

Aus Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

Wirkung von Zigarettenrauch, Nikotin und N-Acetylcystein auf die Differenzierung und Funktion von Präadipozyten

Dissertation

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

Vorgelegt von
Christian Heyne
aus
München
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Rudolf M. Huber

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen
Prüfung: 03.02.2011

Meiner lieben Freundin
Katharina
und
meinen lieben Eltern und Geschwistern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Hintergrund der vorliegenden Arbeit.....	7
2. Grundlegende Überlegungen: COPD und Seneszenz	9
2.1 Charakteristika der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD)	9
2.2 Pathophysiologie der COPD.....	11
2.2.1 Klassische Mechanismen.....	11
2.2.2 Induzierte zelluläre Seneszenz als Teilursache des Lungenemphysems ..	15
2.3 Systemische Veränderungen/Komorbiditäten bei der COPD	18
3. Fragestellung der Arbeit	21
4. Material, Methoden und Analytik	22
4.1 Verwendete Materialien und Reagenzien.....	22
4.1.1 Zellen	22
4.1.2 Chemische Reagenzien	22
4.1.3 Materialien	24
4.2 Arbeiten mit Zellkulturen.....	27
4.2.1 Ansetzen von Nährmedium.....	27
4.2.2 Auftauen und Füttern der 3T3-L1-Zellen.....	28
4.2.3 Passagieren der 3T3-L1-Zellen.....	30
4.2.4 Versuchsansatz	32
4.3 Auswertungen	33
4.3.1 Behandlung der Zellen ab Cocktailgabe (Tag 0).....	33
4.3.2 Zellernte an den Auswertungstagen 0, 2 und 7.....	36
4.3.3 Bestimmung der Aktivität der Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase	39
4.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Verfahrens nach Bradford.....	41
4.3.5 Bildauswertung der zytologischen Präparate	46

4.4 Herstellung der Homogenisierungs- und Reaktionslösung.....	50
4.5 Herstellung des Zigarettenrauchextraktes (cigarette smoke extract, CSE)	51
4.6 Statistische Auswertung	53
5. Ergebnisse	55
5.1 Wirkung auf die Zellzahl	55
5.1.1 Zellzahl bei Exposition gegenüber CSE	55
5.1.2 Zellzahl bei Gabe von Nikotin	56
5.1.3 Zellzahl bei Behandlung mit NAC und CSE	57
5.2 Wirkung auf den Proteingehalt	61
5.2.1 Proteingehalt bei Exposition gegenüber CSE	61
5.2.2 Proteingehalt bei Gabe von Nikotin.....	62
5.2.3 Proteingehalt bei Behandlung mit NAC und CSE	63
5.3 Wirkung auf die GPDH-Aktivität	68
5.3.1 GPDH-Aktivität bei Exposition gegenüber CSE	68
5.3.2 GPDH-Aktivität bei Gabe von Nikotin.....	70
5.3.3 GPDH-Aktivität bei Behandlung mit NAC und CSE	73
5.4 Wirkung auf den Lipidgehalt.....	79
5.4.1 Lipidgehalt bei Exposition gegenüber CSE	79
5.4.2 Lipidgehalt bei Gabe von Nikotin	81
5.4.3 Lipidgehalt bei Behandlung mit NAC und CSE	82
6. Diskussion	88
6.1 Molekulare Faktoren bei der Adipogenese	88
6.2 Faktoren bei der Regulation des Zellzyklus.....	90
6.3 Interpretation der Ergebnisse	96
6.3.1 Auswirkungen von CSE	96
6.3.2 Oxidantien versus Antioxidantien.....	99
6.3.3 Effekte durch N-Acetylcystein	102
6.3.4 Effekte von Nikotin	103

6.3.5 Schlussfolgerung im Vergleich zu anderen Zelltypen	104
7. Zusammenfassung	106
8. Literaturverzeichnis	108
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	117
9.1 Abbildungen	117
9.2 Tabellen.....	119
10. Verwendete Abkürzungen.....	121
A. Anhang.....	125
A.1 Lebenslauf	125
A.2 Danksagung.....	125
A.3 Eigenständigkeitserklärung.....	125

1. Einleitung

1.1 Hintergrund der vorliegenden Arbeit

Es ist eine gängige Beobachtung, dass eine Anzahl von Rauchern bei chronischem Nikotinabusus an einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) – mit ihren beiden Varianten Lungenemphysem und chronisch-obstruktive Bronchiolitis – leidet. Dabei ist auffallend, dass gerade Patienten mit Emphysem häufig kachektisch sind. Unregelmäßigkeiten in der Nahrungsaufnahme bei anhaltender Luftnot, katabole Eigenschaften zirkulierender Entzündungsmediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, sowie vermehrte Atemarbeit gegen einen erhöhten Widerstand der Atemwege sind gängige Hypothesen zur Erklärung dieser Tatsache. Allerdings könnten auch andere Faktoren beteiligt sein, unter anderem Adipozyten, die bekanntlich mittels freigesetzter Adipokine auf eine Vielzahl von Funktionen einschließlich entzündlicher Prozesse Einfluss nehmen können [Trayhurn & Wood 2004]. Darüber hinaus ist aus Tierversuchen bekannt, dass Adipozyten zentral an der durch das Nahrungsangebot regulierbaren Langlebigkeit sowie an der Induktion von zellulärer Seneszenz beteiligt sind [Wolf 2006, Ghosh 2008]. In der Tat wurden Zeichen einer zellulären Seneszenz bei Patienten mit COPD gefunden, vor allem in Lungenstrukturzellen wie Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten [Holz et al. 2004; Müller et al. 2006]. Auch wurde eine veränderte Expression von Enzymen wie Sirtuinen nachgewiesen [Picard & Guarente 2005, Rajendrasozhan et al. 2008, Nakamaru et al. 2009], die sowohl für die zelluläre Homöostase und Genregulation im Allgemeinen als auch für die Differenzierung und Funktion von Adipozyten von Bedeutung sind.

Die vielfältigen systemischen Effekte des Rauchens legen nahe, dass bestimmte Komponenten des Zigarettenrauchs direkt in die Zirkulation gelangen und auch außerhalb der Lunge Wirkungen entfalten können. Dies könnte, neben einer – in ihrer Bedeutung umstrittenen – systemischen Entzündung, ein Faktor in der Entwicklung von Organstörungen außerhalb der Lunge bzw. von Komorbiditäten bei der COPD sein. Inwieweit einzelne Komponenten des Zigarettenrauches dabei die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten erschweren oder die Funktion von Adipozyten beeinträchtigen können, wurde bislang nicht untersucht. Die Beteiligung einer solchen Wirkung an der Entwicklung eines Lungenemphysems wird nahe gelegt durch die Beobachtung, dass Hungern mit einem Strukturabbau der Lunge

einhergehen kann. Bei Mäusen und Ratten kann eine kalorische Restriktion („Hungern“) einen Abbau der alveolären Struktur bewirken [Massaro et al. 2002; Massaro & Massaro 2004], zudem können junge Patienten mit Anorexia nervosa radiologisch einen Strukturverlust des Lungengewebes im Sinne einer reduzierten Alveolenzahl zeigen [Cook et al. 2001; Coxson et al. 2004]. Auch haben Raucher mit normalem Körpergewicht offenbar ein höheres Risiko, eine COPD zu entwickeln, als (leichtgradig) übergewichtige Raucher [Harik-Khan et al. 2002]. Zudem konnten frühere Untersuchungen einen seneszenten Zustand von Lungenfibroblasten bei Patienten mit Emphysem zeigen [Holz et al. 2004; Müller et al. 2006]. Diese Beobachtungen sprechen dafür, die obige Überlegung zu verfolgen.

Daher erschien es interessant, bei einer angenommenen systemischen Wirkung des Zigarettenrauches seinen Einfluss auf die Differenzierung und Funktionalität von Adipozyten zu ermitteln. Eine eingeschränkte Adipozytenfunktion könnte über eine Störung des Hormonhaushaltes oder Adipokine indirekt zu einer zellulären Seneszenz ortsständiger Strukturzellen der Lunge, beispielsweise Fibroblasten, und so zur Entstehung eines Lungenemphysems beitragen. In früher durchgeführten Versuchen wurde bereits eine gestörte Differenzierung und Funktion von Adipozyten bei experimenteller Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE) beobachtet [Machata 2009]. Unklar blieb allerdings, inwieweit einzelne Komponenten des Zigarettenrauchs, insbesondere Oxidanzien und Nikotin, für diese Effekte verantwortlich waren.

Aufbauend auf diesen Überlegungen war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen von CSE, ohne und mit zusätzlicher Gabe des Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC), sowie von Nikotin allein auf das Wachstum und die Differenzierung von Präadipozyten bzw. Adipozyten zu untersuchen. Hierzu wurde basierend auf vorangegangene Untersuchungen eine etablierte Zelllinie der Maus herangezogen.

2. Grundlegende Überlegungen: COPD und Seneszenz

2.1 Charakteristika der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD)

Bei der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) handelt es sich um einen Sammelbegriff persistierender entzündlicher Veränderungen der Atemwege mit zusätzlicher obstruktiver Komponente. Dazu werden in erster Linie die chronisch-obstruktive Bronchiolitis/Bronchitis und das Lungenemphysem gezählt. Häufig treten Obstruktion und Emphysem zusammen auf, wobei die eine oder die andere Komponente überwiegen und dementsprechend das klinische Bild bestimmen kann. Sowohl der chronisch-obstruktiven Bronchitis, als einer Erkrankung primär der Atemwege, als auch dem Lungenemphysem, bei dem parenchymatöse Veränderungen im Vordergrund stehen, liegen vermutlich verwandte, doch unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde. Vor allem für das Lungenemphysem scheint dabei eine genetische Komponente bedeutsam [Patel et al. 2006]. Hiervon abzugrenzen ist das Asthma bronchiale, das durch periodisch auftretende Attacken von Atemwegobstruktion gekennzeichnet ist. Während der Bronchospasmus beim Asthma bronchiale durch die Gabe von Bronchodilatoren in der Regel deutlich reduziert oder aufgehoben werden kann, führt der Einsatz dieser Medikamente bei der COPD zwar auch zu einer Abnahme der Atemwegobstruktion, die jedoch im Allgemeinen geringer ausfällt. Darüber hinaus zeigen anti-entzündliche Medikamente wie Corticosteroide im Gegensatz zu ihrer Wirkung bei der Mehrzahl von Patienten mit Asthma ein deutlich eingeschränktes Potential bei der COPD. Die Kombination aus einem langwirksamen β_2 -Agonisten und einem inhalativen Corticosteroid hat bei der COPD im Vergleich zum Asthma einen geringeren Effekt. Ferner konnte das Mortalitätsrisiko bei der COPD durch die Kombinationstherapie nicht signifikant gesenkt werden [Calverley et al. 2007; Chung et al. 2009].

Ausgehend von einer chronischen Bronchitis, die im Wesentlichen durch eine andauernde Exposition gegenüber inhalativen Noxen entsteht, entwickelt sich bei einem Teil der Patienten eine Obstruktion im Sinne einer COPD. Eine chronische Bronchitis liegt nach der klassischen WHO-Definition vor, wenn über mindestens 3 Monate im Jahr in wenigstens 2 aufeinander folgenden Jahren Husten und Auswurf besteht. Atemnot besteht nicht zwingend.

Der bedeutendste Risikofaktor für das Entstehen einer COPD ist das Rauchen. Nicht-Raucher können ebenfalls bei chronischer Exposition gegenüber irritativ-toxischen Noxen eine chronisch-obstruktive Lungenerkrankung entwickeln. Inhalative Noxen induzieren in den Atemwegen eine Entzündung, die auf Dauer die strukturellen Veränderungen in den Bronchien sowie den Bronchiolen und Alveolen verursacht [Bosken et al. 1992; Pesci et al. 1998; Anderson & MacNee 2009]. Auch scheinen genetische Risikofaktoren eine Rolle zu spielen, von denen inzwischen eine Reihe identifiziert wurde [Wood et al. 2009]. Allerdings scheint die prädiktive Kraft dieser Risikofaktoren im Einzelfall sehr eingeschränkt.

Vor allem aufgrund des schleichenden Verlaufs wird die COPD häufig nicht bzw. spät diagnostiziert. Erst in den letzten Jahren werden vermehrt großangelegte epidemiologische Studien durchgeführt, um verlässlichere Daten zur COPD auch in frühen Stadien sowie langfristige Verlaufskontrollen zu erhalten. Die Häufigkeit der COPD wurde vermutlich bislang unterschätzt. Die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung aller Altersstufen wird allgemein auf wenige Prozent geschätzt, allerdings zeigt sich ein steiler Anstieg der Prävalenz auf über 10% ab einem Alter von 40 Jahren. Ferner ist weltweit eine deutliche Zunahme der Erkrankungshäufigkeit zu erkennen. Derzeit nimmt die COPD in der Weltstatistik den 4-6. Platz der Todesursachen ein. Bis zum Jahr 2020 wird sie vermutlich aufgrund des expandierenden Zigarettenkonsums und der höheren Lebenserwartung vor allem in Ländern der sog. zweiten und dritten Welt den dritten Platz der zum Tod führenden Erkrankungen einnehmen. Aus diesem Grund und zu dem Zweck, therapeutische Maßnahmen zu optimieren bzw. kausale Maßnahmen überhaupt erst zu entwickeln, werden seit geraumer Zeit weltweit große Anstrengungen in der Forschung unternommen, um die Pathophysiologie der Erkrankung besser zu verstehen [Wirtz et al. 2005; Chapman et al. 2006; Glaab et al. 2006; Rabe et al. 2007, Wood et al. 2009, GOLD 2009].

2.2 Pathophysiologie der COPD

2.2.1 Klassische Mechanismen

Aufgrund pathomorphologischer und pathophysiologischer Unterschiede werden die mutmaßlichen Entstehungsmechanismen der chronisch-obstruktiven Bronchiolitis und des obstruktiven Lungenemphysems im Folgenden getrennt dargestellt.

Chronisch obstruktive Bronchiolitis/Bronchitis

Wesentliche Faktoren, die das Entstehen einer chronisch-obstruktiven Bronchiolitis begünstigen, sind inhalative Noxen, frühkindliche Lungenschäden und virale Infekte. In Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung kommt es zu nachhaltigen pathophysiologischen Veränderungen. Eine persistierende Einwirkung einer Noxe oder ein andauernder Befall der Atemwege durch einen Erreger bedingt eine chronisch-entzündliche Reaktion der Mukosa. Dabei kommt es zu einer Plattenepithelmetaplasie, Becherzellhyperplasie und Einschränkung des Zilienschlages bei noch vorhandenem Zylinderepithel. Dies führt zum einen zu einer gesteigerten Mukusproduktion, zum anderen aufgrund fehlender Clearance zu einem Sekretstau, einer so genannten Mukostase. Hinzu kommt eine Lumenverminderung durch eine Konstriktion der Bronchialmuskulatur. Dies bedingt eine Verschlechterung der Lungenfunktion, ersichtlich u. a. an einem Abfall des FEV₁ (forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde). Eine unzureichende Organfunktion lässt sich ebenfalls anhand der Blutgasanalyse quantifizieren und wird unterteilt in eine respiratorische Partial- oder eine respiratorische Globalinsuffizienz.

Entscheidend an der Atemflussbegrenzung ist die Veränderung der Morphologie der Atemwege (remodelling). Diese geht einher mit einer Infiltration der Mukosa durch Entzündungszellen, vor allem neutrophile Granulozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten. Während die Anzahl an Neutrophilen, Makrophagen und T-Lymphozyten bei einer Progression der Erkrankung nur geringfügig ansteigt, zeigt sich u. a. eine auffällige Zunahme der B-Lymphozyten, was eine spezifische Immunabwehr gegen virale bzw. bakterielle Erreger, die die Atemwege aufgrund fehlender Reinigungsmechanismen dauerhaft besiedeln, nahe legt. Ein konsistenter Befund ist vor allem die erhöhte Zahl von Neutrophilen, ohne dass diese allerdings notwendigerweise eine enge Beziehung zum Schweregrad aufweist [Pesci et al.

1998; Hogg et al. 2004; Anderson & MacNee 2009]. Für Mukosa und Sputum können sich hier unterschiedliche Befunde ergeben. Bei fortbestehender Entzündung kommt es über einen längeren Zeitraum vermutlich u. a. durch aktivierte Fibroblasten zu einer Bindegewebsvermehrung und damit zu einer Wandverdickung [Churg et al. 2006]. Diese Fibrosierung der Bronchialwand erklärt die irreversible Zunahme der Atemwegobstruktion.

Lungenemphysem

Anders verhält es sich bei der Entstehung des Lungenemphysems. Entscheidend hierbei sind die Zerstörung der Alveolarsepten und der daraus resultierende Verlust der elastischen Rückstellkräfte. Dies führt einerseits zu einer irreversiblen Aufweitung des Alveolarraums, andererseits funktionell zu einem Kollaps der Atemwege bei Expiration aufgrund des fehlenden elastischen Zuges im Bereich der Bronchiolen. Weiter peripher gelegene Lungenabschnitte können daher ein bestimmtes Maß an Restluft nicht abgeben [Taube et al. 2000].

Diskutiert werden nach wie vor im Wesentlichen vier Mechanismen der Entstehung des Lungenemphysems: 1) Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht, 2) Ungleichgewicht im Verhältnis von Oxidanzien zu Antioxidanzien, 3) eine dysregulierte Apoptose, vor allem auch im Bereich der Gefäße. und 4) eine insgesamt inadäquate Reparaturantwort der Lunge als Konsequenz dieser Faktoren.

Die Hypothese des Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewichtes besagt, dass bei chronischem Einwirken einer inhalativen Noxe ein Entzündungsprozess in Gang gesetzt wird, bei dem durch fortdauernde Aktivierung von Entzündungszellen über entsprechende Mediatoren sowie anhaltende Einwanderung weiterer Entzündungszellen aufgrund von Chemotaxinen vermehrt Proteasen freigesetzt werden, die das umgebende Gewebe schädigen. Dies wird verstärkt durch einen absoluten oder relativen Mangel an Antiproteasen, die vor allem durch Oxidanzien inaktiviert werden. Hinzu kommt eine direkte Zellschädigung beispielweise durch CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten. Auch hier kommt es bei einer Stimulation der Fibroblasten durch Wachstumsfaktoren im Bereich der Bronchialwand zu einer Fibrosierung. Insgesamt finden sich bei der COPD und dem Lungenemphysem also sowohl Strukturzerstörungen als auch vermehrte Strukturbildungen, wie sie vom

Pathologen an histologischen Schnitten von Lungen mit Emphysem regelhaft, vor allem peribronchiolär, berichtet werden [Stockley 1999; Hogg et al. 2004; Curtis et al. 2007; Mauad & Dolhnikoff 2008; Wood et al. 2009].

Eine besonders wichtige Rolle für die Entstehung des Emphysems spielen vermutlich oxidative Prozesse, die eine direkte Zellschädigung herbeiführen. Wie oben für Proteasen beschrieben, kommt es auch hier zu einem Ungleichgewicht zwischen Oxidanzien und Antioxidanzien. Oxidanzien sind entweder im Zigarettenrauch enthalten oder werden von Entzündungszellen, im Wesentlichen von neutrophilen Granulozyten, gebildet und anschließend freigesetzt. Diese erzeugen insbesondere mit Hilfe der NADPH-Oxidase Superoxidradikale $O_2^{\cdot-}$ mit zelltoxischer Wirkung. Zwei Superoxidmoleküle werden mit Hilfe der Superoxid-Dismutase in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Letzteres kann bei Übertragung eines weiteren Elektrons in ein Hydroxyl-Ion OH^- und ein äußerst reaktives Hydroxylradikal OH^{\cdot} gespalten werden.

Reaktive Sauerstoffspezies können Schäden an vielen Biomolekülen anrichten. Gut untersucht ist die Auswirkung des Hydroxylradikals auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie sie u. a. in biologischen Zellmembranen vorkommen. Dabei entzieht das Hydroxylradikal unter Wasserbildung der Fettsäure an einer CH_2 -Gruppe zwischen zwei Doppelbindungen ein Wasserstoffatom und hinterlässt somit ein Alkylradikal. Durch Anlagerung von Sauerstoff entsteht ein Peroxylradikal, das in der Lage ist, durch Abstraktion eines H-Radikals weitere ungesättigte Fettsäuren zu modifizieren und somit ihre Funktion zu beeinträchtigen. Dieser zyklische, sich selbst perpetuierende Prozess liefert eine große Menge von Fettsäureperoxiden, woraus sich schwerwiegende funktionelle Konsequenzen für die Zelle ergeben können.

Diese Prozesse werden im Normalzustand durch antioxidativ wirksame enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen blockiert. Wichtige Enzyme sind die Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathionperoxidase. Nicht-enzymatische Antioxidantien sind die Ascorbinsäure (Vitamin C) und das α -Tocopherol (Vitamin E). Wird die Oxidanzienproduktion nicht ausreichend durch antioxidative Mechanismen unterbunden, kommt es im Sinne einer positiven Rückkopplung wieder zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, zu gesteigerter Mukusproduktion, zu vermehrter Proteolyse und zur Schädigung von Zellen [MacNee

2001; Wirtz et al. 2005; Glaab et al. 2006; Mak 2008]. Klinische Versuche mit Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC) haben allerdings bislang keine eindeutigen klinischen Effekte gezeigt [Decramer et al. 2005; Dekhuijzen 2006], obgleich protektive Effekte beispielweise auf die Konzentration exhalierter Oxidantien wie Wasserstoffperoxid gezeigt wurden [Rysz et al. 2006].

Beide Hypothesen – Proteasen-Antiproteasen- und Oxidantien-Antioxidantien-Ungleichgewicht – können allerdings den emphysemspezifischen Verlust des Lungenparenchyms vermutlich nur unzureichend erklären, vor allem scheinen sie auch nicht für die COPD spezifisch. Daher wird zusätzlich die dysregulierte Apoptose favorisiert. Die Apoptose ist ein physiologischer, induzierbarer Vorgang der Zelleliminierung. Über eine Aktivierung von Caspasen – Cysteinproteasen mit einer Spezifität für Asparaginsäuren – kommt es zu einer Fragmentierung der DNA und später zum Zerfall der Plasmamembran. Die Zellreste werden von benachbarten Makrophagen aufgenommen, ohne dass sich eine Entzündungsreaktion über eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine entwickelt.

Untersuchungen zeigen, dass eine dysregulierte Apoptose an der Entstehung des Lungenemphysems beteiligt ist. So besteht ein Ungleichgewicht zwischen einer überschießenden Apoptose und einer regenerativen Zellproliferation. Auch konnte eine unzureichende Clearance apoptotischer Zellen beobachtet werden. Diese Prozesse sind auch nach Nikotinkarenz noch nachweisbar. Betroffen von den apoptotischen Veränderungen sind sowohl Epithelzellen der Alveolarsepten als auch Endothelzellen der Gefäße; dies findet seine Erklärung in der gemeinsamen Entwicklung der Alveolarendothel- und -epithelzellen. Des Weiteren sind auch Entzündungszellen, wie T-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, von der überschießenden Apoptose betroffen. Daraus resultiert nicht zuletzt eine unzureichende Erregerabwehr. Die genauen Mechanismen, die zu einer Aktivierung der Apoptose führen, sind noch nicht bekannt. Als Auslöser kommen verschiedene Faktoren in Frage, wobei an erster Stelle wiederum Oxidantien zu nennen sind [Wirtz et al. 2005; Glaab et al. 2006; Demedts et al. 2006; Brown et al. 2009].

2.2.2 Induzierte zelluläre Seneszenz als Teilursache des Lungenemphysems

Wesentliche, für die Zellalterung relevante Faktoren sind mitochondriale Alterung, Akkumulation von DNA-Schäden sowie eine Verkürzung der Telomeren mit der Folge einer Instabilität des Genoms [Dufour & Larsson 2004; Kirkwood 2005]. Da keine eindeutige Beziehung zwischen zellulärer Seneszenz und der Alterung eines Organs besteht [Hayflick 2004], ist es sinnvoll, die Alterung auf Ebene der Zelle als replikative/proliferative Seneszenz zu bezeichnen. Es kommt hierbei mit zunehmendem zellulärem Alter zu einer Abnahme der Teilungsfähigkeit. Zu unterscheiden sind „natürliche“ bzw. intrinsische Alterungsprozesse, die mit dem Verlust der proliferativen Kapazität einhergehen, von induzierter bzw. extrinsischer Seneszenz, die durch externe Stressoren herbeigeführt wird. Auch zeigen sich bezüglich der Seneszenz auf molekularer und zellbiologischer Ebene Unterschiede zwischen der in vitro- und in vivo-Situation [Park et al. 2001].

Wesentliches Merkmal seneszenter Zellen ist der irreversible Stopp der Zellteilung. Dies geht in der Regel jedoch nicht mit einem frühzeitigen Zelltod einher, sondern führt eine relative Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen herbei und garantiert somit ein langes Überleben der Zelle. Zu beachten ist, dass Mechanismen der Seneszenz zugleich auch einen protektiven Effekt gegenüber der Tumorstehung bei den Zellen selbst darstellen, jedoch einen tumorfördernden Effekt auf andere Zellen ausüben können [Krtolica et al. 2001; Parrinello et al. 2005]. Hinzu kommt eine veränderte Zellmorphologie, veränderte Produktion von Inflammations- und Wachstumsmediatoren und die Expression seneszenzrelevanter Marker, wie die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -gal) [Dimri et al. 1995; Nunoya et al. 2006, Müller et al. 2006].

Hinsichtlich des Lungenemphysems ist die Annahme plausibel, dass die anfänglichen entzündlichen Prozesse eine vermehrte Apoptose- und Nekroserate der Strukturzellen bewirken. Dies erfordert einen vermehrten Bedarf an Ersatzzellen. Als Folge kommt es bei vermehrter Proliferation der Strukturzellen frühzeitig zu einem Verbrauch des replikativen Potentials. Hinzu kommt, dass die Zellen durch Oxidanzien altern. Da andere chronisch entzündliche Erkrankungen der Lunge, wie die Lungenfibrose, in der Regel nicht in ein Lungenemphysem einmünden und auch eine antientzündliche Therapie beim Lungenemphysem nur marginal den Verlauf der

Erkrankung beeinflusst, liegt es nahe, die entzündliche Komponente nicht als Hauptursache der Progression der Erkrankung anzunehmen, sondern ein reduziertes bzw. fehlgeleitetes Reparaturvermögen, u.a. auf der Basis eines seneszenten Zustandes der Zellen, für den Verlauf und die Irreversibilität der Erkrankung verantwortlich zu machen. So erfordert die Erhaltung alveolärer Septen einen regelmäßigen Zellersatz, der dann bei dem gestörten Teilungsverhalten ortsständiger Stammzellen nicht gewährleistet wäre [Holz et al. 2004]. Wenn auch noch nicht ganz klar ist, inwieweit ortsständige Zellen Lungenfibroblasten ersetzen, so lassen doch Analogien zu anderen Zelltypen wie Epithelzellen den Schluss zu, lokalen Zellen der Lunge zumindest teilweise die Aufgabe der Zellersatzes zuzuschreiben.

Lösliche Komponenten des Zigarettenrauches können aber vermutlich auch in die Blutbahn gelangen und so an anderen Organen Wirkungen ausüben. Über einen längeren Zeitraum führt dann möglicherweise ein u. a. durch den Verlust funktioneller Adipozyten gestörtes hormonelles Gleichgewicht zur Entstehung seneszenten Zellen in der Lunge, wodurch wiederum regeneratives Potenzial des Organs verloren geht.

Die Tatsache, dass eine chronische Entzündung in den Atemwegen der Patienten mit COPD auch bei Nikotinkarenz persistiert, legt auch die Wirkung epigenetischer Mechanismen als möglicher Basis der Seneszenz nahe. Klinische Beobachtungen stärken die Hypothese einer zellulären Seneszenz als Teilursache einer COPD bzw. eines Lungenemphysems. Physiologische Alterungsprozesse der Lunge, die zu einem Altersemphysem führen, sind zwar nicht-destruktiver Natur, im Gegensatz zu dem durch Zigarettenrauch induzierten Lungenemphysem, führen aber zu vergleichbaren morphologischen und funktionellen Veränderungen und lassen so einen gleichen Mechanismus vermuten [Domna & Domna 2002]. Auch die Korrelation zwischen dem Ausmaß der Bildung von Hautfalten und dem Vorkommen eines Emphysems [Patel et al. 2006] stützt die Hypothese einer durch das Rauchen induzierten, insgesamt veränderten Gewebs- und Organarchitektur, wie sie auch bei Alterungsprozessen beobachtet werden kann.

Lungenfibroblasten von Patienten mit einem Lungenemphysem zeigen eine vermehrte Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) im Vergleich zu gesunden Rauchern [Müller et al. 2006]. Auch die reduzierte proliferative Kapazität der Lungenfibroblasten von Patienten mit einem

Lungenemphysem im Vergleich zu gesunden Rauchern ist ein Indiz einer zellulären Seneszenz der Lungenstrukturzellen [Holz et al. 2004]. Ferner zeigen verschiedene Enzyme, die auf Alterungsprozesse der Zelle Einfluss nehmen, eine veränderte Expression. So konnte eine verminderte Expression von SIRT1, einer Histondeacetylase Typ III, in Lungenepithelzellen nachgewiesen werden [Rajendrasozhan et al. 2008]. Des Weiteren fand man eine vermehrte Expression der Zellzyklus-regulierenden Enzyme p16^{INK4a} und p21^{Cip1/Waf1} [Tsuji et al. 2004], die eine Zellzyklusprogression hemmen und damit eine zelluläre Seneszenz mitverursachen [Huschtscha & Reddel 1999; Collins & Sedivy 2003; Mirzayans et al. 2009]. Dies steht möglicherweise mit der verminderten SIRT1-Aktivität in Zusammenhang [Karrasch et al. 2008, MacNee 2009; Ito & Barnes 2009]. In jedem Fall machen diese Beobachtungen eine zelluläre Seneszenz als Teilursache der COPD bzw. des Lungenemphysems wahrscheinlich.

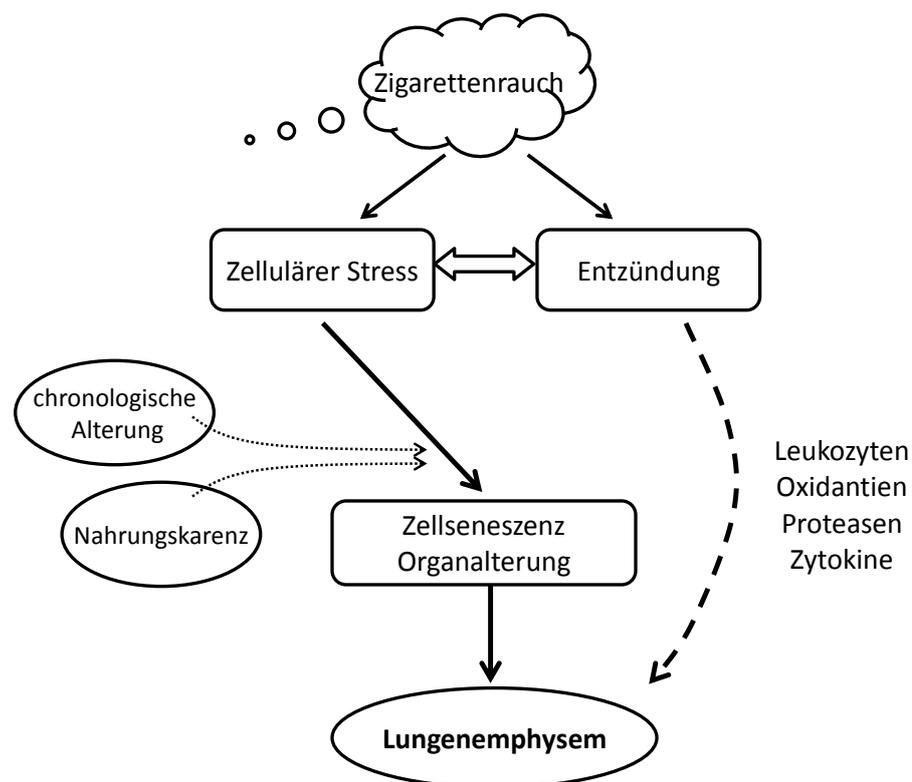


Abbildung 2.1.1: Pathomechanismen der COPD. Wesentlich für die Entstehung der COPD sind die chronische Entzündung der Lunge sowie in der Folge vermutlich auch eine Seneszenz der Strukturzellen inklusive Lungenfibroblasten. Es entsteht ein vermehrter Zellverlust ohne entsprechenden Ersatz [modifiziert nach Karrasch et al. 2008].

2.3 Systemische Veränderungen/Komorbiditäten bei der COPD

Bei Patienten mit COPD beschränkt sich die Erkrankung nicht allein auf die Lunge, sondern bezieht auch andere Organe in das Krankheitsgeschehen mit ein [Decramer et al. 2005; Watz & Magnussen 2006; Curtis et al. 2007; Fabbri et al. 2008; Barnes & Celli 2009].

Die COPD ist wie beschrieben charakterisiert durch eine chronische mukosale Infiltration der Atemwege mit Entzündungszellen. Diese führt nicht nur zu einem Strukturverlust des Lungenparenchyms, sondern aktiviert auch Reparaturprozesse, die sich in einer meist peribronchialen Fibrosierung äußern (remodelling). Als Ursache für die inadäquate, überschießende Entzündungsreaktion bei prädisponierten Patienten, die auch nach Beendigung einer Exposition gegenüber inhalativen Noxen noch zu beobachten ist, wird unter anderem auch eine Immunreaktion gegen neu, möglicherweise auf dem Boden einer dysregulierten Apoptose, entstandene Epitope diskutiert. Allerdings ist nicht klar, ob die Autoantikörper die Ursache oder eine Folge der COPD darstellen [Curtis et al. 2007].

In verschiedenen Studien konnten bei Patienten mit einer COPD systemisch erhöhte Werte von Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden [Gan et al. 2004; Pinto-Plata et al. 2006]. Dabei scheint die systemische Entzündung nicht die Folge einer überschießenden lokalen Entzündungsreaktion in den Atemwegen zu sein. So ließ sich kein Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten im Sputum und dem Serumspiegel des CRP zeigen [Roy et al. 2009]. Die systemische Entzündung steht offenbar im Zusammenhang mit einer Anzahl weiterer chronischer Erkrankungen, wie Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, Diabetes mellitus sowie Erkrankungen des muskuloskeletalen Systems [Watz & Magnussen 2006, 2009].

