeutic potential in asthma; *Prog. Drug Res.* 40, 1993, 9-32.

Ralph R.K.; Cyclic AMP, calcium and control of cell growth; *FEBS letters* 161, 1983, 1-8.

Reddy K.B., Keshamouni V.G., Chen Y.Q.; The level of tyrosin kinase activity regulates the expression of p21/WAF1 in cancer cells; *International Journal of Oncology* 15, 1999, 301-306.

Roempp Chemie-Lexikon (CD-ROM, Version 1.0), 9. Auflage, Herausgeber: Falbe J., Regitz M., Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Russell P., Nurse P.; Negative regulation of mitosis by wee 1+, a gene encoding a protein kinase homologue; *Cell* 49, 1987, 559-567.

Russo T., Zambrano N., Esposito F., Ammendola R., Cimino F., Fiscella M., Jackman J., O'Connor, P.M., Anderson C.W., Appella E.; A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress; *J. Biol. Chem.* 270, 1995, 29386-29391.

Saldou N., Obernolte R., Huber A., Baecker P.A., Wilhelm R., Alvarez R., Li B., Xia L., Callan O., Su C., Jarnagin K., Shelton E.R.; Comparison of recombinant human PDE4 Isoforms: Interaction with substrate and inhibitors; *Cell. Signal.* 10, 1998, 427-440.

Sassone-Corsi P.; Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM; *Biochemistry & cell biology* 30, 1998, 27-38.

Schneider H.H., Schmiechen R., Brezinski M., Seidler J.; Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures, *Eur. J. Pharmacol.* 127, 1986, 105-115.

Scott A.I., Perini A.F., Shering P.A., Whalley L.J.; In patient major depression: Is rolipram as effective as amitriptyline?; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 40, 1991, 127-129

Sette C., Conti M.; Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation; *J. Biol. Chem.* 271, 1996, 16526-16534.

Sette C., Iona S., Conti M.; The short-term activation of a rolipram-sensitive, cAMP-specific phosphodiesterase by thyroid-stimulating hormone in thyroid FRTL-5 cells is mediated by a cAMP-dependent phosphorylation; *J. Biol. Chem.* 269, 1994a, 9245-9252.

Sette C., Vicini E., Conti M.; Modulation of cellular responses by hormones: Role of cAMP-specific, rolipram-sensitive phosphodiesterases; *Mol. Cell. Endocrinol.* 100, 1994b, 75-79.

Sette C., Vicini E., Conti M.; The rat PDE3/IVd phosphodiesterase gene codes for multiple proteins differentially activated by cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* 269, 1994c, 18271-18274.

Shackelford R.E., Kaufmann W.K., Paules R.S.; Cell cycle control, checkpoint mechanisms and genotoxic stress; Environmental Health perspectives 107 Suppl. 1, 1999, 5-24.

Shakur Y., Pryde J.G., Houslay M.D.; Engineered deletion of the unique N-terminal domain of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase RD1 prevents plasma membrane association and the attainment of enhanced thermostability without altering its sensitivity to inhibition by rolipram; Biochem. J. 292, 1993, 677-686.

Shakur Y., Wilson M., Pooley L., Lobban M., Griffiths S.L., Campbell A.M., Beattie J., Daly C., Houslay M.D.; Identification and characterization of the type-IVA cyclic AMP-specific phosphodiesterase RD1 as a membrane-bound protein expressed in cerebellum; Biochem. J. 306, 1995, 801-809.

Sharma R.K., Hickie R.A.; Ca²⁺/Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1); In: Phosphodiesterase Inhibitors. (Eds: Schudt C., Dent G., Rabe K.F.), Academic Press, San Diego, 1996, 65-79.

Soderling S.H., Bayuga S.J., Beavo J.A.; Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A; Proc. Natl. Sci. USA 96, 1999, 7071-7076.

Souness J.E., Scott L.C.; Stereospecificity of rolipram actions on eosinophil cyclic AMP-specific Phosphodiesterase; Biochem. J. 291, 1993, 389-395.

Souness J.E., Rao S.; Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4; Cell. Signal. 9, 1997, 227-236.

Stryer L.; Biochemie; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1994.

Sullivan M., Rena G., Begg F., Gordon L., Olsen A.S., Houslay M.D.; Biochem. Journal 333, 1998, 693-703.

Sutherland E.W., Rall T.W.; The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg²⁺ and epinephrine or glucagon; J. Am. Chem. Soc. 79, 1957, 3608-3612.

Szipirer C., Szipirer J., Riviere M., Swinnen, J., Vicini E., Conti M.; Chromosomal localization of the human and rat genes (PDE4D and PDE4B) encoding the cAMP specific phosphodiesterases 3 and 4; Cytogenet. Cell Genet. 69, 1995, 11-14.

Terrett N.K., Bell A.S., Brown D., Ellis P.; Sildenafil (VIAGRATM), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction; Bioorg. Med. Chem. Lett. 6, 1996, 1819-1824.

Torphy T.J.; Biochemical regulation of airway smooth muscle tone: Current knowledge and therapeutic implications; Rev. Clin. Basic Pharmacol. 6, 1987, 61-103.

Torphy T.J.; Phosphodiesterase Inhibitors; In: Asthma, Vol. 2 (Ed.: Barnes P.J.), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, 1755-1773.

Torphy T.J.; Phosphodiesterase Isozymes. Molecular targets for novel antiasthma agents; J. Respir. Crit. Care Med. 157, 1998, 351-370.

