

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Rainer H. Böger

**Der metabolische Einfluss von Zigarettenrauchkondensat auf die
Wirkung von Glitazonen und Sartanen
bei 3T3-L1-Prädipozyten**

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg
vorgelegt von

Irina Heinz

aus Semiosernoe/Kasachstan

Hamburg, 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg am 28.02.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer H. Böger
Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jörg Heeren
Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Wenzel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Die Bedeutung der Fette für den menschlichen Organismus	5
1.2 Ein Rezeptor als multimodales Steuerungsinstrument des Metabolismus	5
1.3 Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Atherosklerose	6
1.4 3T3-L1-Prädipozyten.....	6
1.4.1 Die wesentlichen Phasen der Zelldifferenzierung.....	7
2. Fragestellung	8
3. Die Familie der PPAR-Rezeptoren.....	9
3.1 Der PPAR γ -Rezeptor	9
3.2 Ziel-Gene des PPAR γ -Rezeptors	11
3.2.1 Cluster of differentiation 36	11
3.2.2 Fatty acid-binding protein 4	12
4. Zigarettenrauchen und seine Auswirkungen.....	14
5. Die zur Inkubation verwendeten Testsubstanzen	17
5.1 Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten im Allgemeinen.....	17
5.1.1 Losartan und EXP3179	18
5.1.2 Telmisartan	18
5.2 Ein wichtiger Vertreter der Glitazone: Pioglitazon.....	19
5.3 Zigarettenrauchkondensat	20
6. Materialien und Methoden	22
6.1 Geräte	22
6.2 Chemikalien	23
6.3 Zellen	24
6.4 Puffer und Lösungen.....	25
6.4.1 Herstellung des Nährmediums	25
6.4.2 Herstellung der Insulinlösung.....	25
6.4.3 Herstellung der Dexamethasonlösung	25
6.4.4 Herstellung der Isobutylxanthin(IBX)-Lösung.....	25
6.4.5 Herstellung der Phosphate-Buffered-Saline(PBS)-Lösung	25
6.5 Aufbereitung und Durchführung der Fettrot-Färbung.....	25
7. Zellkultivierung.....	26
7.1 Vorbereitung der Zellkultur und Handhabung der Zellen	26
7.2 Einfrieren der Zellen zur Konservierung.....	27
8. Versuchsaufbau	28

9. Anleitung zur Gewinnung von cDNA.....	28
9.1 Isolierung der mRNA.....	28
9.2 Reverse Transkription.....	29
10. Auswertung des Genproduktes	30
10.1 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion.....	30
10.2 Handhabung der qRT-PCR mit dem TaqMan (Assay on Demand)	30
10.2.1 Herstellung der Standardreihe	30
10.2.2 cDNA-Ansatz für die Messung der Proben.....	31
10.2.3 Die Messung mit dem TaqMan	31
11. Statistische Auswertung.....	32
12. Ergebnisse	33
12.1 Versuchsreihe mit Pioglitazon	33
12.2 Versuchsreihe mit Telmisartan.....	35
12.3 Versuchsreihe mit EXP3179.....	37
12.4 Versuchsreihe mit verschiedenen Substanzen.....	38
12.5 Untersuchung der Testsubstanzen in Verbindung mit CSC.....	41
12.5.1 Pioglitazon und CSC	41
12.5.2 Telmisartan und CSC.....	44
13. Mikroskopische Analyse mittels Fettrotfärbung.....	49
13.1 Inkubation mit Pioglitazon und CSC	50
13.2 Inkubation mit EXP3179 und CSC	51
13.3 Inkubation mit Losartan und CSC	52
13.4 Inkubation mit der Kontrollsubstanz.....	53
14. Diskussion.....	54
14.1 Einfluss von CSC auf den PPAR γ -Rezeptor.....	54
14.2 Ursachenforschung und Erklärungsansätze	54
14.3 Einflüsse auf die Präsenz des PPAR γ -Rezeptors im Organismus.....	55
14.3.1 Interpretation der klinischen Studienergebnisse	56
14.4 Kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen meiner Arbeit.....	58
14.5 Stellenwert der gewonnenen Resultate in der Praxis	59
15. Zusammenfassung	61
16. Literaturverzeichnis	63
17. Abkürzungsverzeichnis.....	75
18. Danksagung	77
19. Eidesstattliche Versicherung	78

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Fette für den menschlichen Organismus

In der Erforschung der heute vielfach verbreiteten Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2, arterieller Hypertonus und Adipositas als Risikofaktoren für die Entstehung einer Koronaren-Herz-Krankheit (KHK) war die Rolle der Fette lange Zeit umstritten.

Die Annahme, eine übermäßige fettreiche Ernährung sei im Allgemeinen krankheitsfördernd und bedinge Herz-Kreislaufkrankungen musste durch mehrere wissenschaftliche Erkenntnisse in den letzten Jahren revidiert werden.¹ Betrachtete man Lipodystrophie-Patienten mit vermindertem oder nicht vorhandenem Fettgewebe, litten diese klassischerweise an einer Fettleber, Insulinresistenz und Hyperlipidämie mit daraus resultierendem deutlich erhöhten Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen. Zog man Volksgruppen mit niedriger Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen, wie Inuiten, heran, zu deren Hauptnahrungsmitteln Fisch gehört, erkannte man die gesundheitsfördernde Bedeutung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren für den Organismus. Folglich musste die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine ausreichende Zufuhr von Nahrungsfetten, insbesondere von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, und das Vorhandensein von ausreichend Fettgewebe in einem eukaryoten Organismus unverzichtbare Komponenten zur Erhaltung eines gesunden metabolischen Gleichgewichtes sind.

1.2 Ein Rezeptor als multimodales Steuerungsinstrument des Metabolismus

Mit der Entdeckung des Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) konnten die zunächst paradox erscheinenden Effekte der Fette und des Fettgewebes erklärt werden.¹

In der Therapieerforschung von Diabetes mellitus als kardiovaskulärer Risikofaktor zeigten PPAR γ -Agonisten, wie Pioglitazon, ein Vertreter aus der Gruppe der Glitazone zur Behandlung von nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus Typ II, eine Minderung der Insulinresistenz und des Blutzuckerspiegels - ohne Erhöhung der Insulinsekretion - durch ihre agonistische Wirkung am PPAR γ -Rezeptor.² In Tierversuchen wurde zudem die antihypertensive Wirkung sowie die Verbesserung der endothelialen Funktion und Schutz vor oxidativem Stress in Leber und Nieren durch Pioglitazon bei an Diabetes mellitus erkrankten

Kaninchen nachgewiesen.^{3,4} Interessanterweise führten in vivo Untersuchungen von Antihypertensiva aus der Gruppe der AT-II-Rezeptor-Typ1(AT₁)-Antagonisten, wie Telmisartan, neben der Blutdrucksenkung zu einer AT₁-Rezeptor-unabhängigen Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors und bewirkten eine signifikante Minderung der Insulinresistenz und Hyperglykämie.⁵

1.3 Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Atherosklerose

Bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wurde ebenfalls das Zigarettenrauchen als wichtiger Risikofaktor identifiziert, der u.a. zu vermehrtem oxidativen Stress in Gefäßen führt, eine Minderung der Vasodilatation bewirkt und zudem einen toxischen Einfluss auf das Endothel ausübt.^{6,7,8,9} Auf der Suche nach Zusammenhängen zwischen den einzelnen kardiovaskulären Risikofaktoren, die häufig miteinander einhergehen, rückte die Frage, inwieweit das Zigarettenrauchen der Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors und somit seinem positiven Einfluss auf die kardiovaskulären Risikofaktoren entgegenwirkt, in den Mittelpunkt meines wissenschaftlichen Interesses.

1.4 3T3-L1-Prädipozyten

Wegen ihrer hohen Genexpression des PPAR γ -Rezeptors verwendete ich für meine Versuchsreihen 3T3-L1-Zellen, um den Einfluss von Zigarettenrauchkondensat auf den Zellmetabolismus und die Wirkung von Sartanen und Glitazonen zu untersuchen. Hierbei handelte es sich um eine Subpopulation von Prädipozyten, die 17 bis 19 Tage alten embryonalen Mäusen entnommen wurde und im Rahmen der unten dargestellten Versuche eine Entwicklung von Prädipozyten zu Adipozyten durchlebte. Der Prozess der Differenzierung wurde in seiner Geschwindigkeit und seinem Ausmaß durch äußere Faktoren entscheidend beeinflusst.

1.4.1 Die wesentlichen Phasen der Zelldifferenzierung

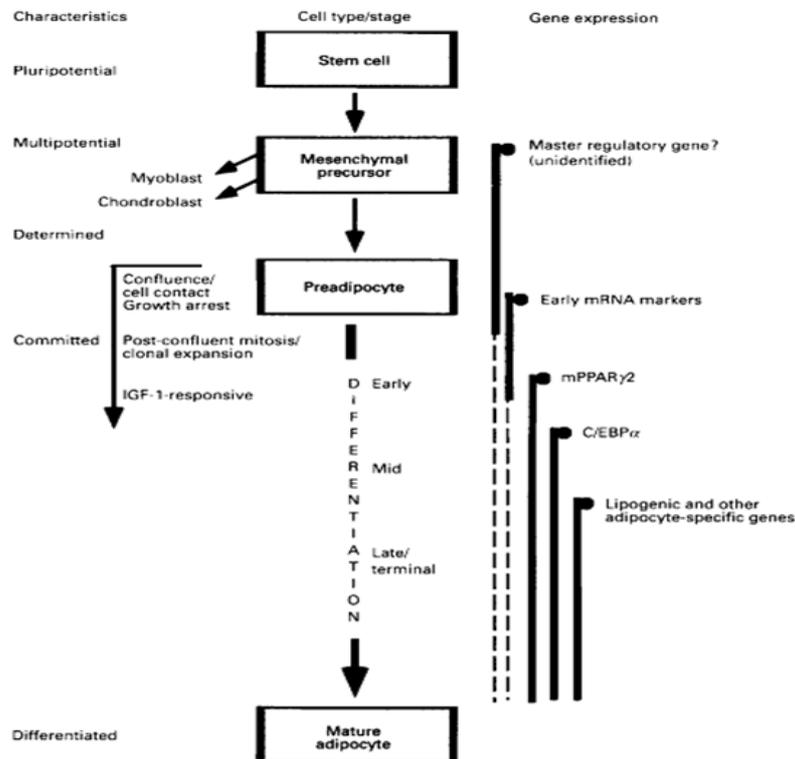


Abbildung (Abb.) 1. Smas CM, Sul HS. Control of adipocyte differentiation. Biochem. J. 1995;303:697-710

Hierbei entsteht aus einer pluripotenten Stammzelle zunächst eine multipotente mesenchymale Vorstufe mit exprimiertem Hauptregulator-Gen, das die weitere Entwicklung der Zelle zum Myoblasten, Chondroblasten oder Präadipozyten bestimmt. Letztere treten nach vollständiger Konfluenz mit Erreichen des Zellkontaktes in einen Wachstumsstillstand ein, der durch den Einfluss von Transkriptionsfaktoren, Hormonen und zytoskelettalem Remodelling den Prozess der Differenzierung zu reifen Adipozyten bestimmt.

3T3-L1-Zellen vermögen zu einem gewissen Grad, sich binnen einiger Wochen nach Erreichen der Konfluenz - bei Wachstum im Nährmedium mit fetalem Kälberserum (FCS) - zu Bündeln aus Adipozyten zu differenzieren. Setzt man die gleiche Zelllinie dem synthetisch hergestellten Glukokortikoid Dexamethason und Phosphodiesterasehemmer Isobutylxanthin (IBX) 48 Stunden nach Konfluenz aus, resultiert daraus eine höhere Anzahl sich differenzierender Zellen sowie eine Verkürzung der Differenzierungsdauer auf fünf bis sieben Tage. Weiterhin fördern Wachstumshormone, das Schilddrüsenhormon T₃, der Insuline-like growth factor 1 (IGF-1) und Prostaglandine die Adipogenese in verschiede-

nen Präadipozyten-Zelllinien. Hormone wie Insulin hingegen, beschleunigen die Speicherung von Fetten in der Zelle ohne Einfluss auf die Anzahl der Zellen zu nehmen.^{10,11}

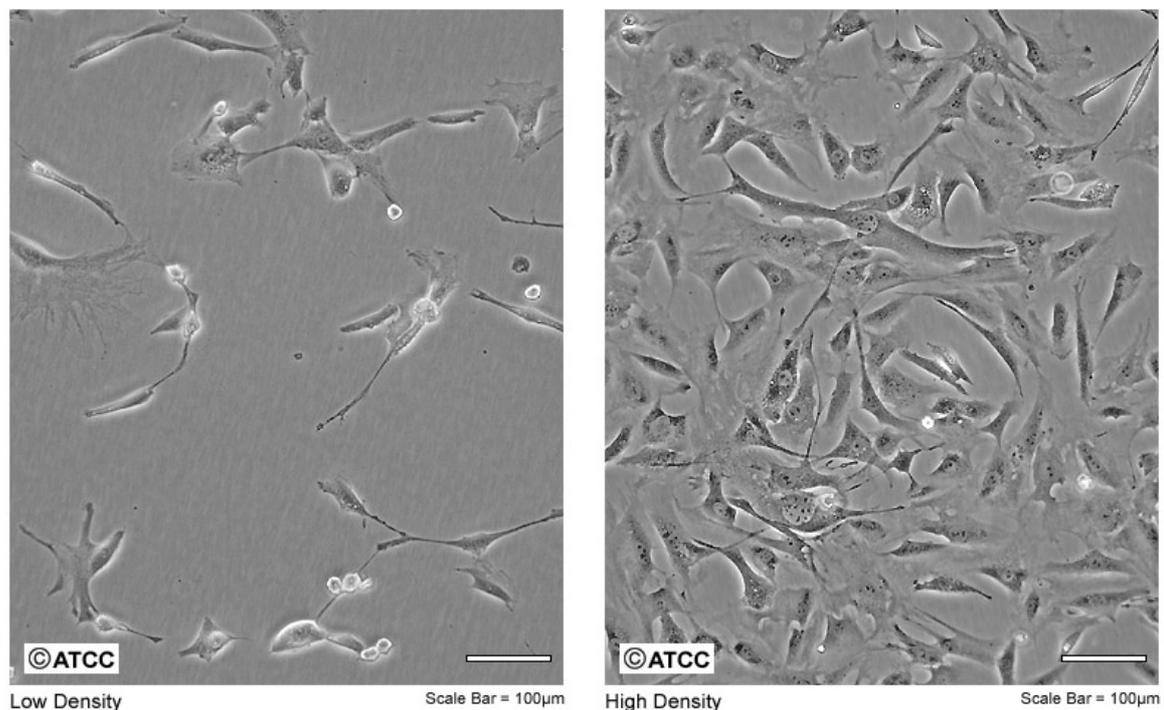


Abbildung (Abb.) 2. Die verschiedenen Stadien der Konfluenz der Präadipozyten. ATCC, CL-173, designation 3T3-L1, Massachusetts Institute of Technology, USA.

Eine herausragende Rolle bei der Adipozytendifferenzierung spielt eine Kombination aus IGF-1 und Insulin, die erforderlich ist, um eine Adipozyten-spezifische mRNA zu bilden.¹²

2. Fragestellung

Es soll die Frage untersucht werden, ob Zigarettenrauchkondensat (CSC) die metabolische Wirkung von dem Antidiabetikum und selektiven PPAR γ -Rezeptor-Agonist Pioglitazon, dem Antihypertensivum und partiellen Agonist Telmisartan, dem als Prodrug vorliegenden Antihypertensivum Losartan sowie seinem aktiven Metabolit EXP3179 beeinflusst.

3. Die Familie der PPAR-Rezeptoren

PPAR beschreibt eine Gruppe von nukleären Rezeptoren, die als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren fungieren. Bislang konnten drei Subtypen des PPAR-Rezeptors identifiziert werden: PPAR α , PPAR β , der PPAR δ entspricht, und PPAR γ .¹³

PPAR α findet sich vor allem in Herz, Niere, Leber, Skelettmuskel sowie Monozyten und Makrophagen und wird heute bereits pharmakologisch als Angriffspunkt der Fibrate genutzt. PPAR β ist vor allem in Herz, Nieren und Darm vertreten, ist in seiner Funktion jedoch nicht hinreichend erforscht. Der PPAR γ -Subtyp kommt überwiegend im Fettgewebe vor, findet sich aber auch in anderen Strukturen des Organismus, wie Endothel, glatten Gefäßmuskelzellen, Monozyten und Makrophagen sowie Darmmukosa.¹ Für PPAR γ wurden bereits zahlreiche Effekte beschrieben. Gemeinsam mit PPAR α und δ , der in vergleichbarer Dichte in nahezu allen Geweben vertreten ist, greift PPAR γ entscheidend in den Fettsäurenmetabolismus ein.¹⁴

3.1 Der PPAR γ -Rezeptor

Für den PPAR γ -Rezeptor konnte bereits eine Vielzahl von endogenen als auch synthetischen Liganden identifiziert werden. Zu diesen zählen unter anderem lipophile Hormone, darunter Steroid- und Schilddrüsenhormone, Vitamin-A-Metaboliten, oxidiertes LDL, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Glitazone, wie z.B. Pioglitazon, AT₁-Antagonisten, wie Telmisartan sowie der aktive Losartan-Metabolit EXP3179.^{15, 16, 17, 18, 125}

Als Transkriptionsfaktor ist dieser Rezeptor befähigt, nach seiner Aktivierung die Transkription unterschiedlicher Gene durch Bindung der jeweilig spezifischen DNA-Sequenzen in der Promoter-Region, sogenannte „PPAR-Response-Elements“, zu steuern. Damit der PPAR γ -Rezeptor die Transkriptionsrate bestimmter Gene erhöhen kann, muss er mit dem Retinoid-X-Rezeptor ein Heterodimer bilden. Erst dieses Dimer bindet an PPAR-Response-Elements und löst eine entsprechende Genexpression aus.

Der PPAR γ -Rezeptor besitzt eine hoch konservierte DNA-bindende Domäne (DBD) in der Größe von etwa 70 Aminosäuren und eine Liganden-bindende Domäne (LBD), die etwa 250 Aminosäuren umfasst. Die LBD beinhaltet eine transkriptionsaktivierende Funktion 2 (AF 2), eine Region zur Dimerisierung sowie transkriptionellen Aktivierung, und liegt am

Rande des C-Terminus des Rezeptors. Das N-terminale Ende, auch A/B-Region genannt, besitzt ebenfalls eine transkriptionsaktivierende Funktion 1 (AF 1), die wiederum eine mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) mit einer phosphorylierbaren Stelle beinhaltet.^{19,}
²⁰ Kommt es zu einer Phosphorylierung dieser Stelle, wird die Fähigkeit der Ligandenbindung des PPAR γ -Rezeptors reduziert, mit der Folge, dass auch seine transkriptionelle Aktivität gemindert wird.²¹ PPAR γ -Agonisten entfalten ihre wichtigsten metabolischen Wirkungen in der Skelettmuskulatur, im Fettgewebe und in der Leber. In der Skelettmuskulatur und im Fettgewebe wird über die vermehrte Expression des Glukosetransportproteins GLUT 4 die Glukoseaufnahme in die Zelle erhöht, was eine Senkung des Blutzuckerspiegels und des nicht enzymatisch glykosylierten Hämoglobins HbA1c bewirkt. Zudem verbessert eine Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors die Insulin-Sensitivität - ein Effekt, der durch den Einsatz von Glitazonen bereits pharmakologisch genutzt wird. Zusätzlich wird im Fettgewebe die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten herbeigeführt, was zu einer vermehrten Aufnahme von freien Fettsäuren und Triglyceriden in die Zellen mit nachfolgender Senkung der Blutfette führt. Die erhöhte Insulinsensitivität löst eine Umverteilung des Fettgewebes aus. Auf diese Weise nehmen die stoffwechselaktiven viszeralen Fettspeicher bei Typ-2-Diabetikern ab, während sich das inaktive subkutane Fettgewebe vermehrt.^{22, 23}

In der Leber vermögen PPAR γ -Agonisten die Glykolyse, Glykogensynthese und Lipogenese zu aktivieren, hingegen Vorgänge, wie die Glykoneogenese und Glykogenolyse, die bei Insulinresistenz gesteigert sind, zu blockieren.¹

Darüber hinaus konnte in den vergangenen Jahren ein weiterer wichtiger Effekt der PPAR γ -Aktivierung aufgezeigt werden. Über eine Hemmung der Sekretion von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), einem Zytokin, das über seine inflammatorische Wirkung bei der Entstehung der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielt, wird das kardiovaskuläre Risiko reduziert.²⁴ Schon früh konnte sowohl im Fettgewebe von übergewichtigen Menschen als auch Nagern eine vermehrte Bildung von TNF- α und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 festgestellt und deren zentrale Rolle bei der Entstehung der Übergewicht-assoziierten Insulinresistenz und der Pathogenese von Diabetes Typ II herausgestellt werden. Auch hier greift die Wirkung der PPAR γ -Agonisten durch Hemmung der Sekretion dieser Zytokine mit daraus resultierender Minderung der Insulinresistenz.^{25, 26}

Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass der PPAR γ -Rezeptor die in Makrophagen enthaltene Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), die als Hauptprädilektionsfaktor bei der Entstehung der Plaque-Ruptur gilt, zu regulieren vermag.²⁷ Die positiven Wirkungen der PPAR γ -Agonisten auf den Stoffwechsel können jedoch durch verschiedene Einflussfaktoren herabgesetzt werden.¹ Jüngste Forschungsreihen konnten das Zigarettenrauchen als einen dieser Faktoren identifizieren.²⁸

3.2 Ziel-Gene des PPAR γ -Rezeptors

3.2.1 Cluster of differentiation 36

Das Cluster of differentiation 36 (CD36) ist ein Zellwandprotein, das zur B Scavenger Rezeptorfamilie gehört. Es besteht aus einem extrazellulären Anteil zum Binden von Liganden sowie zwei Transmembrandomänen, an deren kurzen Ausläufern sich das C- und N-terminale Ende befindet und ins Zytoplasma hineinreicht. CD36 ist Bestandteil zahlreicher Zelltypen, wie z.B. differenzierten Adipozyten, Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und Makrophagen. Es ist in der Lage, Liganden, wie native und oxidierte LDL, langkettige Fettsäuren, High-density lipoproteins (HDL), oxidierte Phospholipide, fibrilläres Amyloid, Kollagen, Thrombospondin, apoptotische Zellen und mit Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten zu binden.^{29, 30,31, 32, 33}

Der Kontaktaufnahme zwischen Ligand und CD36 folgt eine Internalisierung des Liganden durch eine Actin-vermittelte Endozytose. Diese bedingt die Aktivierung der Src- und c-Jun-N-terminalen Kinasen und Rho-GTPasen. Im Gegensatz zur Pinozytose bleibt diese seltene Form der Endozytose unbeeinflusst von Inhibitoren der Phosphatidylinositol-3-Kinase oder vom Natrium/Wasserstoff-Austausch.³⁴ Bei rekombinanten Mäusen mit einer Punktmutation im CD36-Gen und folglich nicht mehr nachweisbarem CD36-Protein zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Fähigkeit von Makrophagen und Monozyten, oxidiertes LDL zu binden und aufzunehmen. Zudem konnten bei diesen Tieren deutlich erhöhte Nüchtern-Spiegel von LDL-Cholesterin, nicht veresterten freien Fettsäuren und Triglyceriden nachgewiesen und die bislang unterschätzte Rolle des Proteins CD36 am Stoffwechsel von Lipoproteinen und Fettsäuren herausgestellt werden.³⁵ Der Mangel an CD36 ist erblich und führt zu verschiedenen Herzerkrankungen, wie Kardiomyopathie, Vitien oder KHK.^{36, 37}

Da bei einem CD36-Mangel-Typ 1 das besagte Protein in der Zellwand von Monozyten und Thrombozyten fehlt, ist die Aufnahme der energieliefernden langkettigen Fettsäuren in Myokardzellen verändert, was eine mögliche Erklärung für die Entstehung von KHK liefert.³⁶ Interessanterweise konnte bei Patienten mit einem CD36-Mangel auch eine Insulinresistenz beobachtet werden.^{38,39} Da Insulinresistenz einen Teil des metabolischen Syndroms ausmacht, welches mit der Entstehung von Atherosklerose vergesellschaftet ist, gibt es auch eine Verbindung zwischen CD36-Mangel und vaskulären Herz-Kreislauf-erkrankungen.³⁶

3.2.2 Fatty acid-binding protein 4

Das Fatty acid-binding protein 4 (FABP4; Synonym für ALPB, aP2, FABP, A-FABP) findet sich hauptsächlich in zytoplasmatischen und nukleären Kompartimenten reifer Adipozyten, aber auch in Makrophagen. Schon früh wurde FABP4 aus 3T3-L1-Zellen von Mäusen isoliert und einer näheren Erforschung unterzogen.^{40,55} Es gehört zur Familie der kleinen hochkonservierten zytoplasmatischen Proteine und vermag neben der Bindung von langkettigen Fettsäuren auch andere hydrophobe Liganden zu binden. Die Expression von FABP4 wird durch Fettsäuren, oxLDL, PPAR γ -Agonisten und Insulin reguliert.^{26,41 42}

FABP4 ist beteiligt an der Aufnahme, dem Transport und Metabolismus von langkettigen Fettsäuren sowie der Aufrechterhaltung des Fettsäureanteils in der Zellwand, Regulation spezifischer Enzyme des Fettstoffwechsels sowie des Zellwachstums und der -differenzierung.⁴³

Nach Bindung von Fettsäuren an FABP4 gelangt der FABP4-Fettsäure-Komplex u.a. in den Zellkern, wo dieser eine Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors bewirkt und im Rahmen eines positiven Feedbacks eine gesteigerte Expression von FABP4 hervorruft.^{44,45}

Adipozyten und aktivierte Makrophagen geben FABP4 zu einem geringen Anteil in den Blutkreislauf ab, wo es quantitativ bestimmt werden kann.⁴⁶ Durch seine oxLDL-vermittelte Up-Regulation in Makrophagen und der resultierenden Kaskade ist FABP4 an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt.^{50,55} Nach Einwanderung von Monozyten in das vorgeschädigte Gefäßendothel wandeln sich diese physiologischerweise zunächst zu Makrophagen und später durch oxLDL in Schaumzellen um.^{47,48}

Deren Untergang löst eine Entzündungsreaktion in der Gefäßwand sowie Chemotaxis aus, wodurch eine Kaskade der Atherosklerose und Plaquebildung in Gang gesetzt wird.