An vorderster Stelle stehen dabei kardiovaskuläre Erkrankungen [Watz & Magnussen 2006]. Neben kardialen Arrhythmien sind vor allem kardiale Ischämien bei koronarer Insuffizienz bedeutsam. So konnte gezeigt werden, dass bereits eine leichte Abnahme der FEV₁ das Risiko einer koronaren Herzerkrankung um das 2-3 fache erhöht [Sin & Man 2003; Anderson & MacNee 2009]. Dies wird u. a. auf eine bei COPD nachweisbare systemische Entzündung zurückgeführt. Den Ergebnissen

verschiedener Studien zufolge führen die Erkrankung bzw. die mit ihr einhergehende systemische Entzündungsreaktion zu einer endothelialen Dysfunktion nicht nur der pulmonalen, sondern auch der peripheren Strombahn [Dinh-Xuan et al. 1991; Howes et al. 1995].

Des Weiteren zeigt sich bei ca. 25 % der Patienten mit mittelgradig eingeschränkter Lungenfunktion und bei ca. 50 % der Patienten mit schwerer COPD ein ungewollter Gewichtsverlust durch eine Reduktion vor allem der fettfreien Masse bzw. der Muskelmasse. Hinzu kommt eine Dysfunktion der verbliebenen Skelettmuskulatur [Decramer et al. 2005; Watz & Magnussen 2006].

Immobilität, Alter, Steroidmedikation, systemische Entzündung sowie Nikotininhalation werden darüber hinaus als mögliche begünstigende Faktoren einer Osteoporose angesehen. Diese ist ebenfalls mit der kumulativen Steroidkonzentration assoziiert [Watz & Magnussen 2006].

Interessant für die vorliegende Arbeit sind das Auftreten eines metabolischen Syndroms sowie eine Abnahme des BMI im Rahmen der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung. Verschiedene Studien zeigten eine Koinzidenz der COPD mit einer Abnahme des BMI und dem Auftreten eines metabolischen Syndroms. Die Ursache für den Gewichtsverlust ist nicht im Detail geklärt. Systemische Inflammation, genetische Faktoren, ein erhöhter Grundumsatz mit einer katabolen Stoffwechsellage, bedingt durch erhöhte $TNF\alpha$ -, IL-6- und CRP-Spiegel, sowie eine Gewebhypoxie werden als auslösende Faktoren diskutiert. Möglicherweise werden durch proinflammatorische Zytokine über eine Störung des Hormonhaushaltes vermehrt Muskelproteine durch das Proteasom abgebaut [Wouters et al. 2002]. Daten, die bei Tumorerkrankungen erhoben wurden, zeigen, dass die Kachexie direkt mit Entzündungsmediatoren, vor allem mit $TNF-\alpha$, assoziiert ist [Figueras et al. 2005]. Gestört werden vor allem anabol wirksame Hormone wie Wachstumsfaktoren. Besondere Bedeutung kommt dabei dem Insulin und dem IGF-1 (insulin-like growth factor 1) zu [Wouters et al. 2002]. Diese haben nicht nur den Metabolismus, sondern auch das Wachstum betreffende Wirkungen auf eine große Zahl von Zelltypen.

Einer der hierbei relevanten Zelltypen sind Adipozyten. Dementsprechend könnte eine direkte oder indirekte Störung dieser Zellpopulation durch inhalative, systemisch

wirksame Noxen auch eine Störung der Zellantwort auf der Insulinachse nach sich ziehen und damit sekundär die Progression der Lungenerkrankung begünstigen (s.o.). Hinzu kommt eine Störung der Produktion protektiv wirksamer Adipokine. Dadurch wird in den Strukturzellen der Lunge möglicherweise eine Langlebigkeit induziert, wodurch allerdings deren Regenerationspotential im Endeffekt reduziert wird (s.o.). Zweifellos bedarf es jedoch neben derartigen systemischen Faktoren auch lokaler Faktoren, wie Zigarettenrauch, Entzündungszellen und -mediatoren sowie Keimbesiedelung, um das Entstehen und Fortschreiten des Lungenemphysems zu verursachen. Es kann sich bei der Seneszenz und der möglichen Rolle der Adipozyten also nur um einen Faktor unter vielen handeln.

3. Fragestellung der Arbeit

Die genannten Überlegungen waren Anlass, die Wirkung von Zigarettenrauch auf Adipozyten näher zu untersuchen. In einer vorangegangenen Arbeit waren die erforderlichen Methoden entwickelt bzw. aufgebaut worden, und es hatten sich signifikante Effekte von Zigarettenrauch ergeben [Machata 2009]. Dabei zeigte sich wie bei den Versuchen mit Lungenfibroblasten, dass derartige Versuche an der Grenze zwischen unerwünschten toxischen Effekten und der Abwesenheit messbarer Effekte entlang balancieren. Daher stellte sich zunächst die Frage der Reproduzierbarkeit und sodann, analog den Versuchen mit Lungenfibroblasten [De Ritis 2009], die Frage, welche der Komponenten des Zigarettenrauchs für die Effekte verantwortlich war. Diese Frage erschien vor allem im Falle der Oxidanzien nicht ganz trivial, da Oxidanzien, zumindest endogen erzeugte, auch die Differenzierung von Adipozyten begünstigen können (siehe 6.3.2). Es war also nicht klar, ob, wie bei den Fibroblasten, die negativen über die positiven Effekte dominierten. Ähnliches galt für das Nikotin. Daher war das Thema der Arbeit, unter Verwendung einer etablierten Zelllinie der Maus die folgenden Fragen zu beantworten:

- Sind die Ergebnisse vorheriger Untersuchungen über die Auswirkungen von Zigarettenrauchextrakt auf die Differenzierung und Funktion von Adipozyten im Vergleich zu Kontrollzellen reproduzierbar?
- Kann durch die Gabe von N-Acetylcystein (NAC) vor und während Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt die Differenzierung und Funktion von Adipozyten in der einen oder anderen Richtung beeinflusst werden?
- Hat Nikotin in derjenigen Konzentration, die im Zigarettenrauchextrakt enthalten ist, Wirkungen auf die Differenzierung und Funktion von Adipozyten?

Als Messgrößen wurden hierbei die Zellzahl, der Lipid- und Proteingehalt der Zellen sowie die Adipozyten-spezifische Enzymaktivität der GPDH gewählt.

4. Material, Methoden und Analytik

4.1 Verwendete Materialien und Reagenzien

4.1.1 Zellen

3T3-L1-Zellreihe (Embryo Fibroblast, Mouse), ATCC (American Type Culture Collection) LGC Promochrom; Art.-Nr.: CL-173

4.1.2 chemische Reagenzien

Albumin-Flocken:	Roth; Art.-Nr.: T844.1
Aqua dest.:	B. Braun, Melsungen AG
Aquatex:	Merck; Art.-Nr.: 1.08562.0050
Bacillol:	Bode; Art.-Nr.: SAP 405531
β -Mercaptoethanol:	Fluka; Art.-Nr.: 63689
CSE (cigarette smoke extract):	hergestellt nach standardisiertem Verfahren (siehe „Herstellung von CSE“)
Dexamethason:	Sigma; Art.-Nr.: D4902
Dihydroxyacetonphosphat (DHAP):	Fluka; Art.-Nr.: 37440
DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ATCC:	LGC-Promochrom; Art.-Nr.: 30-2002
DMSO:	Sigma; Art.-Nr.: D2650
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure):	Roth; Art.-Nr.: 8043.3
Ethanol:	Merck; Art.-Nr.: 1.11727.1000

FCS (fetal calfserum):	GIBCO; Art.-Nr.: 10270-098
Flüssigstickstoff:	Linde
Gentamicin-Lösung:	Invitrogen; Art.-Nr.: 15710-049
HBSS-Lösung:	GIBCO; Art.-Nr.: 14175-053
IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-xanthine):	Sigma; Art.-Nr.: I5879-1G
Insulin (human):	Sigma; Art.-Nr.: I-9278-5ML
Isopropanol:	Merck; Art.-Nr.: 1.0963
N-Acetylcystein (NAC):	Sigma; Art.-Nr.: A9165-25G
NADH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid):	Sigma; Art.-Nr.: N8129
Natronlauge (NaOH); 1Molar:	Merck; Art.-Nr.: 1.09137.1000
NCS (newborn calfserum):	Biochrom AG; Art.-Nr.: S0125
Nikotin:	Sigma; Art.-Nr.: N1019
Ölrotfarbstoff (Oil red O):	Sigma; Art.-Nr.: O 0625
PBS-Lösung (10-fach Konzentrat):	GIBCO; Art.-Nr.: 14200-067
Protein-Farbstoff (Roti-Nanoquant):	Roth; Art.-Nr.: K880.2
RLT-Puffer:	Qiagen; Art.-Nr.: 79216
Roti-Histofix 10% (Formaldehydlösung 10%):	Roth; Art.-Nr.: A146.3

Salzsäure (HCl); 1Molar:	Merck; Art.-Nr.: 1.09057.1000
Streptomycin-/Penicillin-Lösung:	Invitrogen; Art.-Nr.: 15140122
Triethanolamine hydrochloride:	Sigma; Art.-Nr.: T1502-100G
Tris-HCl; 1Molar (pH 7,4):	Sigma; Art.-Nr.: T2663
Trypsin:	Invitrogen; Art.-Nr.: 25300-062
Trypanblau:	Fluka; Art.-Nr.: 93595

4.1.3 Materialien

Brutschrank:	Binder CB210; Art.-Nr.: 9140-0027
Deckglas:	IDL; Art.-Nr.: 190002450
Digitale Kamera:	Canon Power-Shot A96
Kameraaufsatz:	Canon CA-DC52D
Kolbenhub-Pipetten:	Eppendorf
Kryoröhrchen:	Roth; Art.-Nr.: E309.1
Küvette:	Brand; UV-Küvette mikro; Art.-Nr.: 759210
Kunststoffplättchen, rund:	Sarstedt; Art.-Nr.: 83.1840.002
Messkolben 10ml (mit Glasstopfen):	Brand; Art.-Nr.: 37267

Mikroskope:	Axiovert 40C, Leitz LaborLux S
Minishaker:	MS1; IKA
Neubauer-Zählkammer:	Neubauer improved; Optik Labor
Objektträger:	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG; Ref.- Nr.: 1000200
Pasteurpipette:	Brand; Art.-Nr.: 747715
PC-Programm (ImageJ):	1.34, Java 1.5.0_03
PH-Indikatorstäbchen:	VWR; Art.-Nr.: 1095840001
Photometer:	Shimadzu UV-1602
Photometer:	Dr Lange LP700
Pipettenspitzen (ohne Filter):	Sarstedt; Art.-Nr.: 70.762 (1000 µL)
Pipettenspitzen (ohne Filter):	Sarstedt; Art.-Nr.: 70.760.002 (200 µL)
Pipettenspitzen (mit Filter):	VWR; Art.-Nr.: 732-0544 (1-200 µL)
Pipettenspitzen (mit Filter):	peQLab; Art.-Nr.: 81-1030 (1-100 µL)
Pipettenspitzen (mit Filter):	Sarstedt; Art.-Nr.. 70.1186.210 (-1250 µL)
Reaktionsgefäß 1,7 mL:	Roth; Art.-Nr.: 7080.1
Röhrchen 5 mL:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 60.558.001
Röhrchen 15 mL:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 62.554.502

Röhrchen 50 mL:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 62.547.154
Serologische Pipette 2 mL:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 86.1252.001
Serologische Pipette 5 mL:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 86.1253.001
Serologische Pipette 10 mL:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 86.1254.001
Serologische Pipette 25 mL:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 86.1685.001
Spritze mit Luer-Ansatz 20 mL:	BD Discardit™ II; Ref.-Nr.: 300296
Spritzenvorsatzfilter:	European; Art.-Nr.: 514-0061
Sterile Werkbank (Flow):	Heraeus Laminair
TC-75-Flaschen:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 83.1813
Transferpipette 3,5 mL steril:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 86.1171.001
24-Well-Platten:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 83. 1836
Zellschaber:	Sarstedt; Ref.-Nr.: 83.1832
Zentrifuge/Kühlzentrifuge:	Eppendorf; Centrifuge 5415R
Zentrifuge:	Heraeus; Labofuge 400
Zentrifuge:	Capsulefuge TOMY; Polylabo

4.2 Arbeiten mit Zellkulturen

4.2.1 Ansetzen von Nährmedium

Proliferations- und Differenzierungsprozesse der 3T3-L1-Zelle (ATCC) erforderten eine regelmäßige Zufuhr von frischem Nährmedium (s.u.). Frisches Nährmedium musste daher immer wieder zubereitet werden und konnte sodann bei +8°C gelagert werden. Das Ansetzen des Mediums wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Zuerst musste NCS (newborn calf serum) (Biochrom AG) bzw. FCS (fetal calf serum) (GIBCO) in einem 50mL-Röhrchen aufgetaut werden. Beide Seren wurden in 500mL-Flaschen geliefert und vor dem Gebrauch in 50mL-Röhrchen (Sarstedt) abgefüllt.
- Zugleich wurde eine ebenfalls tiefgefrorene Streptomycin-/Penicillin-Lösung (Invitrogen) aufgetaut. Wie die Seren wurde auch die Antibiotika-Lösung vor dem Gebrauch aliquotiert und in 15mL-Röhrchen bei -25°C gelagert.
- Das Serum, die Streptomycin-/Penicillin-Lösung sowie eine Gentamicin-Lösung (Invitrogen) wurden steril unter die Werkbank (Heraeus laminair) gegeben, um eine Verunreinigung des anzusetzenden Nährmediums zu vermeiden.
- Dem für diese Zellen empfohlenen Kulturmedium mit einem hohen Glukose-Gehalt (ATCC; 500 ml) wurden nun 50 mL entnommen. Diese 50 mL wurden nicht weiter verwendet. Den übriggebliebenen 450 mL wurden daraufhin 50 mL NCS bzw. FCS, 5 mL der Streptomycin-/Penicillin-Lösung und 2,5 mL der Gentamicin-Lösung zugefügt.

Zu beachten war, dass das NCS- und FCS-Medium in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus verabreicht wurde. Während das NCS-Medium einen positiven Effekt auf die Proliferation der Präadipozyten ausübte, wurde das FCS-Medium erst während der Phase der Zelldifferenzierung verwendet (s.u.), da letzteres die Zellteilung nicht wesentlich vorantrieb.

4.2.2 Auftauen und Füttern der 3T3-L1-Zellen

Um ausreichend Versuche an Zellen durchführen zu können, war es essenziell, über einen Zellpool noch undifferenzierter, zur Proliferation fähiger, Vorläuferzellen, d. h. Präadipozyten zu verfügen. Die Zellen der 3T3-L1-Linie wurden in Flaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (TC-75-Flaschen) (Sarstedt) angezogen, um sie dann zu Versuchszwecken in 24-Well-Platten (Sarstedt) auszusäen. Dabei wurden den Zellkulturen in einem Brutschrank (Binder CB210) bei 37°C und 5% CO₂ optimale Bedingungen geboten. Da die Zellen in Flüssigstickstoff (Linde) in entsprechenden Kryoröhrchen (Roth) eingefroren waren, mussten sie zunächst aufgetaut werden.

- Das Kryoröhrchen mit der gewünschten Zellpassage musste möglichst schnell zusammen mit aufgewärmtem NCS-Medium steril unter die Werkbank gestellt werden.
- Mit dem warmen Medium wurde dann die Zellsuspension aufgetaut und in ein 15mL-Röhrchen (Sarstedt) gegeben. Durch mehrmaliges Ausspülen des Kryoröhrchens konnte ein nennenswerter Verlust von Zellen vermieden werden.
- Das 15mL-Röhrchen mit der Zellsuspension wurde nun 8 Minuten bei 1500 rcf zentrifugiert (Zentrifuge: Heraeus). Dadurch wurden die Zellen am Boden des Röhrchens vom Medium abgetrennt, was in Form eines weißen Niederschlages (Pellet) deutlich zu erkennen war.
- Das 15mL-Röhrchen wurde wieder steril unter die Werkbank gestellt und der Überstand vorsichtig bis auf das Pellet abgesaugt.
- Mit frischem NCS-Medium musste dann rasch eine Resuspension der Zellen erfolgen.
- Die Zellsuspension konnte jetzt auf die TC-75-Flaschen aufgeteilt werden.

Um die Präadipozyten während ihres Wachstums mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen, wurden sie alle 2 bzw. 3 Tage mit 9 bzw. 14 mL NCS gefüttert. Dabei wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Die Zellkulturen wurden während der Anzucht und der Versuchsdurchführung steril behandelt, um ein mögliches Wachstum von Pilzen auf dem Nährmedium zu vermeiden. Steriles Arbeiten erfolgte grundsätzlich unter einer

zu diesem Zweck vorgesehenen sterilen Werkbank, die etwa eine halbe Stunde vor Arbeitsbeginn angeschaltet wurde. Erst bei der Versuchsauswertung, die weiter unten in ihren einzelnen Schritten dargestellt wird, musste nicht mehr auf Sterilität geachtet werden, da die Zellen nicht mehr für weitere Versuche verwendet wurden.

- Das Medium (NCS), das vor dem Gebrauch in 50mL-Röhrchen abgefüllt wurde, um eine durch den ständigen Gebrauch mögliche Verunreinigung des Mediums in der 500mL-Flasche zu vermeiden, wurde vor der Fütterung im Brutschrank auf etwa 37°C aufgewärmt. Das Röhrchen mit dem Medium wurde dann unter die Werkbank gestellt, nachdem es mit Bacillol (Bode) gereinigt worden war.
- Die TC-75-Flasche wurde noch im Brutschrank völlig verschlossen¹, bevor sie unter die Werkbank gestellt wurde.
- Das alte Medium wurde jetzt aus der Flasche mit einer Pasteurpipette (Brandt), die zuvor abgeflammt wurde, abgesaugt. Dabei war zu beachten, den Flaschenboden nicht zu berühren, um den Zellrasen nicht zu beschädigen.
- Nun konnte frisches Medium in die Flasche gegeben werden, wobei darauf geachtet wurde, dass das Medium nicht über den Zellrasen gespült wurde. Dadurch wurde verhindert, dass sich die Zellen vom Flaschenboden lösten.
- Bevor die TC-75-Flaschen wieder verschlossen wurde, wurden sowohl der Flaschenhals als auch der Flaschendeckel abgeflammt.
- Nun wurde die Flasche verschlossen wieder in den Brutschrank gestellt und dort der Flaschendeckel in leicht geöffnetem Zustand arretiert.

Diese Arbeitsschritte wurden alle 2 bzw. 3 Tage wiederholt. Dabei wurde der Zellrasen regelmäßig unter dem Mikroskop (Axiovert 40C) betrachtet, um die Dichte des Zellverbandes abzuschätzen. Zu beachten war, dass die Zellen nicht konfluent wurden, da sie dann zu weiterem Wachstum nicht mehr fähig und zum Teil schon vor den eigentlichen Versuchen differenziert waren. War dies der Fall, mussten neue, am

¹ Die TC-75-Flaschen verfügen über einen speziellen Verschlussmechanismus, der es ermöglicht, den Deckel in einem leicht geöffneten Zustand einrasten zu lassen, um den Gasaustausch zu verbessern.

besten junge Passagen von Zellen, die in Flüssigstickstoff eingefroren waren, aufgetaut werden.

4.2.3 Passagieren der 3T3-L1-Zellen

Wie oben erwähnt, war es wichtig, dass die Zellen nicht konfluent wurden und damit ihre Fähigkeit zur Mitose verloren. Die Zellen mussten daher regelmäßig, bevor ein kontinuierlicher Zellverband entstanden war, enzymatisch vom Flaschenboden abgelöst und auf neue Flaschen verteilt werden („Passagieren“).

- Vor dem eigentlichen Beginn der Arbeit wurde das Enzym Trypsin (Invitrogen), das im Gefrierschrank (-30°C) aufbewahrt wurde, aufgetaut. Dieses Enzym sollte später den Zellverband auflösen. Zusammen mit NCS-Medium wurde Trypsin im Brutschrank aufgewärmt.
- Die aufgewärmte Enzymsuspension, das aufgewärmte NCS-Medium und eine HBSS-Lösung (GIBCO) wurden dann, wenn letztere nicht unter der Flow gelagert wurde, steril unter die Werkbank gegeben.
- Als Nächstes wurde das alte Medium abgesaugt, wobei wie bei den folgenden Arbeitsschritten die Pasteurpipette zuerst abgeflammt wurde.
- Um die Enzymwirkung des Trypsins zu verbessern, wurde jetzt der Zellrasen mit mindestens 3 mL HBSS gewaschen. Auch hier musste, wie bei der Fütterung, die Zugabe des HBSS vorsichtig erfolgen, das heißt die Lösung sollte nicht über den Zellrasen gespült werden.
- Da das zugegebene HBSS lediglich den Zellrasen von dem Medium reinigen sollte, konnte es sofort wieder mit einer Glaspipette abgesaugt werden.
- Jetzt erfolgte die Zugabe von Trypsin. Um den Flaschenboden der TC-75-Flasche vollständig mit der Enzymsuspension zu bedecken, wurden mindestens 3 mL verwendet. Da sich die Zellen unter der Enzymwirkung vom Flaschenboden ablösen sollten, musste nicht zwingend auf eine vorsichtige Zugabe der Trypsinlösung geachtet werden.
- Nach 7 Minuten, während derer das Enzym bei Raumtemperatur einwirkte, wurde durch Zugabe von NCS-Medium in einem gleichen Volumenverhältnis zu Trypsin dessen Wirkung neutralisiert.

- Der Inhalt der Flasche, d. h. die 3 mL Trypsin und die 3 mL NCS, wurde nun wiederholt kräftig über den Flaschenboden gespült. Dazu wurde eine 2mL-Serumpipette (Sarstedt) benutzt.
- Anschließend wurde die Zellsuspension aus der Flasche in ein 15mL-Röhrchen gegeben, welches 8 Minuten bei 1300-1500 rcf zentrifugiert wurde.
- Nach den 8 Minuten wurde das Röhrchen, an dessen Boden mehr oder weniger deutlich ein weißer Niederschlag (Pellet) zu erkennen war, wieder steril unter die Werkbank gestellt.
- Dort wurde der Überstand, d. h. die Trypsinlösung und das NCS-Medium, bis auf das Pellet vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die Zellen, die sich am Boden des Röhrchens abgesetzt hatten, wurden nun mit frischem NCS-Medium resuspendiert, das heißt in dem entsprechenden Medium wieder in Lösung gebracht. Das Volumen wurde genau abgemessen, da es bei der folgenden Zellzählung mit in die Rechnung einging. Waren mehrere 15mL-Röhrchen mit Zellsuspension vorhanden, konnten die Suspensionen der einzelnen Röhrchen, um weitere Arbeitsschritte zu erleichtern, in einem Röhrchen zusammengebracht werden. Dabei wurden die Röhrchen gründlich mit NCS-Medium ausgespült, um den Zellverlust möglichst gering zu halten.
- Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 50 µL der Zellsuspension entnommen und zwischen den Objektträger und die Deckplatte einer Neubauer-Zählkammer² (Neubauer improved) gebracht. Die Zählung erfolgte 3-mal in 4 Großquadraten mit je 1 mm² Fläche und einer Tiefe von 0,1mm, entsprechend einem Volumen von 0,1 µL. Anschließend wurde der Mittelwert der drei Zählungen gebildet und der Wert geviertelt, um die mittlere Zellzahl pro Großquadrat zu erhalten. Das Ergebnis wurde mit 10.000 multipliziert, und man erhielt die Zellzahl pro mL. Um die Zellzahl des gesamten Volumens zu erhalten, wurde mit dem Wert des für die Resuspension der Pellets eingesetzten Volumens multipliziert.

² Der Objektträger wurde mit Atem befeuchtet und anschließend die Deckplatte über die beiden äußeren Stege des Objektträgers von dessen unterem Ende zum oberen Ende vorgeschoben, wodurch das Plättchen fixiert wurde. Da sich die in der Mitte eingravierten Zählnetze 0,1 mm unter dem Niveau der beiden äußeren Stege befanden, ergab sich bei einer Fläche eines Großquadrates von 1 mm² ein Volumen von 0,1 mm³ entsprechend 0,1 µL.

- Für die weitere Anzucht wurden jetzt entsprechend viele Zellen, bzw. das diese Zellzahl enthaltene Volumen, in eine neue mit 9 bzw. 14 mL gefüllte TC-75-Flasche pipettiert, wobei das Volumen für die entsprechende Anzahl von Zellen anhand der Zellzahl rechnerisch ermittelt wurde. Das Medium wurde nicht vor zwei Tagen gewechselt, da sich die Zellen erst im Laufe der nächsten 24 Stunden am Flaschenboden absetzten.
- War noch Zellsuspension übrig geblieben, wurde diese auf beschriftete Kryoröhrchen, die in einem Kühlständer vorgekühlt waren, verteilt. Danach erfolgte die Zugabe von 10% DMSO (Sigma). Die Kryoröhrchen mit der Zellsuspension und dem DMSO wurden zunächst in eine Alufolie gewickelt und über Nacht im Gefrierschrank bei -30°C eingefroren, bevor sie dann entgültig in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

4.2.4 Versuchsansatz

Die bisher beschriebenen Arbeitsschritte dienten der Erhaltung und Vervielfachung der Präadipozyten. Um die eigentlichen Experimente durchführen zu können, mussten die Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät werden. Dabei wurden für einen Versuch insgesamt drei Platten (je eine für den Auswertungstag 0, 2 und 7) benötigt. Auf einer Platte wurden 16 Wells belegt. Die Zellen der ersten vier Wells wurden für die Ermittlung der Zellzahl gebraucht, die Zellen der nächsten vier Wells für das Anfertigen zytologischer Präparate, die Zellen weiterer vier Wells dienten der Ermittlung der Enzymaktivität und Bestimmung der Proteinkonzentration, und die Zellen der letzten vier Wells wurden für mögliche weitere Untersuchungen asserviert. Die zusammengehörenden Wells sollten nach Möglichkeit untereinander liegen, also senkrecht zur Längsachse der Platte, damit immer zwei Kontroll-Wells mit zwei Expositions-Wells verglichen werden können. Dies war wichtig, da man, wie in anderen Versuchen gezeigt, nicht von vornherein gleichmäßige Wachstumsbedingungen über eine Platte garantieren kann.

- Wie oben beschrieben, wurden die Zellen in den TC-75-Flaschen zunächst passagiert und gezählt. Da relativ viele Zellen für den Versuch benötigt wurden – ca. 20.000 pro Well – musste das Anziehen der Zellen in mehreren Flaschen erfolgen. Dabei erweisen sich 10 Flaschen für zwei Versuche als ausreichend.

- Die nötige Anzahl der Zellen für drei 24-Well-Platten wurde rechnerisch ermittelt. Dabei wurde die Anzahl der Wells – mindestens 48 Wells für einen Versuch – mit der Zahl der Zellen in einem Well multipliziert. Aufgrund des Volumenverlustes beim Pipettieren wurde allerdings mit mehr Wells gerechnet.
- Das Volumen der Zellsuspension mit der darin befindlichen Anzahl der für einen Versuch nötigen Zellen wurde nun mit NCS-Medium verdünnt. Pro Well wurden 500 μ L Volumen eingesetzt, d. h. es wurden mindestens 24 mL NCS-Medium abzüglich des errechneten Volumens der Zellsuspension benötigt.
- Zuletzt wurden die einzelnen Wells der drei oder mehr Platten belegt, nachdem zuvor auf jeder Platte in vier Wells kleine runde Kunststoffplättchen für das Anfertigen zytologischer Präparate gegeben worden waren.
- Die Platten wurden anschließend in den Brutschrank gelegt. Die Zellen benötigten einige Zeit (bei 20.000 Zellen etwa 5 oder 6 Tage), bis sie zu einem kontinuierlichen Zellverband zusammengewachsen waren. Die Zugabe des Differenzierungscocktails (s. u.) erfolgte erst 2 Tage postkonfluent, also am Tag 7 bzw. 8. Zwischen der Aussaat in die Wells und dem Auswertungstag 0 brauchten die Zellen nur einmal mit 500 μ L NCS-Medium pro Well gefüttert werden, so dass sich zuletzt 1 mL Medium in einem Well befand. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht zu lange konfluent blieben, ohne dass die Differenzierung der Zellen durch den Differenzierungscocktail eingeleitet wurde, da zum einen ab einer bestimmten Zellzahl ein Einfluss der Expositionen auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen aufgrund eines Proliferationsstopps nicht mehr festzustellen war und zum anderen die Zellen teilweise schon spontan differenzierten.

4.3 Auswertungen

4.3.1 Behandlung der Zellen ab Cocktailgabe (Tag 0)

In den konfluenten Kulturen der Präadipozyten wurde durch Zugabe von Insulin (Sigma), IBMX (Sigma) und Dexamethason (Sigma) über 2 Tage deren Differenzierung künstlich eingeleitet. Die Endkonzentration in einem Well mit 2 mL Volumen betrug für IBMX 0,5 mM, für Dexamethason 1 μ M und für Insulin 10 μ g/mL.

Da der Cocktail zuletzt 1:2 verdünnt wurde (500 μ L NCS-Medium + 1 mL Cocktail + 500 μ L CSE/DMEM/Nikotin), wurde er in doppelter Konzentration angesetzt. Aus Gründen der Ökonomie wurden IBMX und Dexamethason als Lösungen aliquotiert und eingefroren, um sie bei Bedarf nicht erst ansetzen zu müssen. Dabei wurde IBMX in einer Konzentration von 0,5 M in DMSO und Dexamethason in einer Konzentration von 10 mM in Ethanol gelöst. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

- Insgesamt wurden für einen Versuch mit drei Auswertungstagen (Tag 0, 2, 7) bei einer Belegung von 16 Wells pro Platte mindestens 32 mL Cocktail benötigt. Die Auswertung einer der drei Platten erfolgte ohne Cocktail-Gabe (Tag 0), um die Ausgangslage festzustellen. Da, wie oben erwähnt, die Reagenzien für den Differenzierungscocktail in doppelter Konzentration benötigt wurden, ergab sich bei einer Konzentration von 1 mM für IBMX (entsprechend einer Menge von 50 μ mol für 50 mL Gesamtvolumen) ein Teilvolumen von 100 μ L. Für Dexamethason ergab sich bei einer Konzentration von 2 μ M (entsprechend einer Stoffmenge von 0,1 μ mol für 50 mL Gesamtvolumen) ein Teilvolumen von 10 μ L. Diese Teilvolumina von 100 μ L bzw. 10 μ L wurden zusammen mit 100 μ L Insulin 49,79 mL FCS-Medium zugegeben. Bei den NAC-Versuchen wurde vor der Exposition der gesamten Versuchsplatte gegenüber CSE die Hälfte der Wells mit N-Acetylcystein (Sigma) in einer Endkonzentration von 1 mM inkubiert. Das NAC wurde in 20 mL Differenzierungscocktail gelöst, mit diesem steril filtriert und auf die Zellen gegeben.
- Bevor der Differenzierungscocktail auf die Zellen gegeben wurde, wurde er steril filtriert. Dabei wurde mit einer 20mL-Spritze (BD Discardit™) die Flüssigkeit aufgesaugt und durch einen Spritzenvorsatzfilter (European) in ein frisches 50mL-Röhrchen gedrückt. Des Weiteren wurden aus jedem Well der Versuchsplatten 500 μ L Nährmedium (NCS-Medium) entnommen und verworfen, so dass sich zuletzt nur noch 500 μ L Medium in jedem Well befanden.
- Auf diese 500 μ L Medium wurde dann vorsichtig mit einer sterilen 1,5mL-Transferpipette (Sarstedt) 1 mL Differenzierungscocktail getropft. Bei den NAC-Versuchen wurden 8 Wells pro Platte mit unbehandeltem und die

anderen 8 Wells mit NAC-haltigem Differenzierungscocktail versehen. Sodann wurden die Platten mit den 1,5 mL pro Well für 3 Stunden in den Brutschrank gestellt. In dieser Zeit konnte die Auswertung für Tag 0 begonnen werden (s.u.).

- Nach 3 Stunden erfolgte die Exposition der Platten. In einer der Versuchsreihen wurde die Wirkung durch CSE auf die Zellen verglichen mit der Wirkung von CSE nach Vorinkubation mit NAC, das zusammen mit dem Differenzierungscocktail appliziert wurde. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Wirkung von Nikotin auf die Zellen untersucht. Als Kontrolle diente hier die Exposition gegenüber Kulturmedium.
 - Nikotin wurde in einer Endkonzentration von 10 µg/mL, entsprechend 60 µM zugegeben. Dies entsprach der Nikotinkonzentration eines 5%-igen standardisierten Zigarettenrauchextraktes (CSE). Da am Tag 0 das zugefügte Volumen (500 µL) des exponierten Mediums (FCS) nur ein Viertel des Gesamtvolumens (2 mL) im Well betrug, musste für den entsprechenden Tag Nikotin bzw. CSE auch in 4-facher Konzentration angesetzt werden. Für den Tag 0 wurde daher 1 µL Nikotin in einer Konzentration von 400 mg/mL mit 10 mL FCS-Medium verdünnt, entsprechend einer 1:10000-Verdünnung, woraus sich die für diesen Tag nötige 4-fache Konzentration von 40 µg/mL ergab. Diese Lösung wurde anschließend steril filtriert, bevor sie unter sterilen Bedingungen vorsichtig auf die Zellen getropft wurde. An den Tagen 2 bis 7, an denen die Entwicklung der Zellkulturen beobachtet wurde, wurden die Kulturen jeden zweiten Tag mit frischem FCS-Medium bzw. Expositionsmedium versorgt. Dazu wurde aus jedem Well 1 mL Medium entnommen, um dann vorsichtig 1 mL frisches Medium mit einer sterilen 1,5ml-Transferpipette zuzugeben. An diesen Tagen wurde 1 µL Nikotin in einer Konzentration von 400 mg/mL in 2 mL FCS-Medium pipettiert, entsprechend einer 1:2000-Verdünnung. Anschließend wurde diese Lösung wieder steril filtriert. 0,5 mL dieser sterilen Nikotin-Lösung wurden dann 9,5 mL FCS-Medium zugegeben. Dies entsprach einer weiteren Verdünnung von 1:20, so dass die gewünschte Endkonzentration von 10 µg/mL bzw. 60 µM erhalten blieb.