- Torphy T.J.;** Beta-adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: Challenges to the dogma; *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 1994, 370-374.
- Torphy T.J., Barnette M.S., Hay D.W.P., Underwood D.C.;** Phosphodiesterase IV inhibitors as therapy for eosinophil-induced lung injury in asthma, *Environ. Health Perspect.* 102, 1994, 79-84.
- Torphy T.J., Dewolf W., Green, D.W., Livi G.P.;** Biochemical characteristics and cellular regulation of phosphodiesterase IV; *Agents Actions* 43, 1993a, 51-71.
- Torphy T.J., Livi G.P., Christensen S.B.;** Novel phosphodiesterase inhibitors for the therapy of asthma; *Drug News Perspect.* 6, 1993b, 203-214.
- Torphy T.J., Stadel J.M., Burman M., Cieslinski L.B., McLaughlin M.M., White J.R., Livi G.P.;** Coexpression of human cAMP-specific phosphodiesterase activity and high affinity rolipram binding in yeast; *J. Biol. Chem.* 267, 1992, 1798-1804.
- Torphy T.J., Undem B.J., Cieslinski L.B., Luttmann M.A., Reeves M.L., Hay D.W.P.;** Identification, characterization and functional role of phosphodiesterase isozymes in human airway smooth muscle; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 1993c, 1213-1223.
- Torphy T.J., Undem B.J.;** Phosphodiesterase inhibitors: New opportunities for the treatment of asthma; *Thorax* 46, 1991, 512-523.
- Towbin H., Staehlin T., Gordon J.;** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamidgels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications, *Proceedings of the national academy of science USA* 76, 1979, 4250.
- Qiu Y., Davis R.L.;** Genetic dissection of the learning/memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*; *Genes Dev.* 7, 1993, 1447-1458.
- Vergheze M.W., McConnell R.T., Lenhart J.M., Hamacher L., Jin S.-L.C.;** Regulation of distinct cyclic AMP-specific phosphodiesterase (PDE4) isozymes in human monocytic cells; *Mol. Pharmacol.* 47, 1995, 1164-1171.
- Vicini E., Conti M.;** Characterization of an intronic promoter of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate cAMP-specific phosphodiesterase gene that confers hormone and cAMP inducibility; *Mol. Endocrinol.* 11, 1997, 839-850.
- Wagner B.;** cAMP-spezifische Phosphodiesterasen: Verhalten bei maligner Zelltransformation und Wirkmechanismus eines spezifischen Hemmstoffs; Universität Kaiserslautern, 1998, Dissertation.
- Wang P., Myers J.G., Wu P., Cheewatrakoolpong B., Egan R.W., Billah M.M.;** Expression, purification, and characterization of human cAMP-specific Phosphodiesterase (PDE4) subtypes A, B, C, and D; *Biochemical and biophysical research communications* 234, 1997, 320-324.
- Weinberg R.A.;** Wie Krebs entsteht; *Spektrum der Wissenschaft Spezial: Krebsmedizin*; 1999, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, 7-17.

10. ANHANG

10.1. Liste der für die RT-PCR verwendeten Primer

PDE4D: Fragmentgröße 262 bp;

Forward Primer („sense“) 4D GR34: CCC TTG ACT GTT ATC ATG CAC ACC
Reverse Primer („antisense“) 4D GR35: GAT CTA CAT CAT GTA TTG CAC TGG C

PDE4D3: Fragmentgröße 800 bp;

Forward Primer („sense“) 4D3-SE11: ATT GCC CAC GAT AGC TGC TC
Reverse Primer („antisense“) COMD-SE13: GAC TCC ACT GAT CTG AGA CAT TG

PDE4D4: Fragmentgröße 764 bp;

Forward Primer („sense“) 4D4-SE10: AGC GCT ACC TGT ACT GTC G
Reverse Primer („antisense“) COMD-SE13: GAC TCC ACT GAT CTG AGA CAT TG

PDE4D5: Fragmentgröße 774 bp;

Forward Primer („sense“) 4D5 SE1: CGG TTT CTC CCA ACG TCT CTC C
Reverse Primer („antisense“) COMD-SE13: GAC TCC ACT GAT CTG AGA CAT TG

β-Actin: Fragmentgröße 466 bp;

Forward Primer („sense“) β-Actin-SE14: CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C
Reverse Primer („antisense“) β-Actin-SE17: CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G

10.2. Werte zur PDE-Hemmung verschiedener Purin- und Pteridinderivate

Verbindung E272: 7-Benzylamino-6-chloro-2-(4-glycylpiperazino)-4-pyrrolidinopteridin

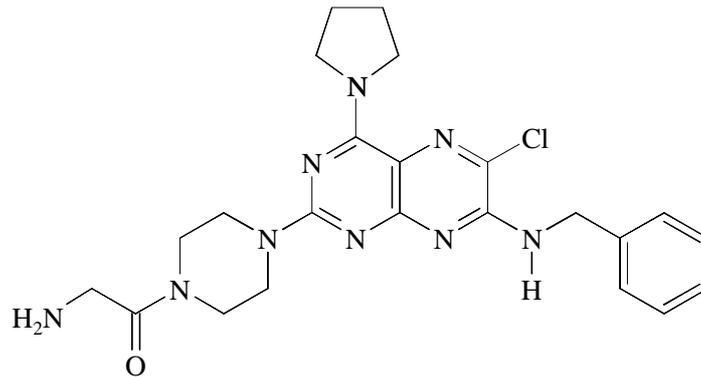


Abb. 101:
Strukturformel von Verbindung E272.

Tabelle 31:

Ergebnisse der durch Verbindung E272 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (10)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (4)
10 ⁻⁴		> 5	88,5 ± 3,1	22,5 ± 2,3	5,2 ± 0,6 ***
10 ⁻⁵			29,1 ± 4,6		
5x10 ⁻⁶	4,2 ± 5,9				
10 ⁻⁶	4,0 ± 6,2		23,4 ± 3,6		
5x10 ⁻⁷	1,9 ± 2,9				
10 ⁻⁷	3,1 ± 4,4		0,6 ± 1,0		
10 ⁻⁸			1,4 ± 2,0		
10 ⁻⁹			4,9 ± 0,9		

Durch E272 induzierte PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen:

Tabelle 32:

Ergebnisse der durch Verbindung E272 induzierten PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (5)
5×10^{-6}	$36,5 \pm 9,4$
10^{-6}	$11,5 \pm 10,1$
5×10^{-7}	$0,7 \pm 1,5$
10^{-7}	$1,8 \pm 3,0$

Verbindung E272a: 7-Benzylamino-6-chloro-2-(4-glycylpiperazino)-4-pyrrolidinopteridin x HCl

Tabelle 33:

Ergebnisse der durch Verbindung E272(b) induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung; n.b.: nicht bestimmt.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%];	IC ₅₀ [µM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [µM]; (2)
10^{-4}			$93,4 \pm 4,7$	$17,1 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,4$ ***
10^{-5}			$36,9 \pm 3,7$		
5×10^{-6}					
10^{-6}	n.b.		$10,1 \pm 6,6$		
5×10^{-7}					
10^{-7}			$5,4 \pm 2,6$		
10^{-8}			$9,2 \pm 9,3$		
10^{-9}			$1,5 \pm 1,8$		

Verbindung E273: 7-Benzylamino-6-chloro-2-(4-lysylo-piperazino)-4-pyrrolidinopteridin

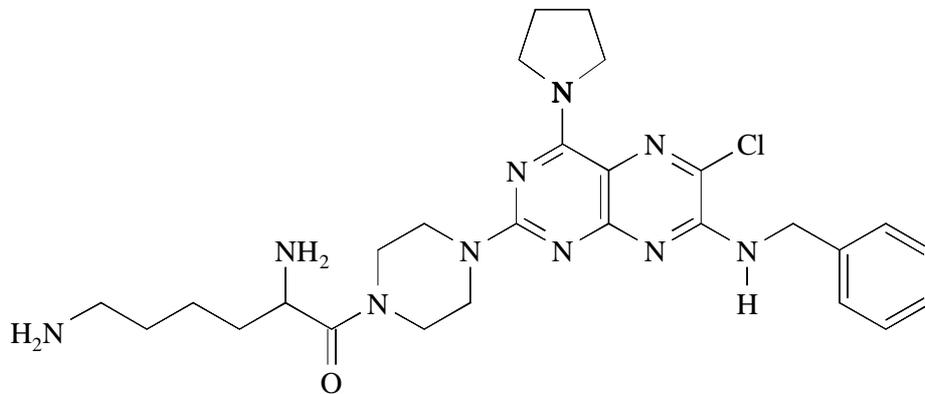


Abb. 102:
Strukturformel von Verbindung E273.