Eine Überexpression von FABP4 führt ferner zur vermehrten intrazellulären Anhäufung von Cholesterin und Triglyceriden, die u.a. durch eine Up-Regulation des Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase-1(ACAT)-Gens, das die Umwandlung von Cholesterin in Cholesterinester, der intrazellulären Speicherform, reguliert wird. Ebenfalls resultiert in einer gesteigerten FABP4-Genexpression eine Down-Regulation des ATP-binding-Cassette-1(ABCA)-Gens, das den transmembranen Transport von Lipiden, wie dem Cholesterin, in den Extrazellulärraum steuert. Weiterhin kommt es zu einer Down-Regulation des Hormon-sensitiv-lipase(HSL)-Gens, das für den Efflux und die Hydrolyse von Cholesterinestern in Makrophagen verantwortlich ist.⁴⁸

In einem in vivo Versuch mit Mäusen, die unter einer Hypercholesterinämie litten, verhinderte das Fehlen von FABP4 die Ausprägung einer hochgradigen Atherosklerose.^{49, 50}

In einer Studie mit KHK-Patienten konnte die positive Korrelation zwischen dem Nüchtern-FABP4-Serumspiegel und dem metabolischen Syndrom, bestehend aus viszeraler Adipositas, gestörter Glukosetoleranz, erhöhtem Triglycerid- und erniedrigtem HDL-Spiegel sowie arterieller Hypertonie, nachgewiesen werden. Hierbei waren die am höchsten gemessenen Nüchtern-FABP4-Serumspiegel bei Patienten, die alle Kriterien des metabolischen Syndroms erfüllten, und die niedrigsten Serumspiegel bei Probanden, die keines der Kriterien für ein metabolisches Syndrom aufwiesen.^{51, 52} Umgekehrt wurde in einer prospektiven 5-Jahres-Studie die Prädiktivität eines hohen FABP4-Serumspiegels im Hinblick auf die Entwicklung eines metabolischen Syndroms bewiesen.⁵³

FABP4 gehört zu den Ziel-Genen des PPAR γ -Rezeptors. Seine zentrale Rolle bei der Transkription von FABP4 und Adipozytendifferenzierung wurde durch folgenden Versuch herausgearbeitet: Embryonale Stammzellen von Mäusen mit Fehlen beider Kopien des PPAR γ -Rezeptor-Gens wiesen in der Folge eine mangelhafte FABP4-Genexpression auf. Zudem waren diese Zellen nicht in der Lage, sich zu Adipozyten zu entwickeln.^{54, 55}

4. Zigarettenrauchen und seine Auswirkungen

Das Zigarettenrauchen gehört zu den wichtigsten Risikofaktoren bei der Entstehung von Krebs und kardiovaskulären Ereignissen, wie Schlaganfall und Herzinfarkt. Mehr als die Hälfte der rauchenden Bevölkerung stirbt vorzeitig an den Folgen des Zigarettenkonsums. Hierbei tritt die Hälfte dieser tabakrauchbedingten Todesfälle bereits im mittleren Lebensalter zwischen 35 und 69 Jahren auf.^{56, 57, 58, 59}

Bei der Inhalation des Tabakrauchs werden über 250 verschiedene zytotoxische und u.a. kanzerogene Substanzen über die Lunge besonders schnell und effektiv aufgenommen und wirken sich bereits in niedrigen Konzentrationen schädlich auf den Organismus aus.^{56, 60, 61, 62, 63}

Bei der Fülle an Inhaltsstoffen, die sich im Zigarettenrauch finden, und deren psychophysischen Auswirkungen auf den Organismus wurden im Folgenden einige wichtige Substanzen und die durch sie vermittelten Signalkaskaden exemplarisch herausgestellt.

Zu den wichtigsten Vertretern der kanzerogenen Substanzen im Zigarettenrauch gehören Nitrosamine, aromatische Amine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Phenole.⁶⁴ Weiterhin wurden im Zigarettenrauch Kanzerogene, wie Acetaldehyd, Acrylnitril, Arsen, Benzol, 1,3-Butadien, Blei, Cadmium, Formaldehyd, Hydralazin, p-Hydrochinon, Naphthalin, Nickel, Nitromethan, Styrol sowie Toluol identifiziert.^{56, 65, 66}

Bei den genannten Stoffen handelt es sich zum Teil um Präkanzerogene, die von einem Organismus in ihre aktive Form erst überführt werden müssen. Zudem wird die schädigende Wirkung dieser Substanzen durch viele nicht primär kanzerogene Zusatzstoffe verstärkt. So löst Ammoniak langfristig eine Zerstörung der Flimmerepithelien in den Bronchien aus, was zum längerem Verbleib der Kanzerogene im Organismus führt.^{56, 60, 61, 62, 63}

Eine zentrale Rolle beim Zigarettenrauchen spielt das Nikotin. Es ist das Hauptalkaloid der Tabakpflanze. Dieses bindet an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren in den autonomen Ganglien, im Nebennierenmark, an neuromuskulären Nervenendigungen und im Zentralen Nervensystem. Daraus resultiert eine Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin, die neben einer Erhöhung von Blutdruck, Herz- und Atemfrequenz, zu einer Verstärkung der Darmmotorik und des Glykogenabbaus führen. Über die direkte Erregung des Hypophysenhinterlappens durch nikotinische Rezeptoren hat Nikotin eine antidiuretische Wirkung. Durch Bindung an Chemorezeptoren des Brechzentrums werden Übelkeit und

Erbrechen induziert. An der motorischen Endplatte führt Nikotin ebenfalls zu einer Erregung und Muskelkontraktion. An sensiblen Nervenenden lösen höhere Konzentrationen jedoch eine Ganglienblockade und Dauerdepolarisation aus.⁶⁷ Nach Inhalation des Zigarettenrauchs wird Nikotin in nicht-ionisierter lipidlöslicher Form rasch über Lunge, Haut, Schleimhaut und Darmmukosa aufgenommen, gelangt ins Herz-Kreislauf-System und passiert die Blut-Hirn-, Plazenta- und Milchschanke.^{67,68}

Zu einer neuronalen Signalübertragung kommt es durch Bindung des Nikotins sowohl an prä- als auch postsynaptische nikotinerge Rezeptoren, was neben der Ausschüttung von Noradrenalin und Adrenalin auch die Sekretion von Dopamin, Serotonin und Endorphinen hervorruft.⁶⁹

Als Agonist von nikotinergeren Rezeptoren beeinflusst Nikotin nach Bindung am Cortex und limbischen System kognitive Funktionen und Emotionen. Durch Interaktion mit dem Nucleus accumbens, einem Teil des Striatums, das zu den Basalganglien gehört, resultiert sowohl ein Belohnungsgefühl, als auch Triebkontrolle, was zum Teil das resultierende Entspannungsgefühl hervorruft.⁶⁷ Bei der Tabakverbrennung entsteht zudem das hochgiftige und geruchlose Gas Kohlenmonoxid, das mit einer vielfach höheren Affinität verglichen mit Sauerstoff an das Häm in Erythrozyten bindet und so den Sauerstofftransport zu den Organen vermindert.⁶⁸ Kompensatorisch steigen Blutdruck und Herzfrequenz an, um der verminderten Sauerstoffversorgung entgegenzuwirken. Dies führt zu einer reduzierten körperlichen Belastung und einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Herz-Kreislauferkrankungen.⁵⁶ Ein weiterer schädigender Mechanismus des Zigarettenrauchens führt zur Endotheldysfunktion. Physiologischerweise bewirkt Stickstoffmonoxid (NO) eine endothelvermittelte Vasodilatation. Dieses wird von dem endothelialen Enzym Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Das Ergebnis dieser Enzymreaktion hängt von der Menge des vorhandenen Cofaktors Tetrahydrobiopterin (BH4) ab, der bei Rauchern erniedrigt ist.⁷⁰ Bei geringer Bioverfügbarkeit von BH4 bildet die eNOS zellschädigende Superoxid-Anionen statt des endothelprotektiven Stickstoffmonoxids, das nur bei BH4 in höheren Mengen entsteht.⁷¹ Die vermehrte Bildung von Superoxid-Anionen führt zu einem erhöhten oxidativen Stress, was wiederum die Entstehung der Atherosklerose begünstigt.⁷⁰ In vitro durchgeführte Endothelversuche demonstrierten die jeweils positive Korrelation zwischen der Einwirkzeit, der Konzentration des Zigarettenextraktes und NADPH-Dosis im Hinblick auf die Dysfunktion der eNOS,

deren Produkt Superoxid-Anionen sind. Diese konnte jedoch durch hohe Konzentrationen des Cofaktors BH4 in ihrer NO-bildenden Funktion nahezu vollständig wiederhergestellt werden. Zudem wurde bewiesen, dass eNOS den Cofaktor BH4 in Anwesenheit von Zigarettenextrakt durch Oxidation selbst zerstörte.⁷² Weiterhin wurde der Beweis einer direkten toxischen Wirkung von Zigarettenrauch auf Endothelzellen geführt.^{8, 73}

Bereits in den 80er Jahren wurde herausgearbeitet, dass Zigarettenrauchen zu einem rapiden Anstieg des Angiotensin-Converting-Enzyms im Serum und damit eine erhöhte Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II bewirkt.⁷⁴ Angiotensin II führt in glatten Muskelzellen über die Aktivierung der NADPH- und NADH-Oxidase zur vermehrten Bildung von zellschädigenden Superoxid-Anionen, die an der Entstehung von Gefäßhypertrophie und -hyperplasie beteiligt sind.⁷⁵ Zudem ist Angiotensin II ein sehr potenter Vasokonstriktor und begünstigt die Entstehung bzw. Zunahme der Schwere eines arteriellen Hypertonus.

Nikotin, ein wichtiger Bestandteil des Zigarettenrauchs, vermag die Angiotensin-II-vermittelte mitogene Reaktion in glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten zu erhöhen, was möglicherweise ebenfalls zur Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen in Verbindung mit Zigarettenrauchen beiträgt.

Atherosklerose, die eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen spielt, wird über eine weitere Kaskade, die das Zigarettenrauchen in Gang setzt, begünstigt und betrifft das LDL. Rauchen verstärkt die Oxidation des LDL. Dieses modifizierte LDL wird von Makrophagen, die sich in Gefäßendothelzellen befinden, über Scavenger Rezeptoren, wie das CD36, aufgenommen, woraufhin sich die Makrophagen, die das oxidierte LDL (oxLDL) nicht abbauen können, zu Schaumzellen verwandeln. Im Verlauf führt dieser Prozess zur Nekrose von Schaumzellen und Ablagerung freier Lipide in der Intima.⁷⁶ Zudem werden beim Zerfall von Schaumzellen Wachstumsfaktoren frei, die eine Entzündungsreaktion und die Einwanderung von Leukozyten und Endothelzellen aus der Media in die Intima herbeiführen und daraufhin die Bildung einer Bindegewebsmatrix sowie proinflammatorischer Proteine induzieren.⁷⁷

Endothelzellen sind ebenfalls befähigt über Scavenger Rezeptoren oxLDL aufzunehmen, was zu einer erhöhten Bildung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in Endothelzellen führt. Adhäsionsmoleküle vermitteln die zunehmende Einwanderung von Monozyten aus dem Gefäßlumen. Chemokine regulieren deren Umwandlung zu Makrophagen.

OxLDL führt außerdem zur Bildung von Autoantikörpern und einer Erhöhung der Thrombozytenaggregation.⁷⁶ Zu weiteren Auswirkungen des Zigarettenrauchens auf das Herz-Kreislaufsystem und die Entstehung der KHK zählen die Erhöhung des Fibrinogenspiegels und der Blutviskosität sowie die Begünstigung der Insulinresistenz, letztere durch vermehrte Freisetzung des Zytokins TNF- α .⁷⁸

5. Die zur Inkubation verwendeten Testsubstanzen

5.1 Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten im Allgemeinen

Definitionsgemäß sind AT₁-Rezeptor-Antagonisten, auch als Sartane bekannt, Pharmaka, deren Bindung an den Rezeptor eine sehr hohe Affinität und Selektivität aufweist.⁸⁰

In der Folge werden auf diese Weise die Rezeptor-vermittelten Wirkungen von Angiotensin II gehemmt. Indirekt führen sie zu einer Aktivierung des AT₂-Rezeptors, da das anfallende Angiotensin II nun vermehrt mit den AT₂-Rezeptoren interagiert. Die Aktivierung von AT₂-Rezeptoren, die bei arterieller Hypertonie hochreguliert werden, trägt zur blutdrucksenkenden Wirkung von AT₁-Rezeptor-Antagonisten bei.

Durch die Behandlung mit AT₁-Rezeptor-Antagonisten wird die Angiotensin II-Bildung sogar erhöht, da durch die Besetzung der AT₁-Rezeptoren die negative Rückkopplung auf die Reninsekretion ausbleibt, die Reninsekretion also nicht mehr durch Angiotensin II gehemmt wird.⁷⁹ Zu den Indikationen einer Therapie mit AT₁-Rezeptor-Antagonisten gehören neben der arteriellen Hypertonie auch Nephropathie, Diabetes mellitus Typ II, diabetische Proteinurie, linksventrikuläre Hypertrophie sowie Husten im Rahmen einer ACE-Hemmer-Therapie.⁸⁰ Unerwünschte Wirkungen von Sartanen sind u. a. Hyperkaliämie, Diarrhoe, Muskelkrämpfe, Sinusitis, verlegte Nasenwege, Erythem, Schwindel, Schlaflosigkeit, Depression, Atemnot, Hypotonie, periphere Ödeme, das angioneurotische Ödem sowie Anstieg von Serumkreatinin und -bilirubin. Zu den allgemeinen Kontraindikationen zählen Schwangerschaft, Stillzeit, schwere Einschränkungen der Leberfunktion sowie im Speziellen bei Telmisartan eine bestehende Gallenwegsobstruktion.^{140, 141, 142}

5.1.1 Losartan und EXP3179

Als erster Vertreter der AT₁-Rezeptor-Antagonisten kam Losartan im Jahr 1996 auf den deutschen Markt. Chemisch gehört es zu den Imidazolderivaten und unterliegt bei gleichzeitig guter oraler Resorption einem ausgeprägten First-pass-Effekt.⁸⁶ So beträgt seine relative Bioverfügbarkeit 33 %.⁷⁹ Bei der Biotransformation entsteht mit Hilfe der Cytochrom-P450-Enzyme aus Losartan, das zunächst als Prodrug vorliegt, sein aktiver Metabolit EXP3179, der hauptsächlich für die Wirkung des Pharmakons verantwortlich ist. Im Gegensatz zum nicht-kompetitiven Hemmer EXP3179 entfaltet Losartan seine Wirkung im Rahmen einer kompetitiven Hemmung am AT₁-Rezeptor. Zu den vielfältigen Wirkungen von Losartan und EXP3179 gehören die Hemmung der AT₁-Rezeptor-vermittelten Vaso-
konstriktion, der Gefäß- und Myokardhypertrophie, positiven Inotropie, Koronarkonstriktion, Absorption von Natrium und Wasser, intraglomerulären Proliferation, Aldosteron-, ADH- und Katecholaminfreisetzung sowie Sympathikusaktivierung.⁶⁸ Zudem entfaltet EXP3179 eine AT₁-Rezeptor unabhängige Wirkung und ist verantwortlich für die antiinflammatorischen Effekte des Losartans, in dem es die Up-Regulation der Cyclooxygenase-2 hemmt.^{81, 82, 83, 84}

Ferner stimuliert EXP3179 die endotheliale NO-Synthase und hemmt die TNF- α -vermittelte Apoptose.⁸² Weiterhin konnte dem EXP3179 eine gerinnungshemmende Eigenschaft durch die Hemmung einer kollagenabhängigen Thrombozytenaktivierung zugesprochen werden.⁸⁴ Ebenso wurde EXP3179 als direkter PPAR γ -Agonist identifiziert, was seine positiven Effekte auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel erklärt.⁸³

Die Halbwertszeit von Losartan bzw. EXP3179 beträgt 2 bzw. 6-9 Stunden.⁸⁰ Die Elimination von Losartan und EXP3179 erfolgt in gleichen Anteilen hepatisch und renal.^{79, 85, 86}

5.1.2 Telmisartan

Ein jüngerer Vertreter der Gruppe der Imidazolderivate ist Telmisartan, der als nicht-kompetitiver AT₁-Rezeptor-Blocker fungiert. Im Gegensatz zu Losartan ist Telmisartan kein Prodrug und zeichnet sich durch seine hohe Halbwertszeit zwischen 20 und 24 Stunden aus. Zudem weist es im Gegensatz zu Losartan mit 50 % eine höhere relative Bioverfügbarkeit auf.^{79, 87}

Neben seiner vordergründigen antihypertensiven Wirkung am AT₁-Rezeptor, spielt Telmisartan durch seinen partiellen Agonismus am PPAR_γ-Rezeptor zudem eine wichtige Rolle im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Zu den positiven Effekten dieser Interaktion gehören u.a. eine Verbesserung der Insulinresistenz sowie Reduktion des Triglyceridserumspiegels und auf diese Weise die Senkung des kardiovaskulären Risikos.⁸⁸ Telmisartan wird nahezu ausschließlich über Galle und Stuhl ausgeschieden, während alle anderen Sartane über die Leber und Niere eliminiert werden.¹⁴⁰

5.2 Ein wichtiger Vertreter der Glitazone: Pioglitazon

Bei einer jüngeren Gruppe von Diabetestherapeutika wurde ein ähnlicher Effekt auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel beobachtet. Einer der bekanntesten Vertreter dieser Gruppe ist Pioglitazon. Er gehört chemisch zu den Thiazolidindionen. Seine metabolische Wirkung entfaltet er durch selektiven Agonismus am PPAR_γ-Rezeptor und beeinflusst, wie AT₁-Rezeptor-Blocker, nach dessen Bindung die Transkriptionsrate des Glukosetransportproteins GLUT 4, woraufhin eine Verbesserung der Insulinempfindlichkeit im Skelettmuskel und Fettgewebe resultiert.⁸⁹

Seine relative Bioverfügbarkeit beträgt 80 %. Die Halbwertszeit von Pioglitazon liegt bei 11, die seiner wirksamen Metaboliten bei 27-29 Stunden. Die Elimination erfolgt überwiegend renal.¹³⁰

Verschiedene unabhängige Arbeitsgruppen zeigten auf, dass Pioglitazon u.a. auch blutdruckregulierend wirkt. Neben einer direkten Blockade der Calciumkanäle und Erhöhung des NO-Serumspiegels mit resultierender Vasodilatation, begünstigt Pioglitazon zudem den Abbau des zytotoxischen Superoxid-Radikal-Anions, das ständig als Nebenprodukt des oxidativen Stoffwechsels entsteht.^{17, 90, 91, 92} Die resultierende Minderung der Gefäßkonstriktion und des oxidativen Stresses fördern die Wiederherstellung der Endothelfunktion, was am Beispiel von diabetischen Mäusen aufgezeigt wurde. Bei diesen Tieren, die zwar an einem Insulinmangel litten, jedoch keine -resistenz aufwiesen, führte Pioglitazon weder zu einer signifikanten Blutzuckersenkung, noch zu der typischen Gewichtszunahme.¹⁷

Leider zeigte Pioglitazon in einer retrospektiven Studie eine leicht erhöhte Inzidenz von Harnblasenkrebs, so dass Patienten mit einem leicht erhöhten Blasenkrebsrisiko, Blasen-

krebs in der Vorgeschichte oder nicht abgeklärter Makrohämaturie bei der Behandlung eines Diabetes mellitus Typ II nicht auf Pioglitazon eingestellt werden sollten.¹³²

Ferner führt Pioglitazon zu Flüssigkeitsretention und peripheren Ödemen, was für Patienten mit Herzinsuffizienz gefährlich werden kann. Rosiglitazon, ein anderer Vertreter der Glitazone, steht sogar im Verdacht das Herzinfarktrisiko zu erhöhen, was maßgeblich zur Rücknahme des Medikamentes vom europäischen Markt im November 2010 beitrug. Pioglitazon ist frei von diesem Risiko, es soll jedoch das Frakturrisiko erhöhen.¹³³

Aus diesem Grund sollte das Nutzen-Risiko-Verhältnis bei einer Therapie mit Pioglitazon im Hinblick auf altersbedingte Risiken wie Blasenkrebs, Frakturen und Herzinsuffizienz vor einem Therapiebeginn sorgfältig abgewogen und der Patient nach wenigen Monaten Therapiedauer bezüglich der genannten Erkrankungen untersucht werden.¹³³

Pioglitazon ist aktuell der einzige zugelassene Vertreter dieser Gruppe in Europa und kontraindiziert bei Leberfunktionsstörungen, Herzinsuffizienz NYHA I-IV, während der Schwangerschaft und Stillzeit, bei Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff sowie bei diabetischer Ketoazidose und oder diabetischem Präkoma. Aufgrund des guten sowie lang anhaltenden positiven Einflusses von Pioglitazon auf den Metabolismus ohne Gefahr einer Hypoglykämie ist Pioglitazon ein wichtiges Therapeutikum bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II und gleichzeitig vorliegender Insulinresistenz.¹³⁹ Eine unerwünschte Wirkung von Pioglitazon ist eine Appetitsteigerung sowie eine hiervon unabhängigen Gewichtszunahme durch Wassereinlagerungen.^{139, 143}

5.3 Zigarettenrauchkondensat

Bei den vielfältigen bereits oben genannten psycho-physischen Auswirkungen des Zigarettenrauchens, hervorgerufen durch zahlreiche Inhaltsstoffe, untersuchte ich im Rahmen dieser Arbeit keinen besonderen Inhaltsstoff, sondern ein repräsentatives kondensiertes Stoffgemisch, das diverse zytotoxische und kanzerogene Substanzen einer Zigarette enthält, die bei der Inhalation von Zigarettenrauch vom Organismus aufgenommen werden. Im eingesetzten CSC wurde eine Vielzahl verschiedener Chemikalien identifiziert, die inflammatorische Prozesse einleiten und sich zytotoxisch auf zahlreiche Zelltypen auswirken, nachgewiesen. Hierbei handelt sich unter anderem um Nikotin, Nitrosamine, Cadmium, Phenole, Schwermetalle und chemische Kanzerogene.^{93, 94}

Direkte Vergleiche zwischen Zigarettenrauch, einem komplexen Gemisch aus vielen einzelnen chemischen Bestandteilen, die als Gase, Dämpfe und kondensierte Aerosolpartikel vorliegen, und CSC bezüglich ihrer gemessenen biologischen Aktivität können nicht gezogen werden, da sie sich im Hinblick auf ihre chemische Zusammensetzung sowie physikochemischen Eigenschaften unterscheiden.⁹⁵ Ergebnisse maschinellen Abrauchens können als ein Beitrag zur Risikobewertung herangezogen werden, sie sind jedoch weder vorgesehen noch geeignet, als Maß möglicher menschlicher Exposition oder zur Risikoeinschätzung zu dienen.⁹⁶

Da es sich in diesem Versuch um eine im feuchten Milieu angesiedelte Zellkultur von Präadipozyten handelt, die natürlicherweise weder über nikotinische Rezeptoren verfügen, noch Katecholamin-induzierte Prozesse aufweisen, wurde in den folgenden Versuchen lediglich die Wirkung von CSC auf die Expression bestimmter Gene untersucht.

Zur Herstellung von CSC wurden in den vergangenen Jahrzehnten mehrere Maschinen hergestellt. Dabei verfolgten die Produzenten zunächst das Ziel, ein dem Zigarettenrauch vergleichbares Stoffgemisch herzustellen und so die vom Menschen inhalierten Substanzen zu eruieren. Durch Modifizierung des Zugvolumens, der -häufigkeit und -dauer standen bei den später entwickelten Geräten die Unterschiede der Stoffkonzentrationen im gewonnenen CSC im Mittelpunkt des Herstellerinteresses. Durch jede dieser Maschinen wird die vorher eingespannte Zigarette abgeraucht und der gewonnene Rauch kondensiert.⁹⁷ Das in diesem Versuch verwendete CSC entstammt der University of Kentucky mit der Zigaretten-Referenznummer 2R4F. Erzeugt wurde das Kondensat durch eine Abrauchmaschine unter Standardbedingungen, die von der Internationalen Organisation für Normung (ISO) mit der ISO-Nummer 4387:2000 festgelegt wurden. Die Sammlung der Partikelphase erfolgte auf einem Cambridgefilter, der derselben ISO-Norm entspricht. Der Dunst wurde durch denselben Filter abgeleitet und in DMSO eingelassen. Somit lassen sich die Kondensat- und Nikotingehalte von Zigaretten, die mit diesem Verfahren bestimmt werden, vergleichen und können auf der Grundlage der durch maschinelles Abrauchen erhaltenen Werte eingestuft werden. Aus produkttechnischen Gründen und aus Gründen der Rechtsetzung ist es sinnvoll, Zigaretten maschinell abzurauen, um Informationen über Zigarettenrauchbestandteile zu erhalten.^{96, 98}

Der Rauch einer Referenzzigarette 2R4F ähnelt in seiner Zusammensetzung mit Nikotin (0,8 mg/Zigarette), Kohlenmonoxid (13 mg/Zigarette) und Teer (9,7 mg/Zigarette) dem

Rauch einer nicht schadstoffreduzierte Filterzigarette (Nikotin 0,8 mg/Zigarette, Kohlenmonoxid 10 mg/Zigarette und Teer 10 mg/Zigarette) auf dem deutschen Markt.⁹⁹ Viele Studien haben in den vergangenen Jahrzehnten die DNA-Schädigung sowohl durch CSC als auch durch Zigarettenrauch in vitro und in vivo nachgewiesen.^{64, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111} Beispielsweise zeigten in vitro behandelte Ovarial- und Leberzellen chinesischer Hamster chromosomale Aberrationen und chromosomale Translokationen.⁹³ Das wiederholte Bestreichen der Haut von Nagern mit CSC führte an den behandelten Stellen zu benignem und malignem Tumorwachstum.¹¹² Bei Versuchen mit Filter- sowie teer- und schwebstofffreien Zigaretten konnte ebenfalls ein resultierender DNA-Schaden nachgewiesen werden.^{64, 113} Das Zigarettenrauchkondensat der Referenzzigarette wurde für meinen Gebrauch in dem organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) mit einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und in Eppendorfgefäßen bei -80 °C aufbewahrt. In den Versuchen kam das CSC in den Konzentrationen 1,5 und 10 µg/ml zum Einsatz.

6. Materialien und Methoden

6.1 Geräte

- Varioklav Dampfsterilisator H+P, Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
- Eppendorf Centrifuge 5415 D, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Microwelle Sharp R-212, Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
- Sartorius Laborwaage CP 225 D, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Sartorius Laborwaage BP 3100, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Heraeus Brutschrank B 5050 E, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
- ACCU Jet Brand Pipettierhelfer, Brand & Co. KG, Wertheim, Deutschland
- Heidolph REAX Top (Vortexapparat), Heidolph Instruments & Co. KG, Schwabach, Deutschland
- Scotsman AF 10 (Eismaschine), MET Mack Eistechnik GmbH, Maintal, Deutschland
- 96 und 384 Well Multiply-PCR-Platten aus Polypropylen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

- Transparentfolie für Multiply-PCR-Platten, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Cover slips 13 mm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Zellschaber mit 1,7 cm Klinge, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- 6-Well-Zellkulturplatten mit traditioneller Wachstumsoberfläche, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Zellkulturflaschen mit 25 und 75 cm² Wachstumsfläche, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Eppendorf Reaktionsgefäße 1, 5 und 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Pipetten 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen farblos 10 µl, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Atman Sequentes Detektion System 7900 HAT, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Smart spec 3000 (Spectrophotometer), Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Pasteurpipetten, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Kühlschrank, Liebherr IKB 2420-20 Premium, Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach, Deutschland
- Axioskop 2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

6.2 *Chemikalien*

- Insulin solution human, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBX), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Dexamethason, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Pioglitazonhydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Losartan Potassium, Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- EXP3179, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Telmisartan, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- TaqMan Probes, Assay on Demand, Applied Biosystems Deutschland GmbH,

Darmstadt, Deutschland

- RealMasterMix Probe with ROX, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Aqua dest, MedPlus Medizintechnik, Dresden-Langebrück, Deutschland
- Superscript II Reverse Transkriptase, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
- dNTP Mix 10 mM Solution, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
- RNazol, WAK-Chemie GmbH, Steinbach, Deutschland
- GAPDH Maus Primer, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
- FABP4 Primer, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
- CD36 Primer, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Random Primer, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
- RNAsin, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
- Trypsin Gibco EDTA, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Gibco D-MEM, liquid, high glucose, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Dabco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Sudan Red 7 b, Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Mowiol 4-88, Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Paraformaldehyd, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Diamino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- 2-Propanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Zigarettenrauchkondensat von Referenzzigaretten mit der Referenznummer 2R4F, University of Kentucky, USA

6.3 Zellen

- 3T3-L1-Zellen, eine Subpopulation von Präadipozyten der CCL-Linie-173 von embryonalen Mäusen, ATCC, Manassas, USA

6.4 Puffer und Lösungen

6.4.1 Herstellung des Nährmediums

Der Flasche Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 450 ml Inhalt wurden 50 ml inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) zugeführt und durch mehrfaches Pipettieren vermischt, so dass sich ein Nährmedium mit 10 %igem FCS-Anteil ergab.

6.4.2 Herstellung der Insulinlösung

Es wurde Insulin mit einer Konzentration von 10 mg/ml in Verhältnis 1:20000 mit aufbereitetem Apothekenwasser verdünnt.

6.4.3 Herstellung der Dexamethasonlösung

Zunächst wurde eine Stammlösung mit 1 mg/ml DMSO angelegt und hiernach im Verhältnis 1:25000 mit destilliertem Wasser verdünnt.

6.4.4 Herstellung der Isobutylxanthin(IBX)-Lösung

Nach Fertigung der Stammlösung von 1 mg IBX/ml Ethanol wurde diese im zweiten Schritt im Verhältnis 1:90 mit Apothekenwasser verdünnt.

6.4.5 Herstellung der Phosphate-Buffered-Saline(PBS)-Lösung

PBS wurde zur Trypsinverdünnung und als neutrale Spüllösung zum Reinigen der Zellen von Überständen eingesetzt. Für die Herstellung wurden 4,77 g PBS-Pulver mit 500 ml Apothekenwasser in einer autoklavierbaren Glasflasche vermischt und mit aufgedrehtem Verschluss autoklaviert.

6.5 Aufbereitung und Durchführung der Fettrot-Färbung

Fettrot vermag die Neutralfette einer Zelle anzufärben. Dapi hingegen bringt die Zellkerne durch einen Fluoreszenzfarbstoff zum Vorschein.

3 g Fettrot wurden in 100 ml heißem 70 %igem Ethanol in der Mikrowelle gelöst, über Nacht bei 56 °C geschüttelt, auf Raumtemperatur abgekühlt und durch ein Filterpapier passiert. Vor jedem Gebrauch wurde die Verbindung erneut erhitzt und von den sich bildenden groben Partikeln filtriert.

Die Zellen mussten für den Färbeprozess auf Deckgläsern, sogenannten Cover slips (CS), die vorher in 6-Well-Zellkulturplatten hineingelegt wurden, wachsen. Der Inkubationsprozess gestaltete sich sonst unverändert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die mit Zellen bewachsenen CS zweimal mit PBS gewaschen und in 12-Well-Zellkulturplatten überführt. Hier erfolgte die Fixierung in 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) mit jeweils 1 ml/Well für einen Zeitraum von 30 min. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und zweimal mit 50 %igem Ethanol für jeweils 2 min gewaschen. Nun wurde das erhitzte und gefilterte Fettrot mit 1 ml/ Well für 10 min auf die Zellen aufgetragen. Hier-nach erfolgten drei Waschungen á 3 min mit 50 %igem Ethanol und anschließend die dreimalige Waschung á 5 min mit PBS.

Um die Zellkerne anzufärben wurden 3 ml Dapi in 100 ml frisch angerührtem PBS ver-mischt und die Zellen mit 1 ml/Well für 3 min beimpft. Hiernach erfolgte die zweimalige Waschung mit PBS á 2 min. Zur Erhaltung der Immunfluoreszenz der gefärbten Zellkerne wurden die Zellen abschließend durch Mowiol mit 0,1 %igem p-Phenyldiamin(PPD)-Anteil bedeckt, auf einem Objektträger mit der Zellseite nach unten getrocknet und bei 4 °C ge-lagert.

7. Zellkultivierung

Alle Arbeiten im Bereich der Zellkultivierung fanden unter einer Sterilbank mit Abzug statt. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuch-tigkeit. Das eingesetzte Nährmedium wurde vor dem Gebrauch stets auf 37 °C erwärmt.

7.1 Vorbereitung der Zellkultur und Handhabung der Zellen

Die Zellen wurden in der Hand aufgetaut, die sich vom Rand lösende Masse in einen 15 ml fassenden Aliquot mit 7 ml Medium überführt und 6 min bei 37 °C, RCF 130 g zentrifu-giert. Der Überstand wurde mittels einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und das verbleibende Sediment mit 6 ml Medium durch Hoch- und Herunterpipettieren blasenfrei vermischt. Anschließend erfolgte die Überführung des Gemisches in eine 25 cm² fassende Zellkulturflasche und Bebrütung in einem Inkubator. Der Mediumwechsel fand alle drei bis vier Tage statt.

Bei 70 %iger Konfluenz wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Hierfür waren insgesamt 18 ml Medium, drei 25 cm² fassende Zellkulturflaschen sowie 3 ml 1x Trypsin vonnöten.

Nach dem Absaugen des Mediums mittels steriler Pasteurpipette und Spülung der Zellen mit 1 ml 1x Trypsin, wurde den Zellen erneut jeweils 2 ml Trypsin zugesetzt und diese für ca. 5 min inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte mittels Zugabe von 4 ml Medium. Durch blasenfreies Pipettieren wurde die Suspension vermischt und das Zellgemisch auf drei 25 cm² fassende Zellkulturflaschen, die vorab mit je 4 ml Medium versehen wurden, aufgeteilt und inkubiert.

Bei dem zweiten Splitting-Vorgang, bei dem die Zellen vom Flaschenboden gelöst und in verdünnter Menge auf neue Flaschen überführt wurden, erfolgte zum Zweck der Ökonomisierung des Arbeitsprozesses eine Umverteilung der Zellen auf mindestens zwei 75 cm² fassende Zellkulturflaschen.

Die Zellen wurden hierbei in einem Stadium der ca. 40-50 %igen Konfluenz wie zuvor mit 1 ml 1x Trypsin gespült und anschließend mit 3 ml 1x Trypsin versetzt. Die Menge des eingesetzten Mediums richtete sich nach der Größe der Zellkulturflaschen. So sollte die Menge des Gemisches aus Zellen, Trypsin und Medium ein Drittel des Flaschenvolumens betragen.

7.2 Einfrieren der Zellen zur Konservierung

Hierbei wurden kleine Behälter mit Schraubverschluss, sog. Kryo-Vials, DMEM mit 10 %igem FCS-Anteil, 5 % DMSO sowie 0,5x Trypsin verwendet.

Die Zellen wurden zunächst mit 1 ml 1x Trypsin und danach mit 3 ml gespült, vom Flaschenboden gelöst, in einen 15 ml Falcon überführt und 5 min bei 400 g und 37°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte das behutsame Absaugen des Überstandes, Vermischen des Sedimentes mit 5 ml Medium und die Abfüllung in Kryo-Vials zu je 1 ml. Der Gefrierprozess wurde zunächst für mehrere Stunden bei -20 °C und hiernach zeitlich unbegrenzt bei -72 °C vollzogen.

8. Versuchsaufbau

Es wurden 3T3-L1-Zellen in 6-Well-Platten in dem o.g. speziell angesetzten Nährmedium kultiviert. Im Stadium der vollständigen Konfluenz erfolgte das Absaugen des Mediums sowie Inkubation für 12 h mit jeweils 970 µl Nährmedium sowie jeweils 10 µl Insulin, Dexamethason und IBX pro Well. Das Insulin diene hierbei der beschleunigten intrazellulären Fetteinlagerung. Das Glukokortikoid Dexamethason und der Phosphodiesterasehemmer IBX verkürzten hingegen den normalerweise mehrere Wochen andauernden Konversionsprozess von unreifen Präadipozyten zu differenzierten Adipozyten auf die Dauer von vier Tagen.¹¹⁴ Im Anschluss wurden die Zellen nach Reinigung mit 1x PBS mit je einem PPAR γ -Agonisten, d.h. Pioglitazon, Telmisartan, Losartan und seinem aktiven Metaboliten EXP3179, mit einer einheitlichen Stoffmengenkonzentration von 3×10^{-6} mol/L sowie Ethanol in einer 1:100-Verdünnung als Kontrolle versehen und inkubiert.

Ergänzt wurde dieser Versuch durch den Einsatz von PPAR γ -Agonisten in verschiedenen Konzentrationen, deren Spanne - je nach Ergebnis im Vorversuch zwischen $2,3 \times 10^{-10}$ und $2,3 \times 10^{-2}$ - reichte, um konzentrationsabhängige Wirkungen einzelner Agonisten zu erforschen. Darauf aufbauend erfolgte im nachfolgenden Versuchsteil die Co-Inkubation eines Agonisten zusammen mit CSC in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml, um dessen Einfluss auf die PPAR γ -Aktivierung zu eruieren.

Nach einer Inkubationsdauer von vier Tagen wurde aus den Zellen in mehreren Durchgängen mRNA isoliert, um hieraus nach Reverser Transkription und Quantifizierung eine Veränderung des Genproduktes zu ersehen.

9. Anleitung zur Gewinnung von cDNA

9.1 Isolierung der mRNA

Bei diesem Vorgang wurden ausschließlich autoklavierte Materialien verwendet und Handschuhe getragen. Die eingesetzten Substanzen waren auf 37 °C vorgewärmt. Das Zentrifugieren erfolgte bei einem RCF-Wert von 1200 g.

Nach Absaugen des Mediums mittels steriler Pasteurpipette und Spülung der Zellen mit PBS wurden die Zellen mit 500 µl RNAzol/Well beimpft, mittels Zellschaber gelöst und in 1,5 ml fassende Eppendorfgeläße, in die jeweils 200 µl Chloroform vorgelegt wurde,

überführt. Hiernach wurden die Wells mit je 300 µL RNAzol nachgespült, um verbleibende Zellen herauszulösen und die Flüssigkeit in das zugehörige Eppendorfgefäß gegeben.

Jede Probe wurde 30 min gevortext und 15 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 1200 g RCF und 4 °C zentrifugiert.

Die Durchführung der folgenden Arbeitsschritte erfolgte auf Eis. Die obere wässrige Phase wurde mittels steriler Pipette abgenommen, in je ein neues Eppendorfgefäß mit 1 ml Isopropanol überführt, erneut gevortext, 1 h bei -20 °C im Gefrierschrank gefällt und anschließend 30 min bei 1200 g erneut zentrifugiert. Hiernach fand sich die präzipitierte RNA als Pellet auf dem Boden des Gefäßes und wurde durch behutsames Absaugen vom Überstand befreit, mit 200 µl 70 %igen Ethanol gewaschen, erneut gevortext und 10 min bei den o.g. Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde vom Ethanol befreit, mit 20 µl Apothekenwasser resuspendiert und einige Sekunden gevortext. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrades.

9.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription diente dem Umschreiben der gewonnenen messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) mit Hilfe von Primern und Desoxyribonukleotiden in cyclische DNA (cDNA). Bei diesem Vorgang wurde ausschließlich autoklaviertes Material verwendet und Handschuhe getragen. Von jeder Probe wurden 1,7 µg mRNA eingesetzt. Zunächst erfolgte die Überführung des berechneten Volumens der RNA-Suspension in je ein Eppendorfgefäß und Abfüllung der Probe mittels Apothekenwasser auf 10 µl. Random Primer und Desoxyribonukleotide (dNTP) der Stoffmengenkonzentration 10 mM wurden in einem 1:1-Verhältnis gemischt und davon je 2 µl jeder Probe zugesetzt. Nach Durchmischung und kurzem Zentrifugieren wurden die Proben 5 min bei 65 °C erhitzt und diesen anschließend je 4 µl 5x Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNAsin beigefügt. Nach erneutem Vortexen für wenige Sekunden erfolgte eine weitere Zentrifugierung der Proben für eine Dauer von 2 min. Anschließend begann das eigentliche Umschreiben von mRNA in cDNA. Hierzu erfolgte eine zweiminütige Vorinkubation der Proben bei 42 °C. Nach Zugabe von je 1 µl Superskript II wurden die Proben erneut 50 min bei 42 °C und anschließend 15 min bei 72 °C erhitzt. Nach Abkühlen der umgeschriebenen cDNA auf Raumtemperatur wurde diese in einem Verhältnis von 1:10 mit Apothekenwasser verdünnt. Aus der nicht ver-

dünnten cDNA wurde je 1 µl aus jeder Probe in einem gesonderten Eppendorfgefäß gepoolt. Diese cDNA-Mischung repräsentierte die cDNA für die Standardkurve bei der später durchgeführten quantitativen Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Die cDNA-Proben konnten bei Bedarf bei -20 °C, die mRNA-Proben bei -72 °C eingefroren werden. Das Ziel der qRT-PCR bestand darin, den Einfluss der oben genannten Testsubstanzen auf die Ziel-Gene CD36 und FABP4 zu untersuchen, so dass bei der Herstellung der Standardreihe und bei der Messung der Proben CD36- und FABP4-Primer eingesetzt wurden. Als Haushalts- bzw. Referenz-Gen wurde das gebräuchliche Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)-Gen der Maus *Mus Musculus* bestimmt, das für ein Enzym der Glykolyse kodiert und dessen Expressierung von äußeren Einflüssen in der Regel unabhängig ist.^{115, 131}

10. Auswertung des Genproduktes

10.1 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die qRT-PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren und verbindet das Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einer zeitnahen Quantifizierung des gewonnenen Genproduktes. Diese erfolgt durch Fluoreszenzmessungen, die während bzw. nach Beendigung eines qRT-PCR-Zyklus erfolgen. Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und ermöglicht auf diese Weise eine Quantifizierung. Dies ist der entscheidende Vorteil zur herkömmlichen PCR, bei der die Fragmente im Anschluss an den PCR-Zyklus mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden müssen. Für diesen Vorgang wurden 384-Well-PCR-Platten, Abdeckfolie für die Platten, autoklavierte Pipettenspitzen, 1,5 ml fassende Eppendorf-Reaktionsgefäße, TaqMan Probes (Assay on Demand), RealMasterMix Probe with ROX sowie Apothekenwasser eingesetzt.

10.2 Handhabung der qRT-PCR mit dem TaqMan (Assay on Demand)

10.2.1 Herstellung der Standardreihe

Aus jeder cDNA-Probe wurden je 1 µl in einem Reaktionsgefäß gemischt, gevortext und kurz anzentrifugiert. Pro Gen wurden 5 µl cDNA-Mix eingesetzt. Für jedes Gen wurde je-

weils eine Verdünnungsreihe mit 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 erstellt. Hierbei erfolgte zunächst die Vermengung von 5 µl cDNA mit 5 µl Wasser und hieraus die Entnahme von 5 µl, um diese wiederum mit 5 µl Wasser für den nächsten Ansatz zu vermischen. Die Schritte wurden wiederholt, bis eine 1:32-Verdünnung vorlag.

Zwischen jedem Verdünnungsschritt wurde der cDNA-Wasser-Ansatz gevortext und an-zentrifugiert. Dieser cDNA-Ansatz lieferte die cDNA für die Standardreihe in der PCR-Platte.

10.2.2 cDNA-Ansatz für die Messung der Proben

Das Vermischen der Reaktionsansätze erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen.

Dazu wurden 8 µl 2,5x RealMasterMix, 1 µl 20x TaqMan Probe (Primer), 4 µl verdünnte cDNA-Suspension bzw. die Standards sowie 8 µl Wasser zu einem Gesamtvolumen von 21 µl vermengt.

In der Negativ-Kontrolle kam statt der cDNA Apothekenwasser zum Einsatz. Der Reaktionsansatz wurde gevortext, kurz zentrifugiert und auf zwei Wells der PCR-Platte á 10 µl verteilt. Die PCR-Platte lagerte hierbei auf Eis. Anschließend wurde sie mit Folie versiegelt und kurz zentrifugiert. Hierbei durften keine Blasen in den Wells entstehen. Die Platte war nun bereit für die Messung. Für jede Probe wurden das Ziel- und das Referenz-Gen immer auf derselben Platte mitgemessen. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung.

10.2.3 Die Messung mit dem TaqMan

Für die Quantifizierung und Messung der cDNA-Menge wurde das SDS 2.1 Computerprogramm mit der Einstellung *Absolute Quantification, 384 Wells Clear Plate* sowie *Blank Template* verwendet. Im Anschluss wurden die Detektoren *GAPDH, FABP4* und *CD36* markiert und die Funktionen *Copy to Plate Document* sowie *Done* bedient. Die Wells, die den gleichen Detector nutzten, wurden durch Anklicken und Ziehen markiert und bei dem entsprechenden Detektor *Use* angekreuzt. Nicht genutzte Wells wurden mit *Omit Wells* markiert und in der Kategorie *Passive Reference: ROX* ausgewählt. Die Probenbeschrif-

tung konnte vor oder nach dem Zyklus vorgenommen werden. Die Negativkontrolle erhielt in der Rubrik *Task* die Zuordnung *NTC*. Die Standards der Standardkurve wurden entsprechend ihrer Verdünnung mit dem *sample name Standard 1/2, Standard 1/4, Standard 1/8, etc.* sowie *Quantity 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125* bezeichnet. In der *Task*-Rubrik erhielten sie die Markierung *Standard*. In der Rubrik *sample name* erfolgte die Kennzeichnung der Proben mit dem eindeutigen Namen entsprechend der Testbedingung sowie *Unknown* in der *Task*-Rubrik. Hiernach wurde die Funktion *Instrument* bedient, um das Volumen von 10 µl einzustellen. Die Einstellung *9600 Emulation* war hierbei zu deaktivieren. Durch Bedienen der Tasten *Connect* und *Start* begann der qRT-PCR-Zyklus. Die gemessenen Cycle-Threshold(Ct)-Werte, bezeichneten den Zyklus, bei dem erstmals eine signifikant höhere Fluoreszenz im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz, erreicht wurde. Zur Normierung der absoluten Ergebnisse wurden die Ct-Werte, die das Genprodukt der internen Kontrolle erzeugte, aus den Messerwerten gemäß CD36/GAPDH und FABP4/GAPDH herausgerechnet.

11. Statistische Auswertung

Die Versuchszahl betrug, sofern in der Graphik nicht anders angegeben, $n=6$. Die Berechnungen wurden in Doppelbestimmung mittels One-way ANOVA durchgeführt und die Resultate anschließend mit dem Newman-Keuls-Vergleichstest in Paaren einander gegenübergestellt. Die Ergebnisse wurden als normierte Messerwerte in üblichen Boxplots mit Median und dem Interquartilsabstand dargestellt. Als statistisch signifikant galten Unterschiede bei einem Signifikanzwert von $p < 0.05$. Eingesetzt wurde das Programm GraphPad Prism Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA.

12. Ergebnisse

12.1 Versuchsreihe mit Pioglitazon

Es wurde eine Stoffmengenkonzentrations-Wirkungskurve erstellt, um diejenige Stoffmengenkonzentration von Pioglitazon zu ermitteln, bei der eine Erhöhung der Genexpression von CD36 und FABP4 eintritt. Da diese durch eine Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors vermittelt wird, ist eine Erhöhung der Genexpression als Marker für die Aktivierung des Rezeptors zu werten.

Es wurden sieben verschiedene Pioglitazon-Stoffmengenkonzentrationen zwischen 3×10^{-9} M und 3×10^{-6} M eingesetzt. Eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression von CD36 im Vergleich zur Kontrolle trat bei einer Pioglitazon-Stoffmengenkonzentration von 10^{-6} M ein und erhöhte sich mit steigenden Stoffmengenkonzentrationen signifikant (Abb. 3).

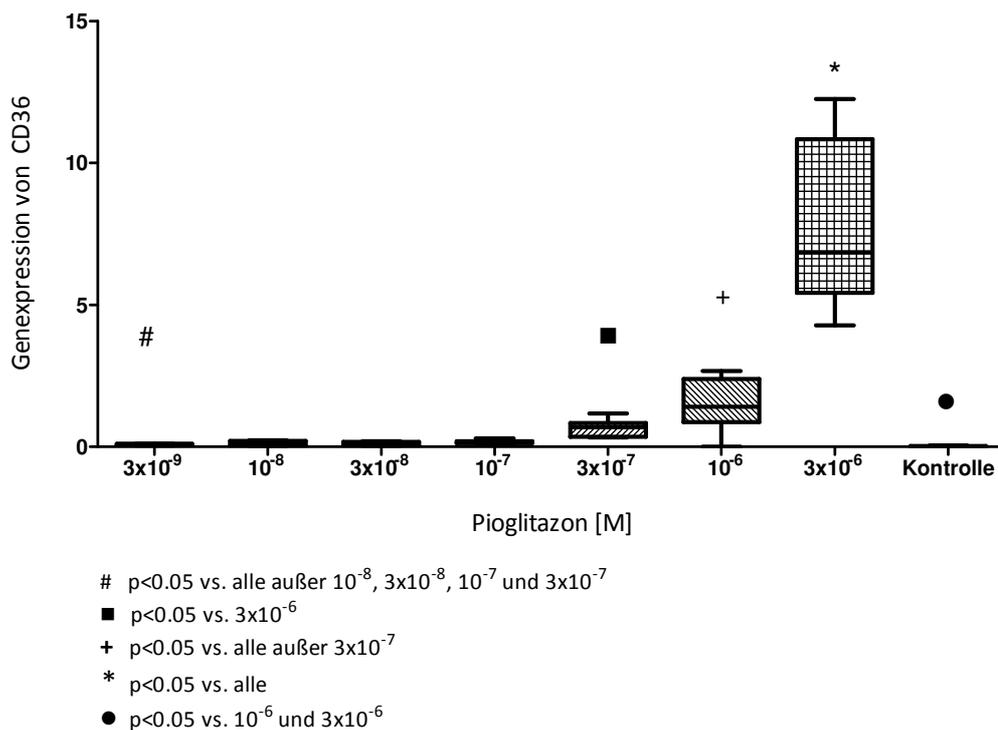


Abb. 3. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der durch Pioglitazon in verschiedenen Stoffmengenkonzentrationen induzierten Genexpression von CD36 im Vergleich zur Kontrolle. Zudem lassen sich die anderen Bedingungen bezüglich signifikanter Unterschiede miteinander vergleichen. Eine statistisch signifikante Induktion der Genexpression des Ziel-Gens und somit PPAR γ -Aktivierung wurde durch eine Stoffmengenkonzentration von 10^{-6} M herbeigeführt.

Parallel dazu wurde eine Messung der relativen Genexpression von FABP4 in Abhängigkeit von aufsteigenden Pioglitazon-Stoffmengenkonzentrationen an denselben Proben durchgeführt, so dass die Testbedingungen und Durchführung beider Messungen gleich waren. Eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression von FABP4 gegenüber der Kontrolle trat bei einer Pioglitazon-Stoffmengenkonzentration von 10^{-6} M ein und erhöhte sich wie auch die Expression von CD36 bei der nächst höheren bestimmten Stoffmengenkonzentration von 3×10^{-6} M in statistisch signifikantem Maße (Abb. 4).

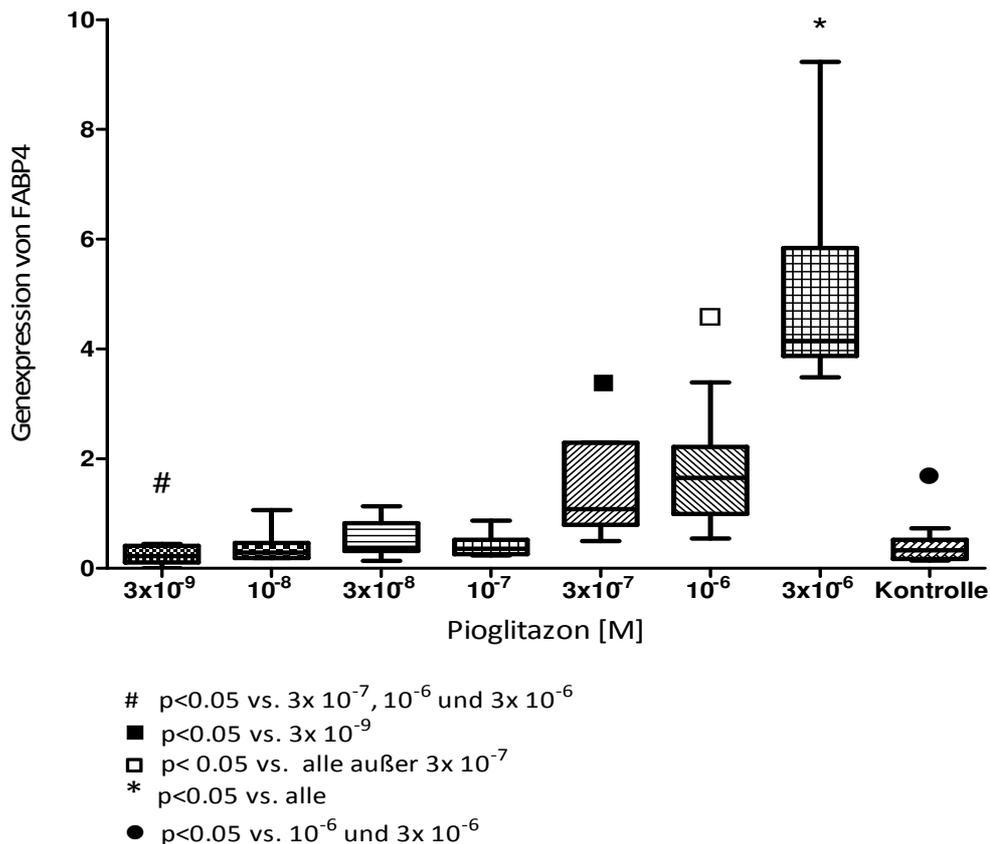
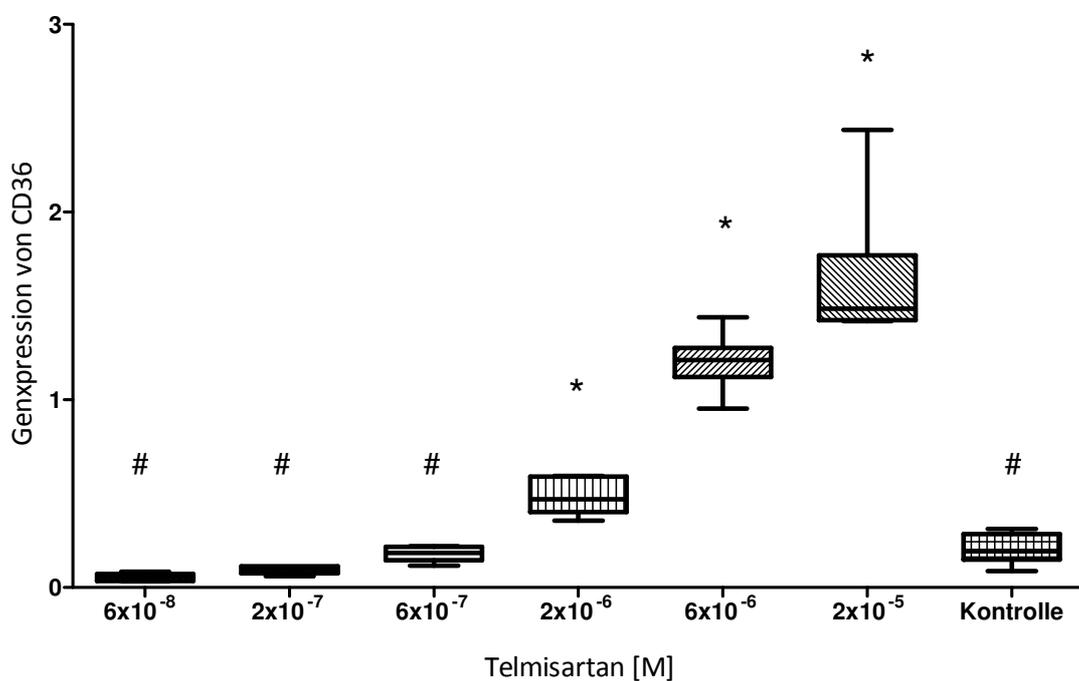


Abb. 4. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von FABP4. Als Testsubstanz diente Pioglitazon in aufsteigender Stoffmengenkonzentration. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle. Eine statistisch signifikante Induktion der Genexpression des Ziel-Gens wurde durch die Stoffmengenkonzentrationen von 10^{-6} und 3×10^{-6} M erreicht. Der Vergleich anderer Testbedingungen zueinander und zur Kontrolle ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied.

12.2 Versuchsreihe mit Telmisartan

Im folgenden Versuch wurde Telmisartan in aufsteigenden Stoffmengenkonzentrationen eingesetzt und die relative Genexpression von CD36 und FABP4 bestimmt. Die Stoffmengenkonzentrationen reichten von 6×10^{-8} M bis 2×10^{-5} M.

Eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression von CD36 gegenüber der Kontrolle wurde durch eine Telmisartan-Stoffmengenkonzentration von 2×10^{-6} M herbeigeführt und nahm bei weiterer Erhöhung der Stoffmengenkonzentration statistisch signifikant zu (Abb. 5).



$p < 0.05$ vs. 2×10^{-6} , 6×10^{-6} und 2×10^{-5} , $p > 0.05$ vs. einander
* $p < 0.05$ vs. alle

Abb. 5. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von CD36. Als Testsubstanz diente Telmisartan in aufsteigender Stoffmengenkonzentration. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle. Eine statistisch signifikante Induktion der Genexpression von CD36 und somit PPAR γ -Aktivierung wurde durch Stoffmengenkonzentrationen von 2×10^{-6} , 6×10^{-6} und 2×10^{-5} M erreicht. Die anderen aufgeführten Testbedingungen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zueinander oder zur Kontrolle.

Die Messung der Genexpression von FABP4 bei aufsteigenden Telmisartan-Stoffmengenkonzentrationen machte deutlich, dass wie auch bei der Bestimmung der Genexpression von CD36 eine statistisch signifikante Erhöhung der FABP4-Genexpression bei einer Stoffmengenkonzentration von $\geq 2 \times 10^{-6}$ M eintrat und wie in den Versuchen mit Pioglitazon mit der nächst höheren Stoffmengenkonzentration von 3×10^{-6} M in statistisch signifikantem Maße zunahm (Abb. 6).

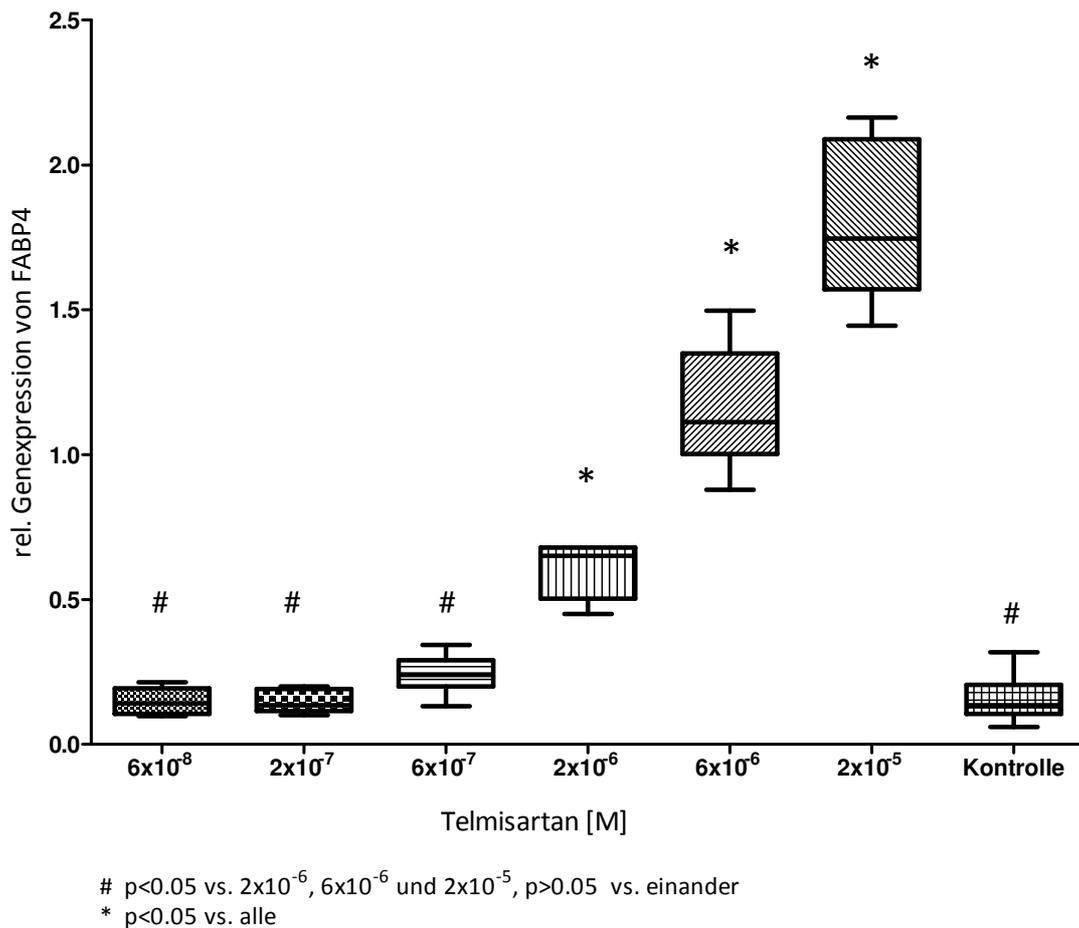


Abb. 6. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von FABP4. Als Testsubstanz diente Telmisartan in aufsteigenden Stoffmengenkonzentrationen. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle. Eine statistisch signifikante Induktion der Genexpression von FABP4 trat ab einer Stoffmengenkonzentration von 2×10^{-6} M auf und erhöhte sich mit aufsteigenden Stoffmengenkonzentrationen.

12.3 Versuchsreihe mit EXP3179

Im darauffolgenden Experiment wurde der aktive Losartan-Metabolit EXP3179 eingesetzt. Wie bei den vorangegangenen Versuchen wurde einer Stoffmengenkonzentrations-Wirkungskurve erstellt. Auch hier war es zielführend, eine PPAR γ -Aktivierung durch Bestimmung der relativen Genexpression von CD36 und FABP4 nachzuweisen. Hierbei trat eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression beider Gene durch EXP3179 bei einer Stoffmengenkonzentration von $2,3 \times 10^{-2}$ M ein (Abb. 7 und 8). Pioglitazon und Telmisartan induzierten die Ziel-Gen-Expression bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen (10^{-6} bzw. 2×10^{-6} M).

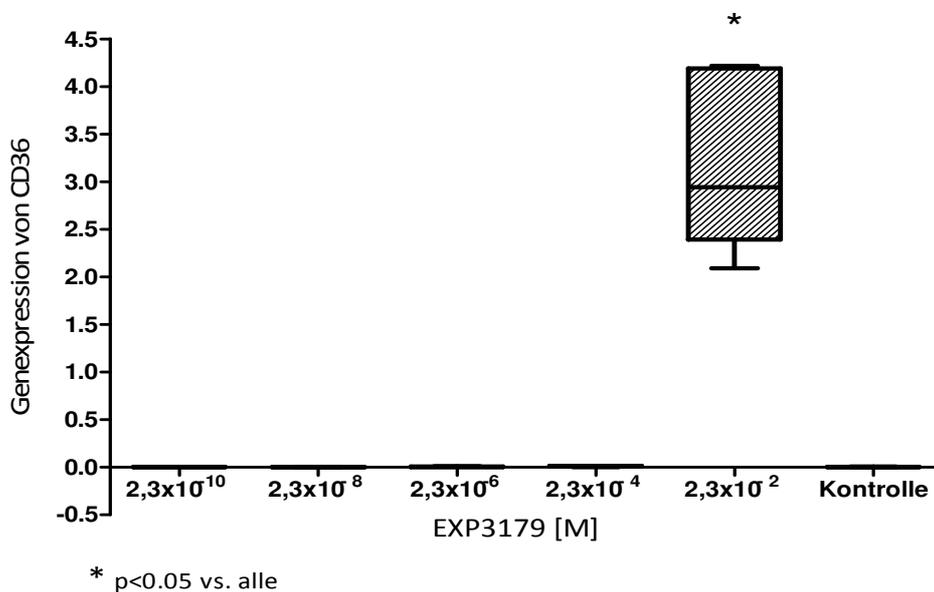


Abb. 7. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von CD36. Als Testsubstanz diente EXP3179 in aufsteigenden Stoffmengenkonzentrationen. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle. Eine statistische Signifikanz zeigte die Induktion von CD36 bei $2,3 \times 10^{-2}$ M ($p < 0.05$ vs. Kontrolle).

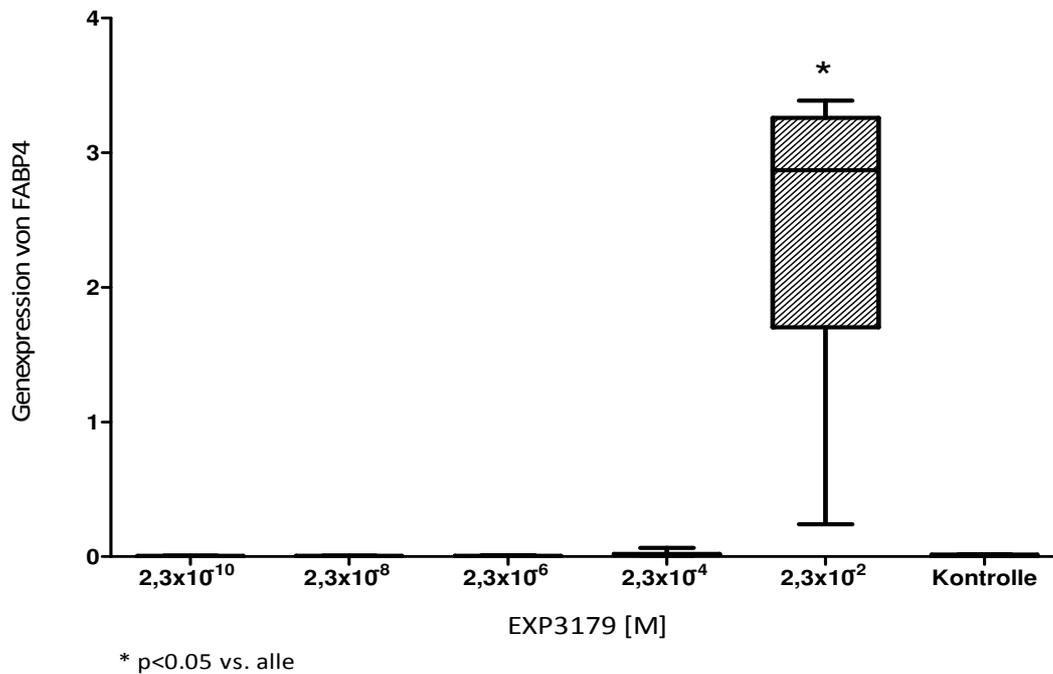


Abb. 8. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von FABP4. Als Testsubstanz diente EXP3179 in aufsteigenden Stoffmengenkonzentrationen. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle. Eine statistische Signifikanz zeigte die Induktion von FABP4 bei $2,3 \times 10^{-2}$ M ($p < 0.05$ vs. Kontrolle).

12.4 Versuchsreihe mit verschiedenen Substanzen

Im Folgenden zeigt sich eine Versuchsreihe mit den PPAR-agonistischen Testsubstanzen Pioglitazon, Telmisartan, Losartan und EXP3179. Hierbei wurde anhand der Ergebnisse aus den o.g. Versuchen mit Pioglitazon und Telmisartan die Stoffmengenkonzentration von 3×10^{-6} M gewählt, da mit ihrem Einsatz eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression beider Gene zu erwarten war. Es muss jedoch angemerkt werden, dass für Losartan vorher keine Stoffmengenkonzentrations-Wirkungskurve erstellt wurde, so dass keine Stoffmengenkonzentration bekannt war, die bei dieser Zellreihe eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression bewirkt.

Eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression von CD36 konnte durch Telmisartan, EXP3179 sowie Pioglitazon erreicht werden ($p < 0.05$ vs. Kontrolle). Durch Losartan hingegen wurde die Genexpression von CD36 im Vergleich zur Kontrolle statistisch nicht signifikant beeinflusst (Abb. 9). Auch untereinander zeigten die Testsubstanzen eine unter-

schiedliche Potenz in Hinblick auf die Induktion von CD36. Zwar erzielten Telmisartan und EXP3179 eine ähnlich hohe CD36-Genexpression, diese unterschied sich jedoch in statistisch signifikanter Weise von derjenigen, die durch Pioglitazon in derselben Stoffmengenkonzentration erreicht wurde. Pioglitazon erwies sich in diesem Vergleich als potentester Induktor der Genexpression und PPAR γ -Aktivator.

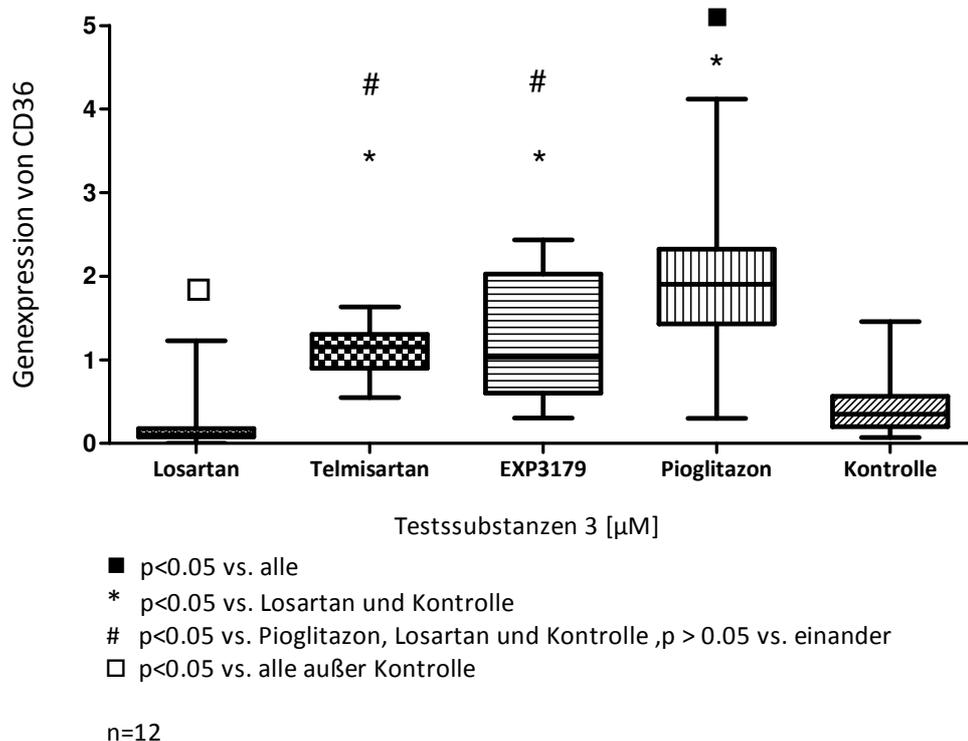


Abb. 9. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von CD36. Als Testsubstanz dienten Losartan, Telmisartan, EXP3179 und Pioglitazon. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle. Eine statistisch signifikante Induktion der Genexpression von CD36 mittels PPAR γ -Aktivierung wurde durch Telmisartan, EXP3179 sowie Pioglitazon erreicht (p<0.05 vs. Kontrolle). Losartan erreichte keine signifikante Induktion der Ziel-Genexpression.

Bezüglich der Induktion von FABP4 durch dieselben Testsubstanzen entsprach das Ergebnis demjenigen von CD36. Auch hier wurde eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression gegenüber der Kontrolle lediglich durch Pioglitazon, Telmisartan und EXP3179 erreicht. Der herbeigeführte Effekt war bei dem Einsatz von Telmisartan und EXP3179 statistisch gleich. Durch den Einsatz von Pioglitazon wurde die stärkste Genexpression hervorgerufen. Diese war von der erzielten Genexpression durch andere Substanzen statistisch signifikant unterschiedlich. Durch Losartan ließ sich in der verwendeten Stoffmengenkonzentration keine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression gegenüber der Kontrolle feststellen (Abb. 10).

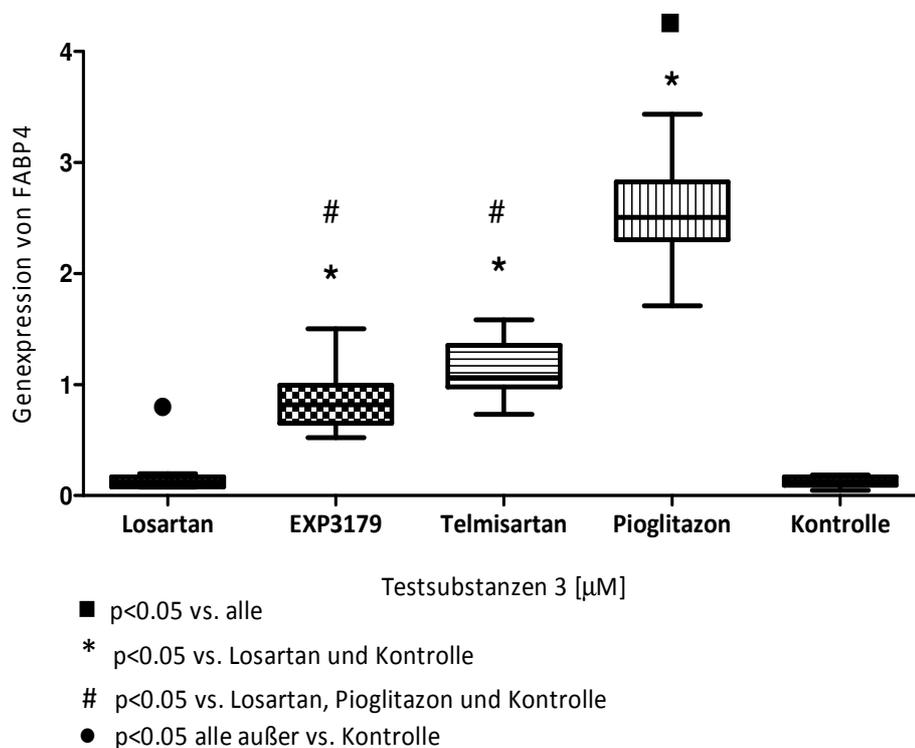


Abb. 10. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von FABP4. Als Testsubstanz dienten Losartan, Telmisartan, EXP3179 und Pioglitazon (3×10^{-6} M). Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle. Ebenfalls lassen sich die Testbedingungen miteinander vergleichen. Eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression von FABP4 wurde lediglich durch Pioglitazon, Telmisartan und EXP3179 hervorgerufen ($p < 0.05$ vs. Kontrolle). Losartan blieb bei dieser Stoffmengenkonzentration diesbezüglich wirkungslos ($p > 0.05$ vs. Kontrolle).

12.5 Untersuchung der Testsubstanzen in Verbindung mit CSC

12.5.1 Pioglitazon und CSC

Im anschließenden Versuch wurde der Einfluss von CSC auf die Pioglitazon-induzierte Genexpression von CD36 untersucht. Hierbei wurde eine Pioglitazon-Stoffmengenkonzentration von 3×10^{-6} M eingesetzt, bei der eine Erhöhung der Genexpression von CD36 gemäß den Vorversuchen zu erwarten war. Hierbei war es nicht mehr zielführend, den aktivierenden Effekt von Pioglitazon auf den PPAR γ -Rezeptor zu untersuchen, sondern vielmehr die Unterschiede der Genexpression im Vergleich zur Co-Inkubation mit CSC herauszuarbeiten.

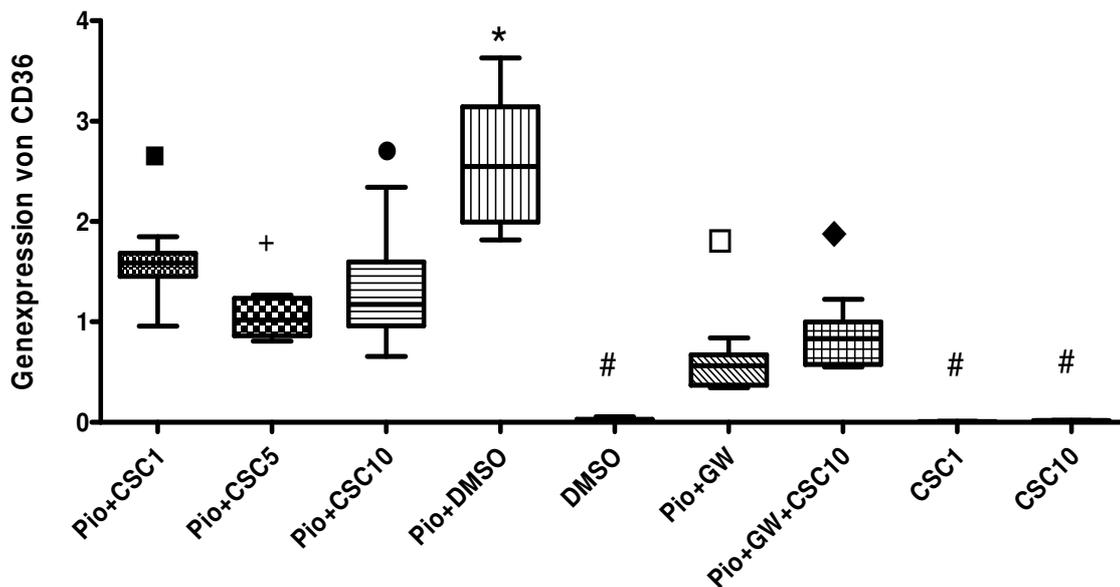
Das CSC wurde den Zellen in den Konzentrationen 1, 5 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugesetzt. Ergänzend kam der potente PPAR γ -Antagonist GW 9662 in Co-Inkubation mit Pioglitazon zum Einsatz, um die grundsätzliche Hemmbarkeit der Genexpression des Rezeptors bei der verwendeten Zellreihe zu demonstrieren. Als Kontrolle diente in allen Versuchen mit CSC DMSO, da dieses als Lösungsmittel bei der Herstellung von Referenz-CSC verwendet wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 11 und 12 dargestellt. Mehrere Aussagen können Abb. 11 entnommen werden:

Die durch Pioglitazon in Co-Inkubation mit der Kontrollsubstanz DMSO herbeigeführte CD36-Genexpression unterschied sich im Vergleich zu allen anderen Testbedingungen in statistisch signifikanter Weise und fiel deutlich stärker aus. Zudem unterschied sich die CD36-Genexpression sowohl von der Expression, die durch DMSO in solitärer Inkubation erreicht wurde als auch von derjenigen, die sich nach Co-Inkubation von Pioglitazon mit CSC in allen drei Konzentrationen einstellte.

Der hemmende Effekt von CSC auf die Pioglitazon-induzierte CD36-Genexpression war durch CSC bei allen drei CSC-Konzentrationen festzustellen. Allerdings war dieser Effekt in den Konzentrationen 1 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einander gegenüber nicht signifikant unterschiedlich. Den stärksten hemmenden Einfluss auf die Pioglitazon-Wirkung zeigte CSC bei 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ein statistisch gleichwertig hemmender Effekt ergab sich durch die Co-Inkubation von Pioglitazon mit GW 9662 und CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die GW-9662-induzierte Hemmung auf die Pioglitazon-Wirkung zeigte bei Co-Inkubation mit CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ keine statistisch signifikante Änderung.



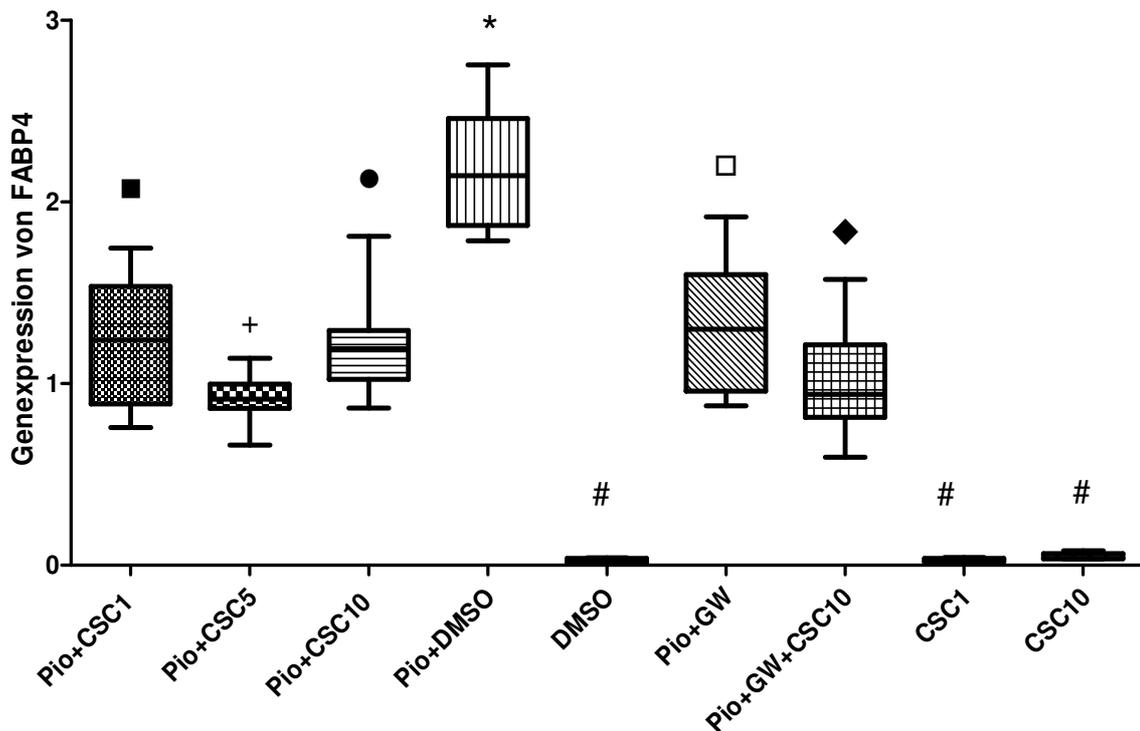
Pio=Pioglitazon 3 [μM], CSC=Zigaretterrauchkondensat [$\mu\text{g}/\text{ml}$], DMSO=Kontrolle, GW 9662 10 [μM]=PPAR-Antagonist

- $p < 0.05$ vs. alle außer Pio+CSC 10
- + $p < 0.05$ vs. alle außer Pio+GW+CSC 10
- $p < 0.05$ vs. alle außer Pio+CSC 1
- * $p < 0.05$ vs. alle
- # $p > 0.05$ vs. einander, $p < 0.05$ vs. alle übrigen
- $p < 0.05$ vs. alle außer Pio+GW+CSC 10
- ◆ $p < 0.05$ vs. alle außer Pio+CSC 5 und Pio+GW

Abb. 11. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von CD36. Als Testsubstanz diente Pioglitazon in verschiedenen Konstellationen, darunter mit CSC, DMSO und GW 9662. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). Die höchste Genexpression wurde durch Pioglitazon in Verbindung mit DMSO und die zweithöchste durch Pioglitazon in Verbindung mit CSC 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sowie Pioglitazon in Verbindung mit CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erzielt. Pioglitazon induzierte in Kombination mit GW 9662 die niedrigste Genexpression. Hingegen war beim Einsatz von DMSO, CSC 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine kaum bzw. nicht messbare Genexpression über die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors festzustellen.

An denselben Proben wurde die Messung der FABP4-Genexpression durchgeführt (Abb. 12). Wie bei der Genexpression von CD36 war die stärkste Genexpression unter Pioglitazon und DMSO und deren stärkste Hemmung unter allen drei CSC-Konzentrationen durch CSC 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu verzeichnen. Eine statistisch signifikante Hemmung der Genexpression wurde ebenfalls durch Zugabe von GW 9662 bzw. GW 9662 und CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erzielt.

Anders als bei der CD36-Genexpression war die Hemmung der Genexpression von FABP4 durch Pioglitazon in Verbindung mit GW 9662 schwächer ausgeprägt als durch die Kombination von Pioglitazon, GW 9662 und CSC 10 µg/ml.



Pio=Pioglitazon 3 [µM], CSC=Zigaretterrauchkondensat [µg/ml], DMSO=Kontrolle, GW 9662 10 [mM]= PPAR-Antagonist

- p<0.05 vs. alle außer Pio+CSC 10 und Pio+GW
- + p<0.05 vs. alle außer Pio+GW+CSC 10
- p<0.05 vs. alle außer Pio+GW+CSC 10, Pio+GW und Pio+CSC 1
- * p<0.05 vs. alle
- # p>0.05 vs. einander, p<0.05 vs. alle übrigen
- p<0.05 vs. alle außer Pio+CSC 1 und Pio+CSC 10
- ◆ p<0.05 vs. alle außer Pio+CSC 1, Pio+CSC 5 und Pio+CSC 10

Abb. 12. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von FABP4. Als Testsubstanz diente Pioglitazon in Verbindung mit CSC, DMSO und GW 9662. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). Die stärkste Genexpression wurde durch Pioglitazon und DMSO erzielt. Die Genexpression von FABP4 war sowohl unter Pioglitazon und CSC 1 µg/ml als auch unter Pioglitazon in Verbindung mit CSC 10 µg/ml signifikant schwächer, jedoch nicht unterschiedlich zu einander. Bei dem Einsatz von Pioglitazon und CSC 5 µg/ml wurde die Genexpression am stärksten gehemmt und verhielt sich gleich wie bei dem Einsatz von Pioglitazon, GW 9662 und CSC 10 µg/ml.

12.5.2 Telmisartan und CSC

Im folgenden Versuch wurde Telmisartan mit 3×10^{-6} M zusammen mit CSC in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Untersucht wurde hierbei die Hemmung des Rezeptors in der Kombination von Telmisartan und CSC. Als Referenz-Bedingung diente auch hier die Co-Inkubation von Telmisartan und DMSO.

Eine statistisch signifikante Hemmung der Genexpression von CD36 wurde lediglich bei der mittleren CSC-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ erzielt, wohingegen keine signifikante Änderung der Genexpression nach Co-Inkubation mit CSC 1 $\mu\text{g/ml}$ und CSC 10 $\mu\text{g/ml}$ eintrat (Abb. 13).

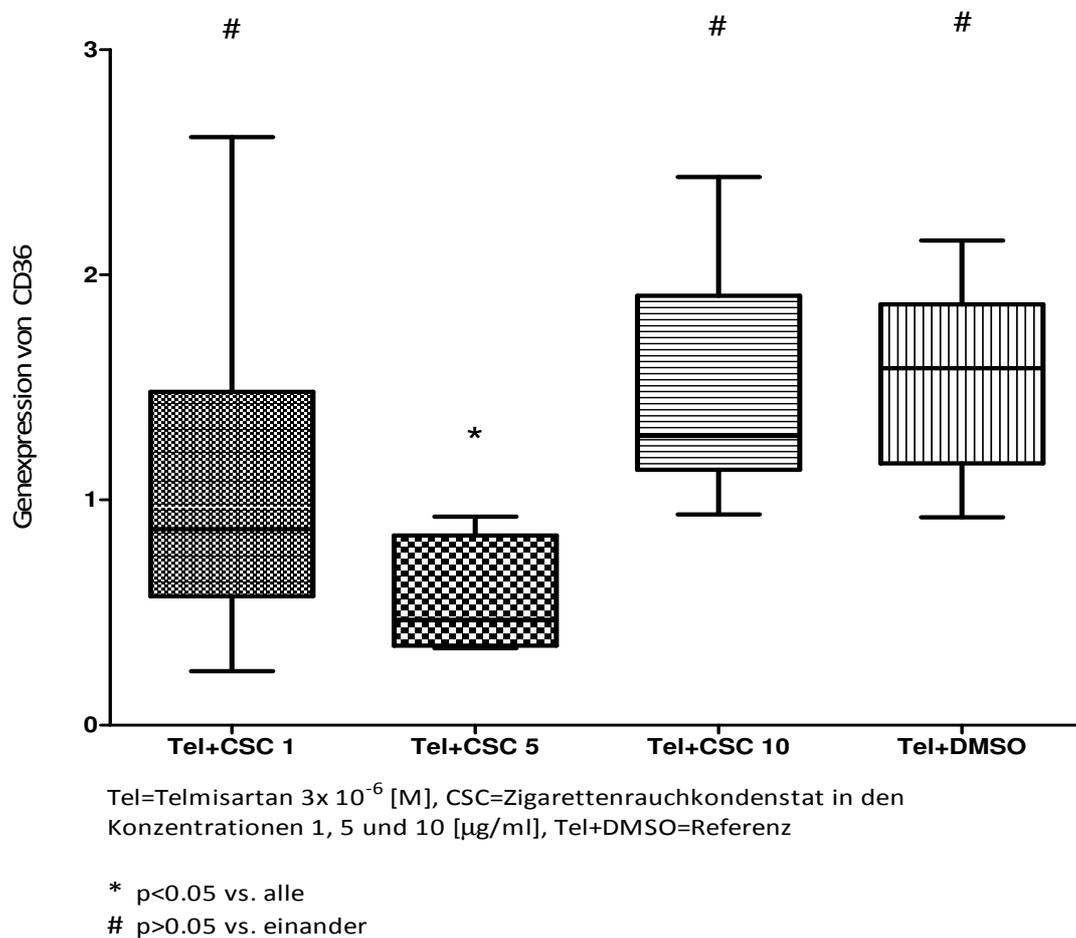
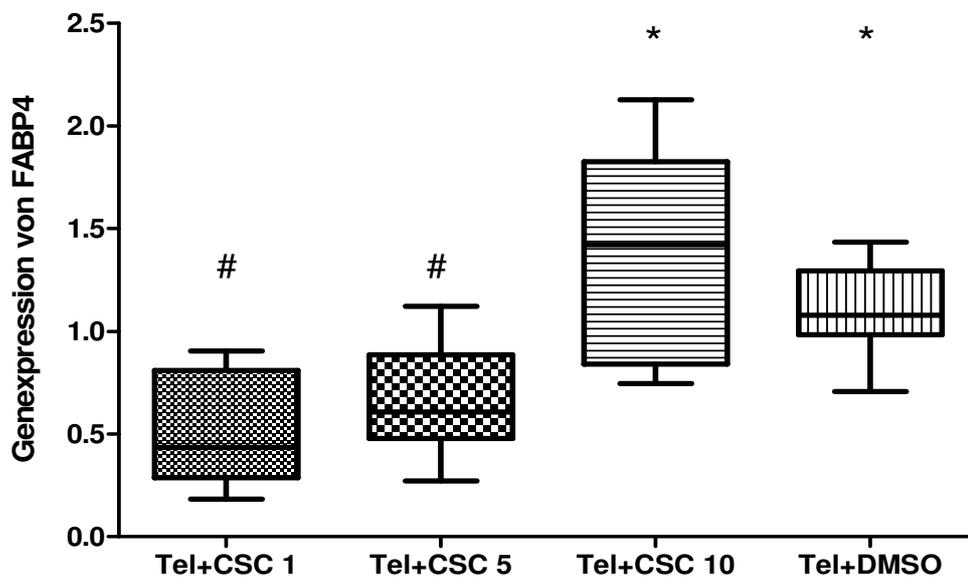


Abb. 13. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von CD36. Als Testsubstanz diente Telmisartan in Verbindung mit CSC in verschiedenen Konzentrationen. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Referenz Telmisartan in Verbindung mit DMSO. Eine statistisch signifikante Erniedrigung der Genexpression wurde lediglich durch Telmisartan und CSC 5 $\mu\text{g/ml}$ herbeigeführt. Die Zugabe von CSC 1 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ hatte denselben Effekt wie Telmisartan in Verbindung mit DMSO.

Parallel erfolgte die Bestimmung der Genexpression von FABP4 an denselben Proben. Eine statistisch signifikante Hemmung der FABP4-Genexpression im Vergleich zur Referenz-Bedingung wurde durch CSC 1 µg/ml und 5 µg/ml erreicht und fiel statistisch voneinander nicht unterschiedlich aus ($p > 0.05$ vs. TEL+DMSO) (Abb. 14). Die Kombination aus Telmisartan und CSC 10 µg/ml erzielte eine statistisch gleiche Genexpression im Vergleich zur Referenzbedingung.



Tel=Telmisartan 3×10^{-6} [M], CSC=Zigarettenrauchkondensat in den Konzentrationen 1, 5 und 10 [µg/ml], Tel+DMSO=Referenz

* $p < 0.05$ vs. alle

$p > 0.05$ vs. einander

Abb. 14. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von FABP4. Als Testsubstanz diente Telmisartan in Verbindung mit CSC in verschiedenen Konzentrationen. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Referenzbedingung Telmisartan in Verbindung mit DMSO. Unter CSC 1 µg/ml und CSC 5 µg/ml in Kombination mit Telmisartan zeigte sich eine statistisch signifikant geringere Genexpression von FABP4 im Vergleich zur Referenzbedingung und zu Telmisartan in Verbindung mit CSC 10 µg/ml. Die FABP4-Genexpression durch Telmisartan mit CSC 1 µg/ml als auch Telmisartan mit CSC 5 µg/ml war statistisch gleich. Auch Telmisartan in Verbindung mit CSC 10 µg/ml sowie Telmisartan mit DMSO verhielten sich einander gegenüber statistisch gleich.

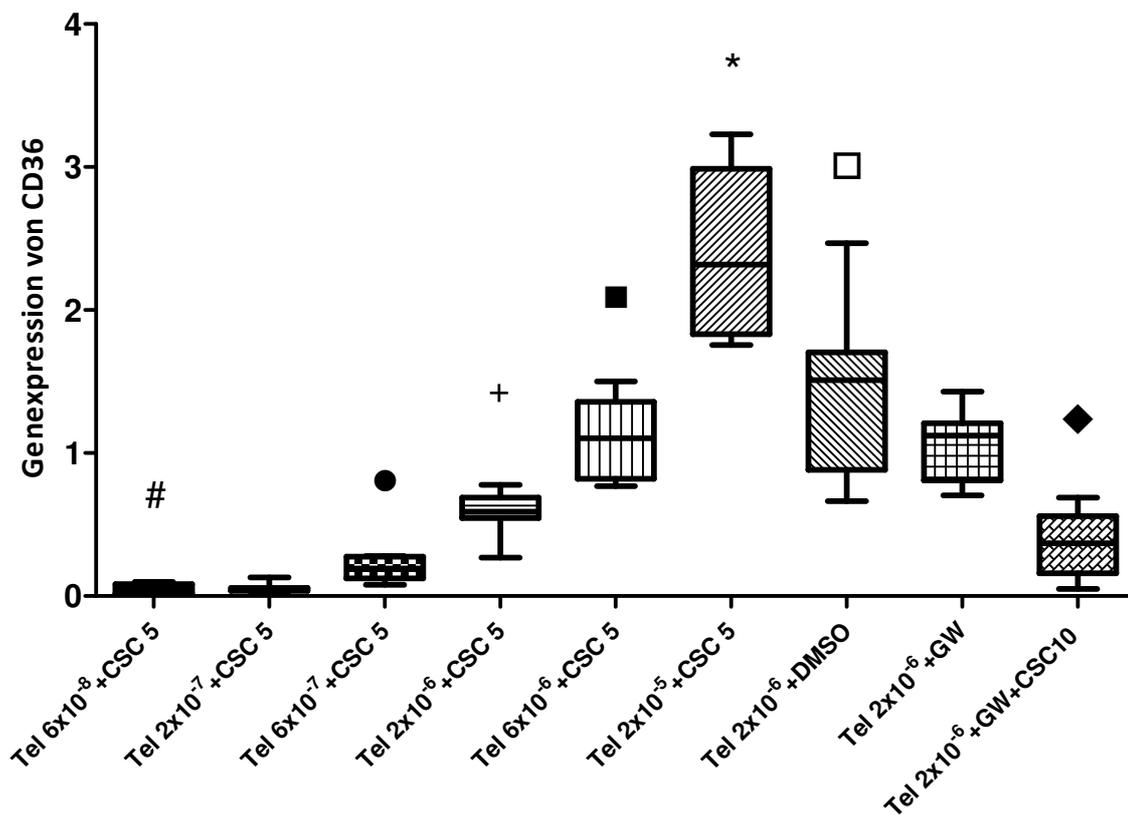
Nachdem die ausgeprägte Hemmung der Expression beider Ziel-Gene in den Vorversuchen bei einer mittleren CSC-Konzentration demonstriert wurde, rückte diese bei den folgenden Versuchen in den Mittelpunkt meines Interesses. Mit der Untersuchung der Stoffmengenkonzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen Telmisartan in unterschiedlicher Stoffmengenkonzentration und CSC 5 µg/ml sollte überprüft werden, inwieweit die Hemmung durch CSC 5 µg/ml durch steigende Telmisartan-Stoffmengenkonzentrationen aufgehoben werden kann.

Die vorherige Untersuchung der Telmisartan-Stoffmengenkonzentrations-Wirkungs-Beziehung (s. Abb. 5 und 6) ergab eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression beider Gene bei einer Stoffmengenkonzentration von 2×10^{-6} M, so dass dieser im folgenden Versuch ein besonderes Interesse gewidmet wurde, indem Telmisartan 2×10^{-6} M mit anderen Substraten kombiniert wurde. Obwohl niedrigere Telmisartan-Stoffmengenkonzentrationen keinen signifikanten aktivierenden Effekt auf die Ziel-Genexpression aufwiesen, wurden sie dennoch in diesem Versuch aufgegriffen, um mögliche Kontroversen, die die Verschiedenen CSC-Konzentrationen erzeugten, aufzuzeigen.

Dieser Versuch zeigte, dass die CSC-induzierte Hemmung der CD36-Genexpression mit steigenden Telmisartan-Stoffmengenkonzentrationen statistisch signifikant abnahm (Abb. 14). Die fehlende statistisch signifikante Genexpression von CD36 durch Telmisartan in den Stoffmengenkonzentrationen 6×10^{-8} M sowie 2×10^{-7} M im Vergleich zur Kontrolle wurde auch durch Co-Inkubation mit CSC nicht verändert.

Bei einer Stoffmengenkonzentration von 6×10^{-6} M in Verbindung mit CSC 5 µg/ml zeigte sich eine geringere Aktivierung des Rezeptors im Vergleich zur Referenzbedingung Telmisartan 2×10^{-6} M und DMSO. Bei der nächst höheren Stoffmengenkonzentration von Telmisartan 2×10^{-5} M in Verbindung mit CSC fiel die relative Genexpression statistisch deutlich stärker aus, als diejenige unter Telmisartan 2×10^{-6} M und DMSO ($p < 0.001$).

Weiterhin wurde beobachtet, dass sich die Hemmung der Genexpression von CD36 durch den PPAR-Antagonisten GW 9662 nach Zugabe von CSC 10 µg/ml verstärkte.



Tel=Telmisartan [M], CSC=Zigarettenrauchkondensat 5 und 10 [$\mu\text{g/ml}$],
 Tel 2×10^{-6} + DMSO = Referenz und GW = GW 9662 (PPAR-Antagonist)

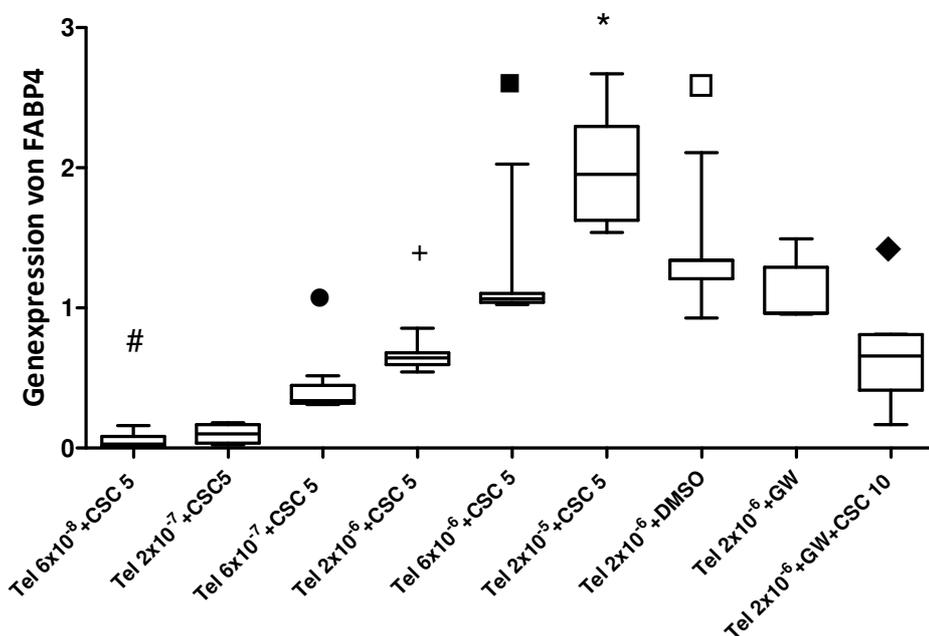
- # $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 2×10^{-7} + CSC 5, Tel 6×10^{-7} + CSC 5 und Tel 2×10^{-6} + GW + CSC 10
- $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 6×10^{-8} + CSC 5, Tel 2×10^{-7} + CSC 5 und Tel 6×10^{-7} + CSC 5
- + $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 2×10^{-6} + GW + CSC 10
- $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 2×10^{-6} + GW
- * $p < 0.05$ vs. alle
- $p < 0.05$ vs. alle
- ◆ $p < 0.05$ nur vs. Tel 6×10^{-6} , Tel 2×10^{-5} + CSC 5, Tel 2×10^{-6} + DMSO und Tel 2×10^{-6} + GW

Abb. 15. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von CD36. Als Testsubstanz diente Telmisartan in verschiedenen Stoffmengenkonzentrationen in Verbindung mit CSC $5 \mu\text{g/ml}$ sowie in der Konzentration 2×10^{-6} M in Verbindung mit GW 9662 mit und ohne CSC $10 \mu\text{g/ml}$ sowie DMSO. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Referenzbedingung Telmisartan 2×10^{-6} M in Verbindung mit DMSO. Die Hemmung der Genexpression durch CSC $5 \mu\text{g/ml}$ nahm ab einer Telmisartan-Stoffmengenkonzentration von 2×10^{-6} M statistisch signifikant ab. Bei 2×10^{-5} M in Verbindung mit CSC $5 \mu\text{g/ml}$ fiel die Genexpression von CD36 sogar stärker aus als diejenige durch die Referenzsubstanz Telmisartan 2×10^{-6} M und DMSO.

Bei der Messung der Genexpression von FABP4 wurde derselbe hemmende Effekt durch CSC $5 \mu\text{g/ml}$ aufgezeigt (Abb. 16). Dieser nahm mit höheren Telmisartan-Stoffmengenkonzentrationen in statistisch signifikanter Weise ab. Die drei niedrigsten Stoffmengenkonzentrationen von Telmisartan führten zu keiner signifikanten FABP4-Expression.

Bei einer Telmisartan-Stoffmengenkonzentration von 6×10^{-6} M in Verbindung mit CSC 5 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich im Vergleich zur Referenzbedingung Telmisartan 2×10^{-6} M und DMSO eine Aktivierung des Rezeptors, die wie bei CD36 niedriger ausfiel als diejenige hervorgerufen durch die Referenzbedingung Telmisartan 2×10^{-6} M und DMSO.

Auch bei der nächst höheren Stoffmengenkonzentration von Telmisartan 2×10^{-5} M in Verbindung mit CSC fiel die Genexpression wie bei CD36 statistisch deutlich ausgeprägter aus als unter Telmisartan 2×10^{-6} M und DMSO ($p < 0.001$). Ferner kam es wie auch bei der CD36-Genexpression zur verstärkten Hemmung durch Zugabe von CSC 10 $\mu\text{g/ml}$ zum PPAR-Antagonist GW 9662.



Tel=Telmisartan [M], CSC=Zigarettenrauchkondensat 5 und 10 [$\mu\text{g/ml}$],
Tel 2×10^{-6} +DMSO=Referenz und GW=GW 9662 (PPAR-Antagonist)

- # $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 2×10^{-7} +CSC 5 und Tel 6×10^{-7} +CSC 5
- $p < 0.05$ vs. Tel 6×10^{-6} +CSC 5, Tel 2×10^{-5} +CSC 5, Tel 2×10^{-6} +DMSO und Tel 2×10^{-6} +GW
- + $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 6×10^{-7} +CSC 5 und Tel 2×10^{-6} +CSC 5+GW
- $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 2×10^{-6} +DMSO und Tel 2×10^{-6} +GW
- * $p < 0.05$ vs. alle
- $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 6×10^{-6} +CSC 5
- ◆ $p < 0.05$ vs. alle außer Tel 6×10^{-7} +CSC 5 und Tel 2×10^{-7} +CSC 5, $p > 0.05$ vs. alle

Abb. 16. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand der absoluten Messergebnisse der Genexpression von FABP4. Als Testsubstanz diente Telmisartan zum einen in verschiedenen Stoffmengenkonzentrationen in Verbindung mit CSC 5 $\mu\text{g/ml}$ sowie zum anderen in der Stoffmengenkonzentration 2×10^{-6} M in Verbindung mit GW 9662 mit und ohne CSC 10 $\mu\text{g/ml}$ sowie DMSO. Bestimmt wurde das Genprodukt mittels qRT-PCR im Vergleich zur Referenzbedingung Telmisartan 2×10^{-6} M in Verbindung mit DMSO. Wie bei CD36 nahm die Hemmung der Genexpression durch CSC 5 $\mu\text{g/ml}$ ab einer Telmisartan-Stoffmengenkonzentration

von 2×10^{-6} M statistisch signifikant ab. Bei einer Stoffmengenkonzentration von 2×10^{-5} M in Verbindung mit CSC $\mu\text{g/ml}$ fiel die Genexpression von FABP4 sogar stärker aus als diejenige durch die Referenzbedingung Telmisartan 2×10^{-6} M und DMSO. Dies ergab sich auch aus der CD36-Messung (Abb. 15).

13. Mikroskopische Analyse mittels Fettrotfärbung

Bei diesem Verfahren wurde die Reifung der 3T3-L1-Prädipozyten zu reifen Adipozyten untersucht. Hierbei galt die qualitative und quantitative Bildung von lipidhaltigen Vesikeln, die sich durch die Färbung rot darstellten, als Marker für die u.a. PPAR γ -induzierte Zellreifung. Gemäß dem o.g. Protokoll sollten die Zellkerne fluoreszierend zur Darstellung kommen, um mehr Aufschluss über die Proliferation der 3T3-L1-Zellen unter Einsatz der Testsubstanzen zu erbringen. Die Fluoreszenz kam auch nach mehreren Versuchen leider nicht zum Vorschein.

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie bereits in den genannten Versuchen durch eine zwölfstündige Vorinkubation mit Insulin, Dexamethason und IBX. Hiernach wurden die Zellen mit einzelnen Testsubstanzen inkubiert. Hierbei wurde die Stoffmengenkonzentration 3×10^{-6} M gewählt, da diese die Induktion der Ziel-Gene - außer bei Losartan - zur Folge hatte. Zudem wurde ein Teil der Zellen mit den Testsubstanzen und CSC $10 \mu\text{g/ml}$ inkubiert, um den Effekt von CSC auf den PPAR γ -Rezeptor - diesmal mittels anderem Testverfahren - zu untersuchen. Die einzelnen Substanzen wurden parallel an derselben Zellgeneration getestet.

Um die Ergebnisse dieses Verfahrens vergleichbar zu machen, wurde bei allen Bildaufnahmen eine 20x-Vergrößerung, Blende 2, Lichteinstellung 4 und Belichtungszeit von 2 s gewählt. Da sich EXP3179 und Telmisartan bezüglich der Erhöhung der Genexpression von FABP4 und CD36 ähnelten, wurde bei diesem Verfahren auf den Einsatz von Telmisartan verzichtet.

13.1 Inkubation mit Pioglitazon und CSC

In Abb. 17 sind die Zellen nach Inkubation mit Pioglitazon 3×10^{-6} M dargestellt. Die roten Lipidvakuolen waren im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23) in hoher Ausprägung vorhanden, was auf die PPAR γ -Aktivierung durch Pioglitazon zurückzuführen ist.

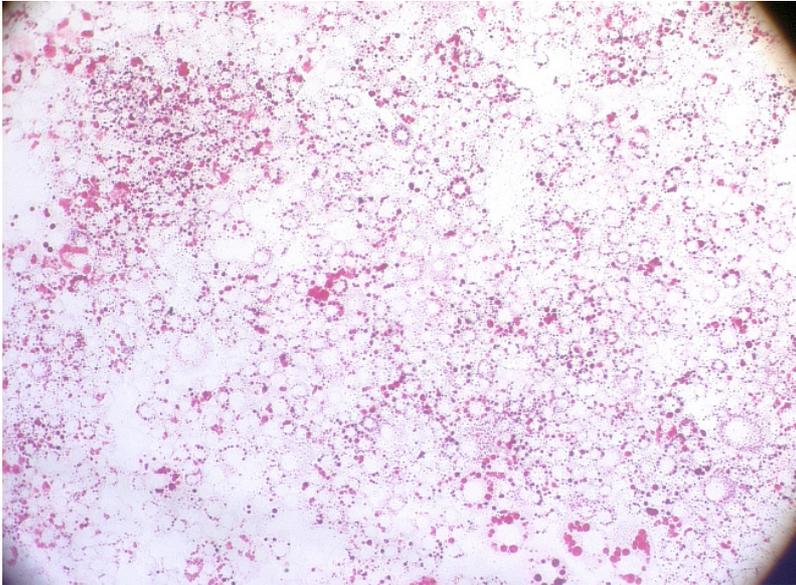


Abb. 17. 3T3-L1-Zellen nach Inkubation mit Pioglitazon 3×10^{-6} M. Die roten Vesikel entsprechen Lipidvakuolen.

Die folgende Abbildung zeigt die Zellen nach Co-Inkubation mit Pioglitazon 3×10^{-6} M und CSC 10 $\mu\text{g/ml}$. Die niedrige Anzahl der Lipidvakuolen macht deutlich, dass hier eine Hemmung der PPAR γ -vermittelten Zellreifung und Fetteinlagerung stattfand.

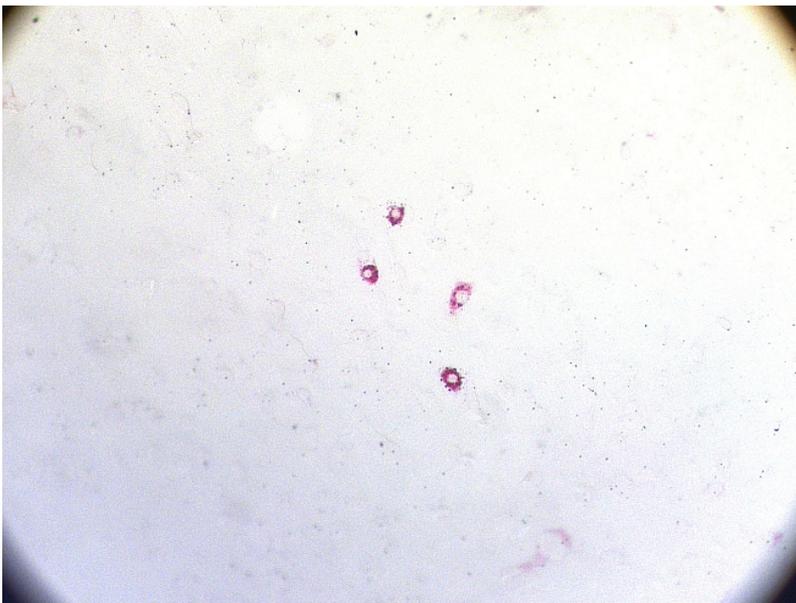


Abb. 18. Die Co-Inkubation mit Pioglitazon 3×10^{-6} M und CSC 10 $\mu\text{g/ml}$ der 3T3-Zellen hatte eine verminderte Zellreifung und Lipideinlagerung zur Folge.

13.2 Inkubation mit EXP3179 und CSC

In Abb. 19 sind 3T3-L1-Zellen nach Inkubation mit EXP3179 3×10^{-6} M dargestellt. Hierbei zeigten sich weniger Lipidvakuolen als nach Inkubation mit Pioglitazon, allerdings mehr als nach Inkubation mit der Kontrollsubstanz (s. Abb. 23).

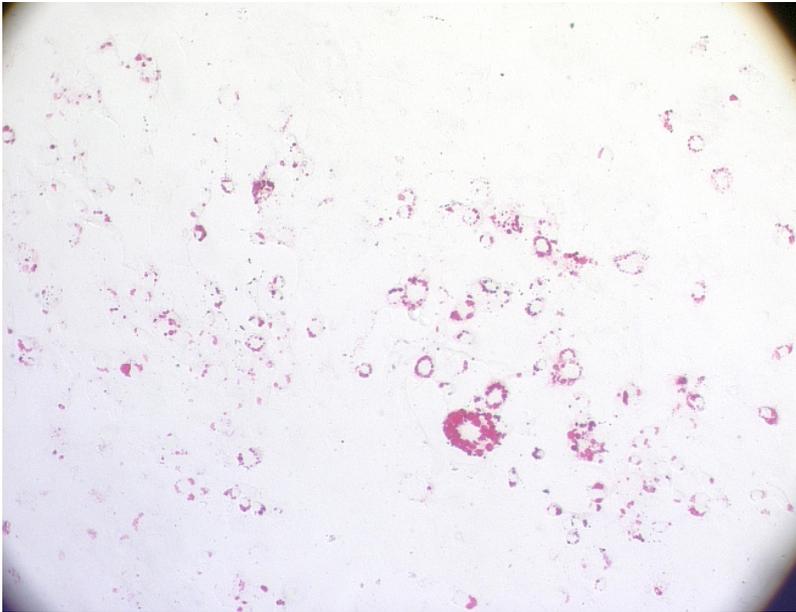


Abb. 19. Darstellung der 3T3-L1-Zellen nach Inkubation mit EXP3179 3×10^{-6} M mit geringerer Ausprägung der Lipidvakuolen im Vergleich zur Inkubation mit Pioglitazon.

Abb. 20 zeigt die 3T3-L1-Zellen nach Inkubation mit EXP3179 3×10^{-6} M und CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Ausbildung der Lipidvakuolen, die u.a. durch den PPAR γ -Rezeptor getriggert wird, fiel kleiner aus als nach Inkubation mit EXP3179 und entsprach dem erzielten Ergebnis nach Inkubation mit der Kontrollsubstanz.

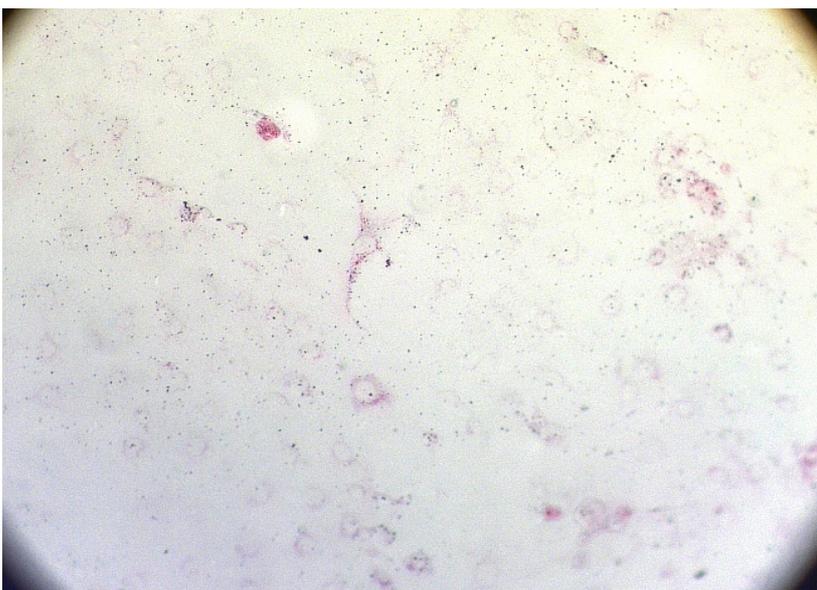


Abb. 20. 3T3-L1-Zellen nach Co-Inkubation mit EXP3179 3×10^{-6} M und CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die qualitative und quantitative Ausprägung der Lipidvakuolen war im Vergleich zur Inkubation mit EXP3179 geringer.

13.3 Inkubation mit Losartan und CSC

Abb. 21 zeigt die Zellen nach Inkubation mit Losartan 3×10^{-6} M. Hierbei wird deutlich dass im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 23) eine erhöhte Anzahl an reifen Adipozyten mit multiplen Lipidvakuolen vorliegt. Die Ausbildung von Lipidvakuolen war nach Inkubation mit EXP3179 (s. Abb. 19), dem aktiven Losartan-Metaboliten, jedoch größer.

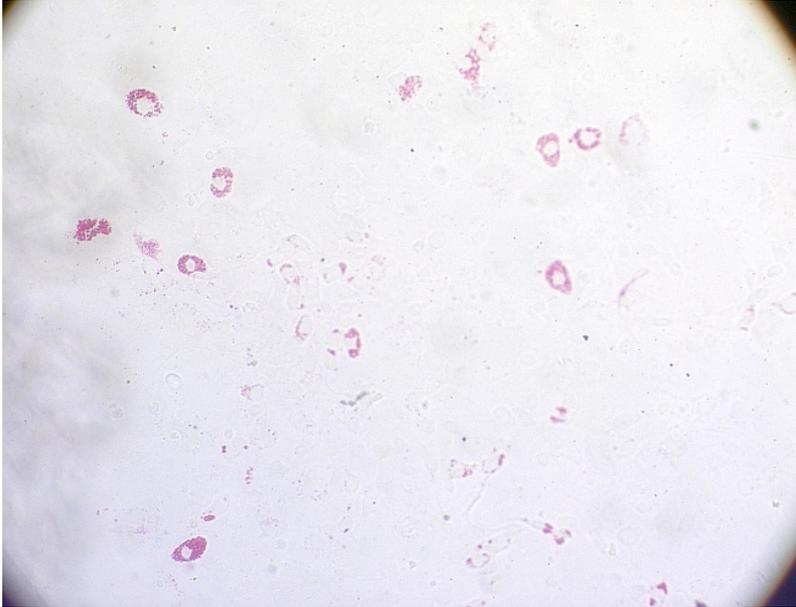


Abb. 21. Darstellung der 3T3-L1-Zellen nach Inkubation mit Losartan 3×10^{-6} M. Darunter war die Anzahl der Lipidvakuolen stärker ausgeprägt als in der Kontrolle, jedoch schwächer als nach Inkubation mit EXP3179.

Abb. 22 zeigt die Zellen nach Co-Inkubation mit Losartan und CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hier ist die Anzahl der Lipidvakuolen geringer als nach solitärer Inkubation mit Losartan, was für den hemmenden Einfluss von CSC auf die Losartan-vermittelte PPAR-Aktivierung spricht.

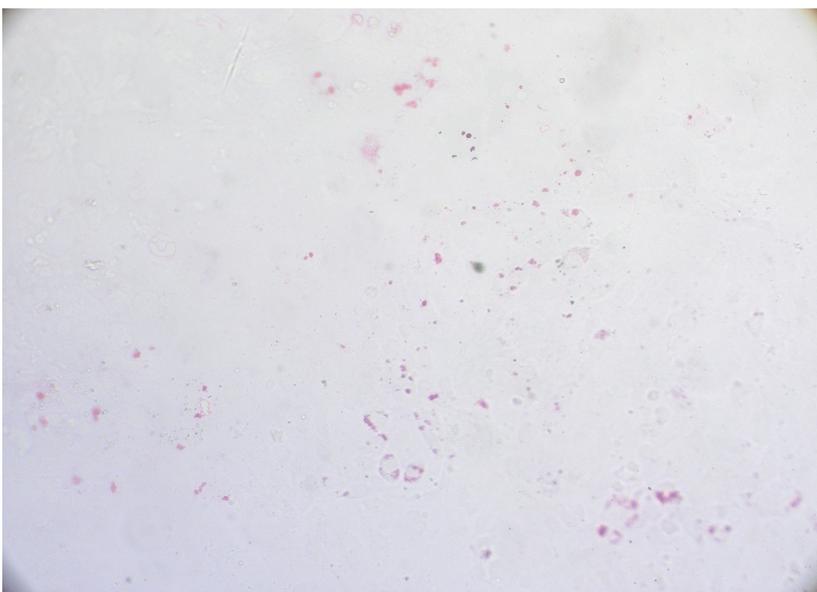


Abb. 22. 3T3-L1-Zellen nach Co-Inkubation mit Losartan 3×10^{-6} M und CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mit geringerer Ausprägung von Lipidvakuolen als nach solitärer Inkubation mit Losartan.

13.4 Inkubation mit der Kontrollsubstanz

In Abb. 23 sind die Zellen nach viertätiger Inkubation mit der Kontrollsubstanz DMSO dargestellt. Hierbei sind einige lipidhaltige Vakuolen erkennbar. Deren quantitative Ausprägung war jedoch deutlich geringer als diejenige nach Inkubation mit Pioglitazon und EXP3179.

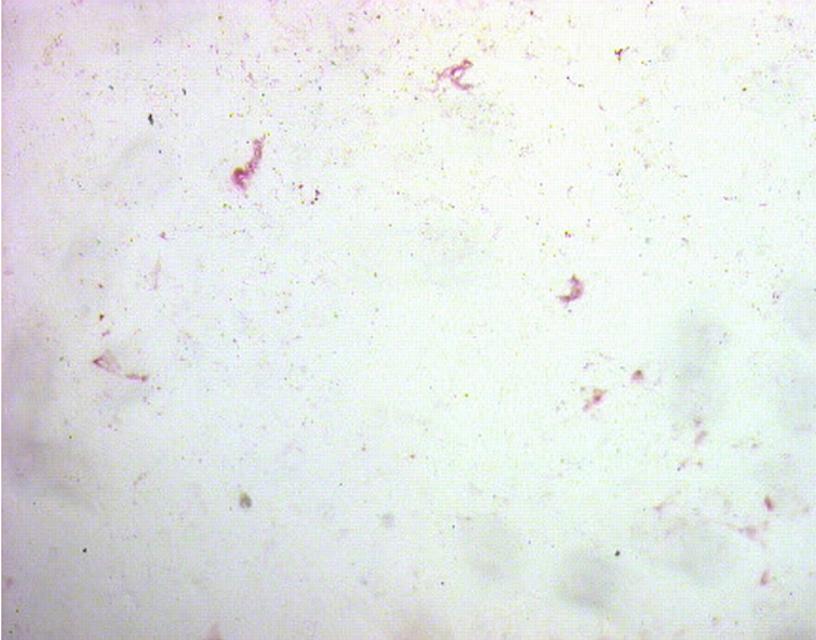


Abb. 23. 3T3-L1-Zellen nach Inkubation mit DMSO. Die Ausbildung von Fettvakuolen ist deutlich geringer als nach solitärer Inkubation mit der Testsubstanz.

14. Diskussion

14.1 Einfluss von CSC auf den PPAR γ -Rezeptor

Anhand der durchgeführten Versuche konnte demonstriert werden, dass CSC einen metabolischen Einfluss auf die Wirkung von PPAR γ -Rezeptor-Agonisten, wie Pioglitazon, Telmisartan, Losartan und seinem aktiven Metaboliten EXP3179 ausübt, indem es die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors herabsetzt. Dies wurde zum einen anhand der PPAR γ -vermittelten Induktion von FABP4 und CD36 gezeigt, die im Vergleich zur solitären Inkubation mit Pioglitazon, Telmisartan und EXP3179 bei Zugabe von CSC statistisch signifikant niedriger ausfiel. Die alleinige Inkubation mit CSC bewirkte keine statistisch signifikante Erhöhung der Expression beider Gene.

Weiterhin gelang es, einen hemmenden Einfluss von CSC auf die Zellreifung von 3T3-L1-Prädipozyten festzustellen, die bei Zugabe von CSC eine geringere Einlagerung von lipidhaltigen Vesikeln aufwiesen im Vergleich zur solitären Inkubation mit Pioglitazon, Telmisartan, Losartan und EXP3179.

14.2 Ursachenforschung und Erklärungsansätze

Die genannten Testsubstanzen entfalten ihre Wirkung vor allem durch Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors, zu dessen Ziel-Genen CD36 und FABP4 gehören. Beide Gene kodieren für Proteine, die den intrazellulären Transport von Lipiden und deren Weiterverarbeitung bzw. Einlagerung steuern, so dass eine mögliche Erklärung für die erniedrigte Genexpression die CSC-induzierte Hemmung des Rezeptors ist.

Ferner besteht CSC aus zahlreichen kanzerogenen und zytotoxischen Bestandteilen, zu denen auch Nikotin gehört. Schon früh wurde seine Fähigkeit, chromosomale Aberrationen und Translokationen auszulösen nachgewiesen, was ebenfalls einen möglichen Einfluss auf die Ergebnisse der o.g. Versuchsreihe nahm.^{64, 98, 113}

Zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen seit vielen Jahren Herz-Kreislauf-erkrankungen. So starb laut Statistischem Bundesamt 41,1 % der deutschen Bevölkerung im Jahr 2010 an chronischer ischämischer Herzkrankheit, akutem Myokardinfarkt oder Herzinsuffizienz in absteigender Reihenfolge. Bereits seit Jahrzehnten steht die Ursachenforschung der chronisch ischämischen Herzkrankheit im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Bemü-

hens, die die Identifizierung neuer Risikofaktoren, wie Lipoprotein (a) oder Hyperhomozysteinämie, hervorbrachte.¹¹⁶ Dennoch sind die pathophysiologischen Mechanismen der lange bekannten Risikofaktoren der KHK, wie der Schweregrad der arteriellen Hypertonie, Rauchen, Dyslipoproteinämie, Diabetes mellitus und (Stamm-)Fettleibigkeit, bisher nicht vollständig geklärt.¹³⁴

14.3 Einflüsse auf die Präsenz des PPAR γ -Rezeptors im Organismus

Mit der Entdeckung des PPAR γ -Rezeptors vor einigen Jahren wurde eine zentrale Regulatorseinheit entdeckt, deren Aktivierung einerseits die Ausprägung der Risikofaktoren von Herz-Kreislaufkrankungen reduziert, die jedoch andererseits durch einige dieser Risikofaktoren in ihrer protektiv wirkenden Funktion gehemmt wird.

Der PPAR γ -Rezeptor findet sich vor allem in Adipozyten, Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen sowie Gefäßmuskelzellen.¹ Er ist befähigt die Insulinsensitivität zu erhöhen, hohe Insulinspiegel zu erniedrigen, die Glukoseaufnahme und -utilisation zu fördern und den Serumspiegel an freien Fettsäuren zu reduzieren.^{1, 117, 118, 119, 120}

Zudem erschlossen viele Arbeitsgruppen weitere positive Eigenschaften des PPAR γ -Rezeptors, die der Entstehung der Atherosklerose entgegenwirken. Dazu gehört die Reduktion von oxidativem Stress, Verbesserung der Endothelfunktion, antiproliferative Wirkung an der Gefäßwand, Unterdrückung der Fatty-Streak-Entstehung sowie Plaquestabilisierung und -rückbildung.^{121, 122, 123, 124} Mit den letztgenannten Erkenntnissen erweiterte sich auch der bisher bekannte Wirkungsumfang von Antihypertensiva, wie Losartan und Telmisartan, sowie Antidiabetika, wie Pioglitazon, die ihre Wirkung vor allem über die PPAR γ -Aktivierung entfalten.

Die in vivo Erforschung des PPAR γ -Rezeptors fand in den letzten Jahren zunehmenden Anklang. So erbrachte die Arbeitsgruppe von Amoroso et. al. 2007 den Nachweis einer natürlichen Expression des PPAR γ -Rezeptors in Monozyten und dessen Up-Regulation bei der Reifung zu Makrophagen. Zusätzlich konnte die Expression durch Zugabe von Liganden, wie 15-Deoxy-delta(12,14)-Prostaglandin J(2) oder Ciglitazon gesteigert werden. Ferner senkten beide Liganden die basale Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und Interleukin-6. Interessanterweise zeigten Monozyten und Makrophagen von klinisch gesunden Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern eine erhöhte PPAR γ -Expression und erniedrig-

te Zytokinsekretion. Die zugeführte Nikotindosis korrelierte positiv mit der PPAR γ -Expression und negativ mit der Zytokinsekretion in den untersuchten Zellen.¹²⁵ Dieses Ergebnis schien der Identifikation des Rauchens als Risikofaktor für die Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen zu widersprechen, woraufhin eine weitere Arbeitsgruppe - ebenfalls unter der Leitung des o.g. Kollegen Amoruso - Monozyten und Makrophagen von KHK-Patienten, die viel, ehemals oder niemals rauchten, untersuchte.¹²⁶

Die höchste PPAR γ -Expression und niedrigste Zytokinausschüttung zeigten Makrophagen von ehemals rauchenden KHK-Patienten, die allerdings vor eins bis zwei Jahren den Konsum aufgaben. Die PPAR γ -Expressionrate in Makrophagen fiel mit zunehmender Abstinenzdauer und glich erst nach 5-10 Abstinenzjahren der Expressionsrate von nichtrauchenden KHK-Patienten. Bei den stark rauchenden an KHK leidenden Probanden zeigten Makrophagen die niedrigste PPAR γ -Expressionrate. Die basale Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α und Interleukin-6 korrelierte reziprok mit der PPAR-Expression.

Ferner konnte in allen drei Gruppen eine ähnlich signifikante Steigerung der PPAR γ -Expressionrate durch natürliche und synthetische PPAR γ -Agonisten aufgezeigt werden. Die untersuchten Monozyten hingegen wiesen in allen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer PPAR γ -Expressionrate auf.¹²⁶ Eine hinreichende Erklärung für den zugrunde liegenden Mechanismus der gesteigerten PPAR γ -Expressionrate bei gesunden Rauchern und erst kurzzeitig nikotinabstinenten KHK-Patienten gab es nicht.

Erklärungsversuche wurden u.a. durch folgenden Aspekte erschwert: Bei der Arbeitsgruppe vom Amoruso et. al. 2007 gehörten zur Gruppe der gesunden Raucher Probanden ohne kardiovaskuläre oder andere chronische Erkrankungen und waren Blutspender. Bei der Auswahl wurden jedoch weder BMI noch LDL-Spiegel berücksichtigt.

14.3.1 Interpretation der klinischen Studienergebnisse

Geht man davon aus, dass die Probanden der beiden Versuchsreihen von Amoruso et. al. 2007 und 2009 frei von kardiovaskulären Risikofaktoren waren, gibt es meiner Ansicht nach folgende - zugegeben spekulative – Erklärungen: Wenn man den PPAR γ -Rezeptor nicht nur als Immunmodulator, sondern als Teil eines Regulationssystems gegen exogene Noxen versteht, könnte die gesteigerte PPAR γ -Expressionsrate bei gesunden Rauchern als eine Art Abwehrreaktion bzw. Kompensationsmechanismus auf die Einwirkung von Zigarettenrauch

erwogen werden - eine Situation in der nur durch eine Überexpression des Rezeptors der Genese von Herz-Kreislaufkrankungen entgegengewirkt werden kann.

Regulationsmechanismen kommen im menschlichen Organismus häufig zum Einsatz, um Dysbalancen, die durch exogene oder endogene Faktoren herbeigeführt wurden, zu kompensieren. Solch ein Mechanismus wird zum Beispiel bei Rauchern beobachtet, die bei vermehrter Bildung von CO-Hämoglobin eine gesteigerte Erythropoetinsekretion aufweisen, um die Erythrozytenzahl zu erhöhen und letztlich die Sauerstoffversorgung des Organismus sicherzustellen.¹²⁷ Allerdings reicht die Entwicklung einer Polyglobulie nicht aus, um einer chronischen Sauerstoffunterversorgung entgegenzuwirken, da langjähriger starker Zigarettenkonsum auch Erkrankungen, wie die chronisch obstruktive Bronchitis (COPD), die mit chronischer Entzündung, narbigen Umbauvorgängen und Untergang des Flimmerepithels am Bronchialepithel einhergeht, zu Tage fördert und rund 15 % der Raucher hiervon betroffen sind.¹²⁸ Im letzten Stadium der COPD besteht eine respiratorische Insuffizienz, die sich trotz aller Kompensationsmechanismen, wie der Polyglobulie, dem gesteigerten Herzminutenvolumen und vermehrter Atemarbeit, einstellt.

So könnte auch die alleinige Überexpression des PPAR γ -Rezeptors bei Vorliegen oder Hinzu kommen von Risikofaktoren eine KHK nicht in jedem Fall verhindern.

Nach Absetzen des toxischen Agens kam es bei KHK-Patienten laut Amoruso et. al. zu einer überschießenden PPAR γ -Expression.

An Beispielen von verschiedenen synthetischen Substraten, wie Antihypertensiva oder Hormonersatzstoffen, wurde bei der ausgiebigen Erforschung von Rezeptoren bereits aufgezeigt, dass abruptes Ausbleiben des Substrates am Rezeptor ein Rebound-Phänomen zur Folge haben kann. So verhält es sich z.B. nach einer rasch beendeten Betablocker-Therapie, während der die Zahl der Betarezeptoren sich an der Zelloberfläche erhöht und daraufhin eine Steigerung der Sensitivität gegenüber Katecholaminen eintritt, was u.a. resultierende Blutdruckentgleisungen zur Folge haben kann.¹²⁹

Ferner untersuchten die Arbeitsgruppen von Amoruso et. al. lediglich die PPAR γ -Expression an Monozyten, partiell differenzierten Makrophagen und vollständig ausdifferenzierten Makrophagen. Wie es sich mit der PPAR γ -Expression bei den o.g. Probanden im Fett- oder Muskelgewebe verhielt und welchen Einfluss dies wiederum auf die die Fett- und Glukoseutilisation hatte, wurde leider nicht berücksichtigt. Vergleicht man beide Versuchsreihen, ergibt sich eine vermeintliche Ambivalenz bezüglich der PPAR γ -Expression. Zigarettenrauch bei gesunden Rauchern wirkte über eine vermehrte PPAR γ -Expression zwar antiinflammato-

risch, bei kranken Rauchern sank die Anzahl der PPAR γ -Rezeptoren jedoch signifikant, um kurz nach Aufgabe des Konsums, wieder anzusteigen.

Seit man den PPAR γ -Rezeptor kennt und beforscht, führten die gewonnenen Resultate über sein Ausmaß an Präsenz und Funktion immer wieder zu neuen Fragen, von denen viele mit zunehmendem Wissen beantwortet werden konnten.

14.4 Kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen meiner Arbeit

Auch die von mir erzielten Ergebnisse aus den CSC-Versuchen weisen Divergenzen auf.

Hier führte CSC in solitärer Inkubation zwar nicht zur gesteigerten PPAR γ -Aktivierung, jedoch war die Hemmung von CSC in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stets signifikant stärker als diejenige, die durch CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hervorgerufen wurde, so dass die Vermutung naheliegt, dass CSC in höheren Konzentrationen eine Induktion der Expression von CD36 und FABP4 in Kombination mit einem PPAR-Agonisten hervorruft.

Die von mir durchgeführten qRT-PCR-Untersuchungen zeigten auf, dass alle Testsubstanzen ausgenommen Losartan, in den gewählten Stoffmengenkonzentrationen in solitärer Inkubation zu einer gesteigerten Expression der Ziel-Gene führten. Durch Erhöhung der Stoffmengenkonzentration wurde diese sogar gesteigert. Nach Zugabe von CSC wurde die Expression in Abhängigkeit von der CSC-Konzentration reduziert. So zeigte z.B. die Expression der Ziel-Gene bei Co-Inkubation mit CSC 1 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine gleichwertig erniedrigte Genexpression im Vergleich zur Co-Inkubation mit Pioglitazon. Die stärkste Hemmung der Genexpression führte CSC 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Co-Inkubation mit Pioglitazon herbei.

Wenn bei höheren Substratkonzentrationen eine weniger starke Rezeptorhemmung resultiert, ist dies zum Beispiel durch eine Down-Regulation erklärbar, bei der es zu einer Internalisierung des Rezeptors und einer Zersetzung durch lysosomale Enzyme kommt. Da aber die Testsubstanzen die Genexpression über denselben Rezeptor regulieren und zum Teil induzieren, kommt dieser Mechanismus als Erklärung nicht in Betracht. Zudem scheidet sowohl ein rein kompetitiver als auch nicht kompetitiver Antagonismus des CSC aus, da die Hemmung mit steigender Konzentration von CSC 5 zu CSC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ abnimmt. Auch kann hier nicht von einem konventionellen partiellen Agonismus bzw. Antagonismus ausgegangen werden, dessen Effekt definitionsgemäß durch seine Konzentration und die Anwesenheit eines weiteren Substrates bestimmt wird. Ein partieller Agonist wirkt in niedrigen Kon-

zentrationen synergistisch und in höheren Konzentrationen antagonistisch im Vergleich zum reinen Agonisten.¹⁴⁷

Da die Blockade durch CSC mit steigender Konzentration abnimmt, könnte eine mögliche Erklärung hierfür ein bisher nicht berücksichtigtes Substrat sein, das durch CSC bei höheren Konzentrationen aktiviert wird, was wiederum eine Aktivierung des PPAR-Rezeptors herbeiführt.

Auf welche Mechanismen die oben dargelegten Beobachtungen tatsächlich zurückzuführen sind, kann meines Erachtens nicht allein durch die bekannten Regulations- bzw. Interaktionskaskaden und die bisherigen Erkenntnisse zum CSC und seine in Gang gesetzten Kaskaden erklärt werden.

14.5 Stellenwert der gewonnenen Resultate in der Praxis

Anhand meiner Untersuchungen habe ich bewiesen, dass CSC in bestimmten Konzentrationen die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors herabsetzt. Diese Tatsache zeigt eine weitere Verbindung zwischen dem Zigarettenrauchen und seinen metabolischen Auswirkungen auf, wie z.B. der Insulinresistenz und Dyslipidämie, die die Atherosklerose begünstigen, wodurch der Stellenwert von PPAR γ -Rezeptor-Agonisten bei der Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen und deren Risikofaktoren zunimmt. Überträgt man diese Erkenntnis auf einen Organismus, wäre zu vermuten, dass auch hier die protektive Wirkung der untersuchten Medikamente durch Zigarettenrauchen in bestimmter Dosis herabgesetzt wird.

Vor der Prüfung der klinischen Relevanz sollten zunächst zwei Fragen geklärt werden: Waren die Inhaltstoffe von CSC in den verwendeten Konzentrationen vergleichbar mit realistischen in vivo Konzentrationen von Rauchern? Und ähnelten die gewählten Konzentrationen der Testsubstanzen dem therapeutischen Serumspiegel von Patienten?

Zur Beantwortung der ersten Frage dienen zwei in vivo Untersuchungen, die aufzeigten, dass die gemessenen Serumnikotinkonzentrationen bei Rauchern zwischen 4 und 72 ng/ml bzw. 0,1 und 38,8 ng/ml lagen.^{135,136} Das CSC der Referenzzigarette 2R4F enthält standardisiert 20 mg Teer/ml CSC und 0,91 mg Nikotin/ml CSC.¹³⁷

Umgerechnet auf die Verwendung in dieser Versuchsreihe lag der Nikotingehalt, dem die Zellen ausgesetzt waren, bei 0,91 ng/mg CSC und 9,1 ng/mg CSC, was somit den in vivo herrschenden Nikotinkonzentrationen im Serum eines Rauchers entspricht. Allerdings ent-

halten Zigaretten zahlreiche Inhaltsstoffe, deren übliche in vivo Konzentrationen bei Rauchern bislang wenig erforscht wurden bzw. werden diese im Falle von Kohlenmonoxid indirekt über den prozentualen Anteil des Carboxyhämoglobins am Gesamthämoglobin bestimmt. Bei der Frage nach Schadstoffkonzentrationen im Serum eines Rauchers kommt erschwerend hinzu, dass auch nicht rauchende Großstadtbewohner sowie Passivraucher zum Teil hohen Schadstoffen, wie Feinstaub, ausgesetzt sind.¹⁴⁴

Spezifische Untersuchungen zeigten auf, dass die untersuchten Aktivraucher zwar mit 3-15 % einen deutlich erhöhten Carboxyhämoglobinanteil im Gegensatz zu Nichtrauchern mit <1,5 % aufwiesen.¹⁴⁵ Allerdings wurde in derselben Studie bei der Gruppe von Passivrauchern - je nach Qualität und Quantität der Exposition - eine 2,5fache Erhöhung des Carboxyhämoglobinanteils im Vergleich zur Gruppe der Nichtraucher verzeichnet.¹⁴⁶

Bei der Frage nach dem schädlichen Ausmaß einer Zigarette sollte sich das Augenmerk nicht auf einzelne Schadstoffkonzentrationen im Serum richten. Vielmehr müssen einerseits alle Inhaltsstoffe einer Zigarette sowie deren Zusammenwirken im Organismus als auch der Gesundheitszustand des Organismus berücksichtigt werden, der diesen Schadstoffen ausgesetzt ist. Das alleinige Wissen um einzelne Serumkonzentrationen der Schadstoffe einer Zigarette zur Feststellung deren Pathogenität auf einen Organismus ist nicht entscheidend. Aufgrund der Komplexität der Auswirkungen des Rauchens und des Organismus bevorzugte die Wissenschaft in den letzten Jahrzehnten in vivo Untersuchungen zur Klärung bestimmter Fragestellungen zum Thema Zigarettenrauchen als Krankheitsursache.

Auch wenn die von mir eingesetzten Nikotinkonzentrationen denen von Rauchern entsprechen, muss ein entscheidender Unterschied von in vivo Messungen zu meinen Versuchen berücksichtigt werden. Die 3T3-L1-Zellen wurden ohne Unterbrechung über mehrere Tage mit CSC inkubiert. Ein Raucher hingegen, betreibt Zigarettenkonsum in Intervall und zumeist über einen längeren Zeitraum. Mit den von mir durchgeführten Versuchen konnte jedoch von der Schadstoffkonzentration auf einen bestimmten Aktivierungszustand des PPAR γ -Rezeptors geschlossen werden.

Bei der Frage nach klinischer Relevanz in Bezug auf die von mir gewählten Konzentrationen der Testsubstanzen muss ebenfalls bedacht werden, dass bei den von mir durchgeführten in vitro Versuchen eine dauerhafte Inkubation mit derselben Konzentration der Substrate durchgeführt wurde, wohingegen die wirksame Serumkonzentrationen bei Patienten durch Unterschiede in Dosis, Einnahmefrequenz, Proteinbindung, Geschlecht, Zeitabstand zu Mahlzeiten sowie Organfunktion variiert.^{86, 130, 138}

Zudem habe ich bei meinen Untersuchungen der PPAR γ -Aktivierung lediglich synthetische Rezeptor-Agonisten eingesetzt, so dass über den Effekt von CSC beziehungsweise Zigarettenrauch auf endogene Liganden keine Aussage getroffen werden kann. Weiterhin bleibt unklar, welche der zahlreichen Inhaltsstoffe des CSC die Aktivierung des Rezeptors herabsetzt bzw. induziert.

Ferner führte ich keine quantitative Bestimmung des PPAR γ -Rezeptors und Proteine CD36 und FABP4 durch, die möglicherweise einen weiteren Beitrag zur Klärung des Einflusses von CSC auf den Rezeptor geleistet hätten.

Dennoch ist es mit dieser Arbeit gelungen, eine Verbindung zwischen CSC und dem PPAR γ -Rezeptor herzustellen. Nun gilt es, den Stellenwert der neu gewonnenen Resultate in zukünftigen in vivo Studien unter Einsatz von Zigarettenrauch und AT $_1$ -Rezeptor-Blockern sowie Glitazonen zu untersuchen.

15. Zusammenfassung

Mit dem PPAR γ -Rezeptor gelang der Wissenschaft vor einigen Jahren die Entdeckung einer multimodalen Regulationseinheit für zahlreiche Stoffwechselfvorgänge. Der PPAR γ -Rezeptor, der sich vor allem in Adipozyten, aber auch in glatter Gefäßmuskulatur, Monozyten und Makrophagen und der Darmmukosa findet, spielt eine wichtige Rolle im Glukose- und Fettmetabolismus. Durch seine zusätzliche antiinflammatorische und blutdrucksenkende Eigenschaft wirkt er der Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen auf vielfältige Weise entgegen. Längst hat er sich als pharmakologisches Ziel von AT $_1$ -Rezeptor-Blockern und Glitazonen etabliert und findet als Forschungsgegenstand im Hinblick auf äußere Einflussfaktoren, wie das Zigarettenrauchen, großes Interesse.

Die Effekte des Zigarettenrauchens als Risikofaktor für die Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen wurden in den letzten Jahren ebenfalls ausgiebig untersucht. Hierbei zeigte sich neben einer kanzerogenen Wirkung auch die Zunahme des oxidativen Stresses, Hemmung der Vasodilatation sowie ein direkt zytotoxischer Einfluss des Zigarettenrauchens. Zudem wirkt es proliferativ und prodiabetogen, so dass das Zigarettenrauchen mehr als einen solitären Risikofaktor für die Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen darstellt und den positiven Eigenschaften des PPAR γ -Rezeptors bezüglich deren Genese konträr gegenübersteht.

Daraus ergab sich für mich die Frage, inwieweit der Einsatz von Zigarettenrauchkondensat, repräsentativ für eine gerauchte Zigarette, die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors durch einen potenten PPAR γ -Agonisten beeinflusst.

Wegen der hohen Genexpression des PPAR γ -Rezeptors wurden zur Klärung dieser Fragestellung kultivierte 3T3-L1-Prädipozyten von embryonalen Mäusen verwendet, deren Reifung u.a. durch die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors hervorgerufen wird. Unter Einsatz von Sartanen und Glitazonen als PPAR γ -Agonisten und Zigarettenrauchkondensat untersuchte ich den Einfluss auf die Zellreifung zu großen, mit lipidhaltigen Vakuolen gefüllten Adipozyten und Veränderung der Genexpression der Proteine CD36 sowie FABP4, die u.a. den Fettstoffwechsel regulieren. Ich arbeitete heraus, dass Zigarettenrauchkondensat einen hemmenden Einfluss auf die Wirkung von PPAR γ -Rezeptor-Agonisten ausübt, wobei die stärkste Hemmung interessanterweise zumeist nach Einsatz der mittleren Stoffmengenkonzentration des Zigarettenrauchkondensats auftrat. Dieses Ergebnis zeigt auf, dass das Zigarettenrauchen nicht nur als ein multimodaler Risikofaktor für die Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen gesehen werden darf, sondern auch ein direktes Hindernis bei der adäquaten Therapie der zur Atherosklerose führenden Erkrankungen darstellt.

16. Literaturverzeichnis

1. Willson T, Lambert M. H. und Kliewer A. Peroxisome proliferator-activated receptor and metabolic disease. *Annual Revue Biochemistr* 2001;70:341-367.
2. Ikeda H, Taketomi S, Sugiyamam Y, Shimura Y, Sohda T, Meguro K, Fujita T. Effects of pioglitazone on glucose and lipid metabolism in normal and insulin resistant animals. *Arzneimittel-Forschung* 1990;40:156-62.
3. Kotchen TA, Reddy S, Zhang HY. Increasing insulin sensitivity lowers blood pressure in the fructose fed rat. *American Journal of Hypertension* 1997;10:1020-6.
4. Gumieniczek A. Effect of the new thiazolidinedione pioglitazone on the development of oxidative stress of diabetic rabbits. *Life Science* 2003;74:553-62.
5. Phielix E, Szendroedi J, Roden M. The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact. *Trends in pharmacological science* 2011 Oct;32(10):607-16.
6. Gonon AT, Bulhak A, Labruto F, Sjöquist PO, Pernow J. Cardioprotection mediated by rosiglitazone, a PPAR γ ligand, in relation to nitric oxide. *Basic research in cardiology* 2007;102:80-89.
7. Han W, Giraldo C, Li YD, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Respiratoric Cell model Biol* 1998;19:819-825.
8. Amussen I, Kjeldsen K. Intimal ultrastructure of human umbilical arteries. Observation on arteries in newborn children of smoking and non-smoking mothers. *Circ Res* 1975;36:579-589.
9. Davis JW, Shelton L, Eigenberg DA, Hignite CE, Watanabe IS. Effects of tobacco and non-tobacco cigarette smoking on endothelium and platelets. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1985;37:529-533.
10. Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM. *J Biol Chem* 1978;253:7570-7578.
11. Green H, Kehinde O. *Cell* 1976;7:105-113.
12. Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS. *J Biol Chem* 1988;263:9402-9408
13. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-650.

-
14. Kersten S, Desverne B, Wahli W, Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000;404:221-224.
 15. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995;83:835-39.
 16. Giguere V. Orphan nuclear receptors: From gene to function. *Endocr Rev* 1999;20:689-725.
 17. Majithiya B, Paramar AN, Balaraman R. Pioglitazone, a PPAR γ agonist, restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular Research* 2005; 66:150-161.
 18. Kappert K, Tsuprykov O, Kaufmann J, Fritzsche J, Ott I, Goebel M, Bähr IN, Hässle PL, Gust R, Fleck E, Unger T, Stawowy P, Kintscher U. Chronic treatment with losartan results in sufficient serum levels of the metabolite EXP3179 for PPAR γ activation. *Hypertension*. 2009 Oct; 54(4):738-4.
 19. Zhang B, Berger J, Zhou GC, Elbrecht A, Biswas S, et al. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 1996;271:31771-74.
 20. Hu K, Kim BM, Sarrof P, Spiegelmann BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* 1996;274:2100-3.
 21. Adams M, Reginato MJ, Shao DL, Lazar MA, Chatterjee VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 1997;272:5128-32.
 22. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2784-91.
 23. DeFronzo RA. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2784-91.
 24. Ryan KE, McCance DR, Powell L, McMahan R, Trimble ER. Fenofibrate and pioglitazone improve endothelial function and reduce arterial stiffness in obese glucose tolerant men. *Atherosclerosis* 2007 Oct;194(2):e123-30.
 25. Murase K, Odaka H, Suzuki M, Tayuki N, Ikeda H. Pioglitazone time-dependently reduces tumour necrosis factor-alpha level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* 1998 Mar;41(3):257-64.

-
26. Moller DE. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2000;11(6):212-7.
27. Luo YM, Wan XH, Jiang DQ, Kuang WY, Guo HB, Chen ZX, Wang HJ, Xie LH, Duan W. Effects of PPAR γ agonist rosiglitazone on MMP-9 and TIMP-1 expression of monocyte-derived macrophages isolated from patients with acute coronary syndrome 2009 Aug;37(8):739-45.
28. Amoroso A. Tobacco smoke affects expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in monocyte/ macrophages of patients with coronary heart disease. *British Journal of Pharmacology* 2009 Nov;158(5):1276-84.
29. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem* 1989; 264(13):7576–83.
30. Silverstein RL, Baird M, Lo SK, Yesner LM. Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor. *J Biol Chem* 1992;267(23):16607–12.
31. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell* 1989;58(1):95–101.
32. Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasunción MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 1998;39(4): 777–88.
33. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 2002;277(41):38503–16.
34. Collins RF, Touret N, Kuwata H, Tandon NN, Grinstein S, Trimble WS, Uptake of oxLDL by CD36 occurs by an actin-dependent pathway distinct from macropinocytosis. *J Biol Chem* 2009;284(44):30288–97.
35. Febbraio M, Abumrad NA, David P, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SFA and Silverstein RL. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *The Journal of Biochem Industry* 1999;274:19055-19062.
36. Yasunaga T, Koga S, Ikeda S, Yasuoka C, Sonoda Y, Tanioka Y, Kohno S. Cluster of differentiation-36 deficiency type 1 and acute coronary syndrome without major cardiovascular risk factors. *Circ J* 2007;71:166 –169.

-
37. Tanaka T, Nakata T, Oka T, Ogawa T, Okamoto F, Kusaka Y et. al. Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations. *J Lipid Res* 2001;42:751–759.
38. Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, Nozaki S, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36 deficiency associated with insulin resistance. *Lancet* 2001;357:686–687.
39. Hirano K, Kuwasako T, Nakagawa-Toyama Y, Janabi M, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency. *Trends of Cardiovascular Medicine* 2003;13:136 – 141.
40. Matarese V, Bernlohr DA. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *J Biol Chem* 1988;263(28)14544-14551.
41. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Development* 1994;8:1224–1234.
42. Distel RJ, Robinson GS, Spiegelman BM. Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267(9)5937-5941.
43. Furuhashi M, Hotamisligil GS, Fatty acid-binding proteins: role of metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Discov* 2008;7:489-503.
44. Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE. Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism* 2004 Mar;53(3):303-9.
45. Gorbenko O, Filonenko V, Gout I. Generation and characterization of monoclonal antibodies against FABP4. *Hybridoma (Larchmt)* 2006; Apr;25(2):86-90.
46. Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006;52:405-413.
47. Yeung DC, Xu A, Cheung CW, Wat NM, Yau MH, Fong CH, Chau MT, Lam KS. Serum adipocyte Fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vasclular Biology. Journal of the American Heart Assosiation* 2007; 27:1796-1802.
48. Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP₂) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006;188(1):102-11).

-
49. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM et al. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 2000;141(9):3388-3396.
50. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte Fatty acid-binding protein. *Science* 1996;274:1377-1379.
51. Kriterien der Internationalen Diabetesföderation 2005, <http://www.diabetes-deutschland.de/metabolischesyndrom.html>
52. Hsu BG, Chen YC, Lee RP, Lee CC, Lee CJ, Wang JH. Fasting serum level of fatty-acid-binding protein 4 positively correlates with metabolic syndrome in patients with coronary artery disease. *Circ J* 2010 Feb; 74(2):327-31.
53. Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, Yeung DC, Janus ED, Sham PC, Lam KS. Circulating adipocyte-binding fatty acid protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year study. *Circulation* 2007;115:1537-1543.
54. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4: 611–617.
55. Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 mRNA and proteins in human THP-1 macrophages. *J Lipid Res.* 2000;41:2017-2023.
56. Deutsche Bundeszentrale für Gesundheitliche Aufklärung, Raucher sterben früher, Stand 16.5.2012, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Robert-Koch-Institut Saarbrücken, Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends, 2004.
57. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V., Robert-Koch-Institut Berlin, Krebs in Deutschland 2003-2004 – Häufigkeiten und Trends, 6. Überarbeitete Auflage, 2008.
58. Keil U. Coronary artery disease, the role of lipids, hypertension and smoking. *Basic Research in Cardiology* 1995;Suppl1:152-158.
59. Bonita R, Duncan J, Truelsen T, Jackson RT, Beaglehole R. Passive smoking as well as active smoking increases the risk of acute stroke. *Tobacco Control* 1999; 8:156–160.
60. Bornscheuer U, Pühler A, Dill B et al. Römpf Online. *Thieme Chemistry* 2007, Stuttgart. www.roempp.com/prod/index1.html

-
61. Boyle P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting in Helsinki. *Lung Cancer* 1996 October;17:1-60.
62. Deutsches Krebsforschungszentrum. Die Tabakindustriedokumente I: Chemische Veränderungen an Zigaretten und Tabakabhängigkeit, Heidelberg 2005.
63. Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. Handbook of Toxicologic Pathology. *Academic Press*, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo 2002.
64. De Marini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res.* 2004 Nov;567(2-3):447-74.
65. Bornscheuer U et. al. *US Environmental Protection Agency.* 2007
66. Deutsches Krebsforschungszentrum, 2005, Stabsstelle Krebsprävention, 2008
67. Lang-Roth R, Karow Th. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie* 2012; 20. Auflage:1220-1221, Köln.
68. Burgis E. *Intensivkurs-Allgemeine und spezielle Pharmakologie* 2001; 2. Auflage: 74-75, Urban & Fischer Verlag, München-Jena.
69. Eichhorn J. Rauchen: Gesundheitsrisiko Nr.1. *Ärzte Zeitung*, Neu-Isenburg, 7.6.1999. *Jahrbuch Sucht* 2001, <http://ever.ch/PDF/Rauchen.pdf>
70. Atherosklerose: Rauchen sabotiert die NO-Biosynthese. *Deutsches Ärzteblatt* 2000;9(46):A-3067/B-2593 / C-2301)
71. Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Jun;280(6):H2484-8.
72. Lowe ER, Time-dependent inhibition and tetrahydrobiopterin depletion of endothelial nitric-oxide synthase caused by cigarettes. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005;33:131-138.
73. Davis JW, Shelton L, Eigenberg DA, Hignite CE, Watanabe IS. Effects of tobacco and non-tobacco cigarette smoking on endothelium and platelets. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1985;37:529-533.
74. Mizuno K, Yaginuma K, Hashimoto S, Toki T, Nakamura I, Fukuchi S. Acute effect of cigarette smoking on serum angiotensin-converting enzyme activity in normal man. *Tohoku J Exp Med* 1982 May;137(1):113-4.

-
75. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH und NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994 Jun;74(6):1141-8.
76. Kreuzer J, Tiefenbacher Ch. *Atherosklerose* 2003:26, Thieme-Verlag.
77. Erdmann E, *Klinische Kardiologie* 2006; 6. Auflage:48, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- 78 . Kreuzer J, Tiefenbacher Ch, *Atherosklerose*, 2003:16, Thieme-Verlag.
79. Graefe KH, Lutz W, Bönisch H. *Duale Reihe. Pharmakologie und Toxikologie* 2011:108, Thieme-Verlag.
80. Erdmann E., *Klinische Kardiologie*, 6. Auflage, 2006:303, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
81. Krämer C, Sunkomat J, Witte J, Luchtefeld M, Walden M, Schmidt B, Tsikas D, Böger RH, Forssmann WG, Drexler H, Schieffer B. Angiotensin II receptor-independent anti-inflammatory and antiaggregatory properties of losartan: role of the active metabolite EXP3179. *Circ Res* 2002;90:770–776.
82. Watanabe T, Suzuki J, Yamawaki H, Sharma VK, Sheu SS, Berk BC. Losartan metabolite EXP3179 activates endothelial nitric oxide synthase via vascular endothelial growth factor receptor-2 in endothelial cells: angiotensin II type 1 receptor-independent effects of EXP3179. *Circulation* 2005;112:1798–1805.
83. Schupp M, Lee LD, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T, Kintscher U. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. *Hypertension* 2006;47:586–589.
84. Grothusen C, Umbreen S, Konrad I, Stellos K, Schulz C, Schmidt B, Kremmer E, Teebken O, Massberg S, Luchtefeld M, Schieffer B, Gawaz M. EXP3179 inhibits collagen-dependent platelet activation via glycoprotein receptor-VI independent of AT1-receptor antagonism: potential impact on atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1184–1190.
85. Lang-Roth R, Karow Th. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie* 2012; 20. Auflage:1220-1221, Köln.
86. Burgis E. *Intensivkurs-Allgemeine und spezielle Pharmakologie* 2001; 2. Auflage:132-133, Urban & Fischer Verlag, München-Jena.
87. Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H, *Duale Reihe, Pharmakologie und Toxikologie*, 2011, 166, Thieme-Verlag.

-
88. Benson St, Pershadsingh H, Ho Ch, Chittiboyina A Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avary M, Kurzt Th. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR γ -modulating activity. *Hypertension* 2004 May;43(5):993-1002.
89. Koida G. *Pharmakologie/Toxikologie systematisch* 2002;2. Auflage:342.
90. Zhang F, Sowers JR, Ram JL, Standley PR, Peuler JD. Effects of pioglitazone on calcium channels in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1994 Aug;24(2):170-5.
91. Buchanan TA, Meehan WP, Jeng YY, Yang D, Chan TM, Nadler JL, Scott S, Rude RK, Hsueh WA. Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):354-60.
92. Horton HR, Moran LA, Gray Scrimgeour K, Rawn JD, Perry MD, Biochemie, 4. Auflage, 2008:235.
93. Zhang W, Song F, Windsor LJ. Cigarette smoke condensate affects the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 2009;Vol. 44, Issue 6:704-713.
94. Gao S, Chen K, Zhao Y, Rich CB, Chen L, Li SJ, Toselli P, Stone P, Li W. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of lysyl oxidase expression by cigarette smoke condensate in cultured fetal lung fibroblasts. *Toxicological Sciences* 2005;87:197-203.
95. Smith CJ, Hansch C. The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate. *Food and chemical toxicology* 2000;38:637-646.
96. Zigaretten - Bestimmung des Rohkondensats und des nikotinfreien Trockenkondensats unter Verwendung einer Zigaretten-Abrauchmaschine für Routineanalysen. DIN ISO 4387, 2011; Ausgabe Januar (ISO 4387:2000 + Amd.1:2008).
97. Foy JW, Bombick BR, Bombick DW, Doolittle DJ, Mosberg AT, Swauger JE. A comparison of in vitro toxicities of cigarette smoke condensate from Eclipse cigarettes and four commercially available ultra low-“tar” cigarette. *Food and Chemical Toxicology* 2004;42:237-243.
98. Lee CK, Doolittle DJ, Burger GT, Hayes AW. Comparative genotoxicity testing of mainstream whole smoke from cigarettes which burn or heat tobacco. *Mutat Res*. 1990 Sep;242(1):37-45.
99. Roemer E, Schramke H, Weiler H, Buettner A, Kausche S, Weber S, Berges A, Stueber M, Muench M, Trelles-Sticken E, Pype J, Kohlgrueber K, Voelkel H, Wittke S. Mainstream

smoke chemistry and in vitro and in vivo toxicity of the reference cigarettes 3R4F and 2R4F, *Contributions to tobacco research* 2012 Feb;25(1):316-35.

100. Nakayama T, Kaneko M, Kodama M, Nagata C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature* 1985;314:462–464.

101. Leanderson P, Tagesson C. Cigarette smoke-induced DNA damage: role of hydroquinone and catechol in the formation of the oxidative DNA-adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine. *Chem Biol Interact* 1990;75:71–81.

102. Leanderson, Tagesson C. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem Biol Interact* 1992;81:197–208.

103. Leanderson P, Tagesson C. Cigarette tar promotes neutrophil-induced DNA damage in cultured lung cells. *Environ Res* 1994;64:103–111.

104. Bermudez E, Stone K, Carter KM, Pryor WA. Environmental tobacco smoke is just as damaging to DNA as mainstream smoke. *Environ Health Perspect* 1994;102:870–874.

105. Willey JC, Grafstrom RC, Moser CE Jr., Ozanne C, Sundqvist K, Harris CC. Biochemical and morphological effects of cigarette smoke condensate and its fractions on normal human bronchial epithelial cells in vitro. *Cancer Res* 1987;47:2045–2049.

106. Spencer JPE, Jenner E, Chimel K, Aruoma OI, Cross CE, Wu R, Halliwell B. DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *FEBS Lett* 1995;375:179–182.

107. Seree EM, Villard PH, Re JL, De Meo M, Lacarelle B, Attolini L, Dumenil G, Catalin J, Durand A, Barra Y. High inducibility of mouse renal CYP2E1 gene by tobacco smoke and its possible effect on DNA single strand breaks, *Biochem. Biophys Res Commun* 1996;219:234–249.

108. Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis* 1997 Jul;18(7):1359-63.

109. Liu X, Lu J, Liu S. Synergistic induction of hydroxyl radical-induced DNA single-strand breaks by chromium (VI) compound and cigarette smoke solution. *Mutat Res* 1999;440:109–117.

110. Yang Q, Hergenbahn M, Weninger A, Bartsch H. Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji. *Carcinogenesis* 1999 Sep;20(9):1769-75.

-
111. Zhang Z, Heng Z, Li A, Zhao R. Study on the effects of DNA damage induced by cigarette smoke in male mice testicular cells using comet assay. *Wei Sheng Yan Jiu* 2001;30:28–30.
112. Roemer E, Ottmueller TH, Urban HJ, Baillet-Mignard C. SKH-1 mouse skin painting: a short-term assay to evaluate the tumorigenic activity of cigarette smoke condensate. *Toxicol Lett* 2010 Feb 1;192(2):155-61.
113. Hess RD, Brandner G. DNA damage by filtered, tar-and aerosol-free cigarette smoke in rodent cells: a novel evaluation. *Toxicol Lett* 1996;88:9–13.
114. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2002 July;51(7):2045-55.
115. Koolman J, Röhm KH. *Taschenatlas Biochemie des Menschen* 2009;242.
116. Beisiegel U. *Zeitschrift der Deutschen Herzstiftung* 1999;(2)4-6.
117. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004 April;10(4):355-61.
118. Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors in endothelial cell biology. *Curr Opin Lipidol* 2001 October;12(5):511-8.
119. Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999 June;10(3):245-57.
120. Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol* 2001 June;12(3):245-54.
121. Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999 June;10(3):245-57.
122. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, (Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001 January;7(1):53-8.
123. Hsueh WA, Bruemmer D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Hypertension* 2004 February;43(2):297-305.

-
124. Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 January 1;23(1):52-7.
125. Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Fresu LG, Ferrero V, Brunelleschi S. Quantification of PPAR-gamma protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possible direct effect of nicotine. *Life Sci.* 2007 Aug 23;81(11):906-15.
126. Amoruso A, Gunella G, Rondano E, Bardelli C, Fresu LG, Ferrero V, Ribichini F, Vasanelli F and Brunelleschi S. Tobacco smoke affects expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in monocyte/macrophages of patients with coronary heart disease. *Br J Pharmacol.* 2009 November; 158(5): 1276–1284.
127. Gerd Herold und Mitarbeiter, *Innere Medizin*, 2007:86, Köln.
128. Joachim Lorenz, *Pneumologie*, 3. Auflage 2009:157, Thieme-Verlag, Stuttgart.
129. Burgis E, *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie*, 2. Auflage 2002:53, Urban & Fischer Verlag, München-Jena.
130. Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H, Duale Reihe, *Pharmakologie und Toxikologie*, 2011:408, Thieme-Verlag.
131. Horton HR, Moran LA, Gray Scrimgeour K, Rawn JD, Perry MD. *Biochemie*, 4. Auflage, 2008:860, Pearson Studium Verlag.
132. Rote-Hand-Brief, 28. Juli 2011, www.Akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2011/20110729.pdf.
133. Diabetes: Pioglitazon geht wegen Krebsrisiko vom Markt, 10. Juni 2011, www.aerzeblatt.de/nachrichten/46215.
134. Erdmann E. *Klinische Kardiologie*. 8. Auflage, 2011:256, Thieme-Verlag.
135. Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J.* 1980 April 5; 280(6219): 972–976.
136. Taylor RG , Woodman G, und Clarke SW. *Thorax* 1986, Mai; 41 (5):407-408.
137. Guo X, Verkler TV, Chen Y, Richter P, Polzin GM, Moore MM, Mei N. Mutagenicity of cigarette smoke condensates in two versions of the mouse lymphoma assay. *Mutagenesis* 2011(2):273-281.
138. Archived Drug Labels. MICARDIS® (telmisartan) tablet. Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., Ridgefield, CT 06877 USA, 25. Mai, 2006.

-
139. Gallwitz B, Müller-Wieland D, Häring H-U, Usadel K-H. *Diabetologie in Klinik und Praxis*, 6. Auflage, 2011:190, Thieme-Verlag.
140. Lemmer B, Brune K, *Pharmakotherapie/ klinische Pharmakologie*, 13. Auflage, 2004: 219, Springer-Verlag, Berlin.
141. Burgis E, *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie*, 2. Auflage, 2002:133, Urban & Fischer Verlag, München-Jena.
142. Rote Liste® 2010, © 2010 Herausgeber und Verlag, Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt/Main:701, 877.
143. Tack CJ, Smits P. Thiazolidinedione derivatives in type 2 diabetes mellitus. *Net J Med*. 2006, Juni; 64(6):166-74.
144. <http://www.umweltbundesamt.de/luft/schadstoffe/feinstaub.htm>.
145. Pearce AC, Jones RM. Smoking and anesthesia: preoperative abstinence and perioperative morbidity. *Anesthesiology* 1984;61:576-584.
146. Light A, Grass C, Pursley D, Krause J. Carboxyhemoglobin levels in smokers vs. non-smokers in a smoking environment. *Respiratory care* 2007; http://www.rcjournal.com/abstracts/2007/?id=aarc07_111
147. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie*, 16. Auflage, 2006:11, Thieme-Verlag.

17. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCA	ATB-binding-Cassette-1
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase-1
AF1	transkriptionsaktivierende Funktion 1
AT	Angiotensin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD36	Cluster of differentiation 36
cDNA	cyclische Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CS	Cover slips
CSC	Zigarettenrauchkondensat
DBD	Desoxyribonukleinsäure-bindende Domäne
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EXP3179	aktiver Metabolit des Losartans
FABP4	Fatty acid-binding protein 4
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm bzw. mittlere Erdschwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT 4	Glukosetransportprotein 4
GTPase	Guanosintriphosphatase
GW 9662	2-Chloro-5-Nitrobenzanilid
HDL	High-density lipoprotein
HSL	Hormone-sensitive-lipase
IBX	Isobutylxanthin
IGF-1	Insuline-like growth factor 1
KHK	koronare Herzerkrankung
LBD	Liganden-bindende Domäne
LDL	Low-density lipoprotein
L	Liter
Los	Losartan
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm

MIBX	Methylisobutylxanthin
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	mikromolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes LDL
Pio	Pioglitazon
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPD	P-Phenylendiamin
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
RCF	relative centrifugal force
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tel	Telmisartan
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

18. Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen für die Möglichkeit am ehemaligen Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie zu promovieren und den sehr anregenden Unterricht während meines Pharmakologie-Wahlfach-Trimesters, der mich inspirierte und in mir den Forschungsgeist weckte.

Herrn Prof. Dr. R. H. Böger danke ich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und viele nützliche Anregungen bei jener Erforschung und Verbesserung dieser Arbeit.

Für die Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der Ergebnisse spreche ich PD Dr. T. K. Rudolph und Dr. F. Schulze einen ganz besonderen Dank aus, die mich z. T. kritisch, jedoch stets konstruktiv den gesamten Arbeitsprozess über begleitet haben.

Unvergessen bleibt mir auch die Zusammenarbeit im Labor mit den technischen Assistentinnen Frau A. Steenpass und Frau M. Kastner, die mir neben praxisorientierten und empirischen Tipps bei der Durchführung meiner Versuche mit offenem Ohr und gutem Rat zur Seite standen und für ein angenehmes Laborklima auch an weniger Erfolg bringenden Tagen sorgten.

Des Weiteren danke ich vielen hier nicht namentlich aufgeführten Institutsmitgliedern, die mir mit ihrem theoretischen und praktischen Wissen bei vielen Schritten meiner Arbeit Unterstützung boten.

Ferner danke ich der kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Mitfinanzierung dieses Projektes.

Meiner Mutter danke ich für die stetige Unterstützung auf meinem Lebensweg sowie die Begleitung durch viele Höhen und einige Tiefen sowie nicht zuletzt interessante Denkanstöße bei der Erklärung der gewonnenen Ergebnisse.

Ebenfalls spreche ich all meinen Freunden ein großes Dankeschön aus, die sich mit mir über Erfolge freuten, mir an weniger erfolgreichen Tagen stärkend und motivierend zur Seite standen und Nachsicht zeigten, wenn es im Labor - wie so oft - etwas länger dauerte.

19. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Irina Heinz