In den Kontroll-Wells wurden die Zellen gegenüber reinem FCS-Medium exponiert.

- Bei den NAC-Versuchen wurden nach 3 Stunden, während derer N-Acetylcystein von den Zellen metabolisiert werden konnte, alle Wells der zwei Platten (Tag 2, 7) mit 20% CSE versetzt. Auch hier wurde das Expositionsmedium 1:4 verdünnt, so dass sich in jedem Well eine Endkonzentration von 5% CSE befand. Die Zellkulturen wurden nun alle zwei Tage mit frischem FCS-Medium, dem 5% CSE beigefügt wurde, versorgt. Da der Hälfte der Wells am Tag 0 N-Acetylcystein in einer Konzentration von 2 mM zugefügt worden war, so dass sich bei einer 1:2-Verdünnung eine Endkonzentration von 1 mM ergab, wurde, um diese Konzentration aufrecht zu erhalten, auch in den weiteren Tagen, an denen die Zellen gefüttert wurden, in dem FCS-Medium N-Acetylcystein in einer Konzentration von 1 mM gelöst und dieser Lösung 5% CSE zugesetzt. Diese Lösung wurde steril filtriert, bevor sie in die entsprechenden Wells gegeben wurde. Die Fütterung erfolgte wie bei den Nikotin-Versuchen, indem erst 1 mL des alten Mediums aus den Wells genommen und anschließend 1 mL des frisch angesetzten Mediums mit einer sterilen 1,5mL-Transferpipette in die Wells getropft wurde.
- Nach der Exposition wurden die Platten wieder in den Brutschrank gestellt. Unter unveränderten Bedingungen wurde die Entwicklung der Zellen bis zum Auswertungstag 7 beobachtet.

4.3.2 Zellernte an den Auswertungstagen 0, 2 und 7

Die Zellen wurden über eine Woche in ihrer Entwicklung beobachtet. An den Tagen 0, 2 und 7 (für jeden Auswertungstag eine Platte mit einer Belegung von 16 Wells pro Platte) wurden die Zellen aus ihren Wells genommen und durchliefen je nach Verwendungszweck das nachfolgend beschriebene Procedere. Insgesamt wurden 16 Wells belegt. Davon wurden 4 benötigt für die Zellzählung, die nächsten 4 für das Anfertigen zytologischer Präparate, weitere 4 für die photometrische Bestimmung der GPDH-Aktivität und der Proteinkonzentration, sowie die letzten 4 Wells für mögliche spätere Analysen der Genexpression. Dabei dienten immer zwei Wells als Kontrolle,

wobei die Zellen hier mit FCS-Medium bzw. CSE+NAC behandelt worden waren, während die anderen beiden Wells Zellen beinhalteten, die gegenüber Nikotin bzw. CSE exponiert wurden. Die einzelnen Arbeitsschritte werden nachfolgend beschrieben. Die Zellen wurden am jeweiligen Auswertungstag nicht steril behandelt, da sie nicht weiter benötigt wurden.

- Die für die Zellzählung bestimmten Zellen wurden einmal mit HBSS gewaschen, nachdem das Medium entfernt worden war. Die Lösung wurde vorsichtig über den Rand des Wells auf die Zellen gebracht, wobei durch das Aufstellen der Platte eine Beschädigung des Zellrasens vermieden werden konnte. Während in drei Wells das HBSS zunächst noch nicht entfernt wurde, konnte aus einem Well die Lösung vorsichtig herausgesaugt und der Zellverband anschließend mit 400 μ L Trypsin aufgelöst werden. Nach 8 Minuten Einwirkzeit wurden auf das Trypsin 400 μ L Trypanblau (Fluka) gegeben und die Lösung gut durchgemischt. Trypanblau akkumuliert sich bei toten oder geschädigten Zellen im Zytoplasma, so dass diese Zellen visuell von den lebenden bzw. ungeschädigten (vitalen) unterschieden werden konnten. Gezählt wurden mit Hilfe des Mikroskops (Leitz LaborLuxS) alle sich in der Neubauer-Zählkammer befindlichen Zellen, sowohl die Trypanblau-positiven als auch die Trypanblau-negativen Zellen. Die Absolutzahl der Zellen in einem Well errechnete sich aus der gemittelten Zellzahl der drei Zählungen multipliziert mit 2.000. Letzterer Wert kam wie folgt zustande: Mittelwert/4 (Zellzahl für ein Großquadrat) multipliziert mit 10.000 (Zellzahl in einem Milliliter) und 0,8 (Absolutzellzahl bei einem Volumen von 800 μ L). Auf diese Weise wurden die Zellen in den vier Wells nacheinander gezählt.
- Die nächsten vier Wells enthielten die Kunststoffplättchen (Sarstedt) zum Anfertigen zytologischer Präparate. Zunächst erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS (GIBCO), wobei auch hier die Lösung vorsichtig über den Rand des Wells auf die Zellen geträpelt wurde. PBS, das als 10-fach Konzentrat geliefert wurde, wurde vor Gebrauch mit Aqua dest. (Braun) in einem Mischungsverhältnis von PBS/Aqua dest. 1:10 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen über mindestens 1,5 Stunden in Formaldehydlösung (Roth) gebadet, um sie auf dem Kunststoffplättchen zu fixieren. Wichtig dabei war, dass die Zellen immer vollständig von der Lösung bedeckt waren. Nach der

Mindestzeit von 1,5 Stunden wurde die Formaldehydlösung aus den Wells entfernt und die Zellen zweimal vorsichtig mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurde für 15 Minuten 500 µL Ölrot-Farbstoff (0,36% Ölrot (Sigma) in 60% Isopropanol (Merck)) auf die Plättchen aufgebracht; der Farbstoff war vorher mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters gereinigt worden. Dadurch kam es zur Anfärbung der Lipidtröpfchen in den Zellen, deren Dichte sodann mittels Bildverarbeitung (s. u.) bestimmt wurde. Nach Entfernen des Farbstoffes wurden die Zellen dreimal mit Aqua dest. gewaschen, da eine Verunreinigung des Präparates zu falschen Ergebnissen in der Auswertung geführt hätte. Sodann wurden die Plättchen aus ihren Wells genommen und in Aquatex (Merck), das zuvor auf den Objektträger (Paul Marienfeld GmbH) gebracht wurde, eingebettet und mit einem Deckplättchen (IDL) versiegelt. Dadurch konnte das Präparat gelagert werden, da sich die Färbung als über einen längeren Zeitraum stabil erwiesen hatte.

- Zur Bestimmung der Glycerol-3-phosphatdehydrogenase-(GPDH)-Aktivität – eines für Adipozyten spezifischen Enzyms – sowie der Proteinkonzentration, die wie die Zellzahl als Bezugsgröße hinsichtlich der Anzahl der Zellen bzw. ihres Volumens fungierte, dienten die Zellen der weiteren vier Wells. Dabei wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Auch hier war Vorsicht angebracht, um eine Zerstörung des Zellrasens zu vermeiden. Im Anschluss an das Waschen wurden in jedes Well 500 µL einer mit β -Mercaptoethanol (1 mM; Fluka) versehenen Homogenisierungslösung³ (homogenization solution) pipettiert. Der Zellrasen wurde nun mit einem Zellschaber (Sarstedt) vom Plattenboden gelöst. Dadurch kam es unter anderem zur Freisetzung der Proteine, die mit Hilfe der Homogenisierungslösung konserviert wurden. Der gesamte Inhalt des Wells wurde nach sorgfältigem Durchmischen in ein beschriftetes 1,7mL-Reaktionsgefäß (Roth) gegeben und bei -30°C gelagert.
- Die Zellen der letzten vier Wells wurden asserviert, vor allem für mögliche spätere Analysen der Genexpression, und zu diesem Zweck mit einem die

³ Die für den Enzymassay verwendete Homogenisierungslösung (homogenization solution) konnte bei +5-+8 °C über einen längeren Zeitraum gelagert werden, da die Inhaltsstoffe (siehe „Herstellung der Homogenisierungslösung“) bis auf β -Mercaptoethanol, das erst für den eigentlichen Gebrauch der Lösung in einer Konzentration von 1 mM dem jeweils benötigten Volumen dieser Ursprungslösung zugefügt wurde, stabil blieben.

RNA stabilisierenden Puffer versetzt. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Zugabe von PBS erfolgte hier, wie bei allen anderen Waschvorgängen auch, über den Rand des Wells. Hierdurch konnte eine Zerstörung des Zellrasens vermieden werden, denn diese hätte beim Entfernen der Waschlösung unvermeidlich zu einem Verlust von Zellen geführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 350 μL RLT-Puffer (Qiagen). Die Zellen wurden dann mittels Zellschaber vom Boden des Wells gelöst. Die Zerstörung der Zellen führte zur Freisetzung der RNA, die mit Hilfe des Puffers konserviert wurden. Nach sorgfältigem Durchmischen der Lösung wurde der gesamte Inhalt eines Wells in ein beschriftetes Kryoröhrchen pipettiert und in der flüssigen Phase des Stickstoffs eingefroren.

Bis auf die Zellzählung waren diese Arbeitsschritte die Vorbereitung auf die eigentliche Auswertung der weiteren Messgrößen, die im Folgenden beschrieben wird.

4.3.3 Bestimmung der Aktivität der Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase

Die quantitative Bestimmung der Glycerol-3-phosphatdehydrogenase-Aktivität erfolgte mittels Photometrie⁴ (DrLange LP700). Dabei wurde bei einer Wellenlänge λ von 340 nm die Abnahme der NADH/H⁺-Konzentration erfasst. Das Reduktionsäquivalent NADH/H⁺ dient als Wasserstoffdonator⁵ bei der Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu α -Glycerophosphat und wird dabei selbst zu NAD⁺ oxidiert. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

- Die an den drei Auswertungstagen eingefrorenen Proben in den 1,7mL-Reaktionsgefäßen wurden aufgetaut.
- Nach kurzem Durchmischen mit einem Minishaker (MS1) wurden die Zellsuspensionen bei 4°C und 10.000 rpm für 5 Minuten in einer

⁴ NAD⁺ und NADH/H⁺ besitzen bei 340 nm unterschiedliche Absorptionseigenschaften. Eine Änderung der Absorption bei dieser Wellenlänge spricht daher ausschließlich für eine Änderung der NADH/H⁺-Konzentration, da NAD⁺ diesen Lichtstrahl nicht absorbiert und so keine Extinktion erfolgt.

⁵ Bei der Oxidation von NADH/H⁺ liefert dieses allerdings nur ein Wasserstoffatom, welches 2e⁻ trägt (Hybrid-Ion/H-Ion). Das benötigte zweite Wasserstoffatom wird in Form eines Protons dem wässrigen Milieu entnommen. Dieser Tatsache wurde bei der Herstellung der Reaktionslösung (siehe „Herstellung der Reaktionslösung“) und der Homogenisierungslösung (siehe „Herstellung der Homogenisierungslösung“) Rechnung getragen.

Kühlzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Folglich kam es zu einer Auftrennung der Lösungsbestandteile in Abhängigkeit von ihrer Dichte. Dabei bildete sich am Boden des Reaktionsgefäßes ein weißer Niederschlag, hervorgerufen durch Zelltrümmer. Den mengenmäßig größten Anteil bildete eine klare, homogene Flüssigkeit aus zytosolischen Bestandteilen, darunter die Glycerol-3-phosphatdehydrogenase. Zuerst war eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Lipidschicht zu erkennen.

- Der klaren Flüssigkeit wurden 320 μL entnommen und in ein 1,7mL-Reaktionsgefäß gegeben. 100 μL davon wurden, nachdem sie in ein weiteres 1,7mL-Reaktionsgefäß pipettiert worden waren, zur Bestimmung der Proteinkonzentration wieder eingefroren, während die anderen 220 μL der Bestimmung der Enzymaktivität dienten.
- Im Anschluss daran wurden die für die GPDH-Messung notwendigen Arbeitslösungen vorbereitet:
 - Ein für die Messung nötiges Volumen (75 μL Lösung pro Reaktionsgefäß bzw. Küvette) wurde der ursprünglichen, lagerungsstabilen Homogenisierungslösung (homogenization solution) (siehe „Herstellung der Homogenisierungslösung“) entnommen und mit 1 mM β -Mercaptoethanol vermischt.
 - In gleicher Weise wurde in einem nächsten Schritt ein für die Messung notwendiges Volumen (90 μL pro Reaktionsgefäß bzw. Küvette) aus der lagerungsstabilen Reaktionslösung (siehe „Herstellung der Reaktionslösung“) genommen und anschließend mit 0,1 mM β -Mercaptoethanol und 334 μM NADH versehen⁶.
 - Zuletzt erfolgte die Herstellung der Substrat-Lösung. Dabei wurden 4 mM Dihydroxyacetonphosphat in Aqua dest. gelöst.
- Für die GPDH-Messung wurden jetzt in einer Küvette (Brandt) die einzelnen Teilvolumina der verschiedenen Reagenzien zusammengebracht. Dabei wurden in nachstehender Reihenfolge folgende Volumina benötigt: 75 μL

⁶ Die genauen Maßzahlen waren: 949,3 μL Reaktions-Ursprungslösung + 50 μL einer 6680 μL NADH-Lösung (bestehend aus 2,37 mg NADH-Feststoff gelöst in 500 μL Reaktions-Ursprungslösung) + 0,7 μL einer β -Mercaptoethanol-Verdünnung (1:100-Verdünnung: 1 μL β -Mercaptoethanol in 99 μL H_2O).

Homogenisierungslösung + 90 µL der NADH beinhaltenden Reaktionslösung + 25 µL der das Enzym enthaltenden Probe (entsprechend einer 1:8-Verdünnung bezogen auf das Gesamtvolumen). Die Küvette wurde im Anschluss daran für 10 Minuten in dem Küvettenhalter des Photometers auf 37°C erwärmt.

- Zum Versuchsstart wurden nach diesen 10 Minuten 10 µL der Dihydroxyacetonphosphat-Lösung zugegeben. Dies erfolgte zügig und unter guter Durchmischung des Küvetteninhaltes.
- 20 Minuten lang wurde nun minütlich die Extinktion, also die Abnahme der NADH-Konzentration entsprechend der Enzymaktivität, registriert.

Die mittlere Enzymaktivität $\left(\frac{\Delta c}{\text{min} \times \text{mL}}\right)$ wurde gemäß folgender Formel berechnet:

$$\frac{\Delta c}{\text{min} \times \text{mL}} = \frac{\Delta E \times f}{\text{min} \times \epsilon \times 1 \text{ cm} \times 0,2 \text{ mL}}$$

Einheit: $\left[\frac{\Delta c}{\text{min} \times \text{mL}} = \frac{\text{mM} \times \text{cm}}{\text{min} \times \text{mL} \times \text{cm}} = \frac{\text{mM} \times \text{cm}}{\text{min} \times \text{mL}} = \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right]$

Dabei ist:

$f = \text{Verdünnungsfaktor} \left(\frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{Probevolumen}} \right)$

$\epsilon = \text{Extinktionskoeffizient; für NADH bei einer Wellenlänge von 340nm:} \left(\frac{6,3}{\text{mM} \times \text{cm}} \right)$

$\frac{\Delta E}{\text{min}} = \text{gemessene mittlere Extinktionsänderung}$

1 cm = Schichtdicke der Küvette

0,2mL = Gesamtvolumen in der Küvette

4.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Verfahrens nach Bradford

Wie die Zellzahl diente auch die Proteinkonzentration (ausgedrückt als µg pro 100 µL) als Bezugsgröße für die Enzymaktivität. Mit Hilfe der Proteinkonzentration konnten somit die Enzymaktivitäten als Ausdruck der Fähigkeit zur Differenzierung sowohl der Kontroll- als auch der Expositions-Wells miteinander verglichen werden.

Zudem lieferte die Proteinkonzentration bezogen auf die Anzahl der Zellen ein weiteres Maß für die Proliferation und metabolische Aktivität der exponierten Zellen verglichen mit der Kontrolle. Bevor die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration begonnen werden konnte, waren einige Vorbereitungen erforderlich:

- Als erstes wurden in einem 10mL-Messkolben 100 mg Albumin-Flocken (Roth) abgewogen. Der Messkolben (Brandt) mit den Proteinen wurde anschließend mit Aqua dest. bis zu einer vorgegebenen Markierung entsprechend 10 mL aufgefüllt⁷. Damit ergab sich eine Konzentration von 10 mg/mL. Ein Schäumen dieser Stockstandardlösung bei unvorsichtiger Zugabe von Aqua dest. hätte zur Folge gehabt, dass ein genaues Auffüllen bis zur 10mL-Markierung nicht möglich gewesen wäre, was sich bei all den Versuchen in einer starken Schwankung in der Steigung der Eichkurve – als Maß für die Proteinkonzentration – niedergeschlagen hätte. Um diese zusätzliche Fehlerquelle zu vermeiden, wurde Aqua dest. sehr vorsichtig über den Rand des Messkolbens zugefügt.
- Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt. Nach Anfärben der Proben mit einem für Proteine spezifischen Farbstoff konnte mit Hilfe eines Photometers (Shimadzu UV-1602) eine Eichkurve erstellt werden, die als Vorlage für die Proteinbestimmung der Kontroll- bzw. Expositionsproben diente. Entsprechend untenstehender Tabelle (Tab. 4.3.1) wurden neun 1,7mL-Reaktionsgefäße mit den jeweiligen Teilvolumina fertiggestellt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurde für die Proben 4-9 die Proteinlösung aus dem Messkolben genommen, während den Proben 1-3 entsprechende Volumina der Proteinlösung aus der bereits vollständig verdünnten Proben-Nummer 7 zugefügt wurden. Wie schon bei der Bestimmung der Enzymaktivität, wurde der Homogenisierungslösung das notwendige Volumen entnommen und mit 1 mM β -Mercaptoethanol vermengt (siehe auch „Herstellung der Homogenisierungslösung“). Nachdem alles zusammengemischt wurde, ergab sich für jedes Reaktionsgefäß ein Gesamtvolumen von 1 mL mit einer für jede

⁷ Da die Albumin-Flocken ein gewisses Volumen einnahmen, konnte der Messkolben nicht einfach mit 10 mL Aqua dest. gefüllt werden. Dies hätte zu einem falsch niedrigen Wert der Proteinkonzentration geführt.

Standardprobe bestimmten Standardkonzentration (Spalte ganz rechts der Tabelle). Die Homogenisierungslösung, wie sie auch in den Kontroll- bzw. Expositionsproben enthalten war, wurde zugegeben, um eine mögliche Verfälschung der Proteinbestimmung durch diese Komponente zu vermeiden, da Vorversuche eine Querempfindlichkeit gezeigt hatten.

ProbenNr.	Stock-Standard µL	Standard- verdünnung Nr.7; µL	Homogeni- sierungslsg (Arbeitslsg) µL	Aqua dest. µL	Verdünnungs- faktor f	erhaltene Konzentration µg/100µL
9	20		200	780	50	20
8	16		200	784	62,5	16
7	10		200	790	100	10
6	5		200	795	200	5
5	4		200	796	250	4
4	2		200	798	500	2
3		100	200	700	10	1
2		50	200	750	20	0,5
1		10	200	790	100	0,1
0			200	800		Leerwert

Tabelle 4.3.1: Verdünnungsreihe der Proteinlösung mit bekannten Konzentrationen.

- Bevor nun die Arbeit am Photometer begonnen werden konnte, musste der für die Proteinfärbung notwendige Farbstoff (Roti-Nanoquant) (Roth) 1:4 verdünnt werden, da er als 5-fach-Konzentrat bei +4 bis +8 °C gelagert wurde. Dabei wurde 1 Teil des Farbstoffes mit 4 Teilen Aqua dest. verdünnt. Insgesamt wurden 400 µL dieser Verdünnungslösung pro Küvette benötigt.

Nach diesen Vorbereitungen erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration am Photometer. Da das Photometer in seiner Funktion Tagesschwankungen unterlag, war es notwendig, an jedem Tag, an dem das Photometer benötigt wurde, eine neue Eichkurve zu erstellen. Zudem wurde, um möglichst gut vergleichbare Werte zu erhalten, immer ein vollständiger Versuch – also sowohl Kontroll-Probe als auch Expositions-Probe – im Anschluss an das Erstellen einer Eichkurve gemessen. In der Zeit, in der die Eichkurve mit den Verdünnungsproben erstellt wurde, wurden die Proben (100 µL) aufgetaut. Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten sowohl für die Verdünnungsproben als auch für die zu untersuchenden Proben.

- Nach Beschriftung aller Küvetten, wurden in jede Küvette entsprechend aufgeführter Reihenfolge 80 μL Aqua dest., 20 μL der jeweiligen Probe und zuletzt 400 μL Roti-Nanoquant-Lösung gegeben. Um einen Verlust der Proteine durch das Pipettieren möglichst gering zu halten, wurde die Proteinlösung sehr sorgfältig in das Aqua dest. gespült. Ebenso wurde auch der Farbstoff, um eine homogene Lösung zu erreichen und damit die Photometrie zu erleichtern, durch mehrmaliges Einspülen in die Küvette zugegeben. Je höher die Proteinkonzentration in der Küvette war, umso stärker war der Farbumschlag zu blau.
- Bevor die einzelnen Proben auf ihre Absorptionseigenschaft gemessen wurden, musste das Photometer noch kalibriert werden. Dazu wurde in beide Küvettenhalter je eine Küvette mit Aqua dest. gestellt und das Gerät durch entsprechenden Knopfdruck geeicht.
- Während jetzt eine der beiden Küvetten aus ihrem Halter entfernt wurde, wurde die andere Küvette mit Aqua dest. belassen und diente als Referenzküvette bei der Messung der verschiedenen Proben.
- Der Reihe nach wurden die einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 590 nm und anschließend von 450 nm durchgemessen.
- Die Werte wurden in eine Excel-Tabelle eingetragen und anschließend der Quotient aus den Signalen bei den Wellenlängen 590 nm und 450 nm berechnet. Letzterer wurde in einem Koordinatensystem gegen die Proteinkonzentration aufgetragen, so dass sich in Abhängigkeit der Pipettiergenauigkeit folgende Gerade ergab.

Bradford-Standardkurve				
Stand.-Nr.	Stand.-Konz.	Messung	Messung	Qu. 590/450
	$\mu\text{g}/100\mu\text{L}$	590 nm	450 nm	
0	0	0,3279	0,6274	0,5226
1	0,1	0,3390	0,6346	0,5342
2	0,5	0,3452	0,6284	0,5493
3	1	0,3517	0,6199	0,5673
4	2	0,3577	0,6069	0,5894
5	4	0,3779	0,5887	0,6419
6	5	0,4078	0,5952	0,6851
7	10	0,4967	0,5673	0,8756
8	16	0,5619	0,5341	1,0521
9	20	0,5861	0,4871	1,2032

Tabelle 4.3.2: Die Tabelle zeigt die bekannten Proteinkonzentrationen (zweite Spalte von links) der Standardlösung, sowie deren Absorptionseigenschaft bei 590 nm und 450 nm. In der Spalte ganz rechts stehen die Zahlenwerte, die sich aus dem Quotient der Absorptionswerte für 590 nm und 450 nm der jeweiligen Proteinlösung ergeben.

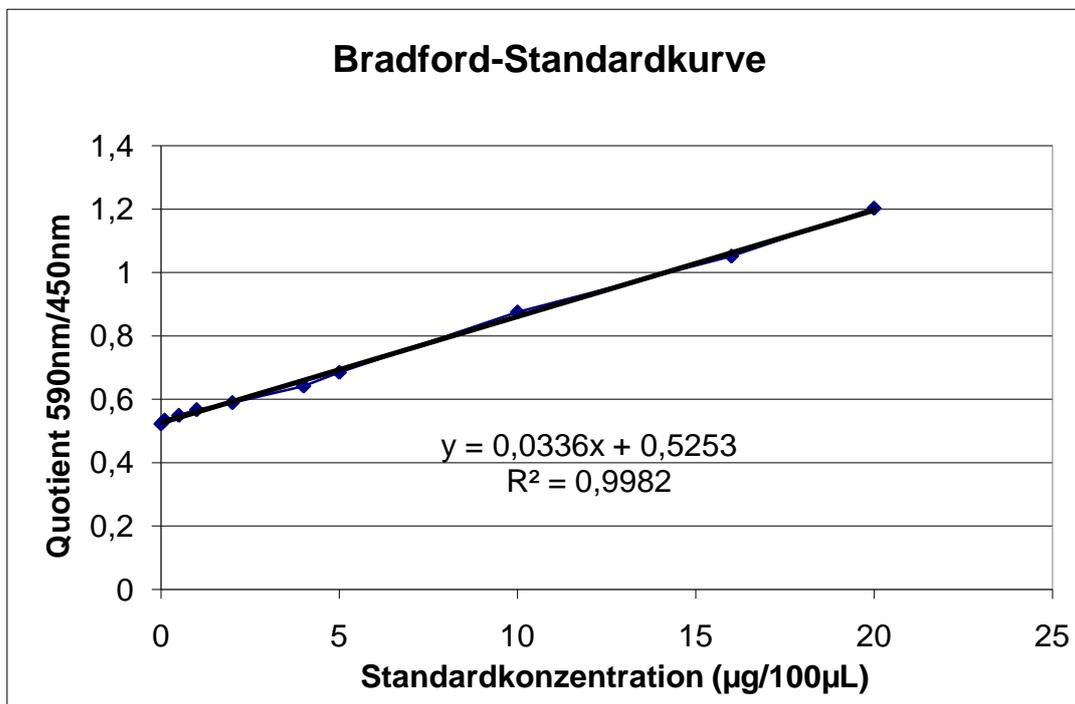


Abbildung 4.3.1: Beispiel einer Eichkurve. Mit Hilfe der Geradengleichung $[y=mx+t]$ konnte durch Freistellung nach x die Proteinkonzentration der zu messenden Proben errechnet werden. Dabei musste zuerst der Quotient aus den Signalen bei 590 nm und 450 nm gebildet und als entsprechender Wert für y eingesetzt werden. Die Konzentration ist in $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ zu verstehen (siehe Tab. 4.3.2)

4.3.5 Bildauswertung der zytologischen Präparate

Mittels Bildauswertung der zytologischen Präparate, die an den Auswertungstagen 0, 2 und 7 angefertigt wurden, wurde die Menge des gespeicherten Lipids bestimmt. Hierbei lieferte der Quotient aus den Werten der Enzymaktivität und der Lipidtröpfchendichte bzw. der Lipidtröpfchendichte und der Zellzahl ein Maß zur Ermittlung der Differenzierung der zu untersuchenden Zellen. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

- Die zytologischen Präparate wurden unter dem Mikroskop (Axiovert 40C) in 20-facher Vergrößerung dargestellt. Zusätzlich konnten mittels eines Hellbildes die rot angefärbten Lipidtröpfchen selektiv dargestellt werden, so dass Störfaktoren, wie Zellbestandteile oder Verunreinigungen, größtenteils ausgeblendet wurden.
- Mit einer digitalen Kamera (Canon Power-Shot A96) wurden über einen entsprechenden Kameraaufsatz (Canon CA-DC52D) bei gegebener Beleuchtungsstärke und Belichtungseinstellung (die für alle Präparate gleich war) an verschiedenen zufällig gewählten Stellen Fotos angefertigt (5 Fotos pro Präparat für Auswertungstag 7, jeweils 3 Fotos pro Präparat für Auswertungstag 0 und 2). Die auf der Kamera gespeicherten Fotos wurden anschließend auf einen Computer übertragen.
- Die Bildauswertung erfolgte mit Hilfe des professionellen Computer-Programms ImageJ (NIH). Jedes einzelne Foto wurde dabei in drei Farbspektren aufgesplittet (RGB-Split für red, green, blue). Die Rot- und Blau-Komponente wurden verworfen, während das Grün-Bild (komplementär zu Rot) weiter verwendet wurde; diese Auswertestrategie hatte sich in einer vorangegangenen Arbeit als die beste herausgestellt [Machata 2009]. In dem Grün-Bild wurde nun ein ovaler, an alle vier Seiten stoßender Bereich abgegrenzt, um die vignettierten Ränder auszublenzen. Alle in diesem Bereich befindlichen Lipidtröpfchen wurden über Dichtewertpixel erfasst. Die Verteilung der Pixelwerte wurde gemäß ihrer Häufigkeit als Histogramm dargestellt. Die zugehörige Datenliste wurde auf ein Excel-Dateiblatt übertragen und die Summe aller Werte von 0-110 (Dichtewerte von 0 bis 255) gebildet. Der hierbei verwandte Cut-off-Wert von 110 war ebenfalls in der vorangegangenen Untersuchung als optimal identifiziert worden.

Auf diese Weise wurde bei jedem Foto in der oben beschriebenen Abfolge der Arbeitsschritte die Gesamtdichte der Lipidtröpfchen bestimmt. Die Werte der pro Präparat zusammengehörigen Fotos wurden für die Endauswertung gemittelt.

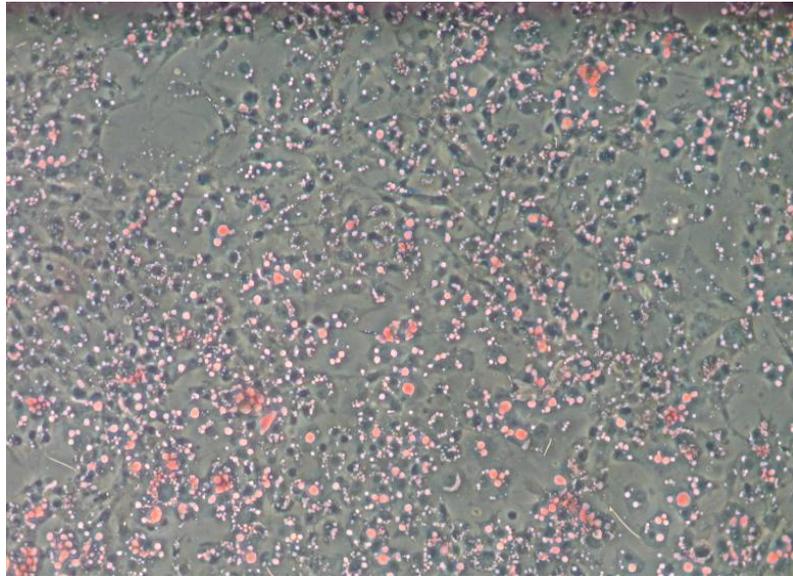


Abbildung 4.3.2: Die Abbildung zeigt einen Zellrasen in 20-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Es handelt sich hierbei um ein Phasenbild der D-MEM-exponierten Kontrollzellen an Tag 7. Die roten Punkte entsprechen intrazellulären Lipidtröpfchen.

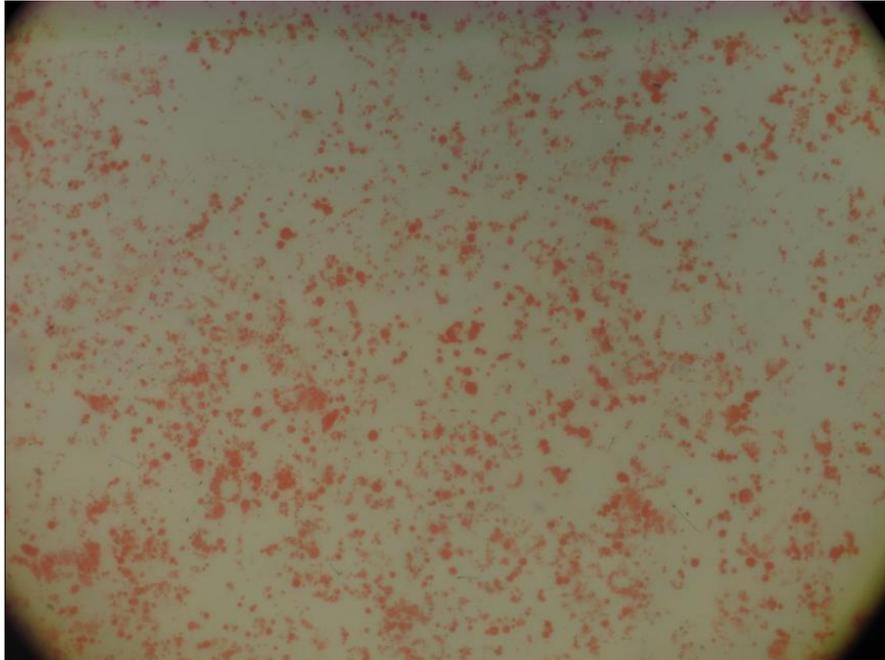


Abbildung 4.3.3: Hellbildaufnahme des gleichen Präpates und Bildausschnitts bei 20-facher Vergrößerung. Die roten Punkte entsprechen den intrazellulären Lipidtröpfchen.