Tabelle 34:
Ergebnisse der durch Verbindung E273 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung; n.b.: nicht bestimmt.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (4)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
10 ⁻⁴		> 5	92,3 ± 5,6	21,7 ± 2,2	n.b.
10 ⁻⁵			28,5 ± 3,7		
5x10 ⁻⁶	35,0 ± 5,5				
10 ⁻⁶	26,9 ± 14,1		4,1 ± 3,1		
5x10 ⁻⁷	24,0 ± 9,1				
10 ⁻⁷	25,3 ± 5,0		3,8 ± 0,0		
10 ⁻⁸			0,0 ± 0,0		
10 ⁻⁹			4,5 ± 5,9		

Durch E273 induzierte PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen:

Tabelle 35:

Ergebnisse der durch Verbindung E273 induzierten PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (4)
5×10^{-6}	$22,1 \pm 8,1$
10^{-6}	$5,0 \pm 3,0$
5×10^{-7}	$6,9 \pm 9,3$
10^{-7}	$2,8 \pm 5,6$

Verbindung E274: 7-Benzylamino-2-(4-carboxymethylpiperazino)-6-chloro-4-pyrrolidinopteridin

Tabelle 36:

Ergebnisse der durch Verbindung E274 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (7)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (4)
10^{-5}		$2,5 \pm 0,65$	$99,7 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,1$	$41,7 \pm 4,2$ ***
5×10^{-6}	$70,0 \pm 8,7$				
10^{-6}	$24,7 \pm 5,2$		$32,9 \pm 2,2$		
5×10^{-7}	$10,5 \pm 8,4$				
10^{-7}	$6,7 \pm 8,4$		$12,2 \pm 6,5$		
10^{-8}			$13,4 \pm 2,8$		
10^{-9}			$0,7 \pm 1,0$		

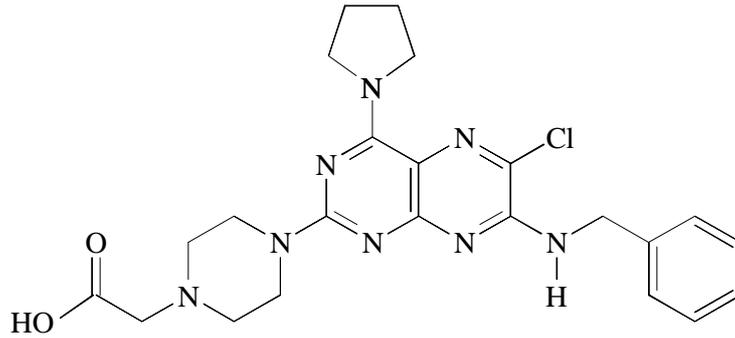


Abb. 103:
Strukturformel von Verbindung E274.

Durch E274 induzierte PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen:

Tabelle 37:

Ergebnisse der durch Verbindung E274 induzierten PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (2)	IC ₅₀ [μM]
5×10^{-6}	60,2 *	3,8
10^{-6}	2,5 ± 1,9	
5×10^{-7}	11,4 ± 7,7	
10^{-7}	0,0 ± 0,0	

Verbindung E274a: [7-Benzylamino-2-(4-carboxymethyl-piperazino)-6-chloro-4-pyrrolidinopteridin]-Natriumsalz

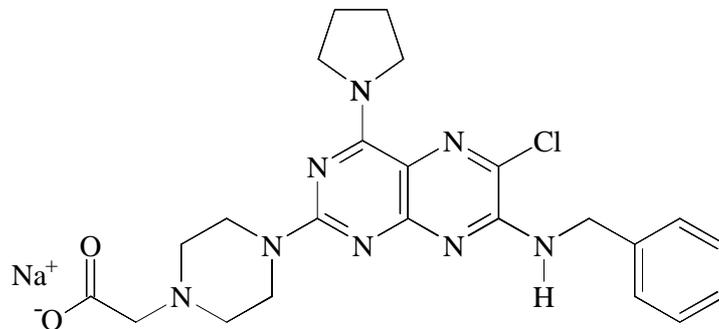


Abb. 104:
Strukturformel von Verbindung E274a.

Tabelle 38:

Ergebnisse der durch Verbindung E274a induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (2)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (4)
10 ⁻⁴		> 5	100,0 ± 0,0	2,8 ± 0,2	> 75 ***
10 ⁻⁵			81,6 ± 7,4		
5x10 ⁻⁶	44,4 ± 6,7				
10 ⁻⁶	15,9 ± 7,9		23,7 ± 6,1		
5x10 ⁻⁷	8,3 ± 6,3				
10 ⁻⁷	5,4 ± 0,5		1,2 ± 1,7		
10 ⁻⁸			2,5 ± 3,5		
10 ⁻⁹			7,0 ± 6,6		

Verbindung E275: 7-Benzylamino-6-chloro-2-[4-(1-glutamyl)-piperazino]-4-pyrrolidinopteridin

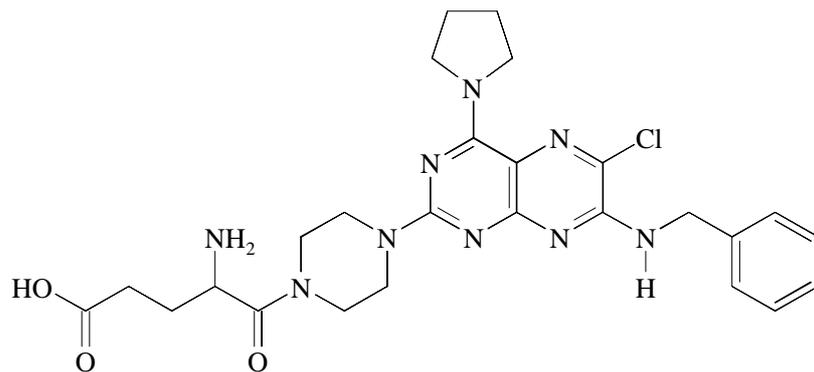


Abb. 105:

Strukturformel von Verbindung E275.

Tabelle 39:

Ergebnisse der durch Verbindung E275 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (4)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
10 ⁻⁴		> 5	72,7 ± 2,6	32,9 ± 5,5	15,7 ± 2,1 (5) ***
10 ⁻⁵			25,7 ± 5,4		
5x10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0				
10 ⁻⁶	7,7 ± 9,7		7,1 ± 6,2		
5x10 ⁻⁷	15,5 ± 12,6				
10 ⁻⁷	5,4 ± 5,0		0,0 ± 0,0		
10 ⁻⁸			11,0 ± 4,9		
10 ⁻⁹			5,9 ± 5,8		

Durch E275 induzierte PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen:

Tabelle 40:

Ergebnisse der durch Verbindung E275 induzierten PDE-Hemmung im Partikular von LXFL529L-Zellen; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (4)
5x10 ⁻⁶	2,7 ± 5,3
10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0
5x10 ⁻⁷	1,5 ± 3,0
10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0

Verbindung E275a: [7-Benzylamino-6-chloro-2-[4-(1-glutamyl)-piperazino]-4-pyrrolidinopteridin]-Natriumsalz

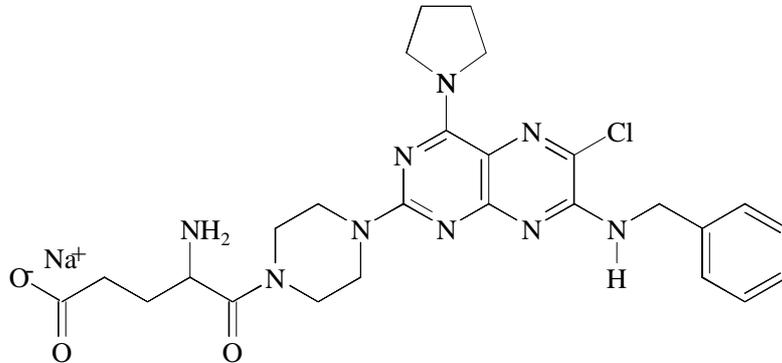


Abb. 106:
Strukturformel von Verbindung E275a.

Tabelle 41:
Ergebnisse der durch Verbindung E275a induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (2)
10 ⁻⁴		> 5	93,6 ± 1,4	8,1 ± 1,5	> 75 ***
10 ⁻⁵			54,7 ± 3,8		
5x10 ⁻⁶	31,6 ± 3,4				
10 ⁻⁶	6,5 ± 2,9		2,2 ± 3,2		
5x10 ⁻⁷	4,8 ± 0,5				
10 ⁻⁷	4,1 ± 3,9		0,0 ± 0,0		
10 ⁻⁸			0,0 ± 0,0		
10 ⁻⁹			0,0 ± 0,0		

Verbindung E276: 7-Benzylamino-6-methyl-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridin

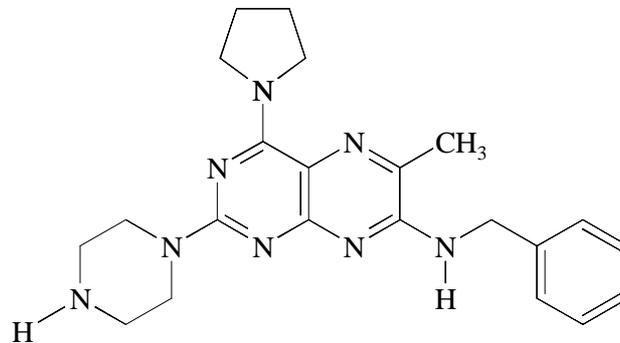


Abb. 107:
Strukturformel von Verbindung E276.

Tabelle 42:
Ergebnisse der durch Verbindung E276 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (2)
10 ⁻⁵		1,8 ± 0,5	98,5 ± 2,6	0,5 ± 0,16	4,1 ± 0,3 ***
5x10 ⁻⁶	76,6 ± 11,4				
10 ⁻⁶	35,5 ± 10,2		63,2 ± 7,2		
5x10 ⁻⁷	11,6 ± 3,2				
10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0		24,2 ± 2,3		
10 ⁻⁸			5,9 ± 1,6		
10 ⁻⁹			0,0 ± 0,0		

Verbindung E277: 8-Chloro-2-piperazino-6-pyrrolidinopurin

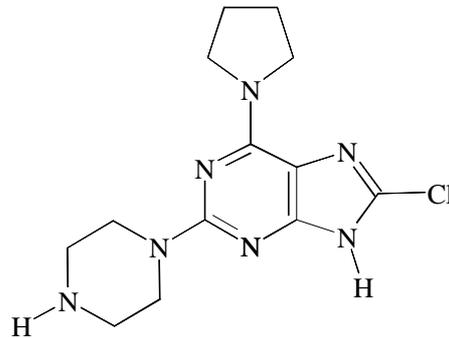


Abb. 108:
Strukturformel von Verbindung E277.

Tabelle 43:
Ergebnisse der durch Verbindung E277 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (10)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (4)
10 ⁻⁴		> 5	95,9 ± 7,0	1,8 ± 0,6	27,0 ± 4,0 ***
10 ⁻⁵			70,2 ± 4,4		
5x10 ⁻⁶	2,6 ± 4,9				
10 ⁻⁶	11,6 ± 11,0		43,3 ± 3,2		
5x10 ⁻⁷	7,3 ± 6,7				
10 ⁻⁷	5,9 ± 7,5		3,3 ± 5,7		
10 ⁻⁸			3,5 ± 4,5		
10 ⁻⁹			3,4 ± 5,9		

Verbindung E278: 7-Benzylamino-6-chloro-2-[4-(2-hydroxyethyl)-piperazino]-4-pyrrolidinopteridin

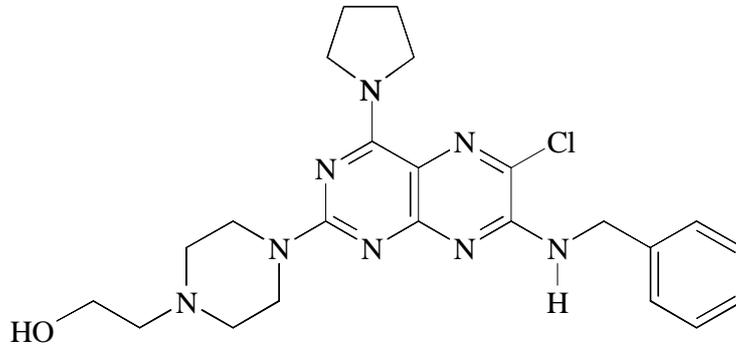


Abb. 109:
Strukturformel von Verbindung E278.