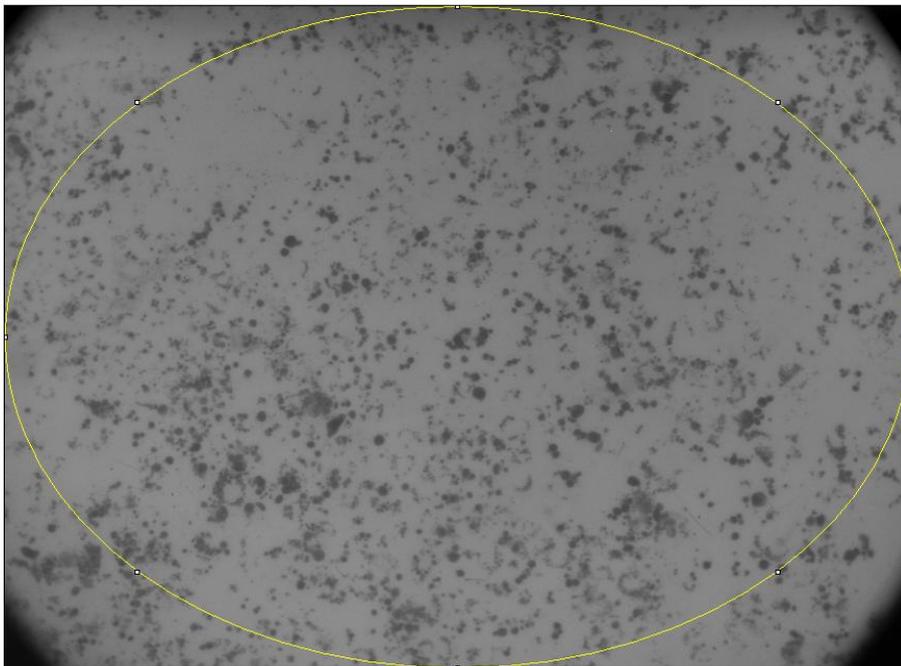
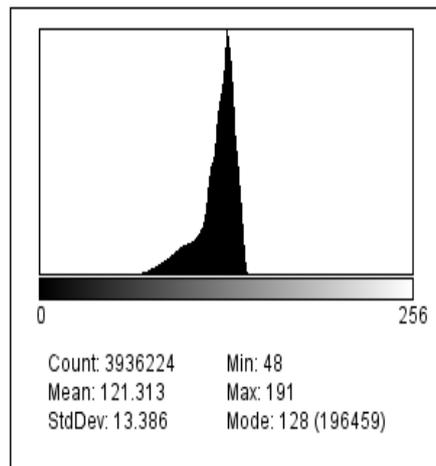


Abbildung 4.3.4: Diese Abbildung zeigt die in ImageJ bearbeitete Aufnahme des Hellbildes der D-MEM-Kontrollen an Tag 7. Das Bild wurde unter RGB-Split in drei Farbkomponenten gesplittet (Grün-, Rot-, Blaubild). Das Grünbild wurde ausgewertet. Das ovale Fenster definiert das Feld (normiertes Bildfeld), in dessen Bereich die Dichteauswertung (als Pixelwerte) der darin befindlichen Lipidtröpfchen erfolgte, um die Randschattierung auszuschließen.



List Copy Log

Abbildung 4.3.5: Wurde obiges Bild auf seine Dichtewerte hin analysiert, ergab sich dieses Histogramm. Es zeigt die Häufigkeitsverteilung der Pixelwerte. Der cut-off-Wert wurde bei 110 gesetzt, d.h. alle Pixelwerte von 0 bis einschließlich 110 wurden im (zu Rot komplementären) Grünbild als Werte von Fetttropfchen gewertet. Anschließend wurde die Summe aller Pixelwerte von 0-110 gebildet. Von jedem Präparat wurden dabei an zufällig gewählten Blickfeldern des Mikroskops Bilder angefertigt und wie beschrieben ausgewertet. Aus den Einzelwerten wurde ein Mittelwert gebildet.

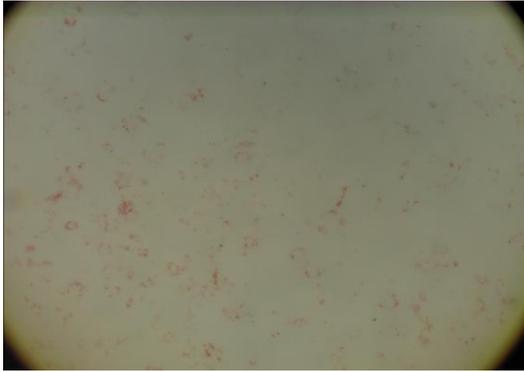


Abbildung 4.3.6: Die Abbildung zeigt die Hellbildaufnahme für den Auswertungstag 2 der D-MEM-Kontrollen. Rot angefärbt sind die intrazellulären Lipidtröpfchen.

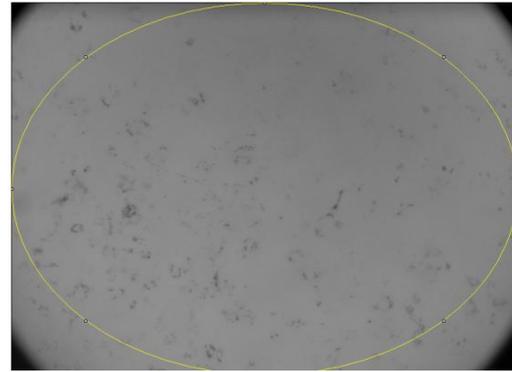


Abbildung 4.3.7: Dargestellt ist hier die in ImageJ bearbeitete Hellbild-aufnahme des nebenstehenden Bildes zur Auswertung des Lipidgehaltes der Zellen der D-MEM-Kontrollen an Tag 2.



Abbildung 4.3.8: Die Abbildung zeigt die Hellbildaufnahme für den Auswertungstag 0 der D-MEM-Kontrollen. Es zeigt sich aufgrund fehlender Anfärbung, dass die Zellen noch kein Lipid eingelagert hatten.

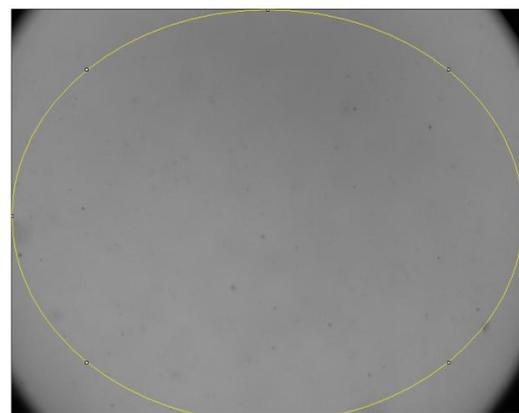


Abbildung 4.3.9: Dargestellt ist hier die in ImageJ bearbeitete Hellbildaufnahme des nebenstehenden Bildes zur Auswertung des Lipidgehaltes der Zellen der D-MEM-Kontrollen an Tag 0.

4.4 Herstellung der Homogenisierungs- und Reaktionslösung

Die Homogenisierungslösung (Homogenization Solution) und der Reaktionsmix (Reaction Mix) konnten zu einem beliebigen Zeitpunkt hergestellt werden. Beide Lösungen wurden im Kühlschrank bei +8°C gelagert. Allerdings waren diese Lösungen bis zu dem Zeitpunkt ihrer Anwendung noch nicht gebrauchsfertig waren, sondern mussten mit unterschiedlichen Substanzen erweitert werden.

Zur Herstellung der Homogenisierungslösung wurden

- 20 mM Tris-Lösung (Sigma) und
- 1 mM EDTA-Pulver (Roth)

in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf einen pH von 7,3 eingestellt. Dies erfolgte mit einem hinreichend genauen pH-Indikatorstäbchen (VWR). Durch Zugabe von Natronlauge (NaOH) (Merck) oder Salzsäure (HCl) (Merck) wurde die Lösung auf den Ziel-pH-Wert eingestellt. Für den Gebrauch wurde diese Lösung noch mit 1 mM β -Mercaptoethanol versehen. Letzteres ist sehr instabil und konnte daher nur kurz vor Gebrauch der Homogenisierungslösung zugefügt werden. Um eine Verunreinigung der Lösung zu vermeiden, wurde der Lösung jeweils nur so viel wie direkt benötigt entnommen.

Der Reaktionsmix wurde wie die Homogenisierungslösung als vorläufige Lösung hergestellt. Dazu wurden

- 0,1 M Triethanolamine (Sigma) mit
- 2,5 mM EDTA

in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf einen pH von 7,7 eingestellt. Vor dem Gebrauch wurden der Lösung 0,1 mM β -Mercaptoethanol und 334 μ M NADH in Pulverform (Sigma) zugegeben. Auch hier wurde aus Gründen der möglichen Verunreinigung nur eine bedarfsgerechte Menge der Gesamtlösung entnommen.

4.5 Herstellung des Zigarettenrauchextraktes (cigarette smoke extract, CSE)

Um die Zellkulturen gegenüber Zigarettenrauchbestandteilen exponieren zu können, mussten diese erst in lösliche Form gebracht werden. Dazu wurde nach folgendem standardisiertem Verfahren vorgegangen:

- In eine Waschflasche (Impinger, DEHA Haan & Wittmer GmbH) mit Fritte wurden 10 mL des D-MEM-Kulturmediums (Gibco) pro Zigarette gegeben.
- Mittels einer motorbetriebenen Probennahmepumpe oder einer Wasserstrahlpumpe wurde in der Waschflasche ein Unterdruck erzeugt.

- Der Unterdruck erzeugte in einem mit der Waschflasche verbundenem Schlauchsystem einen Sog.
- Am Ende des Schlauches wurde eine Zigarette befestigt. Das Abrauchen der Zigarette erfolgte unter einer Werkbank mit Absaugung.
- Die Abrauchgeschwindigkeit der Zigarette, die über den Unterdruck in der Waschflasche reguliert werden konnte, wurde so eingestellt, dass die Zigarette nach 5 Minuten bis kurz vor den Filter abgeraucht war.
- Die löslichen Zigarettenrauchbestandteile wurden auf diese Weise in Medium gebracht. Um standardisierte Bedingungen zu schaffen, wurde mittels Gaschromatographie (Trace GC, Thermo Electron Corporation) der Nikotiningehalt der Lösung bestimmt. Nach diesem Wert richtete sich auch die für die Nikotinversuche verwendete Menge an Nikotin. Die Nikotinkonzentrationen in verschiedenen Abrauchversuchen betragen zwischen 132 und 200 µg pro mL D-MEM-Lösung. Der Mittelwert lag bei 168 µg/mL. Wiederholte Messungen ergeben einen Variationskoeffizienten der Nikotinbestimmung von 8-10%.
- Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden nur Zigaretten einer einzigen Marke verwendet. Zum Einsatz kamen Zigaretten der Marke Gauloise Blondes (nominell Teer 10 mg, Nikotin 0,8 mg).
- Der Zigarettenrauchextrakt wurde unter sterilen Bedingungen mittels Spritzenvorsatzfilter in 1,7mL-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -30°C gelagert. In vorherigen Versuchen war gezeigt worden, dass das Ausmaß der Wirkung des Zigarettenrauchextraktes auf Lungenfibroblasten bei Lagerung unverändert blieben.

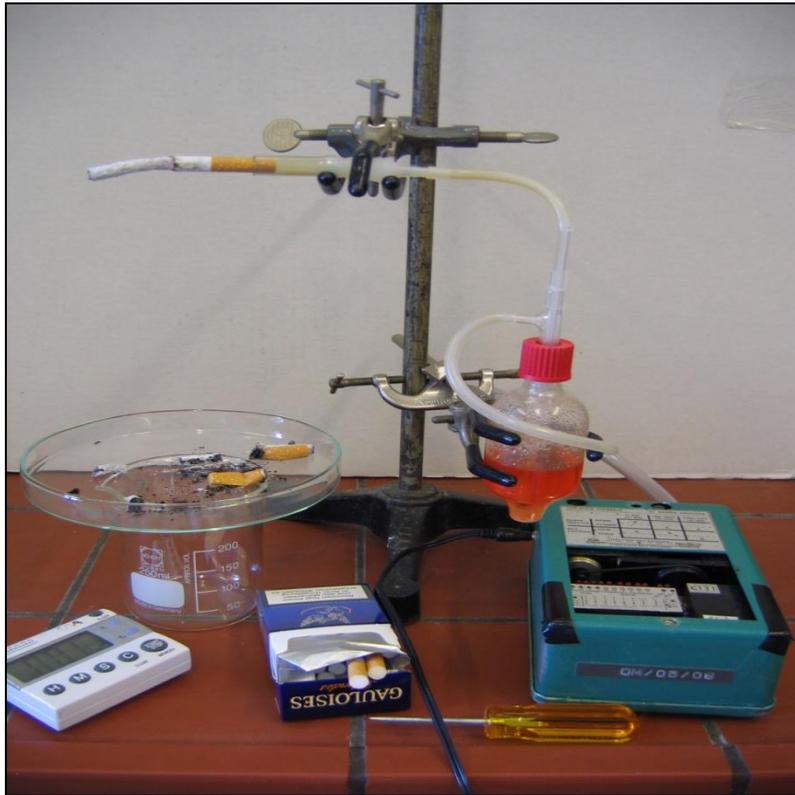


Abbildung 4.5.1: Standardisiertes Verfahren zur Gewinnung von Zigarettenrauchextrakt. Man erkennt die Waschflasche mit 10 mL D-MEM-Lösung pro Zigarette (30 mL insgesamt für 3 Zigaretten in Serie), die mit Hilfe einer Pumpe über ein Schlauchsystem den Zigarettenrauch aufnahm und in Lösung brachte.

4.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden primär mittels Mehrweg-Varianzanalyse ausgewertet. Hierbei fungierte die Exposition als übergeordnete kategoriale Variable, der die Versuchstage 0, 2 und 7 als Messwiederholungen untergeordnet waren. Dies erlaubte es, zum einen mittleren Effekt der Exposition unabhängig von den Tagen zu ermitteln, sodann einen mittleren Unterschied zwischen den Tagen unabhängig von der Exposition, vor allem jedoch einen Interaktionsterm, der die Abweichung von der Additivität anzeigte, d.h. einen nichtparallelen Verlauf der Kurven der jeweiligen Messgröße. Zusätzlich wurden als post hoc-Tests in dem Falle, dass die Varianzanalyse einen signifikanten Unterschied zwischen den Expositionen zeigte, paarige Vergleiche gemäß dem Test von Wilcoxon durchgeführt; dieser Test wurde

gewählt, um bei den kleinen Stichprobenumfängen nicht die Normalverteilung der Werte als unbelegte Voraussetzung annehmen zu müssen.

Zur Darstellung der Werte wurden Mittelwerte und Standardabweichungen des Mittelwertes (Standardfehler, SEM) berechnet und graphisch dargestellt. In Tabellen werden die Hauptmessgrößen auch numerisch angegeben, in diesem Fall mit Standardabweichung (SD), um die Streuung zwischen den Versuchen zu verdeutlichen. Ferner wurden für die primären Messgrößen die Einzelwerte graphisch dargestellt, um die Variabilität der einzelnen Versuche visuell beurteilen zu können. Auf die Angabe prozentualer Änderungen wurde verzichtet, da sich bei einigen Messgrößen wie GPDH-Aktivität oder Lipidgehalt sehr kleine Werte als Ausgangswerte der Zellen ergaben, die noch nicht als Adipozyten aktiv waren; dies führte zu großen Streuungen und unsinnig großen Änderungen.

5. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt anhand von Graphiken, und zwar sowohl in Form von Mittelwerten und Standardfehlern (SEM) als auch in Form von Einzelwerten. Dadurch sollte zum einen ein möglichst übersichtlicher Vergleich zwischen den einzelnen Versuchstagen und Versuchsansätzen (Kontrolle, CSE, Nikotin, NAC+CSE) erreicht werden. Zum anderen ließ sich die Streuung der Ergebnisse anhand der Rohdaten veranschaulichen.

5.1 Wirkungen auf die Zellzahl

5.1.1 Zellzahl bei Exposition gegenüber CSE

In die Analyse gingen 8 Versuche ein, in denen jeweils vergleichend gegenüber CSE und Kontrolle exponiert wurde. Jeder Versuchswert beruhte darüber hinaus auf einer Doppelbestimmung aus zwei parallelen Ansätzen (paarige Wells der Platte). Diese Anzahl der Versuche gilt auch für die anderen Auswertegrößen.

Die Varianzanalyse, in der die gesamten Verläufe zweier Behandlungen zu den Messzeitpunkten Tag 0, 2 und 7 verglichen wurden, ergab bezüglich der Zellzahl einen statistisch signifikanten Unterschied beim Vergleich von CSE und Kontrolle ($p < 0,001$; Abb. 5.1.1). Dabei waren sowohl das mittlere Niveau zwischen CSE und Kontrolle ($p = 0,005$) signifikant verschieden als auch der Interaktionsterm ($p = 0,015$). Letzteres wies auf den divergierenden Verlauf der Kurven hin. In der post hoc-Analyse der einzelnen Tage mittels paariger Vergleiche zeigte sich, dass sowohl die für Tag 2 als auch die für Tag 7 erhaltenen Werte als unterschiedlich gelten mussten (jeweils $p < 0,05$). Die Einzelwerte sind in Abb. 5.1.2 und 5.1.4 dargestellt.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	79.771 ± 12.283	79.354 ± 13.364
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	187.896 ± 42.705	118.521 ± 32.325
Tag 7 (Versuchsende)	359.813 ± 166.542	269.896 ± 110.400

Tabelle 5.1.1: In der Tabelle sind die Zellzahlen pro Well bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition dargestellt. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der Zellzahlen pro Well. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen.

5.1.2 Zellzahl bei Gabe von Nikotin

In diese Analyse gingen ebenfalls 8 Versuche ein, in denen jeweils vergleichend gegenüber Nikotin und Kontrolle exponiert wurde. Jeder Versuchswert beruhte darüber hinaus auf einer Doppelbestimmung aus zwei parallelen Ansätzen (paarige Wells der Platte). Die anderen Auswertegrößen basierten auf der gleichen Anzahl von Versuchen.

Ein Vergleich zwischen Kontrollzellen und Zellen, die mit Nikotin behandelt wurden, ergab in der Varianzanalyse keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Zellzahl sowohl im Gesamtverlauf als auch zu den einzelnen Zeitpunkten (Abb. 5.1.1). Die Einzelwerte finden sich in Abb. 5.1.3.

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	88.917 ± 16.563	89.125 ± 17.145
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	179.583 ± 45.663	183.083 ± 41.091
Tag 7 (Versuchsende)	377.708 ± 93.264	405.792 ± 84.746

Tabelle 5.1.2: In der Tabelle sind die Zellzahlen pro Well bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition dargestellt. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der Zellzahlen pro Well. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen.

5.1.3 Zellzahl bei Behandlung mit NAC und CSE

In diese Analyse gingen 7 Versuche ein, in denen jeweils vergleichend gegenüber NAC+CSE und CSE exponiert wurde. Jeder Versuchswert beruhte darüber hinaus auf einer Doppelbestimmung aus zwei parallelen Ansätzen (paarige Wells der Platte).

Der Vergleich zwischen Zellen, die mit CSE behandelt wurden, und solchen, die vor CSE-Behandlung mit NAC inkubiert wurden, zeigte in der Zweiweg-Varianzanalyse keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zellzahl (Abb. 5.1.1). Die Werte der einzelnen Versuche sind in Abb. 5.1.5 dargestellt.

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	98.667 ± 12.786	104.286 ± 6.468
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	134.714 ± 16.338	151.476 ± 17.520
Tag 7 (Versuchsende)	261.619 ± 30.877	249.286 ± 24.163

Tabelle 5.1.3: In der Tabelle sind die Zellzahlen pro Well bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener Inkubation mit N-Acetylcystein (NAC) dargestellt. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der Zellzahlen pro Well. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und N-Acetylcystein wurden permanent auf den Zellen belassen.

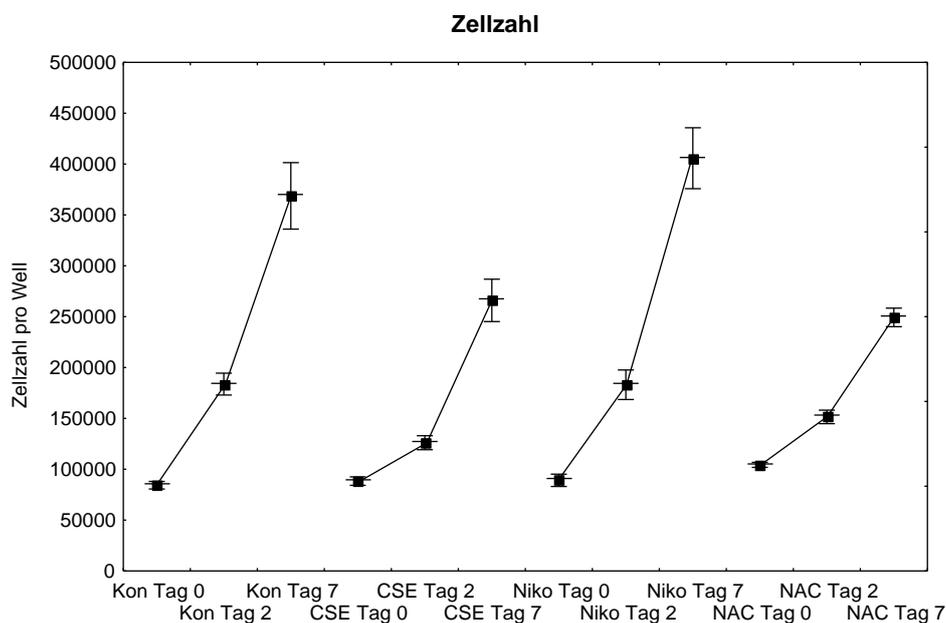


Abbildung 5.1.1: Dargestellt ist die Zellzahl pro Well der D-MEM-Kontrolle (Kon), der gegenüber Zigarettenrauch (5% CSE) und Nikotin (Niko) exponierten Zellen, sowie der mit N-Acetylcystein und 5% CSE (NAC) behandelten Zellen an Tag 0 (vor Gabe des Differenzierungs-Cocktails), Tag 2 (nach Wegnahme des Cocktails), sowie an Tag 7 (Versuchsende). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM). Die Daten basieren auf den Mittelwerten paralleler Doppelansätze aus 8 Versuchen. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

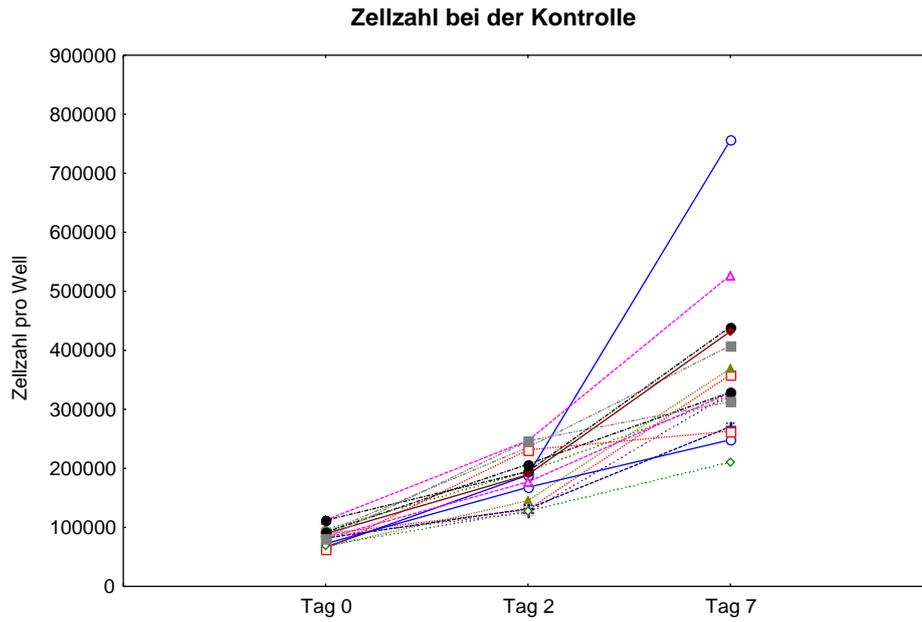


Abbildung 5.1.2: Dargestellt sind die Einzelwerte der Zellzahlen pro Well der D-MEM-Kontrollen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

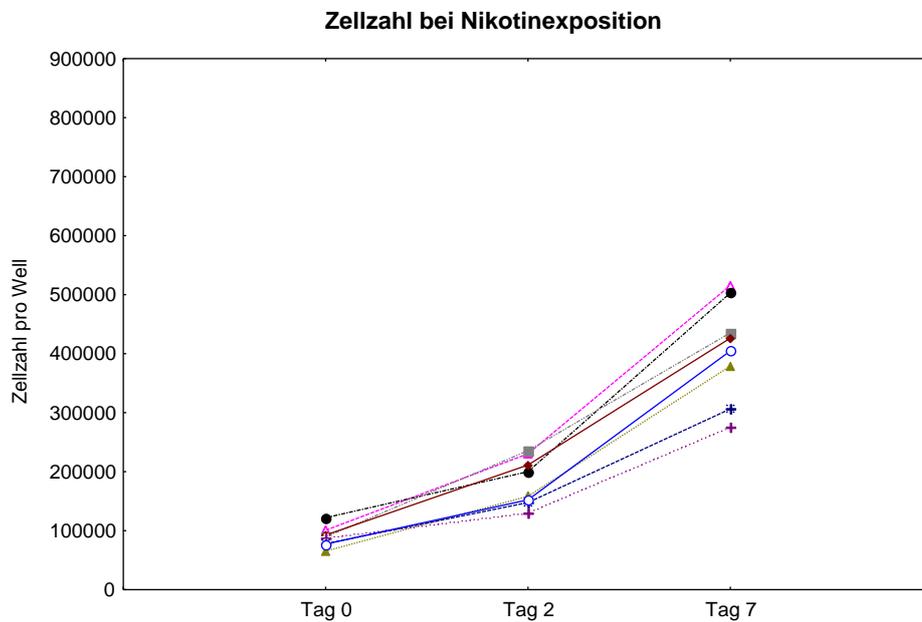


Abbildung 5.1.3: Die Abbildung zeigt die Einzelwerte der Zellzahlen pro Well der gegenüber Nikotin exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

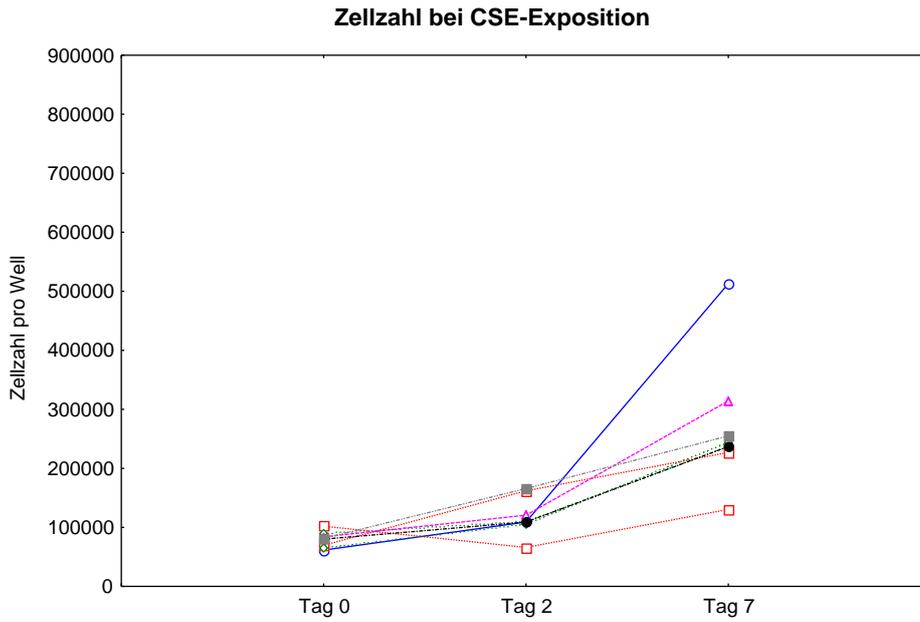


Abbildung 5.1.4: Dargestellt sind die Einzelwerte der Zellzahlen pro Well der gegenüber CSE exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

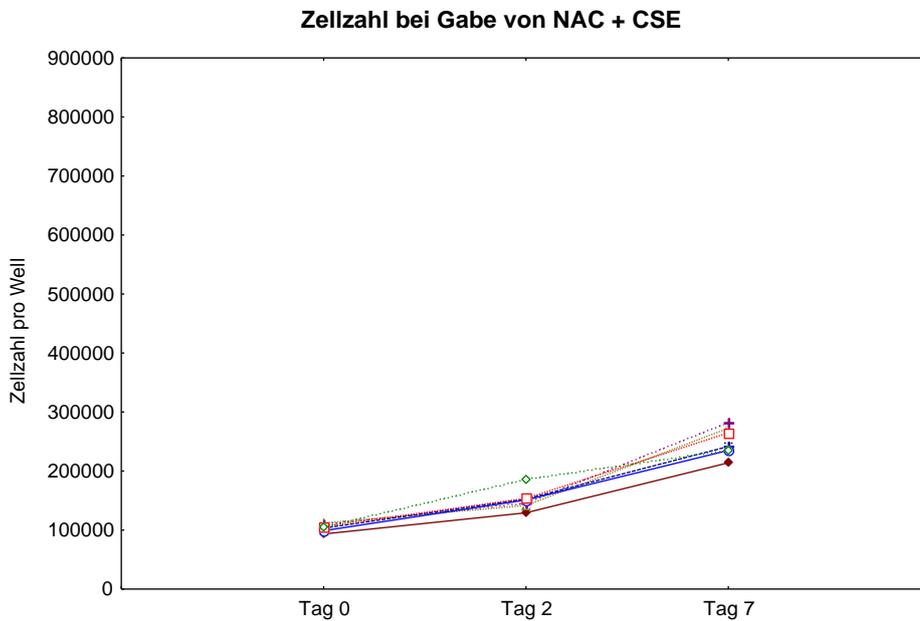


Abbildung 5.1.5: Dargestellt sind die Einzelwerte der Zellzahlen pro Well der mit N-Acetylcystein (NAC) und CSE behandelten Zellen an den Auswertetagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

5.2 Wirkungen auf den Proteingehalt

5.2.1 Proteingehalt bei Exposition gegenüber CSE

Gemäß Varianzanalyse war die Menge an Protein beim Vergleich von CSE und Kontrolle während der Tage 0, 2 und 7 signifikant verschieden ($p < 0,0001$). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen CSE und Kontrolle sowohl bezüglich des mittleren Niveaus ($p = 0,011$) als auch des Interaktionsterms ($p = 0,005$), so dass ein nicht-paralleler Verlauf angenommen werden musste (Abb. 5.2.1). Speziell fand sich in paarigen Vergleichen, dass an Tag 2, nicht hingegen an Tag 7 ein signifikanter Unterschied anzunehmen war ($p < 0,05$). Die Einzelwerte bei Gabe von CSE und Kontrolle sind aus Abb. 5.2.3 und 5.2.5 zu ersehen.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	46,5 ± 19,5	56,9 ± 24,8
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	205,4 ± 74,7	141,3 ± 59,2
Tag 7 (Versuchsende)	504,4 ± 129,0	467,1 ± 159,2

Tabelle 5.2.1: Die Tabelle zeigt den absoluten Proteingehalt ($\mu\text{g/Well}$) bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Proteingehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen.

Hingegen zeigte eine analoge varianzanalytische Auswertung für die Proteinmenge bezogen auf die Zellzahl keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungen (Abb. 5.2.2). Entsprechend mussten auch im paarigen post hoc-Vergleich die Werte für die einzelnen Tage als gleich für die CSE- und Kontrollexposition gelten.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	59,9 ± 29,2	72,8 ± 31,3
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	109,6 ± 32,2	116,0 ± 26,3
Tag 7 (Versuchsende)	166,7 ± 76,7	191,4 ± 66,6

Tabelle 5.2.2: Die Tabelle zeigt den Proteingehalt (μg) bezogen auf 100.000 Zellen bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Proteingehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen.

5.2.2 Proteingehalt bei Gabe von Nikotin

Beim Vergleich der gegenüber Nikotin exponierten Zellen und der Kontrollzellen mittels Varianzanalyse ergab sich bezüglich des Proteingehaltes kein statistisch signifikanter Unterschied im Verlauf über die Versuchstage 0, 2 und 7 (Abb. 5.2.1). Die Einzelwerte sind Abb. 5.2.4 zu entnehmen.

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	60,3 ± 21,8	63,7 ± 23,0
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	224,8 ± 46,6	232,7 ± 41,1
Tag 7 (Versuchsende)	626,9 ± 139,7	618,0 ± 140,7

Tabelle 5.2.3: Die Tabelle zeigt den absoluten Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{Well}$) bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Proteingehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen.

Auch die Proteinmenge bezogen auf die Zellzahl war in der Varianzanalyse nicht signifikant verschieden zwischen den mit Nikotin behandelten Zellen und den Kontrollzellen (Abb. 5.2.2).

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	68,9 ± 25,6	73,7 ± 29,5
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	130,4 ± 37,0	130,5 ± 28,2
Tag 7 (Versuchsende)	179,5 ± 68,6	163,5 ± 63,6

Tabelle 5.2.4: Die Tabelle zeigt den Proteingehalt (μg) bezogen auf 100.000 Zellen bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Proteingehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen.

5.2.3 Proteingehalt bei Behandlung mit NAC und CSE

Bei den mit N-Acetylcystein (NAC) + CSE im Vergleich zu den allein mit CSE behandelten Zellen fanden sich in der Varianzanalyse statistisch signifikante Unterschiede im Proteingehalt ($p < 0,001$; Abb. 5.2.1). Dies galt sowohl für das mittlere Niveau ($p < 0,001$) als auch den Interaktionsterm ($p < 0,001$), der einen nichtparallelen Verlauf anzeigte. Hierbei differierten insbesondere an Tag 7 die Werte zwischen CSE und CSE plus NAC ($p < 0,05$). Einzelwerte des Proteingehaltes finden sich in Abb. 5.2.6.

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	96,4 ± 16,9	97,5 ± 20,2
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	188,6 ± 24,2	198,4 ± 46,5
Tag 7 (Versuchsende)	645,2 ± 122,5	315,5 ± 64,8

Tabelle 5.2.5: Die Tabelle zeigt den absoluten Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{Well}$) bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Proteingehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und N-Acetylcystein wurden permanent auf den Zellen belassen.

Die Proteinmenge pro Zellzahl ergab ebenfalls einen unterschiedlichen Verlauf in der Varianzanalyse ($p < 0,001$; Abb. 5.2.2); und dies galt sowohl für das mittlere Niveau als auch für den Interaktionsterm (jeweils $p < 0,001$). Auch in diesem Fall differierten die Werte zwischen CSE und CSE plus NAC speziell an Tag 7 ($p < 0,05$).

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	97,8 ± 11,3	93,1 ± 16,5
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	141,0 ± 17,8	130,0 ± 21,0
Tag 7 (Versuchsende)	246,1 ± 31,2	127,2 ± 28,1

Tabelle 5.2.6: Die Tabelle zeigt den Proteingehalt (μg) bezogen auf 100.000 Zellen bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Proteingehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und N-Acetylcystein wurden permanent auf den Zellen belassen.

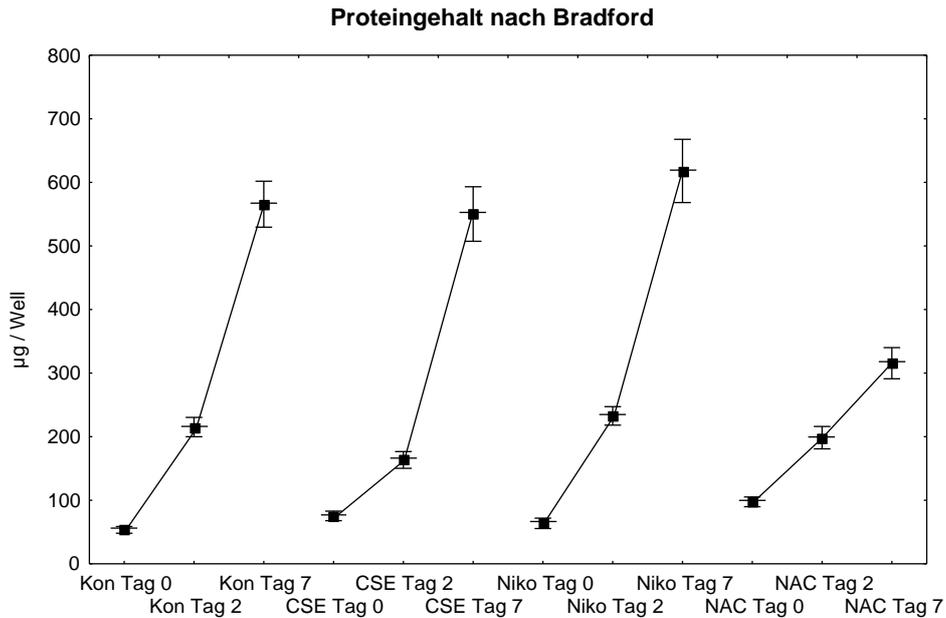


Abbildung 5.2.1: Dargestellt ist die Wirkung von 5% CSE (CSE), Nikotin (Niko) und 5% CSE + NAC (NAC) und D-MEM-Kontrollen (Kon) in Bezug auf den absoluten Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{Well}$) an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die Daten ergaben sich aus den Mittelwerten paralleler Doppelansätze pro Versuch. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

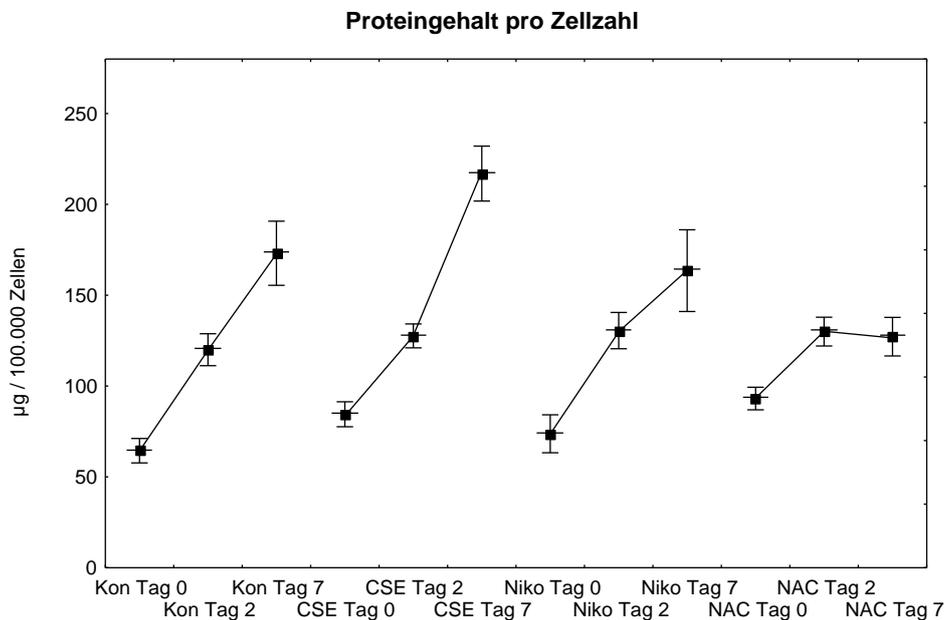


Abbildung 5.2.2: Dargestellt ist die Wirkung von 5% CSE (CSE), Nikotin (Niko) und 5% CSE + NAC (NAC) und D-MEM-Kontrollen (Kon) in Bezug auf den Proteingehalt pro Zellzahl (μg pro 100.000 Zellen) an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die Werte stellen die Mittelwerte paralleler Doppelansätze pro Versuch dar. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

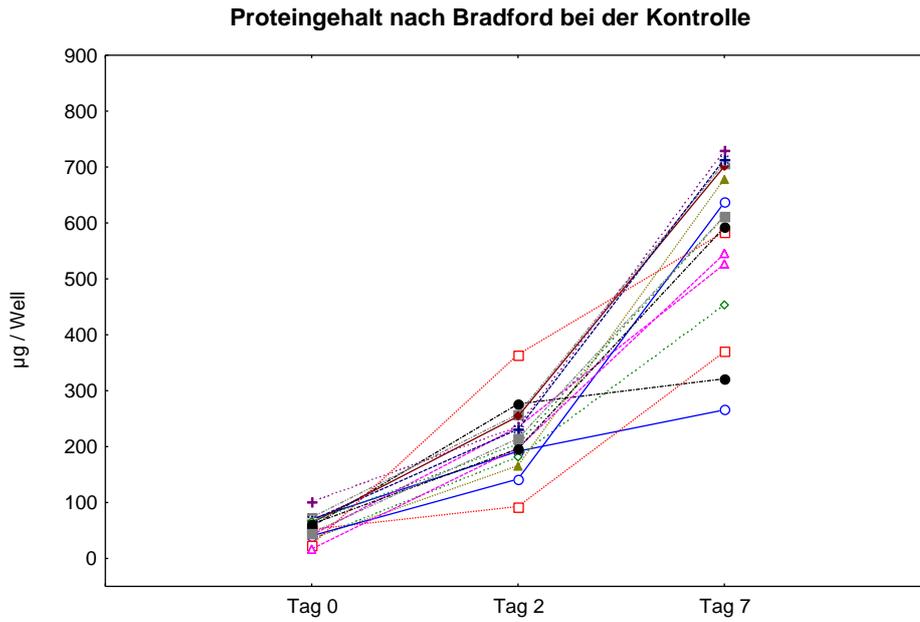


Abbildung 5.2.3: Dargestellt sind Einzelwerte des Proteingehaltes ($\mu\text{g}/\text{Well}$) der D-MEM-Kontrolle an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

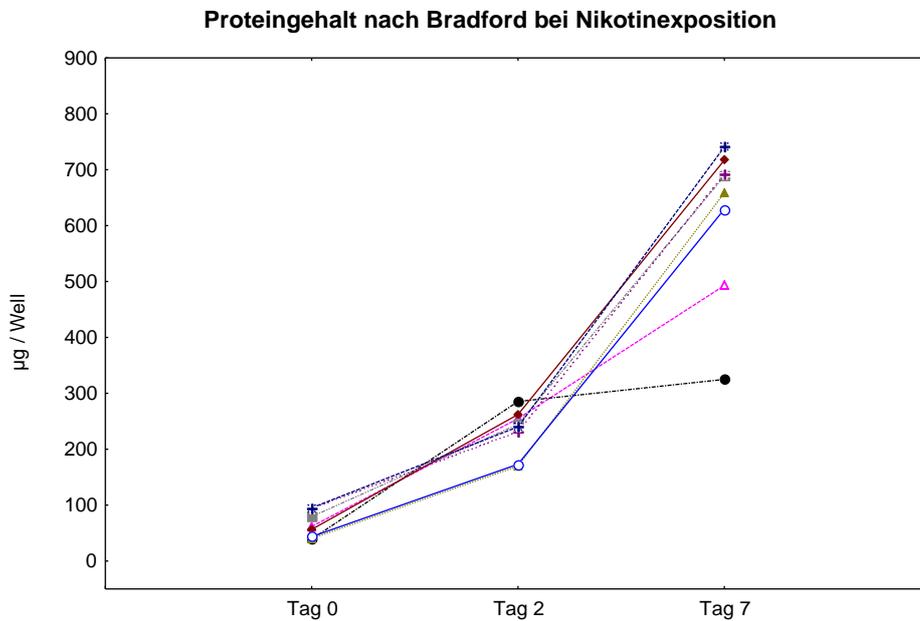


Abbildung 5.2.4: Dargestellt sind Einzelwerte des Proteingehaltes ($\mu\text{g}/\text{Well}$) der gegenüber Nikotin exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

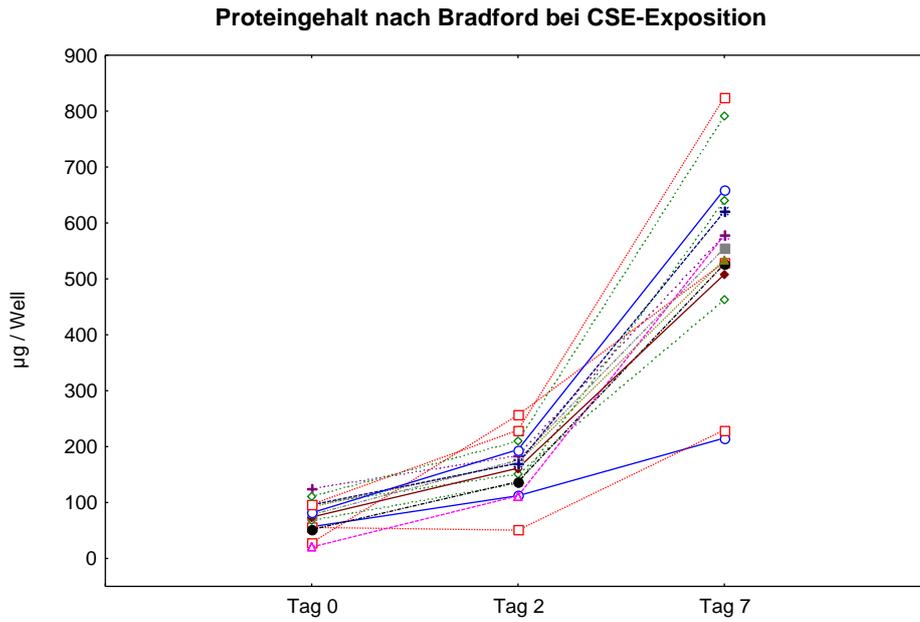


Abbildung 5.2.5: In der Abbildung sind die Einzelwerte des Proteingehaltes ($\mu\text{g}/\text{Well}$) der gegenüber CSE exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7 dargestellt. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

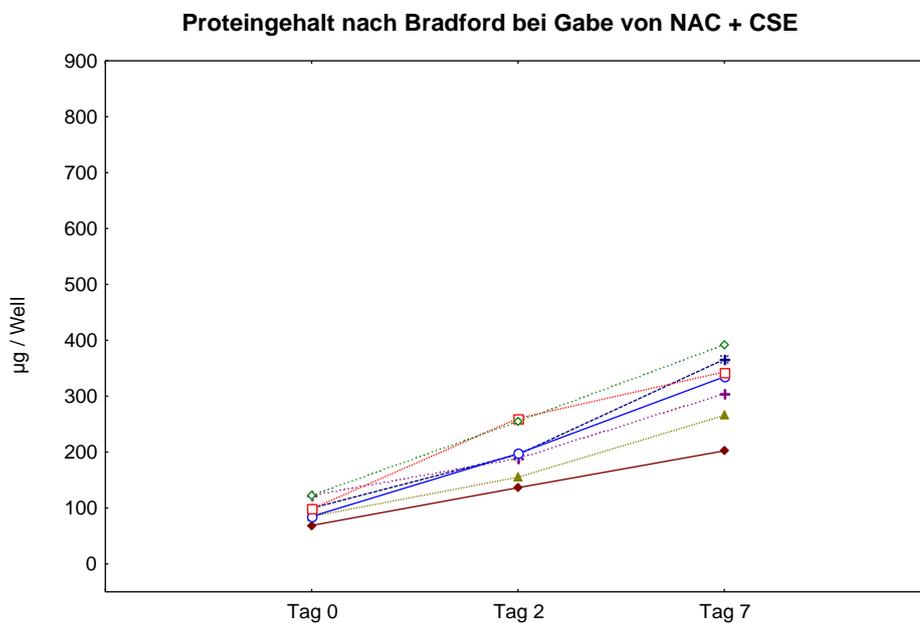


Abbildung 5.2.6: Die Abbildung zeigt die Einzelwerte des Proteingehaltes ($\mu\text{g}/\text{Well}$) der gegenüber NAC + CSE exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

5.3 Wirkungen auf die GPDH-Aktivität

5.3.1 GPDH-Aktivität bei Exposition gegenüber CSE

Die Ergebnisse für die GPDH-Aktivität bei der Behandlung mit CSE zeigten in der Varianzanalyse statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$), und zwar sowohl im mittleren Niveau ($p = 0,001$) als auch in der Interaktion ($p < 0,001$; Abb. 5.3.1). Im paarigen Vergleich konnte für Tag 7 ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p < 0,05$). Die Einzelwerte für die Kontroll- und CSE-Gruppe finden sich in den Abbildungen 5.3.5 und 5.3.7.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	$-1,15 \pm 0,99$	$-0,66 \pm 0,48$
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	$-0,15 \pm 1,53$	$-0,67 \pm 0,52$
Tag 7 (Versuchsende)	$49,14 \pm 10,80$	$29,68 \pm 16,50$

Tabelle 5.3.1: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität (mU/Well) absolut bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bei Aktivitäten um Null bedingt.

Für die GPDH-Aktivität bezogen auf die Zellzahl ergab die Varianzanalyse keinen signifikanten Unterschied zwischen CSE und Kontrolle, und es zeigte sich ein paralleler Verlauf beider Behandlungen (Abb. 5.3.2). Die Werte waren auch an Tag 7 zwischen CSE und Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-1,51 ± 1,52	-0,87 ± 0,67
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	-0,12 ± 0,69	-0,59 ± 0,48
Tag 7 (Versuchsende)	15,92 ± 7,24	12,56 ± 7,68

Tabelle 5.3.2: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität (mU) bezogen auf 100.000 Zellen bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität pro Zellzahl. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt.

Anders verhielt es sich bei der GPDH-Aktivität bezogen auf die Proteinmenge (Abb. 5.3.3). Hier ergab sich in der Varianzanalyse ($p < 0,001$) sowohl im mittleren Niveau ($p = 0,038$) als auch im Verlauf gemäß Interaktion ($p < 0,001$) ein Unterschied. Im paarigen Vergleich ließ sich dieser Unterschied zwischen CSE und Kontrolle insbesondere für den Tag 7 festhalten ($p < 0,05$).

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-2,74 ± 1,79	-1,16 ± 0,73
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	-0,19 ± 0,53	-0,51 ± 0,36
Tag 7 (Versuchsende)	10,37 ± 3,35	6,76 ± 3,44

Tabelle 5.3.3: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität bezogen auf den Proteingehalt (mU pro 100 µg Protein) bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität pro Protein. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt.

Dagegen konnte die GPDH-Aktivität bezogen auf die Lipidmenge in der Varianzanalyse als unbeeinflusst angenommen werden, wenn der Tag 7 zugrundegelegt wurde; die Varianzanalyse war durch die starke Variabilität dieser Relativwerte an den Tagen 0 und 2 nicht aussagekräftig.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-33,30 ± 12,66	-11,33 ± 9,35
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	-9,61 ± 9,19	-5,40 ± 4,49
Tag 7 (Versuchsende)	12,38 ± 4,80	13,22 ± 7,48

Tabelle 5.3.4: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität pro Lipid (mU bezogen auf Pixelwerte pro normiertem Bildfeld, multipliziert mit 100.000) bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität pro Lipid. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt. Zusätzlich kommt zum Tragen, dass die Lipidwerte an Tag 0 und 2 aufgrund der geringen Mengen eine große relative Streuung aufwiesen und daher bei der Quotientenbildung starke Abweichungen produzierten. Für Tag 0 wurden bei der Kontroll-Gruppe zwei Werte aufgrund ihrer unzureichenden Validität, bedingt durch sehr kleine Lipidwerte im Nenner, bei der Mittelwertbildung weggelassen.

5.3.2 GPDH-Aktivität bei Gabe von Nikotin

Obwohl bei der Gabe von Nikotin anhand des Interaktionsterms der Varianzanalyse sich andeutungsweise eine leichte Abnahme der GPDH-Aktivität ergab, konnte doch insgesamt in der ANOVA die GPDH-Aktivität als gleich gelten (Abb. 5.3.1). Einzelwerte sind der Abbildung 5.3.6 zu entnehmen.

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-0,41 ± 0,81	-0,65 ± 0,68
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	-0,03 ± 1,27	0,39 ± 1,49
Tag 7 (Versuchsende)	76,30 ± 24,41	63,82 ± 15,48

Tabelle 5.3.5: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität (U/Well) absolut bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bei Aktivitäten um Null bedingt.

Auch bezogen auf Zellzahl oder Proteinmenge zeigte sich in den Varianzanalysen hinsichtlich der GPDH-Aktivität kein statistisch signifikanter Effekt durch Nikotin (Abb. 5.3.2, Abb. 5.3.3). Eine geringfügig verminderte Aktivität pro Lipidmenge ergab sich allerdings an Tag 7 ($p=0,025$; $n=8$; Wilcoxon-Paardifferenztest).

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-0,42 ± 0,92	-0,84 ± 0,93
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	0,05 ± 0,99	0,15 ± 0,78
Tag 7 (Versuchsende)	22,43 ± 12,81	17,07 ± 8,13

Tabelle 5.3.6: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität (mU) bezogen auf 100.000 Zellen bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt.

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-0,91 ± 1,50	-1,07 ± 1,32
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	-0,03 ± 0,55	0,11 ± 0,55
Tag 7 (Versuchsende)	12,87 ± 5,02	10,75 ± 3,06

Tabelle 5.3.7: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität bezogen auf den Proteingehalt (mU pro 100 µg Protein) bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität pro Protein. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt.

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-34,76 ± 71,17	-64,08 ± 79,08
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	1,61 ± 17,38	0,01 ± 8,84
Tag 7 (Versuchsende)	20,53 ± 6,74	15,44 ± 4,89

Tabelle 5.3.8: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität pro Lipid (mU bezogen auf Pixelwerte pro normiertem Bildfeld, multipliziert mit 100.000) bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität pro Lipid. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt. Zusätzlich kommt zum Tragen, dass die Lipidwerte an Tag 0 und 2 aufgrund der geringen Mengen eine große relative Streuung aufwiesen und daher bei der Quotientenbildung starke Abweichungen produzierten.

5.3.3 GPDH-Aktivität bei Behandlung mit NAC und CSE

Ein unterschiedlicher Verlauf für CSE und CSE plus NAC zeigte sich in der Varianzanalyse für die GPDH-Aktivität, und zwar anhand des Interaktionsterms ($p=0,029$; Abb. 5.3.1). Im paarigen Vergleich ließen sich keine signifikanten Unterschiede an einzelnen Tagen nachweisen. Einzelwerte finden sich in den Abbildungen 5.3.7 und 5.3.8.

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	$-0,53 \pm 0,29$	$-0,28 \pm 0,41$
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	$-0,34 \pm 0,20$	$-0,28 \pm 0,22$
Tag 7 (Versuchsende)	$67,22 \pm 42,28$	$100,32 \pm 26,10$

Tabelle 5.3.9: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität (mU/Well) absolut bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und NAC wurden permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bei Aktivitäten um Null bedingt.

Ferner ergab die Varianzanalyse einen Unterschied in der GPDH-Aktivität bezogen auf Zellzahl sowohl bezüglich des mittleren Niveaus ($p=0,020$) als auch der Interaktion ($p=0,004$) und deutete damit einen unterschiedlichen Verlauf an. Speziell an Tag 7 war auch im paarweisen Vergleich ein Unterschied nachzuweisen ($p<0,05$; Abb. 5.3.2).

Ähnliches galt auch für die GPDH-Aktivität in Bezug auf die Proteinmenge (Abb. 5.3.3). Hier ergab die Varianzanalyse sowohl im mittleren Niveau ($p<0,001$) als auch im Verlauf ($p<0,001$; Interaktion) einen signifikanten Unterschied. Dieser war im paarweisen Vergleich speziell an Tag 7 nachzuweisen ($p<0,05$).

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-0,56 ± 0,36	-0,28 ± 0,41
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	-0,26 ± 0,16	-0,20 ± 0,16
Tag 7 (Versuchsende)	25,06 ± 13,85	40,18 ± 10,58

Tabelle 5.3.10: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität (mU) bezogen auf 100.000 Zellen bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und NAC wurden permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt.

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-0,59 ± 0,39	-0,43 ± 0,50
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	-0,18 ± 0,10	-0,17 ± 0,15
Tag 7 (Versuchsende)	9,76 ± 4,49	31,49 ± 4,70

Tabelle 5.3.11: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität bezogen auf den Proteingehalt (mU pro 100 µg Protein) bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität pro Protein. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. Nikotin und NAC wurden permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt.

Im Unterschied dazu zeigten sich zwischen CSE und CSE plus NAC keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Aktivität bezogen auf die Lipidmenge an Tag 7.

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	-125,85 ± 176,00	-59,61 ± 147,69
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	-2,54 ± 1,81	-2,46 ± 3,11
Tag 7 (Versuchsende)	17,22 ± 10,32	25,11 ± 6,47

Tabelle 5.3.12: Die Tabelle zeigt die GPDH-Aktivität pro Lipid (mU bezogen auf Pixelwerte pro normiertem Bildfeld, multipliziert mit 100.000) bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) der GPDH-Aktivität pro Lipid. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und NAC wurden permanent auf den Zellen belassen. Die teilweise vorkommenden Minuswerte für die Tage 0 und 2 sind durch die natürliche Streuung der Messung bedingt. Zusätzlich kommt zum Tragen, dass die Lipidwerte an Tag 0 und 2 aufgrund der geringen Mengen eine große relative Streuung aufwiesen und daher bei der Quotientenbildung starke Abweichungen produzierten.

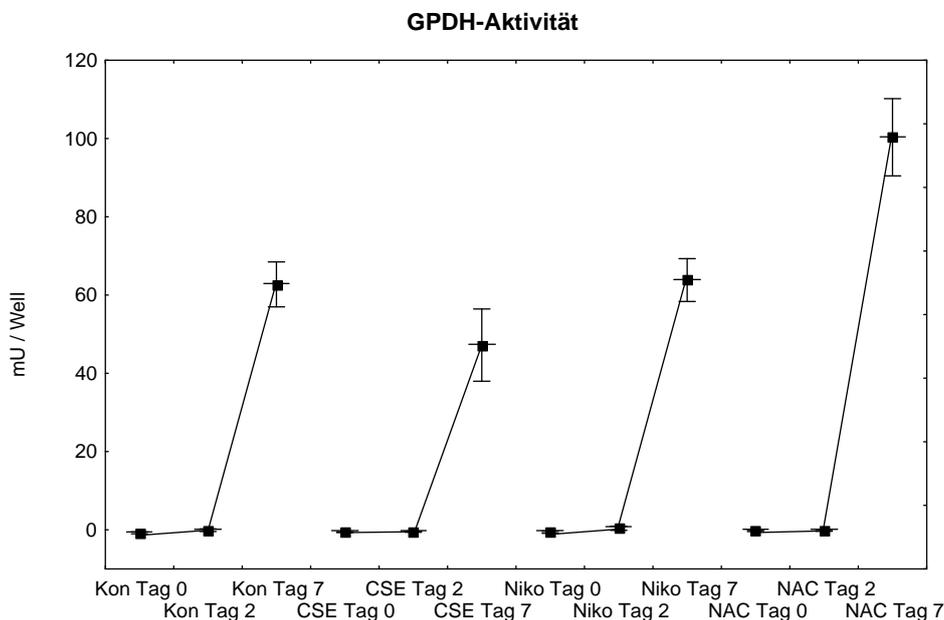


Abbildung 5.3.1: Gezeigt ist die Wirkung von 5% CSE (CSE), Nikotin (Niko), 5% CSE + NAC (NAC) und D-MEM-Kontrolle (Kon) auf die GPDH-Aktivität (mU/Well) an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (SEM). Die Zahlen bilden sich aus den Mittelwerten paralleler Doppelansätze pro Versuch. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

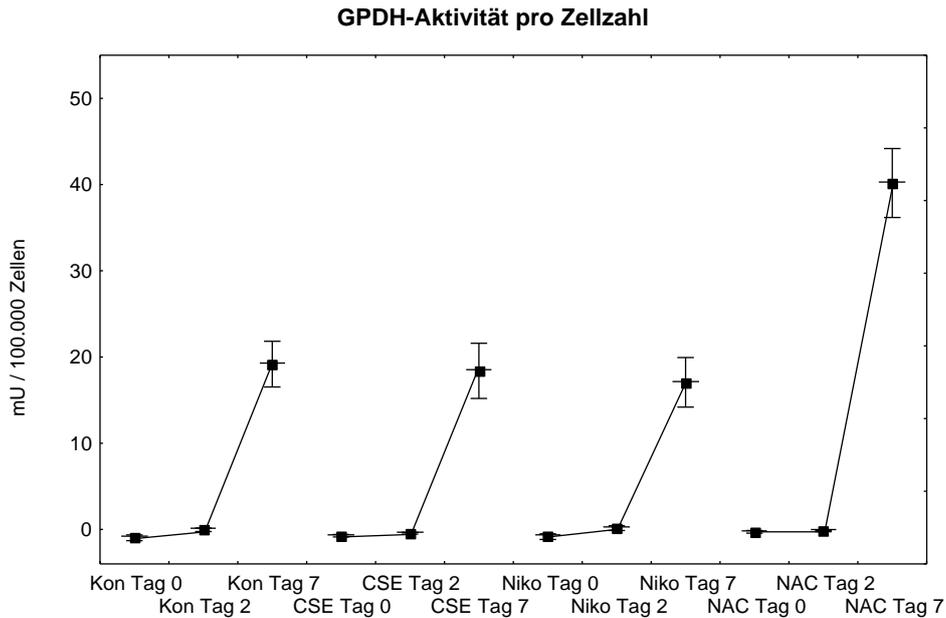


Abbildung 5.3.2: Gezeigt ist die Wirkung von 5% CSE (CSE), Nikotin (Niko), 5% CSE + NAC (NAC) und D-MEM-Kontrolle (Kon) auf die GPDH-Aktivität (mU) pro 100.000 Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die Zahlen bilden sich aus den Mittelwerten paralleler Doppelansätze pro Versuch. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

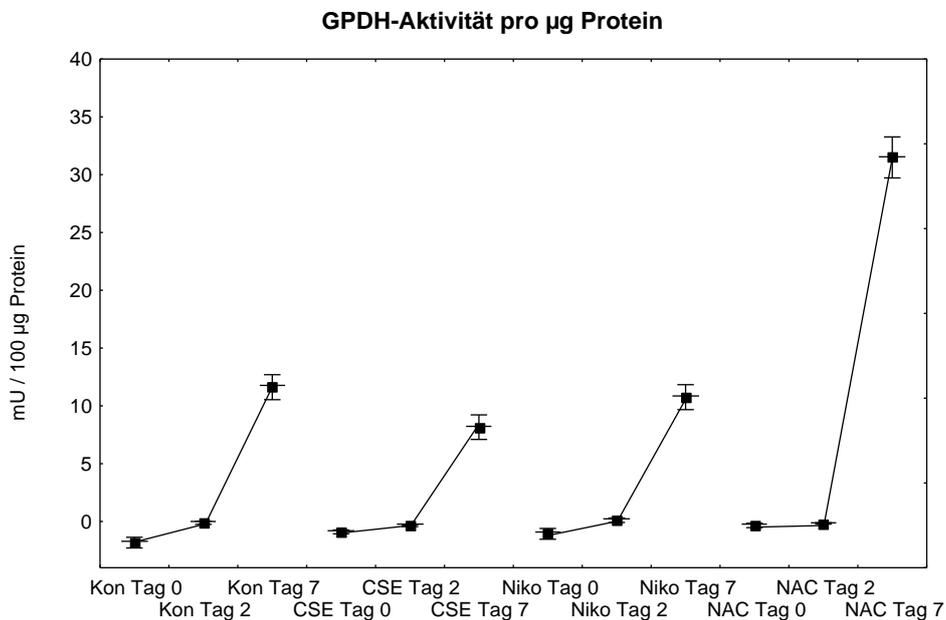


Abbildung 5.3.3: Dargestellt ist die GPDH-Aktivität (mU) pro 100 µg Protein an den Auswertungstagen 0, 2 und 7 bei 5% CSE- (CSE), Nikotin- (Niko) und 5% CSE + NAC (NAC)-Exposition der Zellen verglichen mit D-MEM-Kontrolle (Kon). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die Zahlen bilden sich aus den Mittelwerten paralleler Doppelansätze pro Versuch. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

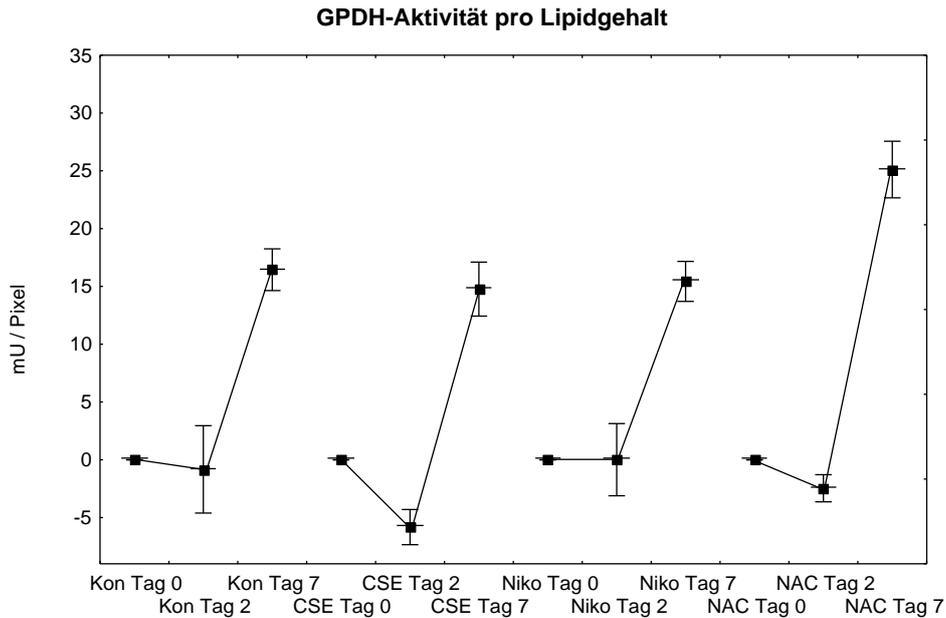


Abbildung 5.3.4: Dargestellt ist die GPDH-Aktivität pro Lipid (mU bezogen auf positive Pixel pro normiertem Bildfeld, multipliziert mit 100.000) an den Auswertungstagen 0, 2 und 7 bei 5% CSE- (CSE), Nikotin- (Niko) und 5% CSE + NAC (NAC)-Exposition der Zellen verglichen mit D-MEM-Kontrolle (Kon). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die Zahlen bilden sich aus den Mittelwerten paralleler Doppelansätze pro Versuch. Aufgrund der geringen Menge Lipid am Auswertungstag 0 und der damit verbundenen großen relativen Streuung der Werte mit starken Abweichungen in der Quotientenbildung wurden die Werte hier gleich Null gesetzt. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

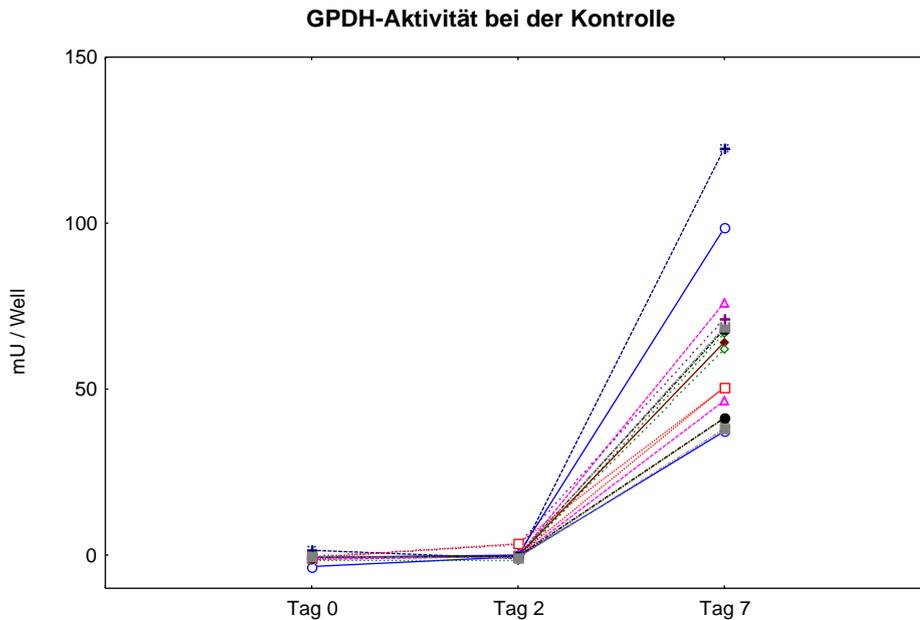


Abbildung 5.3.5: Gezeigt sind Einzelwerte der GPDH-Aktivität (mU/Well) der Kontrollzellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