Tabelle 44:
Ergebnisse der durch Verbindung E278 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (2)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (3)
10 ⁻⁴		> 5	74,6 ± 5,2	27,6 ± 5,8	8,6 ± 0,6 ***
10 ⁻⁵			30,6 ± 2,1		
5x10 ⁻⁶	6,2 ± 8,7		5,5 ± 0,8		
10 ⁻⁶	15,7 ± 8,3		4,0 ± 3,9		
5x10 ⁻⁷	1,9 ± 2,8		0,5 ± 0,7		
10 ⁻⁷	15,6 ± 2,9		7,0 ± 0,6		
10 ⁻⁸					
10 ⁻⁹					

Verbindung E279: 7-Benzylamino-6-chloro-2-[4-{2-(2-hydroxyethoxy)-ethyl}-piperazino]-4-pyrrolidinopteridin

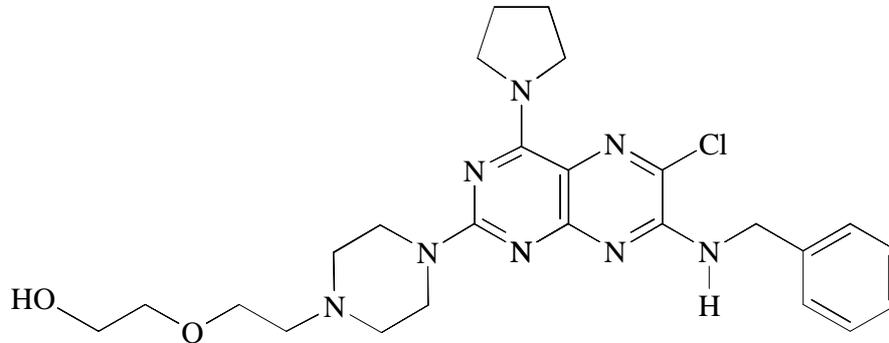


Abb. 110:
Strukturformel von Verbindung E279.

Tabelle 45:

Ergebnisse der durch Verbindung E279 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (2)
10 ⁻⁴		> 5	40,8 ± 6,4	> 100	13,3 ± 0,6 ***
10 ⁻⁵			30,0 ± 5,0		
5x10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0		7,5 ± 4,0		
10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0		0,5 ± 0,6		
5x10 ⁻⁷	3,1 ± 4,4		1,2 ± 1,6		
10 ⁻⁷	9,3 ± 8,1		4,2 ± 0,2		
10 ⁻⁸					
10 ⁻⁹					

Verbindung E280: 7-benzylamino-6-chlor-2-(4-carbamoylmethylpiperazino)-4-pyrrolidinopteridin

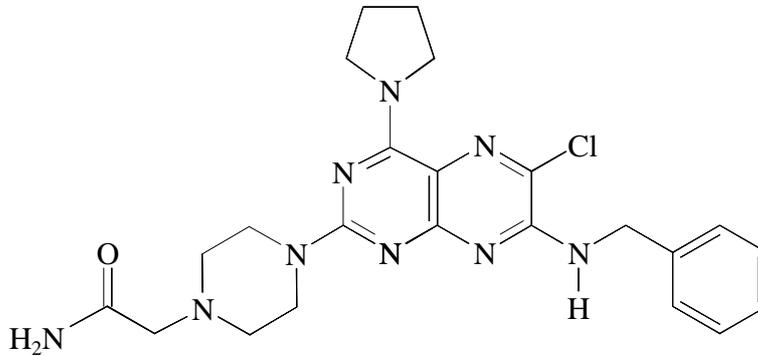


Abb. 111:
Strukturformel von Verbindung E280.

Tabelle 46:

Ergebnisse der durch Verbindung E280 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; ***: Müller, 2000; n.b.: nicht bestimmt; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%];	IC ₅₀ [μM]	PDE-Hemmung am isolierten Enzym [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]; (3)
10 ⁻⁴	n.b.		80,2 ± 2,1	27,3 ± 0,7	18,5 ± 1,7 ***
10 ⁻⁵			26,6 ± 11,6		
5x10 ⁻⁶					
10 ⁻⁶			2,8 ± 3,4		
5x10 ⁻⁷					
10 ⁻⁷			4,9 ± 2,5		
10 ⁻⁸			10,8 ± 7,2		
10 ⁻⁹			8,4 ± 3,5		

Verbindung E481: 7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin (DC-TA-46)

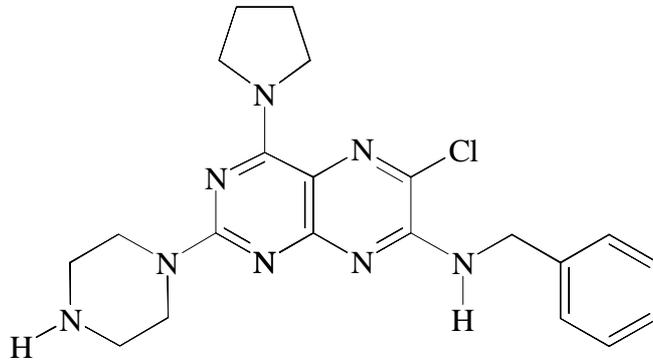


Abb. 112:
Strukturformel von DC-TA-46 (Verbindung E481).

Tabelle 47:

Ergebnisse der durch Verbindung E481 (DC-TA-46) induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung an LXFL529L-Zellen [%]; (4)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	72,2 ± 11,2	2,0 ± 0,46	0,016 ± 0,005 **	2,3 ± 0,3 **
10 ⁻⁶	32,8 ± 9,7			
5x10 ⁻⁷	14,9 ± 6,2			
10 ⁻⁷	8,1 ± 10,9			
10 ⁻⁸	6,1 ± 10,6			
10 ⁻⁹	4,7 ± 8,1			

Verbindung E482: 4-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-7-pyrrolidinopteridin

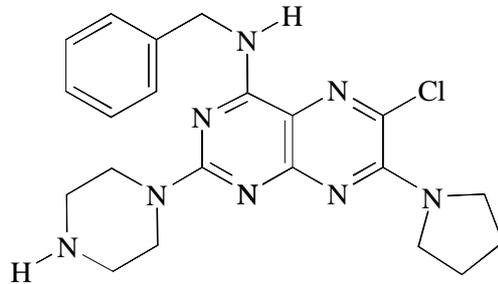


Abb. 113

Strukturformel von Verbindung E482.