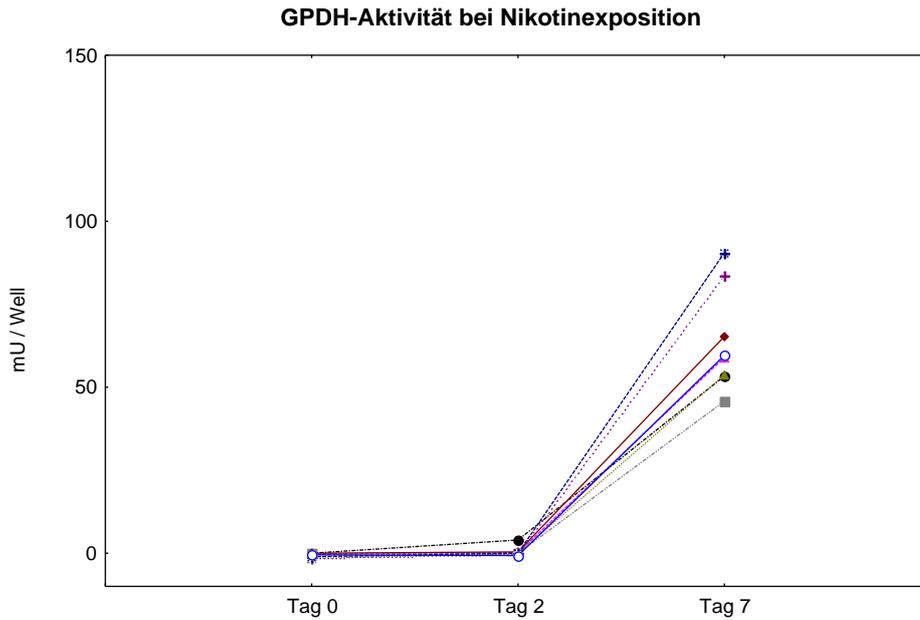


Abbildung 5.3.6: Gezeigt sind Einzelwerte der GPDH-Aktivität (mU/Well) der gegenüber Nikotin exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

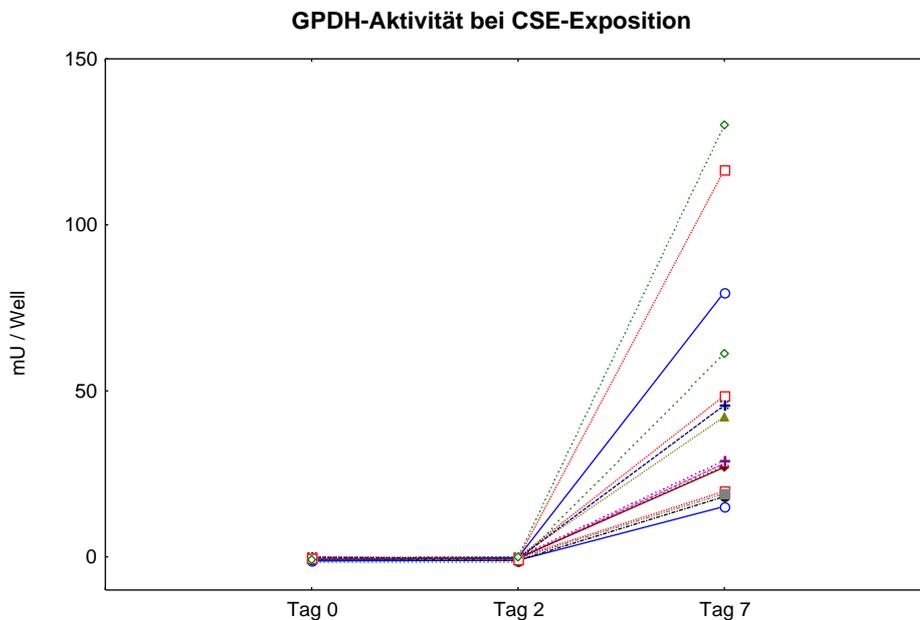


Abbildung 5.3.7: Gezeigt sind Einzelwerte der GPDH-Aktivität (mU/Well) der gegenüber CSE exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

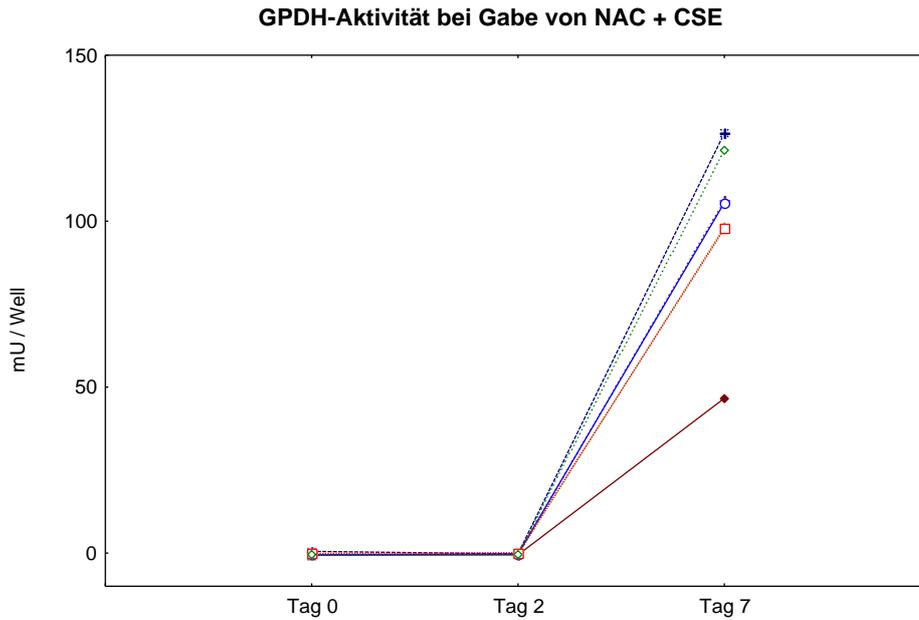


Abbildung 5.3.8: Die Abbildung zeigt die Einzelwerte der GPDH-Aktivität (mU/Well) der gegenüber NAC + CSE exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

5.4 Wirkungen auf den Lipidgehalt

5.4.1 Lipidgehalt bei Exposition gegenüber CSE

Eine Zunahme der über die Bildverarbeitung ermittelten Lipidmenge ließ sich über den Zeitraum feststellen. Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Niveauunterschied ($p=0,004$) sowie einen Interaktionsterm ($p<0,001$), der einen unterschiedlich steilen Verlauf anzeigte. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen CSE und Kontrolle an Tag 7 ersichtlich ($p<0,05$; Abb. 5.4.1). Einzelwerte sind in den Abbildungen 5.4.4 und 5.4.6 zu sehen.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	1.288 ± 1.605	2.199 ± 2.768
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	12.746 ± 8.044	11.244 ± 9.948
Tag 7 (Versuchsende)	433.216 ± 130.137	284.337 ± 128.711

Tabelle 5.4.1: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt absolut in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen.

Ebenso zeigte sich in der Varianzanalyse ein Unterschied der Lipidmenge bezogen auf die Proteinmenge in Form eines signifikanten Interaktionsterms ($p=0,009$), der einen divergierenden Verlauf anzeigte (Abb. 5.4.2). Dies bestätigte sich auch durch einen signifikanten Unterschied an Tag 7 ($p<0,05$).

Bezüglich des Lipidgehalts pro Zellzahl ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5.4.3).

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	50,4 ± 94,5	70,8 ± 132,3
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	81,4 ± 87,5	69,4 ± 93,4
Tag 7 (Versuchsende)	931,1 ± 469,2	519,5 ± 221,4

Tabelle 5.4.2: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt pro Protein (in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld pro μg Protein) bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes pro Protein. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,03
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	0,07 ± 0,06	0,10 ± 0,09
Tag 7 (Versuchsende)	1,22 ± 0,47	1,12 ± 0,51

Tabelle 5.4.3: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt pro Zellzahl (in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld pro Zelle) bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes pro Zellzahl. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. CSE wurde permanent auf den Zellen belassen.

5.4.2 Lipidgehalt bei Gabe von Nikotin

Die Varianzanalyse ergab bei den gegenüber Nikotin exponierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der absoluten Lipidmenge (Abb. 5.4.1). Einzelwerte sind in der Abbildung 5.4.5 zu sehen.

Gleiches galt für die Lipidmenge pro µg Protein (Abb. 5.4.2) oder pro Zellzahl (Abb. 5.4.3).

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	1.421 ± 1.607	1.616 ± 1.567
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	16.080 ± 9.109	22.045 ± 12.706
Tag 7 (Versuchsende)	391.821 ± 83.705	429.657 ± 79.443

Tabelle 5.4.4: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt absolut in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen.

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	29,7 ± 40,4	27,4 ± 28,2
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	71,3 ± 43,8	93,9 ± 52,2
Tag 7 (Versuchsende)	662,2 ± 257,0	750,9 ± 329,9

Tabelle 5.4.5: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt pro Protein (in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld pro µg Protein) bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes pro Protein. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen.

Versuchstag	Kontrolle	Nikotin
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	0,10 ± 0,06	0,12 ± 0,06
Tag 7 (Versuchsende)	1,13 ± 0,47	1,11 ± 0,37

Tabelle 5.4.6: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt pro Zellzahl (in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld pro Zellzahl) bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes pro Zellzahl. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag acht Proben untersucht. Nikotin wurde permanent auf den Zellen belassen.

5.4.3 Lipidgehalt bei Behandlung mit NAC und CSE

Für die Gabe von N-Acetylcystein bei mit CSE behandelten Zellen ergab die Varianzanalyse im Vergleich zu den mit CSE allein behandelten Zellen hinsichtlich der Lipidmenge keinen signifikanten Unterschied (Abb. 5.4.1). Einzelwerte sind in der Abbildung 5.4.7 zu sehen.

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	1.219 ± 1.008	1.187 ± 1.009
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	15.232 ± 3.964	17.049 ± 5.225
Tag 7 (Versuchsende)	387.795 ± 36.927	399.743 ± 30.792

Tabelle 5.4.7: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt absolut in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und NAC wurden permanent auf den Zellen belassen.

Jedoch zeigte sich für die Lipidmenge pro Protein ein signifikanter Effekt in der Varianzanalyse, der sich sowohl im mittleren Niveau als auch im Interaktionsterm äußerte (jeweils $p < 0,001$; Abb. 5.4.2). Dieser bestätigte sich an Tag 7 im paarweisen Vergleich ($p < 0,05$).

Der Lipidgehalt pro Zellzahl hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Varianzanalyse (Abb. 5.4.3).

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	12,0 ± 9,8	11,9 ± 10,6
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	81,6 ± 23,3	85,3 ± 21,8
Tag 7 (Versuchsende)	618,0 ± 128,8	1316,7 ± 306,7

Tabelle 5.4.8: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt pro Protein (in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld pro μg Protein) bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes pro Protein. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und NAC wurden permanent auf den Zellen belassen.

Versuchstag	CSE	CSE + NAC
Tag 0 (Gabe des Cocktails)	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Tag 2 (Entfernung des Cocktails)	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,03
Tag 7 (Versuchsende)	1,50 ± 0,23	1,62 ± 0,22

Tabelle 5.4.9: Die Tabelle zeigt den Lipidgehalt pro Zellzahl (in Form von Pixelwerten pro normiertem Bildfeld pro Zelle) bei CSE-Exposition und bei Behandlung mit CSE unter vorangegangener N-Acetylcystein-Gabe (NAC). Die Zahlen entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) des Lipidgehaltes pro Zellzahl. Es wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe pro Versuchstag sieben Proben untersucht. CSE und NAC wurden permanent auf den Zellen belassen.

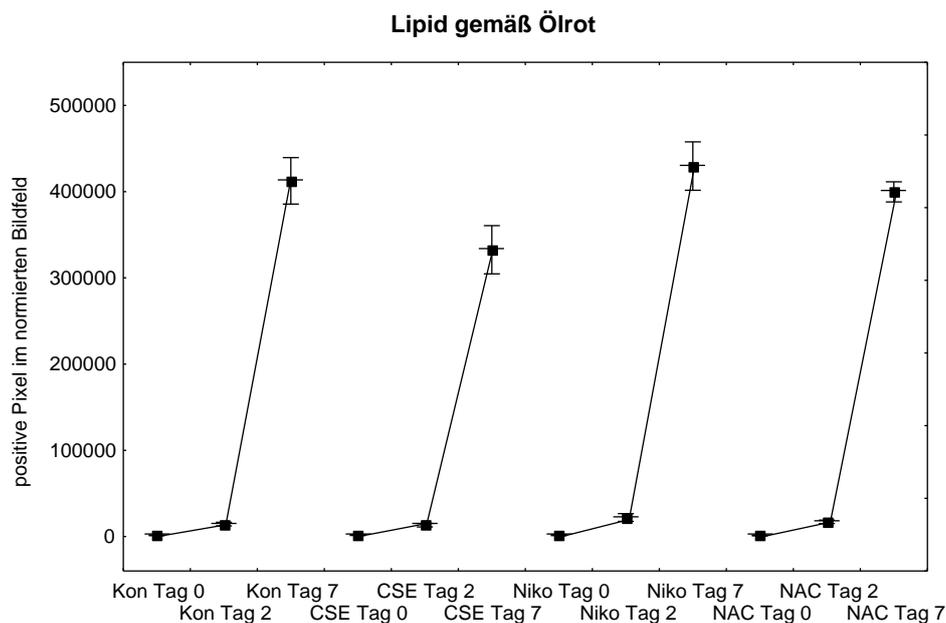


Abbildung 5.4.1: Gezeigt ist die Lipidspeicherung der Zellen (positive Pixel pro normiertem Bildfeld) an den Auswertungstagen 0, 2 und 7 bei 5% CSE- (CSE), Nikotin- (Niko) und 5% CSE + NAC (NAC)-Exposition verglichen mit D-MEM-Kontrolle (Kon). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die Zahlen bilden sich aus den Mittelwerten paralleler Doppelansätze pro Versuch. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

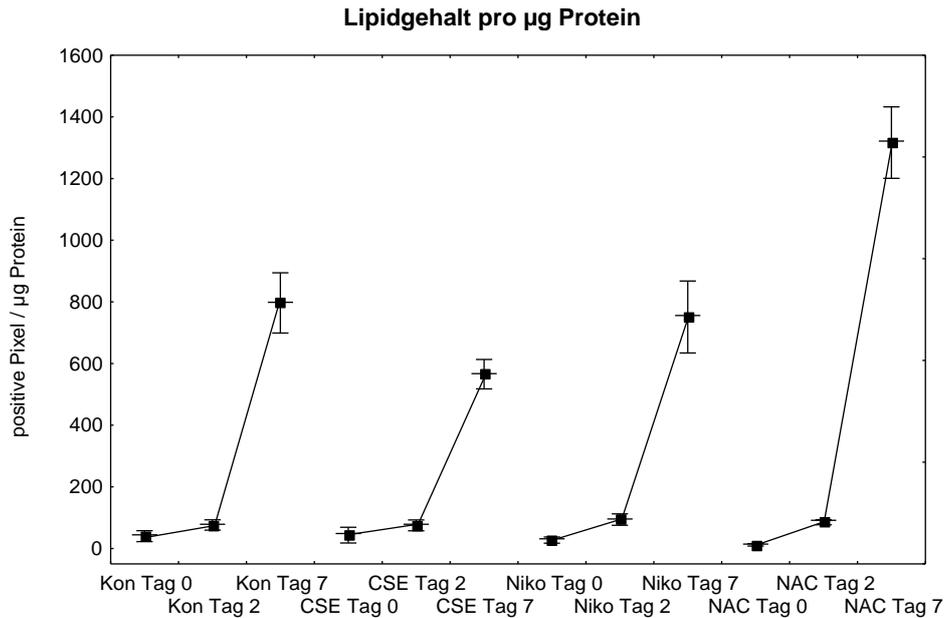


Abbildung 5.4.2: Gezeigt ist die Wirkung von 5% CSE (CSE), Nikotin (Niko), 5% CSE + NAC (NAC) und D-MEM-Kontrolle (Kon) auf die Lipidspeicherung pro μg Protein an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die Zahlen bilden sich aus den Mittelwerten paralleler Doppelansätze pro Versuch. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

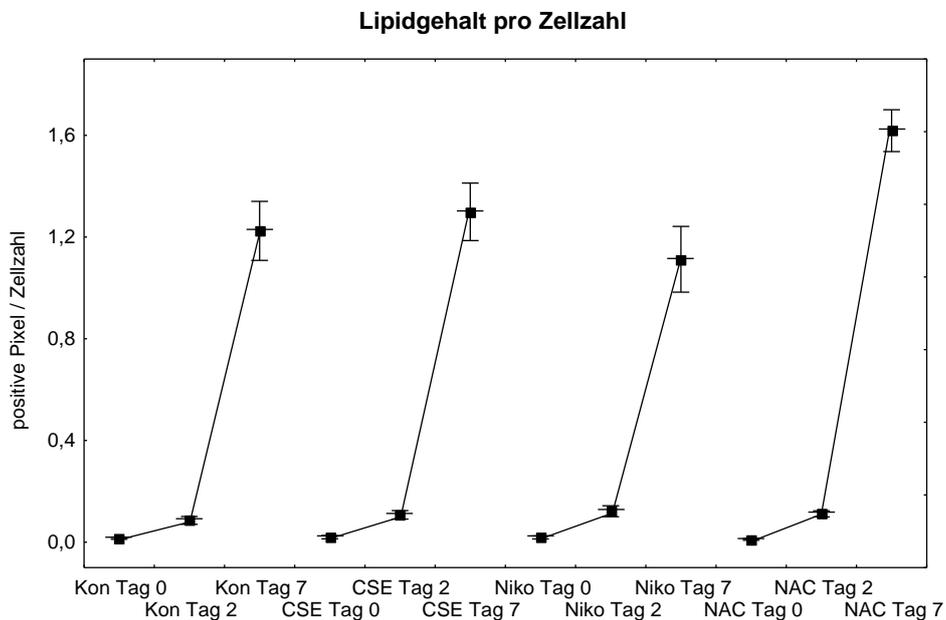


Abbildung 5.4.3: Gezeigt ist die Wirkung von 5% CSE (CSE), Nikotin (Niko), 5% CSE + NAC (NAC) und D-MEM-Kontrolle (Kon) auf die Lipidspeicherung pro Zellzahl (positive Pixel pro Zelle) an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die Zahlen bilden sich aus den Mittelwerten paralleler Doppelansätze pro Versuch. Bezüglich statistischer Unterschiede siehe Text.

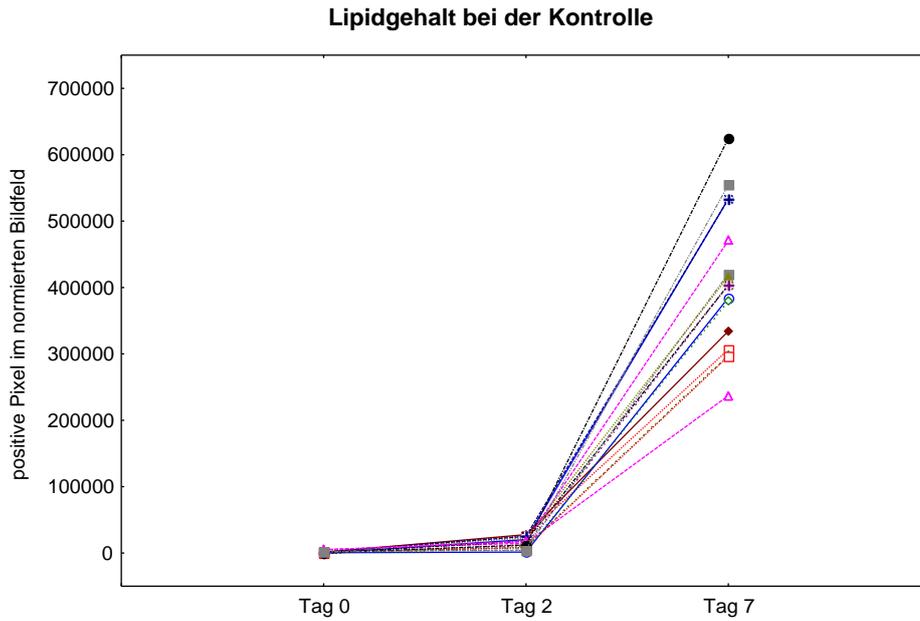


Abbildung 5.4.4: Gezeigt ist der Lipidgehalt (positive Pixel im normierten Bildfeld) der Kontrollzellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Dargestellt sind Einzelwerte. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

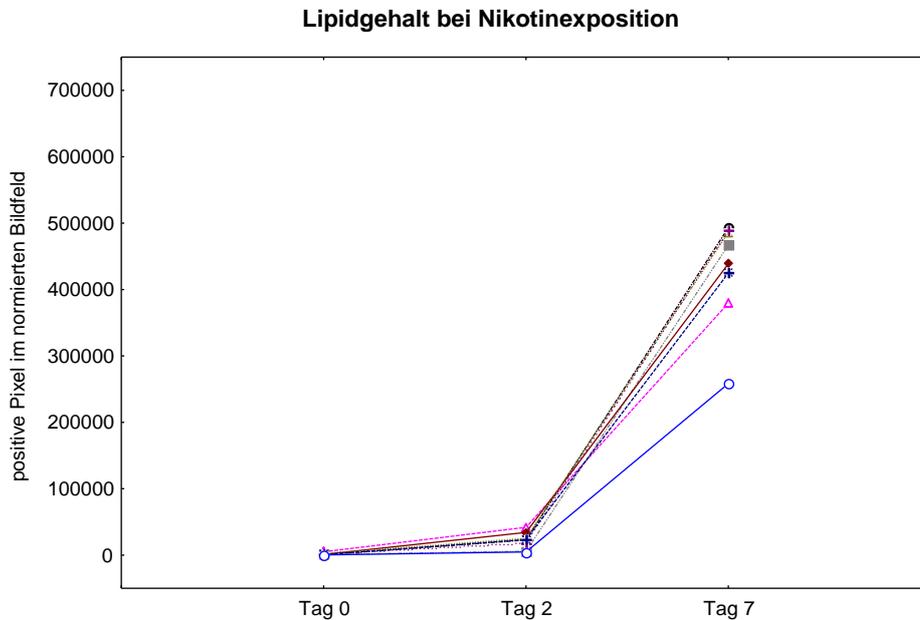


Abbildung 5.4.5: Gezeigt ist der Lipidgehalt (positive Pixel im normierten Bildfeld) der gegenüber Nikotin exponierten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Dargestellt sind Einzelwerte. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

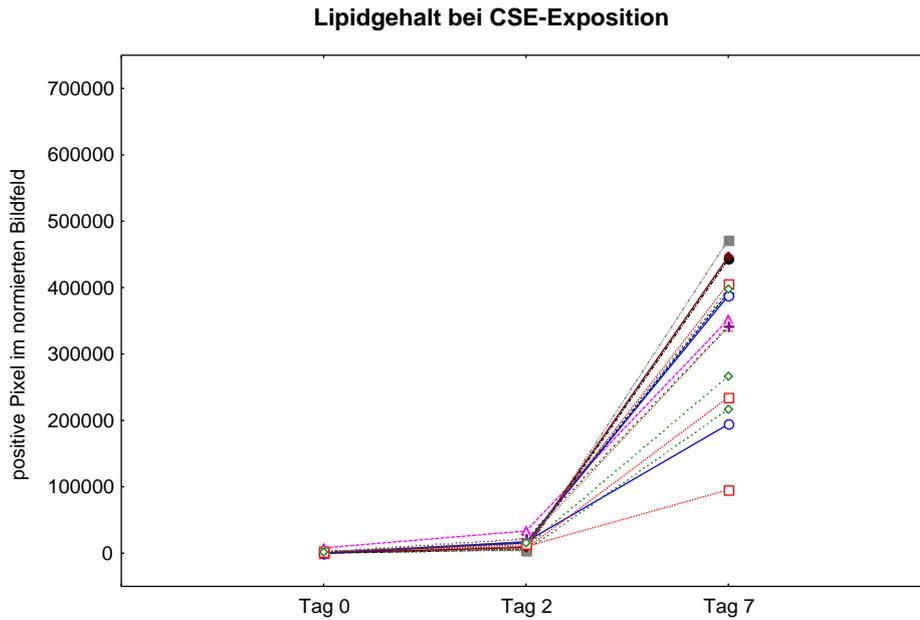


Abbildung 5.4.6: Gezeigt ist der Lipidgehalt (positive Pixel im normierten Bildfeld) der mit CSE behandelten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Dargestellt sind Einzelwerte. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

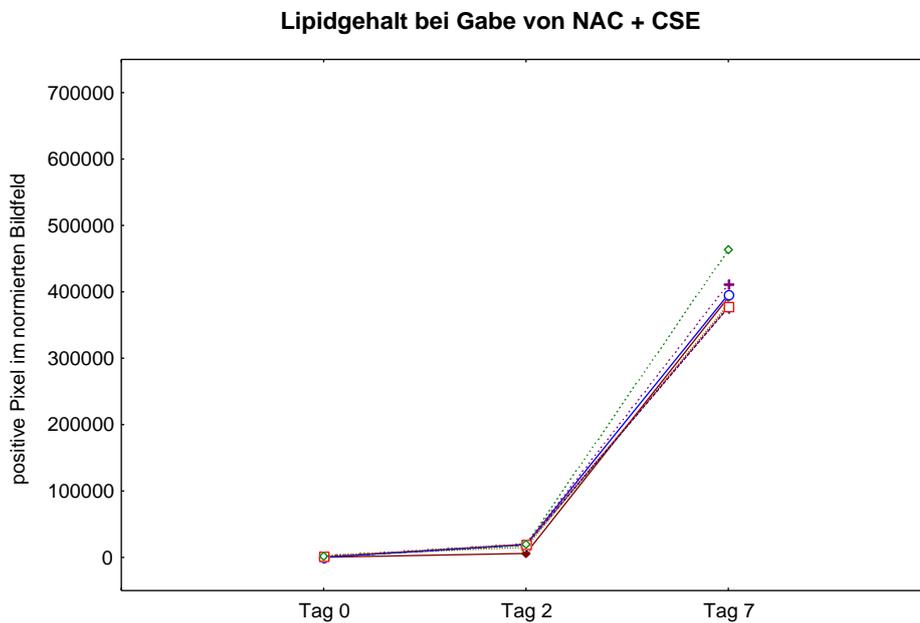


Abbildung 5.4.7: Gezeigt ist der Lipidgehalt (positive Pixel im normierten Bildfeld) der mit CSE und N-Acetylcystein (NAC) behandelten Zellen an den Auswertungstagen 0, 2 und 7. Dargestellt sind Einzelwerte. Jeder Wert basiert auf zwei parallelen Ansätzen.

6. Diskussion

Die Daten dieser Arbeit belegen, dass lösliche Komponenten von Zigarettenrauch (CSE) die Funktionalität von Adipozyten beeinträchtigen können, indem deren Proliferation und Differenzierung beeinflusst werden. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Befunden einer vorangegangenen Arbeit, in der das Expositionsmodell aufgebaut wurde [Machata et al. 2006]. Darüber hinaus fand sich, dass die Gabe eines Antioxidanz bei gleichzeitiger Exposition gegenüber CSE die Funktion der Zellen veränderte. Das Antioxidanz bewirkte eine Abnahme des Proteingehaltes der Zellen sowie des relativen Lipidgehalts, gleichzeitig jedoch eine massive Zunahme der spezifischen Enzymaktivität. Hingegen hatte die Gabe von Nikotin in einer dem CSE entsprechenden Konzentration keinen Effekt auf eine der untersuchten Messgrößen.

Zwecks Diskussion der erhaltenen Ergebnisse sollen zunächst mit Hilfe der Literatur wesentliche Faktoren, die Einfluss auf den Zellzyklus und damit auf die Adipogenese nehmen, dargestellt werden. Einzelheiten der Adipogenese auf molekularer Ebene werden im Anhang beschrieben. Die erhobenen Befunde sind phänomenologischer Natur und können daher nur indirekte Hinweise auf die beteiligten Mechanismen geben. In Verbindung mit der Literatur lassen sich allerdings einzelne Signalwege als wahrscheinlich identifizieren.

6.1 Molekulare Faktoren bei der Adipogenese

Durch Zugabe von Insulin, Dexamethason und Isobutylmethylxanthin (IBMX) wurde die Differenzierung der Präadipotyten zu Adipozyten eingeleitet. Insulin wirkt dabei über einen Rezeptor für IGF-1 und kann daher auch durch selbiges ersetzt werden [Rubin et al. 1978; Gregoire et al. 1998; Ntambi & Young-Cheul 2000; Gregoire 2001]. Durch Bindung von Insulin an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung der PI-3-Kinase. Während die PI-3-Kinase über eine Proteinkinase B (PKB) im Wesentlichen die Glukosehomöostase vermittelt, existiert noch ein alternativer Signalweg, der unabhängig von der PI-3-Kinase abläuft. Dabei kommt es zur Bindung und Aktivierung von GRB2 (Growth-factor receptor binding protein 2) und SOS (Son of sevenless) an dem phosphorylierten Insulinrezeptorsubstrat (IRS). Dies wiederum führt zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras, wodurch der MAPK

(Mitogen activated protein kinase)-Signalweg beschriftet wird und damit mitogene Effekte eingeleitet werden.

Dagegen bindet Dexamethason, ein synthetisches Glukokortikoid, an intrazelluläre Rezeptoren. Aufgrund seiner Lipophilie ist es in der Lage, die Zellmembran ungehindert zu passieren. Nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor im Zytosol kommt es zur Translokation in den Zellkern. Der Rezeptor-Steroid-Komplex bindet hier an seine Zielgene, was zu deren Transkription über eine Aktivierung der RNA-Polymerase führt.

IBMX, ein Phosphodiesterase-Inhibitor, hemmt den Abbau von cAMP und fördert auf diese Weise indirekt die Phosphorylierung und Aktivierung von Signalproteinen durch die cAMP-abhängige Proteinkinase.

Etwa eine Stunde nach Gabe des Differenzierungscocktails kommt es zur Genexpression der Leukin-Zipper-Transkriptionsfaktoren CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) β und δ . Diese wiederum induzieren die Bildung von PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors) – einem nukleären Hormonrezeptor – sowie dem Transkriptionsfaktor C/EBP α . Beide Transkriptionsfaktoren regulieren ihre Genexpression gegenseitig und erhalten dadurch ihre Aktivität aufrecht. PPAR γ ist auf die Anwesenheit von RXR α (retinoid X receptor α) – eines endogenen Liganden – angewiesen, um seine volle Aktivität entfalten zu können. Letzterer scheint durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors ADD1/SREBP-1c (adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1 / sterol regulatory element binding proteins) gebildet zu werden, der in der frühen Phase der Differenzierung auf mitogene und hormonelle Stimuli vermehrt aktiv wird. PPAR γ und C/EBP α nehmen bei dem Differenzierungsprozess der Präadipozyten eine zentrale Rolle ein und induzieren direkt und indirekt – über die Expression der Signaltransduktions-Proteine STATs (signal transducers and activators of transcription) – die Bildung von etwa 300 Proteinen, die die Morphologie und Funktionalität der Adipozyten bestimmen. Mit zunehmender Differenzierung werden die Zellen rund und lagern als enddifferenzierte Adipozyten Fetttröpfchen ein [Gregoire et al. 1998; Ntambi & Young-Cheul 2000, Morrison & Farmer 2000].

Wichtig für die Steuerung des Zellzyklus sind Mitglieder der E2F-Familie, die als Transkriptionsfaktoren zum Teil gegensätzliche Effekte auf die Transkription von PPAR γ aufweisen und damit sowohl auf Proliferation als auch auf Differenzierung der Zelle einwirken. Dabei konnte gezeigt werden, dass E2F₁₋₃ E2F-abhängige Gene aktivieren und somit in der Phase der klonalen Expansion die Vorbereitung auf die Zelldifferenzierung mittels PPAR γ einleiten, während E2F_{4,5} vorzugsweise die Expression ihrer Zielgene unterdrücken und so den Differenzierungsvorgang beenden, indem sie eine weitere Bildung von PPAR γ hemmen.

Somit lässt sich sagen, dass durch E2F₁₋₃ im Komplex mit DP1 die Bildung von PPAR γ induziert und so der Übergang der Zelle aus der Phase der klonalen Expansion in die Differenzierungsphase eingeleitet wird. Während der Differenzierung wird die Bildung von PPAR γ vor allem durch die Transkriptionsfaktoren C/EBPs und SREBP, wie oben erwähnt, aufrechterhalten. Durch Bindung von E2F₄/DP im Komplex mit Rb und anschließende Rekrutierung von Histondeacetylasen an den Promotor des PPAR γ -Gens wird eine weitere Bildung von PPAR γ gehemmt und die Differenzierung beendet. Die ausgereifte Zelle kann nun ihre volle Funktion ausüben [Fajas et al. 2002]

6.2 Faktoren bei der Regulation des Zellzyklus

Eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen unter anderem die Forkhead Box Transkriptionsfaktoren (FOX), indem sie das Wachstum, die Differenzierung und die Apoptose/Seneszenz der Zelle beeinflussen. So konnte z.B. für den Forkhead Box Transkriptionsfaktor des Typs C2 (FOXC2) gezeigt werden, dass er über eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität von PPAR γ in unterschiedlicher Stärke die Expression verschiedener, den differenzierten Phänotyp der Zelle prägender Gene inhibiert [Davis et al. 2004].

Interessant erscheint auch die Beteiligung der Forkhead Box Transkriptionsfaktoren der Klasse O (FOXO) an der Zellzyklusregulation. Diese werden reguliert durch die Proteinkinase B (PKB) und die Serum-und-Glukokortikoid-induzierte-Kinase (SGK). Beide Kinasen sind Substrate der Phosphatidylinositol-dependent Kinase (PDK). Neusynthetisiertes FOXO-Protein wird mit Hilfe einer bestimmten Erkennungssequenz (NLS, nuclear localization sequence) in den Zellkern

transloziert. Nach Phosphorylierung durch PKB/SGK und Bindung der Cofaktoren 14-3-3 und Crm1 wird das FOXO-Protein aus dem Zellkern exportiert.

Unterbleibt nun die Phosphorylierung des FOXO-Proteins, kann dieses im Zellkern seine Wirkung entfalten. Es bindet dabei an entsprechende Promotorregionen und induziert somit die Bildung von p27, eines Cyclinkinaseinhibitors (CKI), der den Cyclin/CDK-Komplex in seiner Aktivität hemmt, von p130, einem Mitglied der Rb-Familie, das in seinem hypophosphoryliertem Zustand den Transkriptionsfaktor E2F₄ bindet, sowie Cyclin G2. Des Weiteren vermindert FOXO die Expression von Cyclin D1 und D2. Damit wird der Übertritt in die S-Phase blockiert und die Zelle in der G₀-Phase arretiert.

Zusätzlich scheint FOXO die Bildung von GADD45a (growth arrest-and DNA damage-inducible protein a of 45 kDa) zu induzieren. Da letzteres im Rahmen einer zellulären Stresssituation hochreguliert wird, wird vermutet, dass auch FOXO bei zellulärem Stress aktiviert wird und somit Einfluss nimmt auf die zelluläre Stressresistenz. Es konnte gezeigt werden, dass FOXO3 und FOXO4, Mitglieder der FOXO-Familie, durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hitzeschock, nicht aber durch UV-Strahlung und Stimulation durch Wachstumsfaktoren vermehrt acetyliert werden. Als Folge der Stimulation durch obengenannte Stressoren kommt es zu einer Rückverlagerung von FOXO3 und FOXO4 in den Zellkern. Hier erfolgt die Acetylierung von FOXO durch die Proteinacetylase p300 und assoziierte Faktoren, ein Effekt, der durch die NAD⁺-abhängigen Proteindeacetylase SIRT1 in Abhängigkeit von der Promotorregion wieder aufgehoben wird. Allerdings scheinen zusätzlich auch Histondeacetylasen (HDACs) der Klassen I und II daran beteiligt zu sein.

Bemerkenswerterweise führt eine Interaktion von SIRT1 mit FOXO zu einer verminderten Expression des fas-Liganden-Gens. Dieser Ligand bindet an den fas-Rezeptor. Dadurch können mit Hilfe von Adaptermolekülen Caspasen an den zytosolischen Anteil des Rezeptor rekrutiert werden, die wiederum über eine Kaskade von Proteolysereaktionen weitere Caspasen aktivieren und somit den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen kommt es in der Anwesenheit von SIRT1 zu einer verstärkten Expression von FOXO-abhängigen Genen, die eine Resistenz der Zelle gegenüber

obengenannten Stressoren herbeiführen (GADD45). SIRT1 verstärkt dadurch die Expression der Gene durch FOXO, die sich auf Zellzyklus und Stressantwort beziehen, während Gene unterdrückt werden, die den Zelltod begünstigen. Selbiges konnte auch bei einer Interaktion von SIRT1 mit p53 beobachtet werden, was die oben geschilderten Erkenntnisse noch unterstützt [Langley et al. 2002; Brunet et al. 2004; Furukawa-Hibi et al. 2005].

Hier ergeben sich interessante Querverbindungen zur Adipozytenfunktion sowie zum Energiestoffwechsel, da bekannt ist, dass Sirtuine, vor allem SIRT1 bzw. sein Homolog Sir2, eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Langlebigkeit bei kalorischer Restriktion spielen. Bekannt ist, dass SIRT1 über eine Hemmung von Genen, die über PPAR γ kontrolliert werden, die Adipogenese hemmt. Analog zur reduzierten Adipogenese in Präadipozyten stimuliert SIRT1 in reifen Adipozyten die Lipolyse [Picard et al. 2004]. Reguliert wird SIRT1 unter anderem über NAD⁺. Bei kalorischer Restriktion kommt es zu einer Zunahme von NAD⁺ und zu einer Abnahme von NADH, was sich in einer Zunahme des Verhältnisses NAD⁺/NADH zeigt. NADH hemmt die SIRT1-Aktivität [Yang & Sauve 2006]. Dies lässt einen Zusammenhang zwischen der Stresssituation einer kalorischen Restriktion und einer durch SIRT1 vermittelten Funktionsstörung der Adipozyten vermuten.

SIRT1 scheint im Wesentlichen mitogene Effekte von Insulin bzw. IGF-1 zu unterbinden, während die Stoffwechsellistung der Zelle hinsichtlich der Glucose- und Fettmetabolisierung weitgehend unbeeinflusst bleibt oder sogar verbessert wird. Vermehrte SIRT1-Expression geht einher mit verminderter Expression des IGFBP-1 (IGF binding protein), vermehrter Gluconeogenese in der Leber und vermehrter Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas [Longo & Kennedy 2006]. Die Störung der Stoffwechsellistung der Zelle wäre demnach eher einer vermehrten Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α , mit nachfolgender Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zuzuschreiben (s.u.). Möglicherweise üben Sirtuine ihre lebensverlängernde Wirkung u.a. indirekt über Adipokine aus [Picard & Guarente 2005]. Die Sirtuine stehen offenbar an zentralen Schaltstellen sowohl in der Regulation der zellulären Stressantwort auf Oxidanzien [Wenzel 2006] als auch der Induktion von Seneszenz oder Apoptose als auch der Antwort auf Mangel an Nahrung, die mit einer veränderten Adipozytenfunktion einhergeht. Ferner könnte

sich eine Störung des Adipozytenspezifischen Hormonhaushaltes systemisch auswirken und so auch die Funktion anderer Organe in Mitleidenschaft ziehen, wie es für den Pathomechanismus des Lungenemphysems vermutet wird.

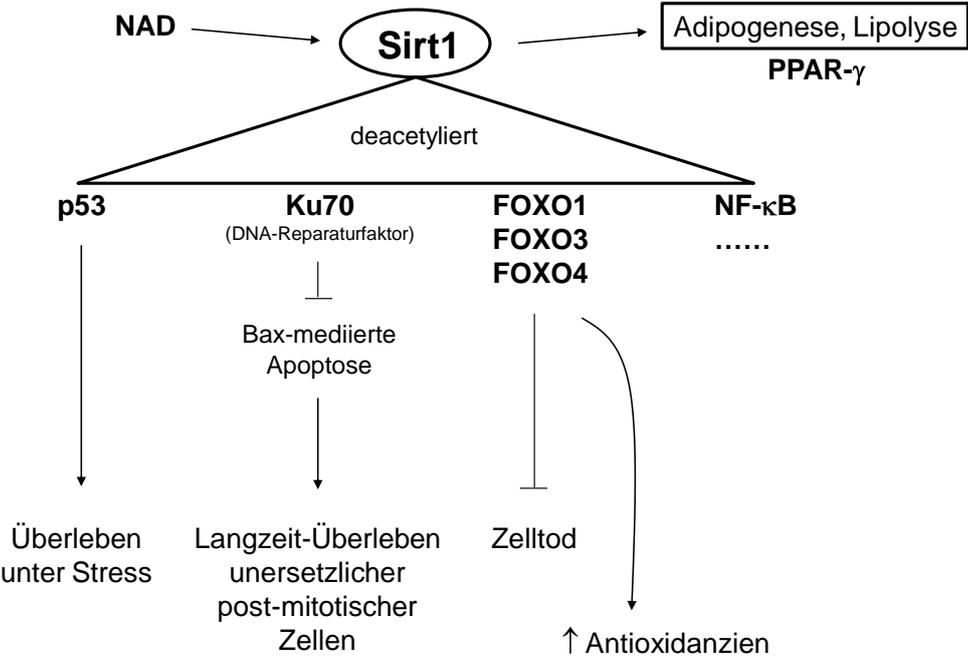


Abbildung 6.2.1: Sirtuine – multifunktionale Enzyme. Dargestellt ist die Wirkung der Proteindeacetylase SIRT1 auf den Zellmetabolismus und Zellzyklus regulierende Proteine. Sirtuine vermitteln einerseits zelluläre Stressresistenz, andererseits verhindern sie eine Progression des Zellzyklus und garantieren so das Überleben der Zelle. Sie scheinen ebenfalls über PPAR γ einen entscheidenden Einfluss auf die Adipogenese nehmen zu können. Da Sirtuine in Stresssituationen der Zelle vermehrt aktiv sind, könnte sich daraus ein wichtiger Zusammenhang ergeben für eine unter zellulärem Stress gestörte Adipogenese, eine damit gestörte Funktionalität resultierender Adipozyten und ein gestörtes hormonelles Gleichgewicht der Adipozyten, das die Entwicklung bzw. Progression eines Lungenemphysems begünstigen könnte. Einzelheiten siehe Text.

Patienten mit Anorexia nervosa zeigen strukturelle Veränderungen des Lungenparenchyms, wie sie auch bei Lungenemphysem beobachtet werden können [Coxson et al. 2004]. Man könnte dieses Phänomen darauf zurückführen, dass die einzelne Strukturzelle des Lungengewebes begünstigt durch hormonelle Dysfunktion des Fettgewebes im Zuge exzessiver oder chronischer kalorischer Restriktion Mechanismen ankurbelt, die eine Resistenz der Zelle gegenüber mitogenen Stimuli verursachen und somit einen vorzeitigen Zellzyklusarrest einleiten. Das Gewebe verliert damit seine Fähigkeit zur physiologischen Regeneration mit der Folge eines langfristigen Strukturverlustes der Lunge. In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen konnte in Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem eine veränderte Expression Insulin-assoziiierter Faktoren nachgewiesen werden [Müller et al. 2006]. Die Annahme, dass das Fettgewebe nur eine Speicherfunktion ausübt, kann somit nicht mehr länger aufrechterhalten werden. Vielmehr handelt es sich um ein metabolisch hochaktives Gewebe.

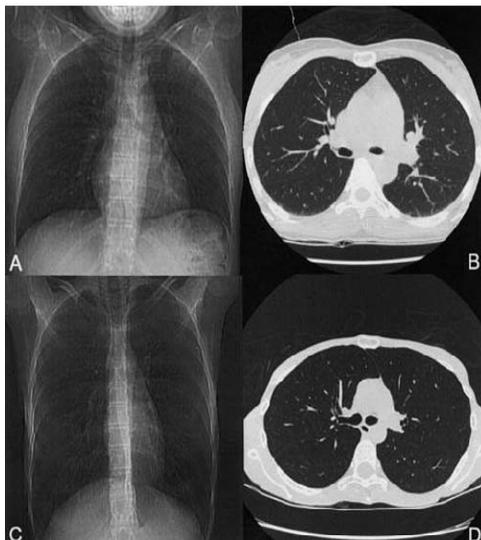


Abbildung 6.2.2: Dargestellt sind eine konventionelle Röntgenaufnahme (links), sowie eine computer-tomographische Darstellung (rechts) des Thorax bei einer gesunden Person (A,B) und einer Patientin mit Anorexia nervosa (C,D). Man erkennt die für das Lungenemphysem charakteristische Zunahme des intrathorakalen Gasvolumens (vermehrte Transparenz der Lungenfelder, Kompression des Mediastinums, sowie den horizontalen Verlauf der Rippen mit Vergrößerung des interkostalen Spaltes) in der konventionellen Röntgen-Thorax-Aufnahme sowie einen Strukturverlust (verminderte Zeichnung) im CT-Bild [Coxson et al. AJRCCM 2004].

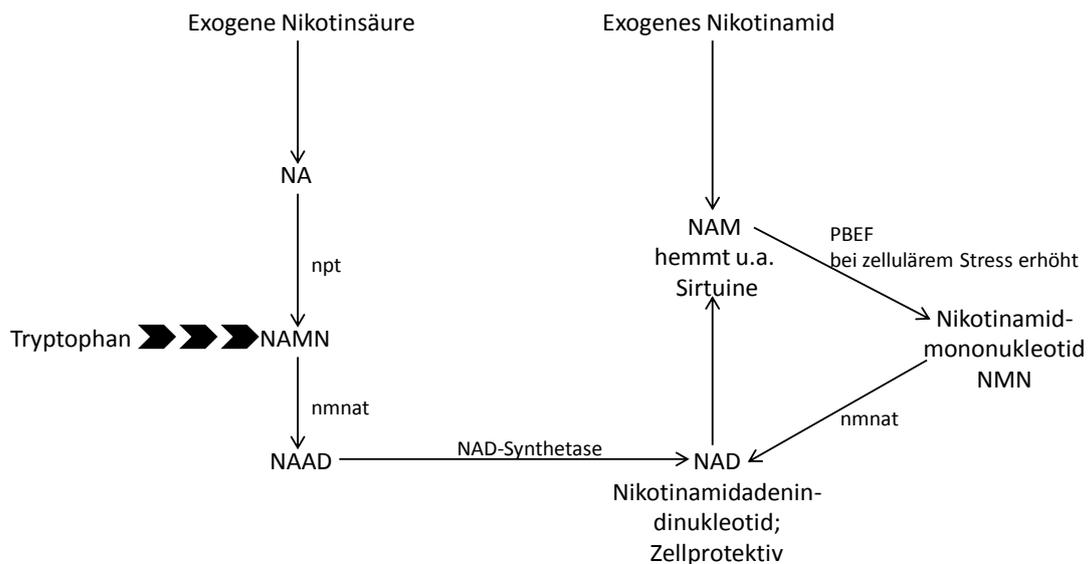


Abbildung 6.2.3: NAD⁺-Metabolismus. Die Abbildung zeigt die de novo-Synthese von NAD⁺ aus Tryptophan und die Resynthese aus Nikotinamid (NAM). Letzteres hemmt Sirtuine in ihrer Funktion, wird jedoch durch pre-B-cell enhancing factor (PBEF) zu Nikotinamid-Mononukleotid umgewandelt. PBEF wird unter zellulärem Stress stark exprimiert. Hieraus ergibt sich ein interessanter Zusammenhang aus einer unter kalorischer Restriktion erhöhten Stresssituation des Körpers und der möglichen Induktion einer zellulären Seneszenz durch Sirtuine. NA: Nikotinsäure, NAMN: Nikotinsäure Mononukleotid, NAAD: Nikotinsäure Adenin Dinukleotid, NMN: Nikotinamid Mononukleotid; NAM: Nikotinamid, npt: Nikotinsäure-Phosphoribosyltransferase, nmnat: Nikotinsäure / Nikotinamid Mononukleotid Adenyltransferase, PBEF: pre-B-cell enhancing factor [modifiziert nach Yang T & Sauve AA AAPSJ 2006].

6.3 Interpretation der Ergebnisse

6.3.1 Auswirkungen von CSE

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Zigarettenrauchextrakt (CSE) und Nikotin auf die Proliferation, Differenzierung und Funktion von Präadipozyten der Maus (3T3-L1) untersucht, sowie eine Beeinflussung der beobachteten Wirkungen nach CSE-Exposition durch eine vorangegangene Gabe des Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC).

Wie in den vorangegangenen Versuchen [Machata 2009] erfolgte die Exposition der Zellkulturen gegenüber CSE in einer Konzentration von 5 % dauerhaft über den gesamten Beobachtungszeitraum von 7 Tagen. Während die Auswertung an Tag 0 noch vor Gabe des Differenzierungscocktails erfolgte und somit die Ausgangssituation darstellte, wurden an den Auswertungstagen 2 und 7 mögliche Effekte von CSE auf die Proliferation, Differenzierung und Funktion der Präadipozyten bzw. Adipozyten ermittelt. Entsprechend den vorangegangenen Untersuchungen wurden die Zellkulturen nur im Differenzierungscocktail mit Insulin behandelt, um Auswirkungen der Expositionen deutlicher zu erkennen. Insulin wurde also nach Ablauf der 2 Tage nicht weiter gegeben, um zu vermeiden, dass die Zellen maximal angetrieben und mögliche Unterschiede reduziert wurden.

Die Zellzahlen zeigten eine deutliche Zunahme sowohl der Kontrollzellen als auch der gegenüber CSE exponierten Zellen an den Auswertungstagen 2 und 7 im Vergleich zu Tag 0, als Ausdruck der vor der endgültigen Differenzierung noch weiter vorangetriebenen Proliferationsprozesse. Allerdings ließ sich hinsichtlich der Absolutzahlen insbesondere für den Tag 7 eine signifikante Abnahme der Zahl der gegenüber CSE exponierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachten. Dies zeigte eine verminderte proliferative Kapazität der CSE-exponierten Zellen an. Diese Ergebnisse sind den an Lungenfibroblasten erhaltenen Daten analog [De Ritis 2009].

Zugleich war die Proteinmenge bei Exposition gegenüber CSE reduziert. Da diese Änderung parallel zu derjenigen der Zellzahl erfolgte, zeigte sich für die Proteinmenge bezogen auf die Zellzahl kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungen. Insbesondere konnten auch bei Versuchsende

(Tag 7) die Werte für die CSE- und Kontrollexposition als ähnlich gelten. Diese Beobachtungen deuten zunächst einmal darauf hin, dass CSE primär in die Regulation des Zellzyklus, weniger hingegen in die Funktionalität der Zellen eingriff, wie es sich u. a. im relativen Proteingehalt äußert. Dies lässt die Möglichkeit einer veränderten Lipidspeicherung noch offen.

Um die Funktion der Zellen genauer zu charakterisieren, wurde die Aktivität der Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH) als eines adipozytenspezifischen Enzyms gemessen. Die Ergebnisse für die GPDH-Aktivität zeigten zum einen, dass zu Beginn sowie unmittelbar nach Gabe des Differenzierungscocktails noch keine wesentlichen Enzymaktivitäten messbar waren. Dies belegt, dass die Zellen noch nicht in signifikantem Maße vordifferenziert waren. Eine messbare Enzymaktivität war erst an Tag 7 festzustellen. Hierbei zeigten die mit CSE behandelten Zellen eine verminderte Enzymaktivität, d.h. sie waren in ihrer Funktionalität beeinträchtigt. Dies könnte zum einen ein direkter Effekt der reduzierten Zellzahl sein, zum anderen ein Effekt des noch anwesenden CSE auf die Funktion des Enzyms. Ferner könnte die verminderte Funktionalität der mit CSE behandelten Zellen eine eingeschränkte Differenzierung der Zellen bedeuten. Dies zu eruieren, wäre beispielsweise in weiteren Versuchen möglich, in denen der CSE im Laufe der Adipogenese wieder weggenommen wurde; dies war allerdings nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Bezog man jedoch die reduzierte GPDH-Aktivität auf die reduzierte Zellzahl, so war kein signifikanter Unterschied der GPDH-Aktivität zwischen CSE-behandelter und Kontrollgruppe mehr nachweisbar. Dies sprach dafür, dass der Effekt auf die Gesamtfunktion der Adipozyten wesentlich dem Effekt auf die Zellzahl zuzuschreiben war. Anders jedoch verhielt es sich bei der GPDH-Aktivität, wenn diese auf die Proteinmenge bezogen wurde. Hier fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen CSE und Kontrolle im Sinne einer Beeinträchtigung durch CSE insbesondere für den Tag 7. Bezog man hingegen die GPDH-Aktivität auf die Lipidmenge, so fand sich wiederum kein signifikanter Effekt von CSE. Diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Messgrößen hängen möglicherweise mit der Variabilität der Bezugsgrößen zusammen, die vermutlich für die Proteinbestimmung am kleinsten war. Andererseits jedoch sind sie plausibel in der Hinsicht, dass die verminderte GPDH-Aktivität auch mit einer geringeren Menge an akkumuliertem Lipid einherging und daher ihr Verhältnis zueinander nicht durch CSE beeinflusst wurde. Die

Tatsache, dass die Aktivität pro Zellzahl nicht signifikant abnahm, wohl aber die Aktivität bezogen auf die Proteinmenge und andererseits die Proteinmenge pro Zelle keinen signifikanten Effekt zeigte, ist vermutlich durch die unterschiedlichen Streuungen der Messgrößen bedingt, die zu einer unterschiedlichen statistischen Bewertung führten. Unter Berücksichtigung der Tendenzen, die den Graphiken zu entnehmen sind, deutet insgesamt die Abnahme der Aktivität pro Proteinmenge doch auf eine Beeinträchtigung der Funktion der Zellen hin, der über den Effekt auf die Zellzahl hinausging.

Eine Zunahme der mittels Bildverarbeitung ermittelten Lipidmenge ließ sich über den gesamten Auswertungszeitraum beobachten. Besonders an Tag 7 wurde hinsichtlich des absoluten Lipidgehaltes ein signifikanter Unterschied zwischen CSE- und Kontrollgruppe erkennbar. Ebenso zeigte sich ein Unterschied der Lipidmenge bezogen auf die Proteinmenge, nicht jedoch im Bezug auf die Zellzahl, da letztere offenbar parallel abnahm. Diese Beobachtung war zu den Daten für die GPDH-Aktivität parallel und deutete ebenfalls eine funktionelle Veränderung der Zellen an, zusätzlich zu dem Effekt auf die Zellzahl. Man könnte diese Beobachtung auch so interpretieren, dass möglicherweise in den gegenüber CSE exponierten Zellen metabolische Reserven nicht in Form von Lipid gespeichert, sondern durch vermehrte Proteinbildung verbraucht wurden.

Die Beobachtungen speziell der Zellzahlen, GPDH-Aktivität bezogen auf den Proteingehalt sowie des Lipidgehaltes im Bezug auf die Proteinmenge legen einen antiproliferativen und zum Teil auch differenzierungshemmenden Effekt auf Präadipozyten bzw. Adipozyten durch CSE nahe. Allerdings ist immer zu berücksichtigen, dass CSE bis zu Versuchsende im Kulturmedium anwesend war. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Seneszenzmarker bestimmt. Jedoch ist eine durch CSE bewirkte vorzeitige Alterung der Adipozyten vorstellbar, die sich primär in anderen Adipozytenfunktionen äußern kann. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass seneszente Adipozyten in Kultur eine nach wie vor unbeeinträchtigte Lipidspeicherung aufwiesen, allerdings hinsichtlich ihrer metabolischen und hormonellen Leistung im Vergleich zu jungen Adipozyten eingeschränkt waren [Yu & Zhu 2004]. Eine hormonelle Störung der Adipozyten wiederum könnte Einfluss nehmen auf die zelluläre Funktion anderer Organe.

Da der Zigarettenrauch aus vielen Substanzen besteht, müssten weitere Studien durchgeführt werden, um die Substanzen zu identifizieren, die die die hauptsächlichen Wirkungen auf die Präadipozyten bzw. Adipozyten ausüben. Oxidanzien sind im Zigarettenrauch reichlich vorhanden und können vielfältige Effekte auf Zellen ausüben. Da allerdings endogene Oxidanzien die Adipogenese fördern [Krieger-Brauer & Kather 1995; Mercier et al. 2001; Carpéné et al. 2008], ist es nicht von vornherein klar, ob ihnen die oben beschriebenen Effekte zuzuschreiben sind. Allerdings könnten endogene und exogene Oxidanzien im Prinzip ganz verschiedene Effekte haben. Dies soll im folgenden Kapitel genauer diskutiert werden.

6.3.2 Oxidanzien versus Antioxidantien

Wie erwähnt bewirken Sirtuine einen vorzeitigen Zellzyklusarrest. Die Zelle überspringt gewissermaßen eine weitere Phase der klonalen Expansion und tritt vorzeitig in die Differenzierungsphase ein. Folglich sind diese vorzeitig differenzierten Adipozyten in ihrer Funktion eingeschränkt, da ihnen nicht genügend Zeit gegeben war, sich ausreichend mit metabolischen Reserven auszustatten. In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass durch Behandlung einer 3T3-L1-Zellkultur mit CSE eine Beeinträchtigung der Differenzierung der Zellen verursacht werden konnte. Dies zeigte sich in einer verminderten GPDH-Aktivität und Lipidakkumulation bei gleichzeitiger Reduktion der Proliferationsrate. Möglicherweise wird diese vorzeitige insuffiziente Differenzierung auf Kosten der Proliferationsrate durch eine endogene/exogene Oxidanzienproduktion hervorgerufen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Proteinmenge pro Zelle nach Exposition gegenüber CSE in diesen Versuchen zunahm, was bedeutet, dass die Zelle nicht in vollem Umfang ihre metabolischen Reserven für die Lipidspeicherung verwandte [Machata et al. 2006].

Eine Lipidakkumulation auch bei nicht diabetogener Stoffwechsellage geht mit einer erhöhten Plasmakonzentration von Oxidantien einher. Dabei kommt es mittels vermehrter Freisetzung freier Fettsäuren zur Aktivierung der membranständigen, adipozytenspezifischen NADPH/H⁺-Oxidase [Inoguch & Nawata 2005]. Diese baut sich aus mehreren Komponenten auf: einem in der Membran befindlichen Anteil, dem Cytochrom b 558, das aus einer kleinen 22kDa- und einer großen 91kDa-

Untereinheit besteht. Erst durch Phosphorylierung des im Zytosol befindlichen 47kDa-Proteins durch eine Proteinkinase C kommt es zur Assoziation desselben mit dem 67kDa-Protein im Zytosol mit nachfolgender Bindung dieses Dimers an Cytochrom b 558 und dessen Aktivierung. Diese NADPH/H⁺-Oxidase reduziert Sauerstoff zu einem Superoxidanion (O₂⁻) entsprechend nachstehender Reaktion: $\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2 \text{O}_2^-$. Das Superoxidanion kann nun weiter unter Katalyse durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) reduziert werden. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass erhöhte Plasmaspiegel von Oxidantien Funktionsstörungen unter anderem des Fettgewebes, der Pankreas und auch des kardiovaskulären Systems nach sich ziehen [Inoguchi et al. 2000; Inoguchi & Nawata 2005; Paravicini & Touyz 2008; Serpillon et al. 2009; Sedeek et al. 2009].

Eine vermehrte Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bewirkt lokal im Fettgewebe eine Dysregulation in der Adipokinproduktion, was in einer vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-6, sowie Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und in einer verminderten Sekretion von Adiponektin ersichtlich ist. So konnte in 3T3-L1-Zellen eine verminderte Expression von PPAR γ nachgewiesen werden, welches über Bindung an PPAR γ -responsiver Elemente (PREs) die Transkription von Adiponektin reguliert [Furukawa et al. 2004].

Zugleich kommt es auf transkriptioneller Ebene zu einer Herunterregulation antioxidativ wirksamer Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD), Gluthation-Peroxidase und Katalase. Eine Oxidanzien-bedingte Schädigung des Fettgewebes bleibt aber nicht lokal auf dieses beschränkt, sondern führt über eine Störung der Adipozytenfunktion, die sich in einer Störung der physiologischen Adipokinsekretion äußert, auch zu einer systemisch ausgeprägten Dysfunktion anderer Organe [Furukawa et al. 2004].

Allerdings kann man einige pathologische Mechanismen auch einer direkten Oxidanzienwirkung zuschreiben. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass Sauerstoffradikale mit α_1 -Antitrypsin reagieren und diesen Proteaseninhibitor mittels Oxidation eines Methionylrestes inaktivieren. Dies kann eine lokale Gewebeschädigung bei Entzündungen noch verstärken [Taggart et al. 2000].

Zugleich bewirkt eine verminderte Expression von PPAR γ , möglicherweise bedingt durch vermehrte Sirtuin-Expression und nachfolgend verminderter Adiponektinsekretion (s.o.), in alveolären Makrophagen eine verstärkte entzündliche Aktivität [Valledor & Ricote 2004].

Andererseits nimmt man an, dass ein kurzzeitiger Aktivitätsanstieg der Insulin-abhängigen NADPH/H⁺-Oxidase mit nachfolgender Synthese reaktiver Sauerstoffspezies wichtig ist für den Insulin-Signalweg in der Zelle. So kann die Gabe von H₂O₂ über das Kulturmedium die Adipogenese fördern [Krieger-Brauer & Kather 1995]. Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten die Produktion von ROS zunimmt und damit die NADPH/H⁺-Oxidase-Aktivität direkt korreliert mit der Fettakkumulation. Möglicherweise fördern niedrige Konzentrationen von ROS die Adipogenese, wohingegen eine starke Zunahme der Fettmasse verbunden mit einem entzündlichen Milieu im Fettgewebe eine weitere Zelldifferenzierung beeinträchtigt. Dem entspricht auch die Tatsache, dass die Aktivierung der Semicarbazid-sensitiven Amino-Oxidase mittels H₂O₂ die Differenzierung der Zelle zeit- und dosisabhängig fördert [Mercier et al. 2001]. Die Expression dieser Oxidase nimmt während der Adipogenese stark zu. Dieser Effekt konnte durch Katalase teilweise aufgehoben werden. Auch eine im Tierversuch durchgeführte Behandlung mit Inhibitoren der Semicarbazid-sensitiven Amino-Oxidase und der Monoaminoxidasen konnte eine Reduktion in der Lipidspeicherung von Adipozyten nachweisen [Mercier et al. 2001; Carpéné et al. 2008]. Eine exzessive Exposition gegenüber ROS reduziert allerdings die Insulinsensitivität insulinabhängiger Zellen. Bedingt durch die Bildung proinflammatorischer Zytokine und eine gestörte Adiponektinsekretion kommt es zu einer Funktionseinschränkung anderer Organe [Furukawa et al. 2004].

Bemerkenswert ist auch, dass verschiedene Homodimere der gleichen Wachstumsfaktoren unterschiedliche Auswirkung auf die Aktivität der Oxidase haben. Während bestimmte Homodimere des Fibroblast Growth Factor (FGF) sowie des Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) die Aktivität der Oxidase antagonisieren, ein Effekt, der durch H₂O₂ reduziert werden kann, haben andere Homodimere der gleichen Wachstumsfaktoren einen positiven Effekt auf die Adipogenese [Krieger-Brauer & Kather 1995]. All diese Wirkungen, die durch ROS hervorgerufen werden, können mit Hilfe von Antioxidantien, wie z.B. N-Acetylcystein (NAC) aufgehoben

werden. Demnach sind sie in der Lage, die Adipogenese zu hemmen. Darüber hinaus konnten sie die Proliferation und Lebensspanne von Präadipozyten – pluripotenter mesenchymaler Stammzellen – vergrößern, bevor diese zu Adipozyten ausreifen [Lin et al. 2005].

Des Weiteren sind Antioxidantien auch in der Lage, dem Entzündungsprozess im Fettgewebe entgegen zu arbeiten. Eine vermehrte Fettmasse geht mit einem Anstieg des $\text{TNF}\alpha$ -Spiegels einher. Mittels $\text{NF-}\kappa\text{B}$ induziert $\text{TNF}\alpha$ die Bildung weiterer proinflammatorischer Adipokine und damit diejenige reaktiver Sauerstoffspezies. Es supprimiert die Synthese antioxidativ wirksamer Enzyme, wie CuZnSOD , MnSOD und Katalase – nicht allerdings der Glutathion-Peroxidase (GPX) – sowie von Adiponektin. Mittels NAC konnte die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Dysbalance in der Synthese pro- und antiinflammatorischer Adipokine beseitigt werden. Damit lässt sich mit Hilfe von NAC, ungeachtet der komplexen Wirkungsweise von ROS, die durch den Überschuss an Fettgewebe verursachte vermehrte Oxidanzienproduktion und die damit verbundene Ausprägung systemischer Störungen als Folge eines gestörten Gleichgewichts in der Adipokinsekretion, wie dem metabolischen Syndrom, günstig beeinflussen [Furukawa et al. 2004; Araki et al. 2006].

6.3.3 Effekte durch N-Acetylcystein

Die Ausführungen über Effekte einer Exposition von Präadipozyten bzw. Adipozyten gegenüber endogenen Oxidanzien sowie die Beobachtungen, die an diesen Zellen nach Gabe von Oxidaseinhibitoren und Antioxidantien gemacht wurden, sind wichtig, um die Wirkungen von CSE bei Gabe von N-Acetylcystein (NAC) zu analysieren. Da zumindest für endogene Oxidanzien ein fördernder Effekt auf die Adipogenese beschrieben wurde, wäre durch die Gabe von N-Acetylcystein zum einen eine Antagonisierung schädlicher Oxidanzien im CSE als positiver Effekt denkbar, zum anderen aber auch eine Funktionsstörung der Adipozyte. Im Falle einer durch exogene Oxidanzien verursachten Störung der Adipogenese wäre durch eine NAC-Gabe, anders als hinsichtlich einer endogenen Oxidanzienexposition zu erwarten, eine Verbesserung der Adipozytenreifung zu erwarten. Möglich wäre allerdings auch eine durch Nikotin verursachte Störung der Adipogenese, die die zu erwartenden positiven Effekte durch Oxidanzien überspielte. Der Effekt von Nikotin wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht (s.u.).

Ein Vergleich zwischen Zellen, die mit CSE behandelt wurden, und solchen, die vor CSE-Behandlung mit NAC inkubiert wurden, zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zellzahl. Die Gabe von NAC hatte somit keine Auswirkung auf die durch CSE hervorgerufene Proliferationshemmung der Zellen. Demnach wäre ein möglicher Effekt von Oxidanzien nicht ausschlaggebend an den beobachteten Wirkungen des Zigarettenrauchextraktes. Anstatt die Reduktion in der Proliferationsrate durch CSE aufzuheben, wurde diese im Gegenteil durch NAC noch verstärkt, so dass die Zellzahl bereits an Tag 2 stagnierte.

Allerdings zeigte sich in der GPDH-Aktivität ein Unterschied zwischen den Zellen nach CSE-Exposition und den Zellen, die vor und während CSE-Exposition mit NAC behandelt wurden. Anders als hinsichtlich der endogenen Effekte von Oxidanzien zu erwarten, ließ sich man bei Inkubation mit NAC eine insgesamt vermehrte GPDH-Aktivität in den Adipozyten beobachten, trotz reduzierter Zellzahl. Ein Artefakt konnte durch den Befund ausgeschlossen werden, dass auch die Lipidmenge pro Proteinmenge oder Zellzahl erhöht war. Die Zellen waren also insgesamt aktiver in ihrer Funktion als Adipozyten, obwohl ihre Anzahl vermindert war.

Denkbar wäre, dass die Konzentration von NAC zumindest bezüglich der Proliferation nicht ausreichend hoch war; allerdings bewegte sich die Konzentration in einem Bereich, der bei anderen Zellen, beispielsweise Lungenfibroblasten, protektive Effekte auch bezüglich der Reduktion der Zellzahl hatte [De Ritis 2009]. Ferner belegte die Funktionssteigerung der mit NAC behandelten Zellen, dass die Substanz in einer im Prinzip aktiven Konzentration anwesend war. Dennoch blieb die Kombination der beobachteten Effekte bei Gabe von NAC schwer zu verstehen. Bezüglich der reduzierten Zellzahl kann man vermuten, dass in Anwesenheit von CSE NAC eine vorzeitige Differenzierung der Zellen die Reduktion in der klonalen Expansion bewirkte, da in den Testsystemen die Expansion der Zellen und ihre Differenzierung miteinander gekoppelt waren.