Tabelle 48:

Ergebnisse der durch Verbindung E482 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (2)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	67,1 ± 0,4	3,25 ± 0,08	0,083 ± 0,037 **	4,0 ± 0,2 **
10 ⁻⁶	3,3 ± 4,7			
5x10 ⁻⁷	0,0 *			
10 ⁻⁷	4,7 ± 6,6			

Verbindung E483: 7-Benzylamino-6-chlor-2-(3-oxopiperazino)-4-pyrrolidinopteridin

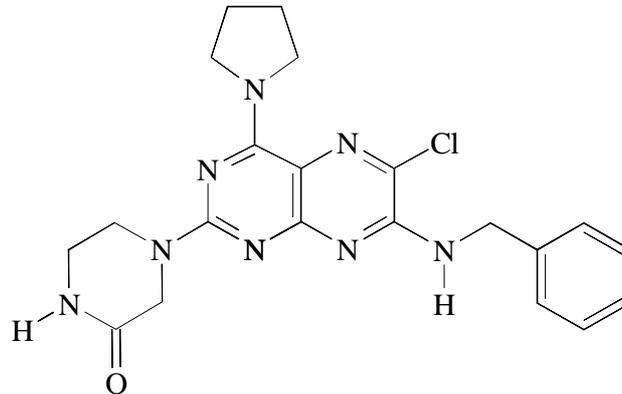


Abb. 114:
Strukturformel von Verbindung E483.

Tabelle 49:

Ergebnisse der durch Verbindung E483 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung; *: Messung nur einmal (als Dreifachbestimmung) durchgeführt; **: Merz et al., 1998.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (2)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym; [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	0,7 ± 1,0	> 5	4,2 ± 0,5 **	9,5 ± 2,2 **
10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0			
5x10 ⁻⁷	2,1 *			

Verbindung E493: 7-Benzylamino-6-chlor-2-(4-methylpiperazino)-4-pyrrolidinopteridin

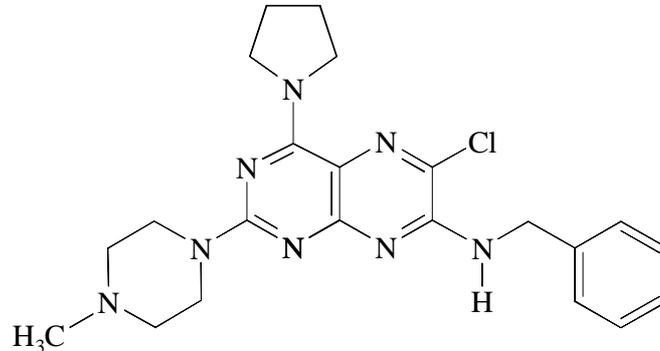


Abb. 115:
Strukturformel von Verbindung E493.

Tabelle 50:

Ergebnisse der durch Verbindung E493 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (9)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
10 ⁻⁵	0,0 ± 0,0	> 5	3,1 ± 0,7 **	6,5 ± 0,5 **
5x10 ⁻⁶	0,3 ± 0,5			
10 ⁻⁶	2,2 ± 3,3			
5x10 ⁻⁷	2,2 ± 3,6			
10 ⁻⁷	0,1 ± 0,4			

Verbindung E494: 2-(4-Acetylpiperazino)-7-Benzylamino-6-chlor-4-pyrrolidinopteridin

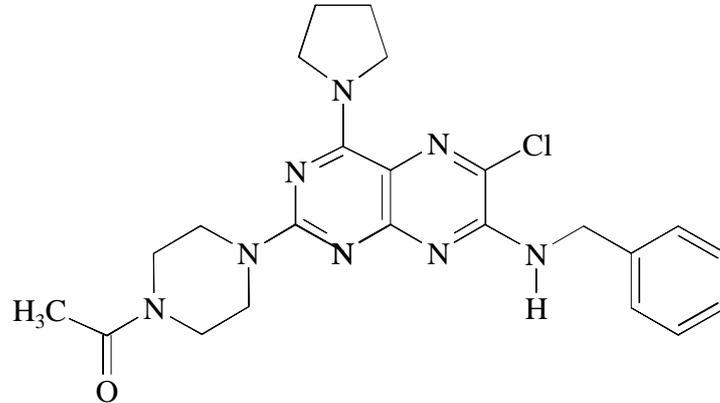


Abb. 116:
Strukturformel von Verbindung E494.

Tabelle 51:

Ergebnisse der durch Verbindung E494 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (7)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym; [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	60,3 ± 14,5	3,6 ± 1,3	5,9 ± 1,0 **	13,0 ± 1,1 **
10 ⁻⁶	10,5 ± 7,7			
5x10 ⁻⁷	1,0 ± 1,4			
10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0			

Verbindung E495: 7-Benzylamino-6-chlor-2-morpholino-4-pyrrolidinopteridin

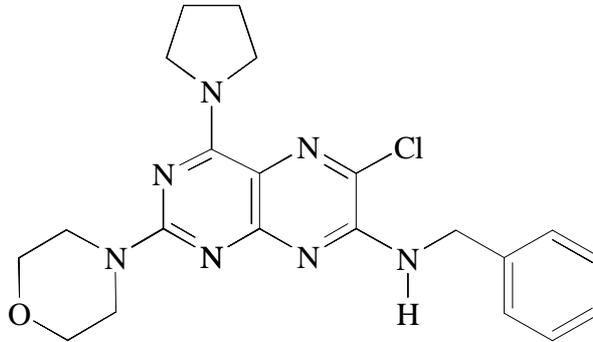


Abb. 117:
Strukturformel von Verbindung E495.

Tabelle 52:

Ergebnisse der durch Verbindung E495 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (5)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym; [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	4,3 ± 6,0	> 5	2,5 ± 0,4 **	> 20 **
10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0			
5x10 ⁻⁷	1,6 ± 2,8			
10 ⁻⁷	8,7 ± 6,1			

Verbindung E496: 7-Benzylamino-6-chlor-4-piperazino-2-pyrrolidinopteridin

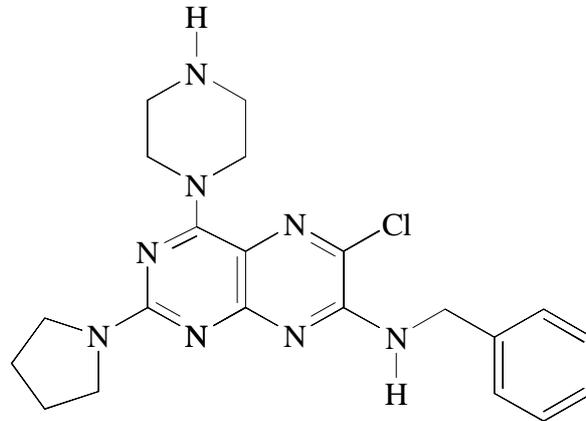


Abb. 118:
Strukturformel von Verbindung E496.

Tabelle 53:

Ergebnisse der durch Verbindung E496 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (5)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0	> 5	> 10 **	4,7 ± 1,1 **
10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0			
5x10 ⁻⁷	2,8 ± 4,3			
10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0			

Verbindung E497: 7-Benzylamino-6-chlor-2-dimethylamino-4-pyrrolidinopteridin

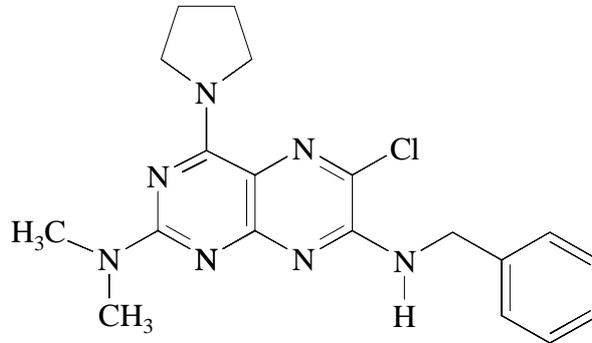


Abb. 119:
Strukturformel von Verbindung E497.

Tabelle 54:

Ergebnisse der durch Verbindung E497 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung; *: Messung nur einmal (als Dreifachbestimmung) durchgeführt; **: Merz et al., 1998.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (5)	IC ₅₀ [μ M]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym; [μ M]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μ M]
5×10^{-6}	$6,5 \pm 7,8$	> 5	$1,8 \pm 1,2$ **	$11,8 \pm 0,8$ **
10^{-6}	0,0 *			
5×10^{-7}	$9,3 \pm 8,1$			
10^{-7}	$0,0 \pm 0,0$			

Verbindung E499: 4,7-Bis-(pyrrolidino)-6-chlor-2-piperazino-pteridin

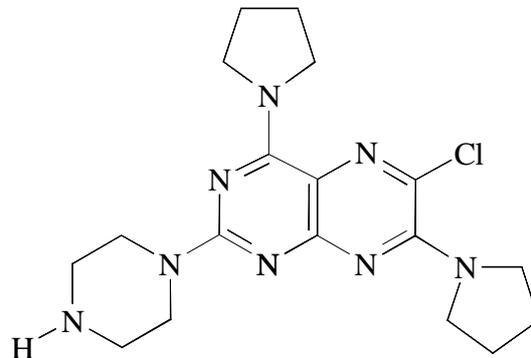


Abb. 120:
Strukturformel von Verbindung E499.

Tabelle 55:
Ergebnisse der durch Verbindung E499 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (4)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	90,7 ± 8,1	0,1 ± 0,02	0,059 ± 0,005 **	3,1 ± 0,1 **
10 ⁻⁶	70,1 ± 3,3			
5x10 ⁻⁷	65,3 ± 3,5			
10 ⁻⁷	14,0 ± 2,0			

Verbindung E581: 4,7-Bis-(dimethylamino)-6-chlor-2-piperazinopteridin

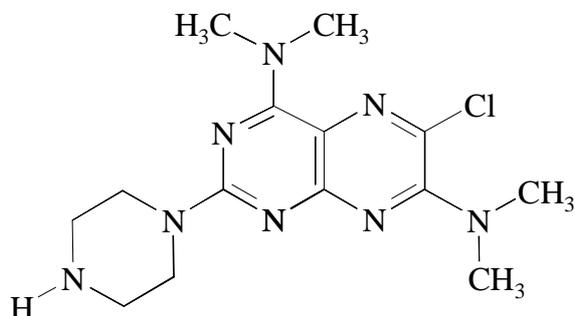


Abb. 121:
Strukturformel von Verbindung E581.

Tabelle 56:
Ergebnisse der durch Verbindung E581 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (4)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	43,9 ± 8,3	>5	1,2 ± 0,5 **	> 20 **
10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0			
5x10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0			
10 ⁻⁷	2,5 ± 4,6			

Verbindung E582: 6-Chlor-7-dimethylamino-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridin

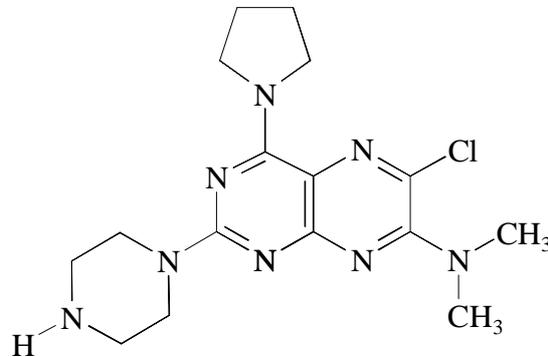


Abb. 122:
Strukturformel von Verbindung E582.

Tabelle 57:

Ergebnisse der durch Verbindung E582 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (6)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	85,9 ± 13,4	0,7 ± 0,08	0,046 ± 0,006 **	5,8 ± 0,4**
10 ⁻⁶	70,9 ± 11,1			
5x10 ⁻⁷	24,4 ± 5,0			
10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0			

Verbindung E583: 7-Benzylamino-6-chlor-4-dimethylamino-2-piperazinopteridin

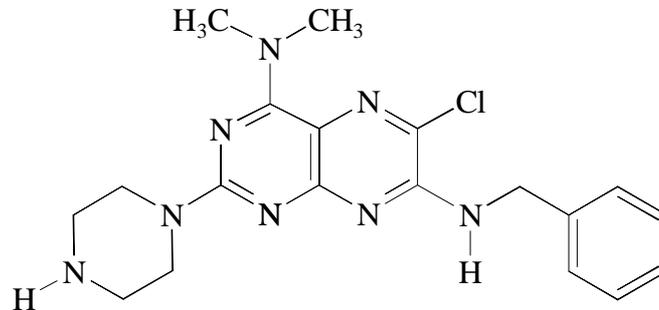


Abb. 123:
Strukturformel von Verbindung E583.

Tabelle 58:
Ergebnisse der durch Verbindung E583 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (5)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	52,2 ± 14,6	4,5 ± 2,2	0,3 ± 0,14 **	5,9 ± 0,6 **
10 ⁻⁶	19,5 ± 13,8			
5x10 ⁻⁷	5,7 ± 6,7			
10 ⁻⁷	3,6 ± 7,2			

Verbindung E584: 2-(2-Aminoethylamino)-7-Benzylamino-6-chlor-4-pyrrolidinopteridin

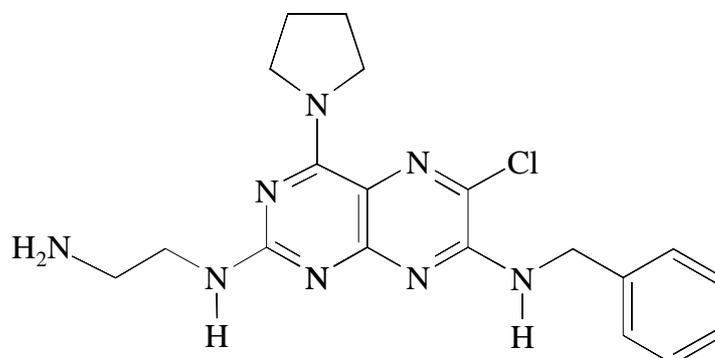


Abb. 124:
Strukturformel von Verbindung E584.

Tabelle 59:
Ergebnisse der durch Verbindung E584 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (3)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym; [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	4,1 ± 5,8	> 5	3,7 ± 0,5 **	3,2 ± 0,4 **
10 ⁻⁶	0,9 ± 1,6			
5x10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0			
10 ⁻⁷	10,1 ± 8,8			

Verbindung E585: 7-Benzylamino-6-chlor-2-(2-Hydroxyethylamino)-4-pyrrolidinopteridin

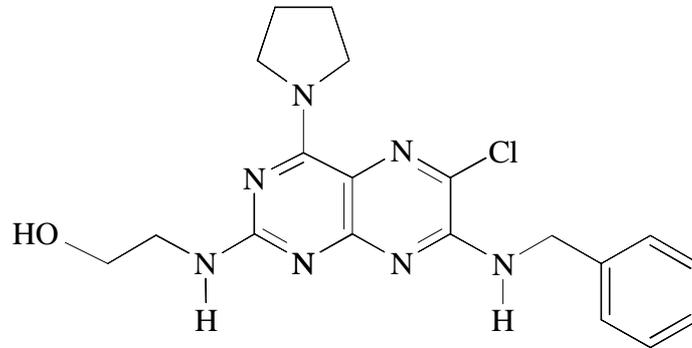


Abb. 125:
Strukturformel von Verbindung E585.

Tabelle 60:

Ergebnisse der durch Verbindung E585 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (5)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym; [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
5x10 ⁻⁶	2,6 ± 5,1	> 5	2,8 ± 0,1 **	15,2 ± 1,4 **
10 ⁻⁶	8,9 ± 8,7			
5x10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0			
10 ⁻⁷	2,4 ± 4,1			

Verbindung E586: 7-Benzylamino-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridin

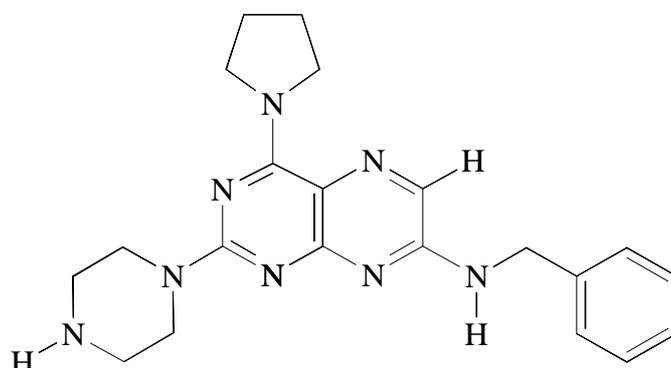


Abb. 126:
Strukturformel von Verbindung E586.

Tabelle 61:
Ergebnisse der durch Verbindung E586 induzierten PDE-Hemmung im Cytosol von LXFL529L-Zellen und an hochaufgereinigter PDE4 aus LXFL529-Tumorgewebe sowie der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen; **: Merz et al., 1998; (n): Anzahl separater Assays, jeweils Dreifachbestimmung.

Konzentration [M]	PDE-Hemmung in LXFL529L-Zellen [%]; (9)	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ der PDE-Hemmung am isolierten Enzym; [μM]	IC ₅₀ der Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen [μM]
10 ⁻⁵	48,5 ± 9,1	>10	0,36 ± 0,09 **	7,3 ± 0,7 **
5x10 ⁻⁶	49,7 ± 10,5			
10 ⁻⁶	0,0 ± 0,0			
5x10 ⁻⁷	0,0 ± 0,0			
10 ⁻⁷	0,2 ± 0,5			

11. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Kunz
Vorname	Claudia-Elisabeth
Geburtsdatum, -ort	13.03.1972, Pirmasens
Adresse	Am Stockwald 29 66954 Pirmasens 06331 / 98452 (claudiakunz@gmx.de)
Familienstand	ledig

Bisherige Ausbildung

1978-1982	Grundschule Pirmasens-Winzeln
1982-1991	Staatl. Leibniz-Gymnasium Pirmasens
1991	Abitur
Seit 1991	Chemiestudium an der Universität Kaiserslautern
1993	Vordiplom
1996	Diplom
05/1996 - 01/1997	Diplomarbeit im Institut für medizinische Biochemie, Homburg, im Arbeitskreis von Prof. Dr. Montenarh / PD Dr. Wagner; Thema: „Untersuchung der Transkription des tms1-Gens der Spaltheife <i>Schizosaccharomyces pombe</i> “
03/1997 - 11/1999	Promotion in der Fachrichtung Lebensmittel- chemie/Umwelttoxikologie (Arbeitsgruppe von Prof. Eisenbrand), Uni Kaiserslautern; Thema: „Untersuchungen zur PDE-Ausstattung unterschiedlicher Zelllinien und Xenograft-Tumoren sowie zum Wirkmechanismus substituierter Pteridine“

Auslandsaufenthalt während des Studiums

11/1994 - 03/1995	Fortgeschrittenenpraktikum an der Universität Catania, Italien, im Arbeitskreis von Prof. Foti (Teilnahme am Erasmus-Programm)
-------------------	--

12. DANK

Bedanken möchte ich mich vor allem bei Christiane Seus, Ellen Niederberger und Anja Müller, mit denen ich viele nette Laborstunden verbrachte, und die mir „treue Verbündete“ im Kampf gegen nichtfunktionierende HPLCs und Säulen, Mykoplasmen und Pilze sowie ähnliche „Widrigkeiten“ des Laboralltags waren.

Dr. Doris Marko danke ich für viele Anregungen und die Korrekturen.

Bei unseren ehemaligen TAs möchte ich für viele wertvolle Anregungen bedanken. Elke Littmianski danke ich für die Hilfe bei der Zellkultur und Wolfgang Petry bei der HPLC. Tom Regiert hat mir die Tumoraufarbeitung und den PDE-Assay erklärt. Danke dafür und für den Spaß bei gemeinsamen Pschyrembel-Lesen!

Dr. Tatiana Höfer und Tobias Weber danke ich für ihre schnelle Reaktion auf meine Hilfeschreie bei Computerproblemen.

Mein Dank gilt auch Dr. Gudrun Pahlke für ihre Hilfe bei der RT-PCR bzw. viele „mündliche Mitteilungen“ zur PDE-Ausstattung.

Christiane Seus, Karlheinz Gutzler, Dr. Emil Kunz, Dr. Ellen Niederberger, Dr. Anja Müller und Volker Glaab danke ich für das gründliche Korrekturlesen von Arbeit und Vortrag.

Allen Kaffeezimmer-Insassen des Bau 52 danke ich für das ständige Mitbringen von Kuchen und ähnlichem Motivat.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, meiner Oma und Karlheinz Gutzler für Ihre Unterstützung und Zuwendung.