6.3.4 Effekte von Nikotin

Im Anschluss an die Beobachtungen mit CSE wurden mögliche Effekte von Nikotin auf Adipozyten untersucht, um zu eruieren, inwieweit Nikotin für die beobachteten Effekte mit verantwortlich war. In Untersuchungen an Lungenfibroblasten hatte Nikotin einen signifikanten Effekt auf die Proliferation gezeigt, der etwa 50 % des

Effektes von CSE ausmachte [De Ritis 2009]. Bei den Adipozyten hingegen bewirkte Nikotin in keiner der Messgrößen erkennbare Veränderungen, so dass man davon ausgehen kann, dass Nikotin in der im CSE vorhandenen Konzentration zumindest bei der verwendeten Präadipozytenlinie der Maus keine Effekte auf die Adipogenese hat.

Aus der Literatur ist über die Wirkung von Nikotin auf Adipozyten nur wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Adipozyten – zumindest bei Ratten – über einen funktionellen nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) verfügen. Nikotin nimmt über diesen Rezeptor zeit- und dosisabhängig Einfluss auf die Freisetzung von $TNF\alpha$ und Adiponektin. Während eine kurzzeitige Gabe von Nikotin zu einer vermehrten Sekretion von $TNF\alpha$ und Adiponektin führt, reduziert eine längerdauernde Gabe die Freisetzung von $TNF\alpha$, verstärkt allerdings die von Adiponektin. Letzteres ist dabei möglicherweise auf die Reduktion von $TNF\alpha$ zurückzuführen. Dieser Effekt einer längerfristigen Nikotingabe könnte sich demnach positiv auf die Insulinsensitivität auswirken [Liu et al. 2004]. Die vorliegenden Daten dieser Arbeit erlauben keine nähere Analyse der Mechanismen, allenfalls die Aussage, dass Präadipozyten und Adipozyten der Maus weniger sensitiv gegenüber Nikotin sind als menschliche Lungenfibroblasten.

6.3.5 Schlussfolgerung im Vergleich zu anderen Zelltypen

Die Daten dieser Arbeit belegen, dass in wässrigem Zellkulturmedium aufgenommener Zigarettenrauchextrakt Effekte auf Präadipozyten in Zellkultur haben kann. Die Wirkungen auf die Zellproliferation waren ähnlich den vorher an Lungenfibroblasten beobachteten Effekten, allerdings deutlich weniger ausgeprägt [De Ritis 2009]. Die unterschiedliche Sensitivität äußerte sich auch darin, dass Nikotin in der im Zigarettenrauchextrakt vorliegenden Konzentration keinerlei messbare Wirkungen hatte, anders als bei Lungenfibroblasten. Während bei Lungenfibroblasten die Gabe des Antioxidanz NAC den Effekt des Zigarettenrauchextraktes auf die Entwicklung der Zellzahl reduzierte, führte die zusätzliche Gabe von NAC bei den Adipozyten eher zu einer weiter reduzierten Zellzahl. Allerdings war gleichzeitig die Funktionsfähigkeit der entstandenen Adipozyten erhöht, die sich in einer erhöhten spezifischen Enzymaktivität und

Lipidspeicherung äußerte. Der Aufbau der Versuche machte es unwahrscheinlich, dass die Messung der Enzymaktivität selbst durch die vorhandenen Komponenten wie CSE oder NAC gestört war. Aus diesem Grunde ist anzunehmen, dass exogene Oxidanzien bei der Adipogenese eine andere Rolle spielen als endogene Oxidanzien und dass die Wechselwirkungen zwischen Antioxidanzien und oxidativen exogenen Faktoren bei Adipozyten schwer voraussehbar sind. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, inwieweit die Adipozyten bleibende Änderungen durch Zigarettenrauch erleiden, ähnlich Fibroblasten, oder ob nach Wegnahme des Zigarettenrauchextraktes eine vollständige Restitution der Funktion zu beobachten ist inklusive einer solchen der final erreichten Zellzahl.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Gegenstand, die Wirkung von wässrigem Zigarettenrauchextrakt auf die Differenzierung und Funktion von Adipozyten zu untersuchen. Der Hintergrund war die Hypothese, dass diese Zellen an der Entwicklung oder dem Verlauf eines Lungenemphysems, einem Phänotyp der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), indirekt beteiligt sein könnten. Auffällig ist nämlich, dass Patienten mit Lungenemphysem häufig eine Kachexie aufweisen, von der nicht klar ist, inwieweit sie auf das primäre Wirken einer systemischen Entzündung oder eine Mangelernährung zurückzuführen ist. Auch sind Gewichtsabnahmen bei der COPD mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Umgekehrt legen verfügbare Daten nahe, dass das Risiko der Entwicklung einer COPD bei Patienten mit leichtgradig erhöhtem Körpergewicht im Vergleich zum Normalgewicht eher erniedrigt ist. Vor allem von Bedeutung ist jedoch die an Nagern vielfach belegte Tatsache, dass eine kalorische Restriktion zu einer Rarifizierung des Lungenparenchyms führt, die einem Lungenemphysem sehr ähnlich ist und dass ähnliche Änderungen CT-morphologisch bei Patientinnen mit Anorexie beobachtet wurden. Da Störungen der Lungenstruktur vermutlich mit solchen der zellulären Erhaltungsprozesse bzw. einer durch Zigarettenrauch induzierten zellulären Seneszenz zusammenhängen und Adipozyten eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Seneszenz und Langlebigkeit spielen, liegt es nahe, die Wirkung von Zigarettenrauchkomponenten auf Adipozyten zu untersuchen. Somit wurde eruiert, inwieweit Effekte auf Adipozyten in reproduzierbarer Weise auftreten und welche Rolle hierbei einerseits Oxidanzien und andererseits Nikotin spielten.

Zu diesem Zweck wurden Präadipozyten der Maus (3T3-L1) angezogen. Nach Erreichen der Konfluenz wurde über 2 Tage die Differenzierung in Adipozyten eingeleitet (Beobachtungstage 0 und 2). Die Zellen wurden sodann bis Tag 7 nachbeobachtet. Während der Differenzierungsphase sowie danach befanden sich entweder Kontrollmedium oder Zigarettenrauchextrakt (CSE, Endkonzentration 5 %) oder Nikotin in einer dem CSE entsprechenden Konzentration (10 µg/mL bzw. 60 µM) oder (mit zusätzlicher Vorinkubation) 1 mM N-Acetylcystein (NAC) als Antioxidanz auf den Zellen. Untersucht wurden Zellzahl (Zählkammer), Lipidgehalt (Ölrotfärbung und Bildanalyse), Proteingehalt (Bradford), sowie als adipozytenspezifische Enzymaktivität die Aktivität der Glycerol-3-phosphat-

dehydrogenase (GPDH). Die Anzahl der unabhängigen Versuche pro Vergleich betrug $n=7-8$ in Doppelbestimmung.

CSE bewirkte eine signifikante ($p<0,05$) Abnahme der Zellzahl verglichen mit der Kontrolle, Nikotin nicht. Ferner veränderte Inkubation mit NAC den Effekt von CSE auf die Zellzahl nicht signifikant. CSE bewirkte eine initiale Abnahme des Proteingehalts gegenüber der Kontrolle, doch waren die Werte zu Versuchsende gleich; bezogen auf die Zellzahl unterschieden sich die Proteingehalte nicht. Nikotin zeigte keinen Effekt auf diese Messgrößen. Hingegen waren die Proteingehalte bei Gabe von NAC+CSE zu Versuchsende niedriger als für CSE oder bei den Kontrollzellen ($p<0,05$); dies war auch der Fall, wenn der Proteingehalt auf die Zellzahl bezogen wurde. Die GPDH-Aktivität wurde zu Versuchsende durch CSE leichtgradig reduziert ($p<0,05$); dies galt auch, wenn die Aktivität auf den Proteingehalt bezogen wurde. Wiederum hatte Nikotin keinen signifikanten Effekt. Die zusätzliche Gabe von NAC führte im Vergleich zu CSE alleine zu einer markanten Steigerung der Enzymaktivität zu Versuchsende ($p<0,05$); diese war besonders auffällig, wenn die Aktivität auf den Proteingehalt bezogen wurde. Parallel zur GPDH-Aktivität nahm der Lipidgehalt der Zellen bei Exposition gegenüber CSE im Vergleich zur Kontrolle ab; gleiches galt für den Gehalt pro Proteinmenge. Nikotin hatte keinen Effekt auf die gespeicherte Lipidmenge. Ferner zeigte NAC+CSE keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Lipidgehalts im Vergleich zur alleinigen Gabe von CSE, wohl allerdings nahm der Gehalt bezogen auf die Proteinmenge ab.

Somit konnte die Arbeit zunächst die in einer vorangegangenen Arbeit erhaltenen Beobachtungen bestätigen, dass CSE im Prinzip eine Wirkung auf die Differenzierung und Funktion von Adipozyten ausüben kann. Darüber hinaus fand sich, dass für diese Wirkung nicht das im Extrakt enthaltene Nikotin verantwortlich war, im Gegensatz zu vorherigen Ergebnissen an Lungenfibroblasten. Das Antioxidanz NAC bewirkte eine Abnahme der Proteinmenge sowie des Lipidgehalts pro Proteinmenge in Gegenwart von CSE, zugleich jedoch eine massive Steigerung der Enzymaktivität. Diesen gegenläufigen Effekten auf Adipozytenfunktionen stehen Literaturbefunde gegenüber, dass endogene Oxidanzien ihre Differenzierung begünstigen. Die vorliegenden Daten legen somit nahe, dass exogene Oxidanzien anders als endogene auf Adipozyten wirken und dass eine mögliche systemische Wirkung von Zigarettenrauch bei der COPD primär durch Oxidanzien vermittelt ist.

8. Literaturverzeichnis

- Anderson D, MacNee W; Targeted treatment in COPD: a multi-system approach for a multi-system disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2009; 4:321-335
- Araki S, Dobashi K, Kubo K, Yamamoto Y, Asayama K, Shirahata A; N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha induced changes in secretion of interleukin-6, plasminogen activator inhibitor-1 and adiponectin from 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci* 2006 Aug 16 [Epub ahead of print]
- Barnes PJ, Celli BR; Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33:1165-1185
- Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC; Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:911-917
- Brown V, Elborn JS, Bradley J, Ennis M; Dysregulated apoptosis and NFkB expression in COPD subjects. *Respir Res* 2009; 10:24
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME; Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 303:2011-2015
- Calverley P, Anderson J, Celli B et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007; 356:775-789
- Carpéné C, Abello V, Iffiu-Soltész Z, Mercier N, Fève B, Valet P; Limitation of adipose tissue enlargement in rats chronically treated with semicarbazide-sensitive amine oxidase and monoamine oxidase inhibitors. *Pharmacol Res* 2008; 57(6):426-434
- Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB et al.; Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:188-207
- Chung KF, Caramori G, Adcock IM; Inhaled corticosteroids as combination therapy with beta-adrenergic agonists in airways disease: present and future. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65:853-871
- Churg A, Tai H, Coulthard T, Wang R, Wright JL; Cigarette smoke drives small airway

- remodeling by induction of growth factors in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 Sep 28; [Epub ahead of print]
- Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumor biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436:642
- Collins CJ, Sedivy JM. Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell* 2003; 2:145-150
- Cook VJ, Coxon HO, Mason AG, Bai TR; Bullae, bronchiectasis and nutritional emphysema in severe anorexia nervosa. *Can Respir J* 2001; 8:361-365
- Coxson HO, Chan IH, Mayo JR, Hlynsky J, Nakano Y, Birmingham CL; Early emphysema in patients with anorexia nervosa. *Am J Resp Crit Care Med* 2004; 170:748-752
- Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC; The Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:512-521
- Davis KE, Moldes M, Farmer SR; The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279:42453-42461
- Decramer M, De Benedetto F, Del Ponte A, Marinari S; Systemic effects of COPD. *Respir Med* 2005; 99 Suppl B:S3-10
- Decramer M, Rutten-van Mülken M, Dekhuijzen PN, Troosters T, van Herwaarden C, Pellegrino R, van Schayck CP, Olivieri D, Del Donno M, De Backer W, Lankhorst I, Ardia A; Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study; BRONCUS): a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2005; 365:1552-1560
- Dekhuijzen PN; [Acetylcysteine in the treatment of severe COPD]. Abstract, *Ned Tijdschr Geneesk* 2006; 150:1218-1221
- Demedts IK, Demoor T, Ken RB, Joos GF, Brusselle GG; Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 2006; 7:53
- De Ritis S; Wirkung von Zigarettenrauchextrakt auf die Proliferation menschlicher Lungenfibroblasten – Beitrag von Nikotin und Oxidantien. *Dissertationsarbeit eingereicht* 2009
- Dimri GP, Lee X, Basile G et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:9363-9367

- Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt Y, Large SR, Wells FC, Wallwork J; Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1539-1547
- Donma O, Donma MM; Relationship of senescence of pulmonary system to chronic obstructive pulmonary disease in advanced life. *Med Hypotheses* 2002; 59:208-211
- Dufour E, Larsson NG; Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658:122-132
- Fabbri LM, Luppi F, Beghé B, Rabe KF; Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2008; 31:204-212
- Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J; E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2002; 3:39-49
- Figueras M, Busquets S, Carbo N, Almendro V, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ; Cancer cachexia results in an increase in TNF-alpha receptor gene expression in both skeletal muscle and adipose tissue. *Int J Oncol* 2005; 27:855-860
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I; Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114:1752-1761
- Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N; Foxo transcription factors in cell-cycle regulation and the response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:752-760
- Glaab T, Hohlfeld JM, Jörres RA, Krug N, Welte T; Pathomechanismus der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). *Med Klin* 2006; 101:951-956
- GOLD; Global Initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for diagnosis, management and prevention of COPD [Internet] [update 2009]; available from: <http://www.goldcopd.org>
- Ghosh HS; The anti-aging, metabolism potential of SIRT1. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9:1095-1102
- Gregoire FM, Smas CM, Sook Sul H; Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998; 78:783-809
- Gregoire FM; Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med* 2001;

226:997-1002

Harik-Khan RI, Fleg JL, Wise RA; Body mass index and the risk of COPD. *Chest* 2002; 121:370-376

Hayflick L; The not-so-close relationship between biological aging and age-associated pathologies in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004; 59:B547-550; discussion 551-553. Comment on: *Bioessays* 1996; 18:89-90

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD; The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2645-2653

Holz O, Zühlke I, Jaksztat E, Müller KM, Welker L, Nakashima M, Diemel KD, Brandscheid D, Magnussen H, Jörres RA; Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 2004; 24:575-579

Howes TQ, Deane CR, Levin GE, Baudouin SV, Moxham J; The effects of oxygen and dopamine on renal and aortic blood flow in chronic obstructive pulmonary disease with hypoxemia and hypercapnia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:378-383

Huschtscha LI, Reddel RR. P16^{INK4a} and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis* 1999; 20:921-926

Inoguchi T, Nawata H; NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 2005; 6(4):495-501

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H; High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49(11):1939-1945

Ito K, Barnes PJ; COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 2009; 135:173-180

Karrasch S, Holz O, Jörres RA; Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respir Med* 2008; 102:1215-1230

Kirkwood TB; Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005; 120:437-447

Krieger-Bauer HI, Kather H; Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent

- H₂O₂ generation in 3T3-L1-cells; *Biochem J* 1995; 307:549-556
- Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J; Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad USA* 2001; 98:12072-12077
- Ladislav R; Cellular and molecular mechanisms of aging and age related diseases. *Pathol Oncol Res* 2000; 6:3-9
- Lahmann C, Bergmann J, Harrison G, Young AR; Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet* 2001; 357:935-936
- Lamb D, Lumsden A; Intra-epithelial mast cells in human airway epithelium: evidence for smoking-induced changes in their frequency. *Thorax* 1982; 37:334-342
- Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D; Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax* 1994; 49:319-326
- Langley E, Pearson M, Faretta M et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo J* 2002; 21:2383-2396
- Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC; Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 2005; 14:92-102
- Liu RH, Mizuta M, Matsukura S; The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310:52-58
- Longo VD, Kennedy BK; Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* 2006; 126:257-268
- Machata B, Kronseder A, Lips K, Kummer W, Hauner H, Nowak D, Jörres RA; Effekt of cigarette smoke extract (CSE) on the differentiation and function of adipocytes. *Eur Respir J* 2006; 28 (Suppl 50): 585s (abstract)
- Machata B; Wirkung von Zigarettenrauch auf Adipozyten als potentielle systemische Modifikatoren einer COPD. *Dissertationsarbeit eingereicht* 2009
- MacNee W; Oxidants/antioxidants and chronic obstructive pulmonary disease: pathogenesis to therapy. *Novartis Found Symp* 2001; 234:169-185
- MacNee W; Accelerated lung aging: a novel pathogenic mechanism of chronic obstructive

- pulmonary disease (COPD). *Biochem Soc Trans* 2009; 37:819-823
- Magnussen H, Watz H; Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relation with comorbidities. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6:648-651
- Mak JCW; Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12(4):368-374
- Massaro D, Massaro GD; Hunger disease and pulmonary alveoli. *Am J Crit Care Med* 2004; 170:723-724
- Massaro GD, Radaeva S, Clerch LB, Massaro D; Lung alveoli: endogenous programmed destruction and regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:L305-L309
- Mauad T, Dolhnikoff M; Pathologic similarities and differences between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14:31-38
- Mercier N, Moldes M, El Hadri K, Feve B; Semicarbazide-sensitive amine oxidase activation promotes adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem J* 2001; 358:335-342
- Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Paterson MC, Murray D; Single-cell analysis of p16(INK4a) and p21(WAF1) expression suggests distinct mechanisms of senescence in normal human and Li-Fraumeni Syndrome fibroblasts. *J Cell Physiol* 2009; 223:57-67
- Morrison RF, Farmer SR; Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 2000; 130:3116S-3121S
- Müller KC, Paasch K, Feindt B, Welker L, Watz H, Branscheid D, Nakashima M, Magnussen H, Jörres RA, Holz O; Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem und Kontrollen unterscheiden sich in der Proliferation nach Inkubation mit Insulin, IGF-1 und IGF-2; Herbsttagung der Arbeitsgruppe Zellbiologie der DGP; Mainz: 2./4.11.2006
- Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, Milne JC, Ito M, Rossios C, Elliot M, Hogg J, Kharitonov S, Goto H, Bemis JE, Elliott P, Barnes PJ, Ito K; A protein deacetylase SIRT1 is a negative regulator of metalloproteinase-9. *FASEB J* 2009; 23:2810-2819, Epub 2009
- Ntambi JM, Young-Cheul K; Adipocytes and gene expression. *J Nutr* 2000; 130:3122S-3126S
- Nyunoya T, Monick MM, Klingelhutz A, Yarovinsky TO, Cagley JR, Hunninghake GW; Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 25:681-688

- Paravicini TM, Touyz RM; NADPH oxidases, reactive oxygen species and hypertension. *Diabetes Care* 2008; 31:S170-S180
- Park WY, Hwang CI, Kang MJ, Seo JY, Chung JH, Kim YS, Lee JH, Kim H, Kim KA, Yoo HJ, Seo JS; Gene profile of replicative senescence is different from progeria or elderly donor. *Biochem Res Commun* 2001; 282:934-939
- Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J; Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 2005; 118:485-496
- Patel BD, Loo WJ, Tasker AD et al. Smoking related COPD and facial wrinkling: is there a common susceptibility? *Thorax* 2006; 61:568-671
- Patel B, Make B, Coxson HO, Muller NL et al. Airway and parenchymal disease in chronic obstructive pulmonary disease are distinct phenotypes. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:355
- Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Alciato P, Donner CF; Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1998; 12:380-386
- Picard F, Guarente L; Molecular links between aging and adipose tissue; *Int J Obes (Lond)* 29 2005; Suppl 1:36-39
- Picard F, Kurvet M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, Mc Burney MW, Guarente L; Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 2004; 429:771-776
- Pinto-Plata VM, Mullerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, Celli BR; C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 2006; 61:23-28
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:532-555
- Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I; SIRT1, an anti-inflammatory and anti-aging protein, is decreased in lungs of patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:861-870

- Roy K, Smith J, Kolsum U, Borrill Z, Vestbo J, Singh D; COPD phenotype description using principal components analysis. *Respir Res* 2009; 10:41
- Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM; Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1978; 253:7570-7578
- Rysz J, Stolarek RA, Luczynski R, Sarniak A, Wlodarczyk A, Kasielski M, Nowak D; Increased hydrogen peroxide concentration in the exhaled breath condensate of stable COPD patients after nebulized N-acetylcysteine. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20:281-289
- Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM; Molecular mechanisms of hypertension: a role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18(2):122-127
- Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS, George S, Kozicky M, Neito V, Recchia F, Stanley W, Wolin MS, Gupte SA; Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297:H153-H162
- Sin DD, Man SF; Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003; 107:1514-1519
- Stockley RA; Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:S49-S52
- Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, Levine RL; Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem* 2000; 275:27258-27265
- Taube C, Lehnigk B, Paasch K, Kirsten DK, Jörres RA, Magnussen H; Factor analysis of changes in dyspnoea and lung function parameters after bronchodilation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:216-220
- Trayhurn P, Wood IS; Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92:347-355
- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A; Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; 31:643-649

- Valledor AF, Ricote M; Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2004; 15:201-212
- Watz H, Magnussen H; Komorbiditäten bei COPD. *Internist* 2006; 47:895-900
- Wenzel U; Nutrition, sirtuins and aging. *Genes Nutr* 2006; 1:85-93
- Wirtz HR; Chronische Bronchitis, COPD. *Internist* 2005; 46:175-194
- Wolf G; Calorie restriction increases life span: a molecular mechanism. *Nutr Rev* 2006; 64:89-92
- Wood AM, Tan SL, Stockley RA; Chronic obstructive pulmonary disease: towards pharmacogenetics. *Genome Med* 2009; 1(11):112
- Wouters E. F. M., Creutzberg E. C., Schols A. M. W. J.; Systemic Effects in COPD. *Chest* 2002; 121:127-130
- Yang T, Sauve AA; NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *AAPS J* 2006; 8:632-643
- Yu YH, Zhu H; Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E402-E410

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abbildung 2.1.1: Pathomechanismus der COPD.....	17
Abbildung 4.3.1: Bradford-Standardkurve.....	44
Abbildung 4.3.2: Foto eines Zellrasens unter dem Mikroskop	46
Abbildung 4.3.3: Hellbildaufnahme des Zellrasens unter dem Mikroskop (Tag 7) ...	47
Abbildung 4.3.4: Mittels ImageJ bearbeitete Hellbildaufnahme	47
Abbildung 4.3.5: Histogramm: Verteilung der Dichtewerte der Lipidtröpfchen.....	48
Abbildung 4.3.6: Hellbildaufnahme eines Zellrasens für Auswertungstag 2	49
Abbildung 4.3.7: Mittels ImageJ bearbeitete Hellbildaufnahme (Tag 2).....	49
Abbildung 4.3.8: Hellbildaufnahme eines Zellrasens für den Auswertungstag 0	49
Abbildung 4.3.9: Mittels ImageJ bearbeitete Hellbildaufnahme (Tag 0)	49
Abbildung 4.5.1: Versuchsaufbau zur Herstellung von Zigarettenrauchextrakt	52
Abbildung 5.1.1: Zellzahl-Mittelwerte an den Auswertungstagen 0, 2 und 7	57
Abbildung 5.1.2: Zellzahl-Einzelwerte der Kontrolle	58
Abbildung 5.1.3: Zellzahl-Einzelwerte bei Nikotinexposition	58
Abbildung 5.1.4: Zellzahl-Einzelwerte bei CSE-Exposition	59
Abbildung 5.1.5: Zellzahl-Einzelwerte bei Gabe von NAC + CSE	59
Abbildung 5.2.1: Mittelwerte des Proteingehaltes der Expositionen	64
Abbildung 5.2.2: Mittelwerte des Proteingehaltes pro Zellzahl der Expositionen.....	64
Abbildung 5.2.3: Einzelwerte des Proteingehaltes der Kontrolle	65
Abbildung 5.2.4: Einzelwerte des Proteingehaltes bei Nikotinexposition	65
Abbildung 5.2.5: Einzelwerte des Proteingehaltes bei CSE-Exposition.....	66
Abbildung 5.2.6: Einzelwerte des Proteingehaltes bei Gabe von NAC + CSE	66
Abbildung 5.3.1: Mittelwerte der GPDH-Aktivität der Expositionen.....	74
Abbildung 5.3.2: Mittelwerte der GPDH-Aktivität pro Zellzahl der Expositionen	75

Abbildung 5.3.3: Mittelwerte der GPDH-Aktivität pro µg Protein der Expositionen ..	75
Abbildung 5.3.4: Mittelwerte der GPDH-Aktivität pro Lipid der Expositionen	76
Abbildung 5.3.5: Einzelwerte der GPDH-Aktivität der Kontrolle	76
Abbildung 5.3.6: Einzelwerte der GPDH-Aktivität bei Nikotinexposition	77
Abbildung 5.3.7: Einzelwerte der GPDH-Aktivität bei CSE-Exposition	77
Abbildung 5.3.8: Einzelwerte der GPDH-Aktivität bei Gabe von NAC + CSE	78
Abbildung 5.4.1: Mittelwerte des Lipidgehaltes der Expositionen	83
Abbildung 5.4.2: Mittelwerte des Lipidgehaltes pro µg Protein der Expositionen	84
Abbildung 5.4.3: Mittelwerte des Lipidgehaltes pro Zellzahl der Expositionen.....	84
Abbildung 5.4.4: Einzelwerte des Lipidgehaltes der Kontrolle	85
Abbildung 5.4.5: Einzelwerte des Lipidgehaltes bei Nikotinexposition.....	85
Abbildung 5.4.6: Einzelwerte des Lipidgehaltes bei CSE-Exposition.....	86
Abbildung 5.4.7: Einzelwerte des Lipidgehaltes bei Gabe von NAC + CSE	86
Abbildung 6.2.1: Sirtuine – multifunktionale Proteindeacetylasen	93
Abbildung 6.2.2: Röntgen- und CT-Thorax	93
Abbildung 6.2.3: NAD ⁺ -Metabolismus und Sirtuine	94

9.2 Tabellen

Tabelle 4.3.1: Verdünnungsreihe einer Proteinlösung bekannter Konzentration	42
Tabelle 4.3.2: Messwerte der Proteinlösung bekannter Konzentration	44
Tabelle 5.1.1: Zellzahl pro Well bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition	55
Tabelle 5.1.2: Zellzahl pro Well bei der Kontrolle und bei Nikotinexposition	56
Tabelle 5.1.3: Zellzahl bei CSE-Exposition und bei Gabe von CSE + NAC	57
Tabelle 5.2.1: Proteingehalt pro Well bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition	60
Tabelle 5.2.2: Proteingehalt pro 100.000 Zellen bei Kontrolle und bei CSE	61
Tabelle 5.2.3: Proteingehalt pro Well bei der Kontrolle und bei Gabe von Nikotin....	61
Tabelle 5.2.4: Proteingehalt pro 100.000 Zellen bei Kontrolle und Nikotingabe	62
Tabelle 5.2.5: Proteingehalt pro Well für CSE und CSE + NAC	63
Tabelle 5.2.6: Proteingehalt pro 100.000 Zellen für CSE und CSE + NAC.....	63
Tabelle 5.3.1: GPDH-Aktivität pro Well bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition ...	67
Tabelle 5.3.2: GPDH-Aktivität pro 100.000 Zellen bei Kontrolle u. CSE-Exposition .	68
Tabelle 5.3.3: GPDH-Aktivität pro 100 µg Protein bei Kontrolle u. CSE-Exposition..	68
Tabelle 5.3.4: GPDH-Aktivität pro Lipid bei der Kontrolle und bei CSE-Exposition...	69
Tabelle 5.3.5: GPDH-Aktivität pro Well bei der Kontrolle und bei Gabe von Nikotin.	70
Tabelle 5.3.6: GPDH-Aktivität pro 100.000 Zellen bei Kontrolle und Nikotingabe....	70
Tabelle 5.3.7: GPDH-Aktivität pro 100 µg Protein bei Kontrolle und Nikotingabe....	71
Tabelle 5.3.8: GPDH-Aktivität pro Lipid bei der Kontrolle und bei Gabe von Nikotin	71
Tabelle 5.3.9: GPDH-Aktivität pro Well für CSE und CSE + NAC	72
Tabelle 5.3.10: GPDH-Aktivität pro 100.000 Zellen für CSE und CSE + NAC.....	73
Tabelle 5.3.11: GPDH-Aktivität pro 100 µg Protein für CSE und CSE + NAC	73
Tabelle 5.3.12: GPDH-Aktivität pro Lipid für CSE und CSE + NAC	74
Tabelle 5.4.1: Lipidgehalt pro normiertem Bildfeld für Kontrolle und CSE	79
Tabelle 5.4.2: Lipidgehalt pro µg Protein für Kontrolle und CSE.....	79
Tabelle 5.4.3: Lipidgehalt pro Zellzahl für Kontrolle und CSE.....	80

Tabelle 5.4.4: Lipidgehalt pro normiertem Bildfeld für Kontrolle und Nikotin.....	80
Tabelle 5.4.5: Lipidgehalt pro µg Protein für Kontrolle und Nikotin	81
Tabelle 5.4.6: Lipidgehalt pro Zellzahl für Kontrolle und Nikotin	81
Tabelle 5.4.7: Lipidgehalt pro normiertem Bildfeld bei CSE und CSE + NAC.....	82
Tabelle 5.4.8: Lipidgehalt pro µg Protein bei CSE und CSE + NAC	82
Tabelle 5.4.9: Lipidgehalt pro Zellzahl bei CSE und CSE + NAC	83

10. Verwendete Abkürzungen

ADD1/SREBP-1c	Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor1/sterol regulatory element binding proteins (Transkriptionsfaktor)
Akt/PKB:	Proteinkinase B
ANOVA:	Varianzanalyse
ATCC:	American Type Culture Collection
BMI:	Body Mass Index
C/EBP:	CCAAT/enhancer binding protein
cAMP:	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CBP/p300:	CREB-binding protein (Histonacetyltransferase), p300 sehr ähnlich
CBP:	CREB binding protein
CDK:	Cyclin-dependent kinase
CDKI:	Cyclin-dependent kinase inhibitor
COB:	Chronisch obstruktive Bronchitis
COPD:	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP:	C-reaktives Protein
CSE:	Cigarette smoke extract
CT:	Computertomogramm
DHAP:	Dihydroxyacetonphosphat
DMEM:	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DP1:	DRTF1-polypeptide-1 (bildet mit E2F einen Transkriptionsfaktorkomplex)
E2F:	Eukaryotischer Transkriptionsfaktor
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure

FCS:	Fetal calf serum
FEV ₁ :	Forciertes expiratorisches Volumen in 1sec.
FGF:	Fibroblast growth factor
FOXC2:	Forkhead Box Transkriptionsfaktor C2
FOXO:	Forkhead Box Transkriptionsfaktor O
GADD45a:	Growth arrest and DANN-damage inducible protein a of 45kDa
GOLD:	Global Initiative for chronic obstructive lung disease
GPDH:	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPX:	Glutathion-Peroxidase
GRB2:	Growth factor receptor binding protein 2
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
HBSS:	Hank`s gepufferte Salzlösung
HDAC:	Histindeacetylase
IBMX:	Isobutylmethylxanthin
IGF-1:	Insulin-like growth factor 1
IGFBP:	IGF binding protein
IL-6:	Interleukin 6
IRS:	Insulin receptor substrate
ITGV:	Intrathorakales Gasvolumen
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein 1
NA:	Nikotinsäure
NAAD:	Nikotinsäure-adenin-dinukleotid
NAC:	N-Acetylcystein
nAChR:	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor

NAD ⁺ :	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidierte Form)
NADH:	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH:	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NAM:	Nikotinamid
NAMN:	Nikotinsäure-mononukleotid
NCS:	Newborn calf serum
NF- κ B:	Nuclear factor kappa B
NLS:	Nuclear localization sequence
NMN:	Nikotinamidmononukleotid
nmnat:	Nikotinsäure-/Nikotinamid-mononukleotid-adenylyltransferase
npt:	Nikotinsäure-Phosphoribosyltransferase
P16:	Cyclin-dependent kinase inhibitor am Genlokus INK4a
P21:	Cyclin-dependent kinase inhibitor am Genlokus CIP1/WAF1/Sdi1
P53:	Tumorsuppressorprotein mit einem Molekulargewicht von 53kDa
PAI-1:	Plasminogenaktivator-Inhibitor 1
PBEF:	Pre-B-cell colony enhancing factor
PBS:	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCAF:	P300/CBP assoziierter Faktor
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PDK1:	Phospholipid dependent kinase1
PI3K:	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIKK:	Phosphatidylinositol kinase-related kinase
PKC:	Proteinkinase C
PPAR γ :	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRE:	PPAR γ responsive element

Ras:	G-Protein
Rb:	Retinoblastomprotein
RNA:	Ribonukleinsäure
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
RXR α :	Retinoid X receptor α
SA- β -gal:	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SGK:	Serum- und Glukokortikoid induzierte Kinase
SOD:	Superoxiddismutase
SOS:	Son of sevenless
STAT:	Signal transducers and activators of transcription
TNF α :	Tumor necrosis factor alpha
WHO:	World Health Organization

A. Anhang

A.1 Lebenslauf

A.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. D. Nowak danke ich für die freundliche Vergabe der Promotionsarbeit an dem Institut für Arbeits- und Umweltmedizin in München.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. R. Jörres für seine ausgezeichnete Unterstützung während meiner Promotionsarbeit. Er vermittelte mir nicht nur theoretisches und praktisches Wissen, sondern half mir auch über schwere Arbeitsphasen hinweg.

Danken möchte ich auch Frau A. Kronseder, CTA, für ihre geduldige Unterweisung in der Laborarbeit sowie für ihre Vermittlung von praktischen und theoretischen Wissensinhalten.

A.3 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dabei habe ich keine anderen Hilfsmittel/Quellen benutzt, als die von mir sowohl im Text als auch im Literaturverzeichnis angegebenen. Des Weiteren versichere ich, dass ich die Arbeit nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule vorgelegt oder mich zwischenzeitlich auch nicht anderweitig zur Promotion angemeldet habe.

Unterschrift: