

Aus dem Institut und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

# **Wirkung von Zigarettenrauch auf Präadipozyten als potentielle systemische Modifikatoren einer COPD**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Birgit Machata

aus

Frankfurt am Main

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Nowak

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rudolf M. Huber

Prof. Dr. Thomas Nicolai

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. nat. R. A. Jörres

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2010

Für Marcus

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Hintergrund der Untersuchung</b> .....	2
2.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) .....	2
2.1.1 Definition und klinisches Bild .....	2
2.1.2 Epidemiologie .....	3
2.1.3 Diagnostik .....	3
2.1.4 Risikofaktoren für das Entstehen einer COPD .....	5
2.1.4.1 Exogene Risikofaktoren .....	5
2.1.4.2 Endogene Risikofaktoren .....	6
2.1.5 Therapie .....	6
2.2 Systemische Aspekte der COPD .....	7
2.2.1 Reduziertes Körpergewicht / Kachexie .....	8
2.2.2 Muskuläre Dysfunktion .....	8
2.2.3 Osteoporose .....	9
2.2.4 Kardiovaskuläre Erkrankungen .....	9
2.2.5 Systemische Inflammation .....	9
2.3 Mögliche pathophysiologische Mechanismen .....	10
2.3.1 Klassische Hypothese .....	10
2.3.1.1 Entzündliche Veränderungen .....	10
2.3.1.2 Proteasen - Antiproteasen .....	11
2.3.1.3 Oxidantien - Antioxidantien .....	12
2.3.1.4 Apoptose .....	13
2.3.2 Hypothese der vorzeitigen Seneszenz als partielle Ursache des Lungenemphysems .....	14
2.3.2.1 Klinische Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Altern und Emphysem .....	14
2.3.2.2 Formen der zellulären Seneszenz .....	15

2.3.2.3	Zelluläre Seneszenz als Faktor bei Organerkrankungen . . . . .	18
2.3.2.4	Hinweise für Seneszenz als partielle Ursache der COPD <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> . .	18
2.4	Zusammenhang zwischen Körpergewicht, Adipozyten und Lungenemphysem . . . . .	19
2.4.1	Die Rolle des Körpergewichts beim Lungenemphysem . . . . .	19
2.4.2	Wirkungen kalorischer Restriktion . . . . .	20
<b>3.</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> . . . . .	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b> . . . . .	<b>24</b>
4.1	Material . . . . .	24
4.2	Gewinnung des Zigarettenrauchextrakts . . . . .	26
4.2.1	Abrauchen der Zigaretten . . . . .	26
4.2.2	Verarbeitung des Zigarettenrauchextrakts . . . . .	28
4.3	Zellkultur und Exposition . . . . .	28
4.3.1	Zellkulturbedingungen . . . . .	28
4.3.2	Anzucht der Zellen und Mediumwechsel . . . . .	29
4.3.3	Passagieren der Zellen . . . . .	29
4.3.4	Kryokonservierung der Zellen . . . . .	30
4.3.5	Versuchsansatz in 24-Loch-Platten . . . . .	30
4.3.6	Differenzierung der Zellen . . . . .	31
4.3.7	Exposition der Zellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt . . . . .	31
4.4	Messungen . . . . .	32
4.4.1	Zellzählung . . . . .	32
4.4.2	Lipidgehalt . . . . .	32
4.4.3	Aktivität der Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH) . . . . .	35
4.4.4	Proteingehalt . . . . .	36
4.5	Auswertung und statistische Analyse . . . . .	38
<b>5.</b>	<b>Erfahrungen in den Vorversuchen und Etablierung der Methoden</b> . . . . .	<b>39</b>
5.1	Versuch mit Lungenfibroblasten . . . . .	39

5.2	Anzucht und Differenzierung der Präadipozyten	39
5.3	Lipidanalyse mittels Bildverarbeitung versus Photometrie	40
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse der Hauptversuche</b>	<b>42</b>
6.1	Zellzahl	42
6.2	Proteingehalt	45
6.2.1	Proteingehalt absolut	45
6.2.2	Proteingehalt pro Zellzahl	48
6.3	Lipidgehalt	51
6.3.1	Lipidgehalt absolut	51
6.3.2	Lipidgehalt pro Zellzahl	55
6.3.3	Lipidgehalt pro Protein	58
6.4	Aktivität der Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH)	60
6.4.1	GPDH-Aktivität absolut	60
6.4.2	GPDH-Aktivität pro Zellzahl	63
6.4.3	GPDH-Aktivität pro Proteingehalt	65
6.4.4	GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt	68
<b>7.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
7.1	Adipogenese	71
7.2	Interpretation der Ergebnisse	73
7.3	Mögliche zugrundeliegende Mechanismen	77
<b>8.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>11.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>12.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>98</b>

<b>Anhang</b> .....	100
A.1 Danksagung .....	100
A.2 Eigenständigkeitserklärung .....	101

## **1. Einleitung**

Erkrankungen des respiratorischen Systems spielen in der modernen Medizin eine immer bedeutendere Rolle. Zu den häufigsten Atemwegserkrankungen zählen die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sowie das allergische Asthma bronchiale. Die COPD betrifft nach Schätzungen der WHO weltweit derzeit ca. 210 Millionen Menschen [WHO 2008]. Sie ist eine der führenden Ursachen für Morbidität sowie Mortalität und gilt als vierthäufigste Todesursache. Ein weiterer Anstieg von Prävalenz und Mortalität wird erwartet. Bereits heute werden die durch die COPD verursachten direkten und indirekten Kosten alleine für die USA auf ca. 38,8 Milliarden Dollar geschätzt [Miller *et al.* 2005]. Aufgrund dieser Tatsachen hat das Interesse an der COPD in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Zu dieser Entwicklung hat auch eine veränderte Beurteilung der Therapieoptionen beigetragen, die auf klinische und pathophysiologische Überlegungen zurückzuführen ist [Celli 2006].

Vor diesem Hintergrund soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der COPD und ihrer systemischen Aspekte leisten. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf der Pathogenese des Lungenemphysems als einem der Phänotypen der COPD. Angesichts der Tatsache, dass Zusammenhänge zwischen Lungenemphysem und Körpergewicht einerseits sowie Körpergewicht und Adipozyten andererseits bestehen und die Erkrankung überwiegend durch Rauchen ausgelöst wird, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob Zigarettenrauchextrakt *in vitro* einen Effekt auf die Differenzierung von Präadipozyten und Funktion von Adipozyten ausübt. Hiermit soll die mögliche Rolle von Adipozyten als Einflussfaktoren auf eine COPD beleuchtet werden.



## **2. Hintergrund der Untersuchung**

### **2.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)**

#### **2.1.1 Definition und klinisches Bild**

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist durch eine chronische Entzündung der Atemwege gekennzeichnet, die klinisch mit Husten, Dyspnoe sowie vermehrter Schleimproduktion einhergeht und auch unter optimaler antiobstruktiver Therapie lungenfunktionsanalytisch eine nicht voll reversible chronische Obstruktion aufweist. Das klinische Erscheinungsbild kann im Wesentlichen in zwei Formen unterteilt werden, die als chronisch-obstruktive Bronchitis und als Lungenemphysem bezeichnet werden und meist in unterschiedlicher Ausprägung gemeinsam vorkommen. Die chronisch-obstruktive Bronchitis stellt den häufigsten Phänotyp der COPD dar und ist insbesondere durch bronchiale Obstruktion und Mukushypersekretion gekennzeichnet. Das Lungenemphysem hingegen zeichnet sich durch eine irreversible Strukturzerstörung der Alveolen und eine damit einhergehende abnorme und dauerhafte Erweiterung der Lufträume distal der terminalen Bronchiolen aus.

Je nach Lokalisation und Art des Strukturabbaus kann aus pathologischer Sicht zwischen drei Hauptformen, dem centriacinären (centrilobulären), panacinären (panlobulären) und bullösen (großbullösen) Emphysem, differenziert werden [z.B. West 1987]. Das centriacinäre Emphysem weist den Strukturverlust insbesondere in der Nähe des zuführenden Bronchiolus auf, wobei die peripheren Alveolarräume überwiegend intakt sind. Diese Form dehnt sich meist weitgehend gleichmäßig über die gesamte Lunge aus. Bei dem panacinären Emphysem betrifft die Rarefizierung der Alveolarsepten den gesamten Acinus. Demzufolge ist die Beeinträchtigung der Lungenelastizität und des Gasaustausches ausgeprägter als bei der centriacinären Form. Dieser Prozess bevorzugt meist die basalen Lungenabschnitte und gilt als charakteristisch für die schweren Emphysemformen bei homozygotem  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel. Das bullöse Emphysem zeichnet sich durch eine ausgeprägte lokale Aufweitung emphysematischen Gewebes und die Bildung großer Emphysemlasen aus. Bei dieser Form kann eine operative Bullektomie zur Anwendung kommen. Unter den Patienten mit COPD weisen diejenigen, die ein Lungenemphysem ausgebildet haben, den stärksten Abfall der Lungenfunktion und zugleich die geringste Überlebensrate auf [Burrows *et al.* 1987].

### **2.1.2 Epidemiologie**

Schätzungen der Prävalenz der COPD fallen aufgrund der schwierigen Definition unterschiedlich aus. Halbert *et al.* [2006] kommen in einer Zusammenfassung verschiedener epidemiologischer Studien auf eine Größenordnung von 7,6 %. Weltweit betrifft die COPD nach Schätzungen der WHO derzeit circa 210 Millionen Menschen und gilt dabei bereits heute als vierthäufigste Todesursache [WHO 2008]. Hinzu kommt, dass Prävalenz, Morbidität und Mortalität der COPD weltweit eine steigende Tendenz aufweisen [Murray & Lopez, 1997, Calverley & Walker 2003, Pauwels & Rabe 2004, Nowak *et al.* 2005]. Aktuellen Schätzungen zufolge wird die COPD im Jahre 2030 8,6 % aller Todesfälle ausmachen. Damit würde sie nach koronarer Herzerkrankung und cerebrovaskulärer Erkrankung Rang 3 der weltweiten Todesursachen belegen [WHO 2008]. Ursächlich hierfür sind die abnehmende Mortalität anderer Krankheiten, insbesondere kardiovaskulärer Erkrankungen in den Industrieländern und Infektionskrankheiten in Entwicklungsländern, sowie ein Anstieg des Zigarettenkonsums und der Luftverschmutzung in Entwicklungsländern [Barnes 2000].

Die geschätzte Prävalenz des Lungenemphysems in der Gesamtpopulation liegt laut Halbert *et al.* [2006] zwischen 0,5 und 5,7 %. Allerdings waren bei der Betrachtung von Obduktionsfällen zumindest leichtgradige Veränderungen im Sinne eines Lungenemphysems morphologisch in immerhin 20 bis 50 % der Fälle nachweisbar [Jinno *et al.* 1994]. Bekannt ist, dass das Lungenemphysem insbesondere mit zunehmendem Alter und bei Männern gehäuft auftritt [Anderson *et al.* 1972, Cockcroft *et al.* 1982, Dodge *et al.* 1986].

### **2.1.3 Diagnostik**

Die Diagnose der chronisch-obstruktiven Bronchitis wird anhand der Symptome Husten und Auswurf in Kombination mit dem typischen spirometrischen Befund gestellt. Die GOLD-Leitlinien (GOLD 2008) und die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie teilen die COPD nach klinischen und lungenfunktionsanalytischen Kriterien in 4 Schweregrade ein (siehe Tab. 1).

Die Diagnostik des Lungenemphysems hingegen ist insbesondere in den frühen Stadien schwieriger als diejenige der chronisch-obstruktiven Bronchitis. Lungenfunktionsanalytisch zeichnet sich das Emphysem unter anderem durch ein erhöhtes intrathorakales Gasvolumen (ITGV) und Residualvolumen (RV) sowie durch eine eingeschränkte Diffusionskapazität für eingeatmetes Kohlenmonoxid ( $DL_{CO}$ ) und eine verminderte Lungendehnbarkeit (Compliance) aus. Diese Messparameter können nur indirekt eine Aussage über das Maß der alveolären

Destruktion machen und weisen insbesondere bei leichtgradigem bzw. lokalisiert auftretendem Emphysem eine geringe Sensitivität auf. So können Menschen, deren Lunge sich in der pathologischen Untersuchung als emphysematös erweist, normale Lungenfunktionsparameter aufweisen. Zur genaueren Beurteilung eines Lungenemphysems sind weiterführende diagnostische Mittel wie beispielsweise die hochauflösende Computertomographie (HRCT) notwendig.

Schweregrad	Klinik	FEV <sub>1</sub> % Soll	FEV <sub>1</sub> / FVC
I	mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Sputum)	FEV <sub>1</sub> ≥ 80 %	< 70 %
II	mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Sputum, Dyspnoe)	50 % ≤ FEV <sub>1</sub> < 80 %	< 70 %
III	mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Sputum, Dyspnoe)	30 % ≤ FEV <sub>1</sub> < 50 %	< 70 %
IV	Respiratorische Insuffizienz, Cor pulmonale	FEV <sub>1</sub> < 30 % oder FEV <sub>1</sub> < 50 % mit chronisch respiratorischer Insuffizienz	< 70 %

Tabelle 1: Einteilung des Schweregrades der COPD nach den GOLD- und DGP-Leitlinien [GOLD 2008].

## **2.1.4 Risikofaktoren für das Entstehen einer COPD**

### **2.1.4.1 Exogene Risikofaktoren**

An erster Stelle ist das Inhalationsrauchen zu nennen, welches in den Industrieländern für ca. 80-90 % der Erkrankungen verantwortlich ist [Snider 1989, Barta 2005, GOLD 2008]. Das Risiko für das Auftreten einer COPD nimmt mit der Dauer und dem Ausmaß des Zigarettenkonsums zu [Fletcher & Peto 1977, Snider 1989]. Doll *et al.* [1994] und Doll [1999] kamen in einer langjährigen britischen Studie zu dem Ergebnis, dass die Mortalität von COPD und Emphysem bei Rauchern je nach Intensität des Zigarettenkonsums im Vergleich zu Nichtrauchern um das 8-22fache ansteigt. Meyer *et al.* [2002] stellten in einer Querschnittsstudie an verstorbenen Personen fest, dass nur 16,7 % der an COPD erkrankten Patienten nie geraucht hatten. Auffallend ist, dass je nach Intensität des Rauchens nur ungefähr 10-20 % der Raucher - so genannte suszeptible Raucher - eine lungenfunktionsanalytisch relevante Atemwegsobstruktion entwickeln [Fletcher & Peto 1977].

Da gegenüber Passivrauch exponierte Nichtraucher ähnliche Gifte und Kanzerogene wie aktive Raucher aufnehmen, liegt der Verdacht nahe, dass auch Passivrauchen das Risiko, an einer COPD zu erkranken, erhöht. Hirayama [1981] belegte, dass das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, bei nicht rauchenden Personen, die in einem Raucherhaushalt leben, ansteigt. Neuere Studien wie Skogstad *et al.* [2006], welche die Auswirkung eines allgemeinen Rauchverbots in Norwegen auf nicht rauchende Beschäftigte in Gastronomiebetrieben untersuchte, zeigten signifikante Verbesserungen der Lungenfunktion der betroffenen Personen nach der Einführung des Rauchverbots. Aufgrund geringer Fallzahlen sind diese Hinweise auf eine Korrelation zwischen Passivrauchen und der Entwicklung einer COPD jedoch nur eingeschränkt gültig.

Inhalative Noxen am Arbeitsplatz stellen weitere Risikofaktoren dar. Darunter fallen insbesondere chemische Dämpfe und Gase sowie Industriestäube wie Isocyanate, Ammoniak, Nitrosegase, Chlorgasverbindungen, Lösungsmitteldämpfe und Metallstäube. Diese tragen insbesondere in Entwicklungsländern signifikant zum Risiko, eine COPD zu entwickeln, bei. Bei Exposition gegenüber einer singulären inhalativen Noxe am Arbeitsplatz wird das Risiko, an einer COPD zu erkranken, auf ungefähr 15 % geschätzt [American Thoracic Society 2002]. Betroffen sind vor allem Beschäftigte im Baugewerbe, der Textil- und Papierindustrie sowie Bergarbeiter.

In verschiedenen Studien wurde belegt, dass die durch Verbrennung fossiler Energieträger entstehende Luftverschmutzung bedeutend zur Entwicklung von Erkrankungen der Atmungsorgane beiträgt [American Thoracic Society 2000]. Inwieweit ein direkter Zusammenhang zwischen Luftverschmutzung und COPD besteht, ist jedoch noch nicht hinreichend bekannt.

Des Weiteren wurde in Langzeitstudien nachgewiesen, dass sozioökonomische Faktoren wie ein niedriges Bildungsniveau und geringes Einkommen unabhängig vom Rauchverhalten ein erhöhtes Risiko, an COPD zu erkranken, mit sich bringen [Prescott *et al.* 1999].

#### **2.1.4.2 Endogene Risikofaktoren**

Unter den endogenen Faktoren sind insbesondere Geschlecht und Alter relevant. Entgegen früherer Erkenntnisse haben Frauen *ceteris paribus* ein höheres Risiko als Männer, an COPD zu erkranken. Gold *et al.* [1996] stellten fest, dass Rauchen bei Frauen einen deutlich stärkeren Abfall der Lungenfunktion bewirkt als bei Männern. Prescott *et al.* [1997] kamen zu dem Ergebnis, dass bei gleichen Rauchgewohnheiten das Risiko von Krankenhauseinweisungen und Mortalität aufgrund von COPD bei Frauen höher ausfällt als bei Männern. Des Weiteren wird übereinstimmend berichtet, dass Prävalenz, Morbidität und Mortalität bei der COPD mit zunehmendem Alter ansteigen [Dodge *et al.* 1986, Snider 1989].

Daneben scheint bei der Genese der COPD eine bisher noch nicht ausreichend bekannte genetische Prädisposition eine Rolle zu spielen [Silverman 2006]. Der am besten dokumentierte genetische Risikofaktor ist der Alpha-1-Antitrypsinmangel, der bei ca. 1-2 % der Patienten mit COPD vorhanden ist [Ranes & Stoller 2005, Devereux 2006]. Als weitere begünstigende Faktoren werden unter anderem schwere respiratorische Infektionen in der Kindheit, ein gestörtes Lungenwachstum sowie eine unspezifische Überempfindlichkeit der Atemwege genannt [Snider 1989, Devereux 2006].

#### **2.1.5 Therapie**

Die wichtigste therapeutische Maßnahme, um ein Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten, ist die Aufgabe des Zigarettenrauchens bzw. das Beenden der Exposition gegenüber berufsbedingten Noxen [Fletcher & Peto 1977, Anthonisen *et al.* 2002, Anzueto 2006].

Zur Behandlung der chronisch obstruktiven Bronchitis steht im Gegensatz zum

Lungenemphysem eine vergleichsweise effektive, wenngleich primär symptomatische medikamentöse Therapie zur Verfügung [z.B. Anzueto 2006]. Hierbei werden insbesondere Bronchodilatoren (Beta-2-Agonisten, Anticholinergika und Methylxanthine) sowie inhalative Glukokortikoide eingesetzt. Eine Behandlung mit systemischen Glucocorticosteroiden kommt bei akuten Exazerbationen zum Einsatz, eine entsprechende Langzeittherapie wird jedoch nicht empfohlen [GOLD 2008]. Ziel der medikamentösen Therapie sind primär die Linderung der Symptome, die Stabilisierung des Krankheitsverlaufes, die Verhinderung von Komplikationen sowie die Verbesserung der Lebensqualität. Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass eine Therapie sowohl mit Bronchodilatoren als auch mit inhalativen Steroiden den Abfall der Lungenfunktion über die Zeit verlangsamen kann [Celli *et al.* 2008].

Wie oben bereits beschrieben, geht das Lungenemphysem mit einer Destruktion von Lungenparenchym sowie einem Verlust alveolärer Struktur einher. Die Therapie des Emphysems ist problematischer als die der chronisch obstruktiven Bronchitis, da der Verlust von alveolärem Gewebe nicht ersetzt werden kann. Eine effektive medikamentöse Behandlung steht derzeit nicht zur Verfügung. Die angewandte medikamentöse Therapie, die derjenigen der chronisch obstruktiven Bronchitis entspricht, erweist sich bei Patienten mit Lungenemphysem als weniger wirksam. Im fortgeschrittenen Stadium können die Folgen der Erkrankung durch eine Sauerstofflangzeittherapie oder mechanische Mittel wie die nichtinvasive Beatmung gelindert werden [z.B. Budweiser *et al.* 2006, Budweiser *et al.* 2007]. Bei maximaler Lungenüberblähung oder einzelnen großen Emphysemlasen kommen operative Techniken wie die Volumenreduktionsoperation oder die operative Bullektomie zum Einsatz.

Gerade aufgrund der momentan noch sehr eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten ist ein besseres Verständnis der pathophysiologischen und zellbiologischen Mechanismen des Lungenemphysems von besonderem Interesse. Dies könnte langfristig zur Entwicklung neuer kausaler Therapieoptionen beitragen.

## **2.2 Systemische Aspekte der COPD**

Die COPD wird zunehmend als Systemerkrankung verstanden, bei der neben der respiratorischen Symptomatik auch gehäuft andere Erkrankungen und Abnormalitäten auftreten. Diese sogenannten systemischen Effekte der COPD beeinflussen die Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten wesentlich [Decramer *et al.* 2005, Agustí *et al.* 2003].

### **2.2.1 Reduziertes Körpergewicht / Kachexie**

Bei Patienten mit COPD ist eine Reduktion des Körpergewichtes ein häufig beobachtetes Phänomen. Bei ca. 25 % der Patienten mit COPD und mittelgradig eingeschränkter Lungenfunktion tritt ein ungewollter Gewichtsverlust auf. Bei schwergradiger COPD kann bei 50 % der Patienten ein Gewichtsverlust beobachtet werden [Watz & Magnussen 2006]. Diese Gewichtsreduktion wird überwiegend durch einen Abbau von Muskelmasse und zu einem geringeren Anteil durch eine Reduktion von Fettgewebe verursacht. Der Abbau insbesondere fettfreier Masse kann klinisch zunächst unbemerkt verlaufen. Beispielsweise fanden Vestbo *et al.* [2006] bei ca. 13 % der untersuchten Patienten mit COPD, die einen normalen BMI aufwiesen, eine erniedrigte fettfreie Masse. In dieser Studie stellte sich ebenfalls heraus, dass ein erniedrigter BMI mit einer signifikant erhöhten Mortalität einherging. Ebenfalls war eine erniedrigte fettfreie Masse bei normalem BMI mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.

Die Gründe für den Gewichtsverlust sind noch nicht vollständig geklärt. Hierbei scheinen ein vermehrter Grundumsatz, vermehrte Atemarbeit, Gewebehypoxie, Medikamente (z.B. Betasympatomimetika) sowie eine bei der COPD vorhandene systemische entzündliche Aktivität beteiligt zu sein [Agustí 2005]. Die Frage, ob auch eine direkte Wirkung des Zigarettenrauches auf Präadipozyten bzw. Adipozyten hieran beteiligt sein kann, ist Gegenstand dieser Arbeit und wird im Folgenden genauer betrachtet.

### **2.2.2 Muskuläre Dysfunktion**

Neben dem bei Patienten mit COPD häufig beobachteten Verlust an Muskelmasse ist weiterhin eine Dysfunktion der verbleibenden Skelettmuskulatur zu beobachten [Mador & Bozkanat 2001]. Diese Veränderungen tragen wesentlich zur Krankheitsproblematik und zur Verschlechterung der Lebensqualität bei. Durch die Muskelschwäche reduziert sich die Fähigkeit zur körperlichen Betätigung, woraus eine weitere Abnahme der Belastbarkeit mit zunehmender körperlicher Schwäche bis hin zur Immobilität resultiert. Als morphologisches Korrelat der muskulären Dysfunktion konnten unter anderem eine Verminderung von Typ-I- und eine relative Vermehrung von Typ-II-Fasern im Vergleich zu gesunden Individuen beobachtet werden [Mador & Bozkanat 2001].

Die am Muskelabbau und der muskulären Dysfunktion beteiligten Pathomechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Es scheinen multiple Faktoren eine ursächliche Rolle zu spielen, die zum Teil auf komplexe Weise interagieren. Hierbei ist die bereits erwähnte reduzierte

körperliche Aktivität zu nennen. Weiterhin werden der Gewebehypoxie sowie den Nebenwirkungen verabreichter Medikamente wie z.B. Glucocorticoide eine ursächliche Bedeutung zugeschrieben. Zudem scheinen Wirkungen der im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion vorhandenen proinflammatorischen Zytokine wie beispielsweise TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 auf den Muskelstoffwechsel beteiligt zu sein [Mador & Bozkanat 2001, Decramer *et al.* 2005].

### **2.2.3 Osteoporose**

Bei Patienten mit COPD wird gehäuft eine Osteoporose beobachtet. Als mögliche Ursachen werden Faktoren wie Immobilität, Alter, Gewichtsverlust, Steroidmedikation, Zigarettenkonsum und die systemische Inflammation genannt [Watz & Magnussen 2006]. Die osteoporotischen Veränderungen bringen eine weitere Einschränkung der Mobilität mit sich. Des Weiteren kann die Osteoporose durch Veränderungen der Konfiguration des Thorax eine zusätzliche Verschlechterung der Lungenfunktion bewirken [Gross 2001].

### **2.2.4 Kardiovaskuläre Erkrankungen**

Epidemiologische Daten zeigen einen Zusammenhang zwischen der Reduktion der Lungenfunktion und der Häufigkeit einer koronaren Herzerkrankung [Sin & Man 2005]. Sogar geringe Einschränkungen der Lungenfunktion erhöhen das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung um das 2-3fache, unabhängig von anderen Risikofaktoren [Sin & Man 2003]. Unter Patienten mit reduzierter Lungenfunktion stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache dar [Schünemann *et al.* 2000]. Bezüglich der zugrundeliegenden Mechanismen scheint neben dem gemeinsamen Risikofaktor des Rauchens auch die bei der COPD nachgewiesene systemische Inflammation eine Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes CRP als Maß der systemischen Entzündung zur eingeschränkten Lungenfunktion ein additives Risiko der kardiovaskulären Mortalität darstellt [Sin & Man 2003].

### **2.2.5 Systemische Inflammation**

Wie oben bereits beschrieben, geht die COPD mit einer systemischen entzündlichen Aktivität einher, welche für einen Großteil der Komorbiditäten mitverantwortlich gemacht wird. In Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit COPD erhöhte Serumspiegel von



Markern einer systemischen Inflammation wie CRP, Fibrinogen, TNF- $\alpha$  sowie eine erhöhte Leukozytenzahl im Plasma aufweisen [Agustí *et al.* 2003, Watz & Magnussen 2006]. Auch bei Patienten mit COPD, die das Rauchen aufgegeben hatten, konnten erhöhte Marker einer systemischen Entzündungsreaktion gefunden werden. Dies weist darauf hin, dass die Inflammation nach Beendigung des Zigarettenrauchens weiter fortbestehen kann [Gan *et al.* 2004].

In Anbetracht der Bedeutung der systemischen Aspekte für die Symptomatik der COPD kann der klinische Zustand mittels Lungenfunktion nur unzureichend erfasst werden. Daher sind zur Schweregradeinteilung der COPD weitere Parameter sinnvoll, die diese systemischen Effekte berücksichtigen. Celli *et al.* [2004] beispielsweise publizierte den BODE-Index, der neben der FEV<sub>1</sub> auch den BMI, den 6-Minuten-Gehtest sowie die Ausprägung der Dyspnoe zur Beurteilung des Schweregrades und der Prognose einer COPD heranzieht.

## **2.3 Mögliche pathophysiologische Mechanismen**

### **2.3.1 Klassische Hypothese**

Die COPD ist durch eine entzündliche Reaktion im Bereich der Lunge gekennzeichnet, die zur Atemwegsobstruktion führt und mit einer Zerstörung alveolärer Strukturen einhergehen kann.

Nach gängiger Auffassung führt die Inhalation von Noxen wie beispielsweise Zigarettenrauch zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen, insbesondere neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Diese bewirken eine vermehrte Produktion von Proteasen und Oxidantien, wodurch das Proteasen-Antiproteasen- und das Oxidantien-Antioxidantien-Gleichgewicht verschoben werden. Diese Veränderungen sowie direkte oxidative Komponenten des Zigarettenrauches führen wiederum zu einer chronischen Entzündung, die durch Gewebeerstörung sowie durch Umbau der Atemwege gekennzeichnet ist [MacNee 2005a, Vogelmeier *et al.* 2006, Shapiro & Ingenito 2005].

#### **2.3.1.1 Entzündliche Veränderungen**

Zahlreiche Studien belegen die vermehrte Anwesenheit von Entzündungszellen in den Bronchien, in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) und im induzierten Sputum von Patienten mit COPD [Barnes 2000]. Die Anzahl der Makrophagen ist in der

Atemwegsmucosa, dem Lungenparenchym und der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Patienten mit COPD 5-10fach erhöht [Vogelmeier *et al.* 2006]. Ihnen wird eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Entzündungsreaktion und des Umbaus der Atemwege zugeschrieben [Barnes 2004].

Darüber hinaus ist die vermehrte Zahl neutrophiler Granulozyten in den Atemwegen ein bekanntes Phänomen der COPD, wobei ein Zusammenhang zwischen der Granulozytenzahl und dem Schweregrad der Erkrankung beobachtet wurde [Keatings *et al.* 1996, Richter *et al.* 1999, Loppow *et al.* 2001, Taube *et al.* 2001]. Zu beachten ist, dass die vermehrte Granulozytenzahl nicht spezifisch für die COPD ist, sondern auch bei anderen Erkrankungen der Atemwege wie beispielsweise der cystischen Fibrose [Reinhardt *et al.* 2003], dem mittel- bis schwergradigen Asthma bronchiale [Richter *et al.* 1999] und der idiopathischen Lungenfibrose [Beeh *et al.* 2003] auftritt.

In einer Untersuchung von Hogg *et al.* [2004] analysierten die Autoren mit aufwändigen quantitativen histopathologischen Methoden die kleinen Atemwege von Patienten mit COPD aller Schweregrade, die bei operativen Eingriffen gewonnen wurden. Hierbei war bereits in frühen Krankheitsstadien eine Infiltration der Atemwegsmucosa mit Entzündungszellen nachweisbar. Die Häufung von CD8- und CD4-positiven Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophilen korrelierte mit dem Schweregrad der COPD. Auch im Lungenparenchym konnten erhöhte Zahlen von CD8-positiven Zellen, Neutrophilen und Makrophagen nachgewiesen werden [Retamales *et al.* 2001]. Des Weiteren ist das gehäufte Auftreten von eosinophilen Granulozyten, insbesondere während infektbedingter Exazerbationen bekannt [Saetta *et al.* 1994, Papi *et al.* 2006].

### **2.3.1.2 Proteasen - Antiproteasen**

Basierend auf Beobachtungen bei Patienten mit  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel wurde die Hypothese, dass ein Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht wesentlich zur Entstehung des Lungenemphysems beiträgt, in zahlreichen Studien untersucht. Hierbei wurde insbesondere ein Abbau von Elastin, einem wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix, angenommen. Die bei Rauchern nachgewiesene geringere Aktivität von  $\alpha_1$ -Antitrypsin war jedoch nur vorübergehend und in sehr geringem Ausmaß vorhanden [Abboud *et al.* 1985, Fera *et al.* 1987]. Daher bleibt es letztlich fraglich, ob ein Mangel an  $\alpha_1$ -Antitrypsin über das bekannte Krankheitsbild des hereditären  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangels einen signifikanten Beitrag für die Entstehung eines Lungenemphysems leistet.

Zudem wird eine Beteiligung weiterer Proteasen wie der Elastase sowie der Cysteinproteinase Cathapsin L bei der Emphysementstehung vermutet. Letztere konnte in der BALF von Patienten mit Lungenemphysem in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden [Takeyabu *et al.* 1998]. Interessanterweise ließ sich im Tiermodell durch Installation von Elastase in die Atemwege ein Lungenemphysem induzieren [Harkema *et al.* 1984, Yokoyama *et al.* 1987].

Es besteht ein zunehmendes Interesse an der Rolle der Metalloproteinasen (MMP) bei der Pathogenese des Lungenemphysems. Sie werden unter anderem von Neutrophilen und Alveolarmakrophagen produziert. Erhöhte Konzentrationen von MMP des Typs 1 (Collagenase) und des Typs 9 (Gelatinase B) wurden in der BALF von Patienten mit COPD nachgewiesen [Culpitt *et al.* 1999, Finlay *et al.* 1997]. Im Lungenparenchym von Patienten mit Emphysem fand sich eine erhöhte Aktivität von MMP des Typs 9 [Betsuyaku *et al.* 1999, Ohnishi *et al.* 1998]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Alveolarmakrophagen von Patienten mit COPD eine im Vergleich zu gesunden Rauchern und Nichtrauchern erhöhte Expression von MMP des Typs 9 aufweisen [Russel *et al.* 2002]. Die Beteiligung der MMP bei der Entstehung einer COPD gewinnt zudem an Bedeutung, da ein Mangel an „Tissue inhibitor of metalloproteinases-3“ (TIMP-3) ein progredientes Emphysem bei Mäusen hervorrufen kann [Leco *et al.* 2001].

### **2.3.1.3 Oxidantien - Antioxidantien**

Eine Reihe von Studien weist darauf hin, dass oxidativer Stress an der Entstehung und Unterhaltung einer COPD beteiligt ist. Zigarettenrauch enthält zahlreiche freie Radikale und andere Oxidantien. Hinzu kommen endogen erzeugte oxidative Komponenten aus den bei COPD vermehrt vorhandenen Neutrophilen und Makrophagen. *In-vitro*-Studien haben ergeben, dass Alveolarleukozyten von Rauchern im Vergleich zu denen von Nichtrauchern vermehrt Oxidantien wie  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  bilden [MacNee 2005a]. Hierzu passend konnten in der Ausatemluft von Patienten mit COPD erhöhte Konzentrationen von verschiedenen Markern für oxidativen Stress, unter anderem  $H_2O_2$  und 8-Isoprostan, gemessen werden [Dekhuijzen *et al.* 1996, Montuschi *et al.* 2001].

Verschiedene Wirkmechanismen von oxidativem Stress bei der COPD sind denkbar. Beispielsweise können Oxidantien die Schleimproduktion durch Atemwegsepithelzellen erhöhen.  $H_2O_2$  und HOCl sind in der Lage, in niedriger Konzentration eine signifikante Verschlechterung des Zilienschlages und damit eine reduzierte mukoziliäre Clearance zu

bewirken. Letztlich können diese beiden Faktoren zur Akkumulation von Schleim in den Atemwegen führen [MacNee 2005b].

Des Weiteren wird die pulmonale Entzündung durch Hochregulierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) und AP-1 (activating-protein-1) gefördert. NF- $\kappa$ B, welches Gene für inflammatorische Mediatoren reguliert, kann durch Oxidantien aktiviert werden und die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-8 bewirken. Hierzu passend zeigte sich, dass Atemwegsepithelzellen von Patienten mit COPD mehr Interleukine freisetzen als solche von gesunden Personen [Vogelmeier *et al.* 2006].

Auch das Chromatinremodelling proinflammatorischer Gene kann durch oxidativen Stress beeinflusst werden und somit die Entzündungsreaktion in der Lunge fördern. Normalerweise ist die DNA eng um einen Histonkern gewunden, wodurch eine exzessive Transkription verhindert wird. Histonacetylasen acetylieren Histonreste und führen dadurch zur Ladungsänderung und zum Abspulen der DNA. In dieser Konfiguration können Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B die Genexpression steigern. Diesem Prozess wirken die Histondeacetylasen (HDAC) entgegen. Durch Deacetylierung von Histonresten bewirken sie ein Aufspulen der DNA mit Abschalten der Genexpression. Auch diese Abläufe sind redoxsensitiv. Eine Histonacetylierung wurde nach Exposition von Epithelzellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt nachgewiesen. Diese kann durch das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) verhindert werden, was erneut die Redoxsensitivität dieses Prozesses belegt. In Tiermodellen konnte nach Exposition gegenüber Zigarettenrauch eine Zunahme der Histonacetylierung und Abnahme der HDAC-Aktivität nachgewiesen werden [MacNee 2005b]. Ito *et al.* [2005] fanden eine progrediente Abnahme der HDAC-Aktivität im Lungengewebe von Patienten mit COPD.

#### **2.3.1.4 Apoptose**

Gegenwärtig mehren sich die Hinweise dafür, dass auch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation an der Entstehung der COPD beteiligt sein kann [Demedts *et al.* 2006]. Bei der Analyse emphysematischen Lungengewebes zeigte sich eine vermehrte Apoptose von Endothel- sowie Alveolarepithelzellen [Imai *et al.* 2005]. Andere Studien fanden neben einer erhöhten Apoptose auch eine erhöhte Proliferation von Alveolarzellen bei COPD-Patienten [Yokohori *et al.* 2004]. Allerdings zeigte sich bei Patienten mit weit fortgeschrittenem Emphysem bei  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel keine veränderte Proliferation bei

gesteigerter Apoptoserate von Alveolarepithelzellen [Calabrese *et al.* 2005]. Es wird vermutet, dass der Verlust an Alveolarzellen auf eine durch Zigarettenrauch bedingte Apoptose zurückzuführen ist, die über Blockade des VEGF (vascular endothelial growth factor) vermittelt wird [MacNee 2005a]. Hierfür spricht, dass im Tierexperiment durch Blockade des VEGF-Rezeptors eine Apoptose alveolärer Zellen sowie die Entwicklung eines Emphysems hervorgerufen werden konnte [Kasahara *et al.* 2000]. Des Weiteren wurden im induzierten Sputum von Patienten mit Emphysem umso geringere Spiegel an VEGF nachgewiesen, je höher der Grad der Atemwegsobstruktion bzw. der Grad der Alveolardestruktion war [Kanazawa *et al.* 2003]. Tudor *et al.* [2003] konnten nachweisen, dass oxidativer Stress und Apoptose bei Ratten interagieren und mittels VEGF-Rezeptor-Blockade ein Emphysem verursachen können.

### **2.3.2 Hypothese der vorzeitigen Seneszenz als partielle Ursache des Lungenemphysems**

Die oben genannten Mechanismen zur Entstehung eines Lungenemphysems erscheinen plausibel, jedoch erklären sie nicht, weshalb nur eine Minderheit der Raucher eine klinisch relevante COPD und ein Lungenemphysem entwickeln. Weiterhin ist zu beachten, dass auch andere, mit Oxidantienbelastung einhergehende, chronisch entzündliche Lungenerkrankungen wie beispielsweise die zystische Fibrose nicht gehäuft mit einem Lungenemphysem assoziiert sind. Solche Beobachtungen legen nahe, dass neben oben genannten Faktoren an der Entstehung des Lungenemphysems noch weitere Mechanismen beteiligt sind, von denen es möglicherweise abhängt, ob sich ein Emphysem entwickelt. In diesem Zusammenhang gewinnt die Theorie einer vorzeitigen zellulären Seneszenz zunehmend an Interesse. Derzeit mehren sich die Hinweise, dass dies ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung des Emphysems sein könnte.

#### **2.3.2.1 Klinische Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Altern und Emphysem**

Es ist bekannt, dass chronische Raucher häufig Zeichen einer vorzeitigen Hautalterung aufweisen [Freiman *et al.* 2004]. Beispielsweise entsprach bei 70-jährigen Personen ein Konsum von 30 Zigaretten täglich einer zusätzlichen Hautalterung von ca. 14 Jahren [Leung & Harvey 2002]. Rauchen bewirkt in der Dermis eine Verdickung, Vermehrung und Fragmentierung elastischer Fasern [Frances *et al.* 1991, Just *et al.* 2007], die mit dem Ausmaß des Zigarettenkonsums korreliert. Just *et al.* [2005] beschrieben eine Korrelation zwischen den morphologischen Veränderungen elastischer Fasern und der Einschränkung der

Lungenfunktion bei Rauchern.

Des Weiteren weiß man seit langem, dass auch Nichtraucher in hohem Alter eine Rarefizierung alveolärer Struktur entwickeln, die als Altersemphysem bezeichnet wird [Janssens *et al.* 1999]. Dies wird auf eine Veränderung der extrazellulären Matrix zurückgeführt. Bei normalem Gehalt an Elastin und Kollagen [Lang *et al.* 1994] zeichnet sich die extrazelluläre Matrix durch veränderte mechanische Eigenschaften aus, insbesondere durch eine Abnahme der Vernetzung des Elastins [Walton & Blackwell 1973], was letztlich zur Umorganisation und zu veränderten elastischen Eigenschaften der Lunge führt [Crapo 1993].

Angesichts des beobachteten Zusammenhangs zwischen Zigarettenrauch, Alterung und Emphysem wird vermutet, dass eine vorzeitige Seneszenz bei der Entwicklung des Lungenemphysems eine Rolle spielen kann. Hierzu passend fanden Patel *et al.* [2006] eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Atemwegobstruktion von Patienten mit COPD und der Bildung von Hautfalten im Gesicht. Da auch das Risiko, eine COPD zu entwickeln, mit dem Vorhandensein von Hautfalten korrelierte, schlugen die Autoren sogar vor, dies als Indikator für das Risiko einer COPD zu verwenden.

### **2.3.2.2 Formen der zellulären Seneszenz**

#### Telomerenabhängige replikative oder intrinsische Seneszenz

Das Phänomen der zellulären Seneszenz wurde erstmals 1961 von Hayflick und Moorhead beschrieben [Hayflick & Moorhead 1961]. Unter diesem Begriff der „Zellalterung“ versteht man den terminalen irreversiblen Teilungsstopp von Zellen nach Ausschöpfung einer endlichen Zahl an Zellteilungen. Beispielsweise können humane Fibroblasten *in vitro* ca. 50-70 Zelldivisionen durchlaufen, bevor sie ihre Teilungsfähigkeit dauerhaft verlieren [Serrano & Blasco 2001]. Dieser permanente Zellarrest bewirkt jedoch keinen frühzeitigen Zelltod, sondern führt im Gegenteil in der Regel zu einer relativen Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen und somit zu einem eher langen Überleben der Zelle [Marcotte *et al.* 2004]. Morphologisch zeichnen sich seneszente Zellen durch einen vergrößerten und abgeflachten Zellkörper aus. Des Weiteren kann bei ihnen eine erhöhte Aktivität des gängigen Seneszenzmarkers SA- $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) nachgewiesen werden [Dimri *et al.* 1995, Kurz *et al.* 2000]. Die genannte durch ein limitiertes Teilungspotential der Zelle erreichte Seneszenz wird als replikative oder intrinsische Seneszenz bezeichnet.

Für das Eintreten der replikativen Seneszenz scheint im Wesentlichen eine progressive Verkürzung von Telomeren von Bedeutung zu sein. Telomere sind spezielle Strukturen am Ende der Chromosomen von Eukaryonten, die beim Menschen tandem-repetitive TTAGGG-Sequenzen beinhalten. Sie dienen der Stabilisierung von Chromosomenenden, indem sie diese vor Rekombination und Degradation schützen. Außerdem spielen sie bei der DNA-Replikation eine bedeutende Rolle [Dahse *et al.* 1997, Campisi *et al.* 2001].

Bei der semikonservativen Replikation müssen RNA-Primer an die DNA-Stränge binden, damit die DNA-Polymerase zu jedem der beiden Einzelstränge einen Komplementärstrang bilden kann. Da alle Polymerasen bei Eukaryonten die DNA nur in Richtung 5'-3' synthetisieren können, erfolgt aufgrund der gegenläufigen Anordnung der beiden Stränge die DNA-Synthese auf der einen Seite kontinuierlich, auf der anderen Seite jedoch nur in einzelnen Abschnitten, den sogenannten Okazaki-Fragmenten. Nach Entfernung der Primer werden die Fragmente durch Polymerasen zusammengefügt. Am 5'-Ende des Tochterstranges verbleibt eine Lücke, die nicht aufgefüllt werden kann, da eine freie 3'-DNA fehlt, um einen Primer anzulagern. Auf diese Weise gehen bei jeder Replikation am Ende eines Chromosoms etwa 35-100 Basenpaare verloren, was zu einer sukzessiven Verkürzung des Chromosoms führt. Dies wird als Endreplikationsproblem bezeichnet. Bei Erreichen einer kritischen Mindestlänge verliert die Zelle ihre Fähigkeit zur Zellteilung und geht in einen seneszenten Zustand über. Menschliche Zellen durchlaufen ca. 60-80 Teilungen vor Erreichen dieses sogenannten „Hayflick-Limits“ [z.B. Sherr & DePinho 2000]. Da die Telomer-DNA zumeist nichtkodierende DNA-Sequenzen umfasst, geht bei der Zellteilung keine genetische Information verloren.

Ein Enzym, das der fortschreitenden Verkürzung entgegenwirkt, indem es die Telomere unter Verwendung einer RNA-Matrize rekonstruieren kann, ist die Telomerase. Diese ist jedoch in der Regel vor allem in Keim- und Stammzellen aktiv. In anderen Körperzellen ist ihre Aktivität häufig mit einer malignen Entartung assoziiert.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Telomerenlängen mit zunehmendem Zellalter *in vitro* abnehmen [Allsopp *et al.* 1992, Chang & Harley 1995]. Wenngleich die Bedeutung der zellulären Seneszenz für das Altern eines Organismus noch nicht geklärt ist, konnten interessanterweise auch *in vivo* für verschiedene Gewebe (Kolonmukosa, Haut, weiße Blutzellen, Niere, Leber) eine Verkürzung der Telomeren mit zunehmendem Lebensalter nachgewiesen werden [Hastie *et al.* 1990, Allsopp *et al.* 1992, Vaziri *et al.* 1993, Melk *et al.* 2000, Aikata *et al.* 2000]. Hierbei ist zu beachten, dass sowohl in verschiedenen

Organen einer Person als auch interindividuell bei gleichem Alter eine große Variabilität der Telomerenlängen vorliegt [Friedrich *et al.* 2000]. Beim Menschen scheinen genetische Unterschiede [Slagboom *et al.* 1994, Bischoff *et al.* 2005a] inklusive des Geschlechts [Bischoff *et al.* 2005b] bis hin zu Unterschieden des Lebensstils und psychischen Stressfaktoren [Epel *et al.* 2004] eine Rolle zu spielen. Anhand von Hautzellen wurde vielfach versucht, eine Assoziation zwischen Telomerenlänge und Lebensalter zu eruieren [z.B. Lindsey *et al.* 1991 Friedrich *et al.* 2000, Nakamura *et al.* 2002]. Neuere, an Primaten gewonnene Daten, weisen darauf hin, dass Zellen der Haut prinzipiell für die Bestimmung des Grades der Seneszenz eines Organismus geeignet sind [Herbig *et al.* 2006].

Bei der replikativen Seneszenz tritt der Proliferationsstopp in der G1-Phase des Zellzyklus auf. Für die Vermittlung der Seneszenz scheint die Aktivierung von Inhibitoren der cyclin-dependent kinases (CDK) wie p53, p16<sup>ink4a</sup> und p21<sup>CIP1/WAF1/Sdi1</sup> wesentlich zu sein, was schließlich zur Hypophosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb) führt.

Das Endreplikationsproblem stellt nicht den einzigen Faktor dar, der zur Verkürzung von Telomeren führt. Auch die Einwirkung freier Radikale kann die Telomere schädigen und zu Einzelstrangbrüchen führen. Offensichtlich erfolgt der Telomerenverlust durch Oxidantien vorzugsweise während der Mitose [Chen *et al.* 2001]. Unklar ist, inwieweit dieser Effekt auch unabhängig von der Zellteilung auftritt.

### Stress-induzierte Seneszenz

Eine zelluläre Seneszenz lässt sich auch telomerunabhängig bei juvenilen Zellen unter Einwirkung von Stressoren vorzeitig induzieren. Dieses als „Stress-induzierte Seneszenz“ bezeichnete Phänomen kann beispielsweise durch aktivierte Onkogene, reaktive Sauerstoffspezies oder DNA-Schädigung ausgelöst werden [Campisi 2005]. *In-vitro*-Experimente haben mehrfach gezeigt, dass Oxidantien wie beispielsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Seneszenz bei Fibroblasten auslösen können, die nicht mit einer Verkürzung von Telomeren einhergehen muss. An der Vermittlung dieser Effekte scheint insbesondere p16<sup>INK4a</sup> im Zusammenspiel mit dem Retinoblastoma-Protein (Rb) eine zentrale Rolle zu spielen. Angesichts des oxidativen Stresses, den Entzündungszellen bei der COPD verursachen, könnte diese Form der Seneszenz beim Emphysem wie bei anderen chronischen Erkrankungen eine zentrale Rolle spielen.



### **2.3.2.3 Zelluläre Seneszenz als Faktor bei Organerkrankungen**

Anzeichen einer zellulären Seneszenz wurden bei verschiedenen Erkrankungen beschrieben und als eventueller kausaler Faktor bei deren Pathogenese diskutiert. So konnte in Nieren mit chronischer Allograft-Nephropathie eine erhöhte Anzahl seneszenten Zellen mittels SA- $\beta$ -Gal nachgewiesen werden, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte [Ferlicot *et al.* 2003]. Bei Patienten mit Leberzirrhose fanden sich in den Hepatozyten verkürzte Telomeren und eine erhöhte SA- $\beta$ -Gal-Aktivität als Zeichen einer zellulären Seneszenz, was mit dem Grad der Zirrhose assoziiert war [Wiemann *et al.* 2002]. Auch in atherosklerotischen Läsionen der Koronararterien konnte insbesondere im Bereich des Endothels eine erhöhte Anzahl seneszenten Zellen nachgewiesen werden. Fortgeschrittene Atherosklerose-Plaques wiesen zudem in den glatten Muskelzellen der Intima eine vermehrte SA- $\beta$ -Gal-Aktivität auf [Minanimo *et al.* 2004, Erusalimsky & Kurz 2005].

### **2.3.2.4 Hinweise für Seneszenz als partielle Ursache der COPD *in vitro* und *in vivo***

Rauchen ist der größte Risikofaktor für das Entstehen einer COPD. Angesichts der Hypothese einer vorzeitigen Alterung als partielle Ursache des Lungenemphysems stellt sich die Frage, ob Rauchen eine zelluläre Seneszenz auslösen kann. In der Tat zeigten menschliche Lungenfibroblasten *in vitro* bei dauerhafter sowie temporärer Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE) eine dosisabhängige Abnahme der Proliferationsrate. Hierbei wurde bei den gegenüber CSE exponierten Zellen vermehrt der Seneszenzmarker SA- $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen [Jörres *et al.* 2005]. Ähnliche Ergebnisse fanden Nyunoya *et al.* [2006] an einer menschlichen Fibroblastenzelllinie. Hierbei konnte nach Exposition gegenüber CSE neben einem vermehrten Nachweis von SA- $\beta$ -Galaktosidase auch eine verstärkte Expression von p16 und p21 als weitere Seneszenzmarker gemessen werden. Auch bei humanen Alveolarepithelzellen *in vitro* und bei Alveolarzellen der Maus *in vivo* induzierte Zigarettenrauch eine zelluläre Seneszenz mit Anstieg der Seneszenzmarker SA- $\beta$ -Galaktosidase und p21<sup>Cip1/WAF1/Sdi1</sup> [Tsuji *et al.* 2004].

Mehrfach wurde emphysematisches Lungengewebe bezüglich Hinweisen auf eine zelluläre Seneszenz untersucht. Hierbei konnte zunächst gezeigt werden, dass Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem im Gegensatz zu Zellen von lungengesunden Personen *in vitro* eine geringere Proliferationsrate als einfachster Marker einer zellulären Seneszenz aufweisen [Holz *et al.* 2004]. Zudem färben sich Lungenfibroblasten von Emphysem-Patienten im Vergleich zu gesunden Rauchern vermehrt für den Seneszenzmarker SA- $\beta$ -Galaktosidase an

[Müller *et al.* 2006]. Weitere Evidenz für das Vorhandensein zellulärer Seneszenz beim Lungenemphysem liefern die Beobachtungen von Tsuji *et al.* [2006], die in humanem emphysematischem Gewebe bei Alveolarzellen des Typ II und bei Endothelzellen eine erhöhte Expression der Seneszenzmarker p16<sup>INK4a</sup> und p21<sup>Cip1/WAF1/Sdi1</sup> nachwiesen, die mit dem Grad der Atemwegsobstruktion korrelierte.

Die Hypothese, dass die Telomerenverkürzung eine Ursache für ein durch Rauchen induziertes Lungenemphysem darstellt, erscheint plausibel angesichts der Tatsache, dass unter Einwirkung von oxidativem Stress wie etwa Zigarettenrauch vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche mit konsekutiver Telomerenverkürzung auftreten können. Zudem ließe sich die variable Suszeptibilität gegenüber der Entstehung eines durch Lebensalter oder toxisch induzierten Emphysems durch die interindividuell sehr unterschiedliche Telomerenlänge erklären. In der Tat war die Telomerenlänge in Alveolarzellen des Typ II sowie in Endothelzellen aus Lungengewebe von Emphysempatienten *in situ* kürzer als bei den Kontrollpersonen [Tsuji *et al.* 2006].

Im Gegensatz hierzu fanden sich in Kulturen von Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem trotz positiver Marker einer zellulären Seneszenz keine wesentlichen Unterschiede der Telomerenlängen im Vergleich zu Kontrollpersonen [Müller *et al.* 2006]. Angesichts dieser Ergebnisse ist die Telomeren-Verkürzung zwar eine plausible Erklärung, kann jedoch zumindest die bei Fibroblasten induzierte Proliferationsreduktion nur unzureichend erklären. Bezüglich methodologischer Aspekte wäre auch denkbar, dass die widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse Ausdruck von verschiedenen Mechanismen bei Zellen in histologischen Lungenparenchymschnitten und in Kultur angezogenen Zellen sind. Mag die zelluläre Seneszenz in diesem Rahmen zunächst als primär organspezifisches Problem erscheinen, so verweisen die Beziehungen zwischen Seneszenz bzw. Langlebigkeit und Metabolismus bzw. Körpergewicht auf den möglichen Einfluss weiterer Faktoren und Zelltypen, darunter Adipozyten, die Gegenstand dieser Untersuchung sind.

## **2.4 Zusammenhang zwischen Körpergewicht, Adipozyten und Lungenemphysem**

### **2.4.1 Die Rolle des Körpergewichts beim Lungenemphysem**

Wie bereits oben erwähnt weisen Patienten mit COPD und insbesondere solche mit

Lungenemphysem häufig einen kachektischen Habitus auf, was im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse ist (siehe 2.2.1). Die Prävalenz eines klinisch relevanten Untergewichtes beträgt bei leicht- bis mittelgradiger COPD 10-15 % und bei fortgeschrittener Erkrankung ca. 50 % [Decramer *et al.* 2005]. Des Weiteren ist eine Gewichtsabnahme bei Patienten mit COPD mit einer erhöhten Mortalität assoziiert [Prescott *et al.* 2002]. Die Auswertung von Daten der Copenhagen City Heart Studie ergab eine Korrelation zwischen dem Grad der Gewichtsabnahme und dem Schweregrad der COPD. Nach 5 Jahren wiesen 30 % der untersuchten Patienten mit schwergradiger COPD eine Gewichtsabnahme von mindestens 1 Einheit BMI auf. Gewichtsreduktion wiederum ging in der Studie allgemein mit einer erhöhten Mortalität einher [Prescott *et al.* 2002]. Chailleux *et al.* [2003] fanden bei Patienten mit COPD und Heimsauerstofftherapie eine positive Korrelation des BMI mit der FEV<sub>1</sub> sowie mit der 5-Jahres-Überlebensrate. Des Weiteren erwies sich in dieser Studie ein niedriger BMI als Prediktor für die Dauer und Häufigkeit von Krankenhausaufenthalten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass normalgewichtige Raucher gegenüber solchen mit leichtgradigem Übergewicht ein nahezu dreimal so hohes Risiko aufweisen, eine COPD zu entwickeln [Harik-Khan *et al.* 2002].

Bei Patienten mit COPD kommt es im Rahmen des Gewichtsverlustes sowohl zur Abnahme von Fettgewebe als auch in noch größerem Ausmaß zur Reduktion von fettfreier Masse [Ischaki *et al.* 2007]. Letztere war dem BMI als Prediktor für die Mortalität in mehreren Studien überlegen. Als Ursache für den Gewichtsverlust bei COPD werden unter anderem ein erhöhter Grundumsatz, vermehrte Atemarbeit, Medikamente sowie die systemische Inflammation vermutet [Agustí 2005, Budweiser *et al.* 2008].

Die genannten Daten weisen in die Richtung, dass ein Lungenemphysem häufig mit einem erniedrigten Körpergewicht assoziiert ist und dass ein Untergewicht bzw. normales Körpergewicht im Vergleich zum Übergewicht die Entstehung und Progredienz der Erkrankung fördern kann.

#### **2.4.2 Wirkungen kalorischer Restriktion**

Es ist seit langem bekannt, dass eine kalorische Restriktion im Sinne einer verminderten Nahrungsaufnahme ohne Mangelernährung bei Maus und Ratte zu emphysemartigen Veränderungen der Lunge führt [Sahebajami & Wirman 1981, Massaro & Massaro 2004, Massaro *et al.* 2004]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen weisen auch Patienten mit Anorexia nervosa eine emphysemähnliche Rarefizierung des Lungengewebes auf [Cook *et al.*

2001, Coxson *et al.* 2004]. Bemerkenswerterweise bildeten sich die durch kalorische Restriktion induzierten emphysemartigen Veränderungen bei Mäusen nach vermehrter Nahrungszufuhr wieder zurück [Massaro *et al.* 2007]. Diese Beobachtungen weisen in die Richtung, dass die Entwicklung eines Emphysems beim Menschen durch systemische Eingriffe induziert oder begünstigt werden kann. Insgesamt sprechen diese Daten dafür, dass ein reduziertes Körpergewicht nicht nur Folge eines Emphysems sondern auch treibender Faktor für dessen Entwicklung und Progression sein kann.

Neben der Entwicklung emphysemartiger Veränderungen vermag eine kalorische Restriktion auch die Lebensspanne zahlreicher Organismen zu verlängern [Heilbronn & Ravussin 2003]. Hierbei korreliert die Lebensverlängerung mit dem Grad der kalorischen Restriktion [Merry 2002]. Dieser Effekt auf die Lebenszeit scheint auch beim Primaten vorhanden zu sein [Roberts *et al.* 2001, Lane *et al.* 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass dieser erhöhten Lebensdauer eine reduzierte zelluläre Teilungsbereitschaft und entsprechend ein veränderter Umsatz von Energiereserven zugrunde liegt [Hsieh *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2000]. Inwieweit diese Daten auf den Menschen übertragbar sind, ist derzeit unklar.

Mit der kalorischen Restriktion gehen metabolische Änderungen im Sinne eines Hungerzustandes und einer Langlebigkeit einher. Die Genexpression ist hierbei entgegengesetzt der bei der Alterung vorhandenen Genexpression [Lee *et al.* 1999]. In die Antwort auf die kalorische Restriktion und die Vermittlung der Langlebigkeit ist der gesamte Organismus miteinbezogen, jedoch sind Adipozyten hierbei von besonderer Bedeutung. Dies verdeutlicht die Beobachtung, dass Mäuse mit einem reduzierten Anteil an weißem Fettgewebe auch ohne kalorische Restriktion eine längere Lebenszeit aufweisen [Blüher *et al.* 2003].

Ebenso bewirkt das Rauchen als Hauptursache der COPD Änderungen des Körpergewichts und des Stoffwechsels. Dies wird im Wesentlichen über die Wirkung neuroendokriner Faktoren, insbesondere durch Neuropeptid Y (NPY) erklärt [Li *et al.* 2000]. Nach Beendigung des Rauchens kommt es zu einer Zunahme des Körpergewichts, die im Wesentlichen auf einer Zunahme der Fettmasse beruht [Filozof *et al.* 2004]. Dieser Effekt wird einem verminderten Grundumsatz, geringer körperlicher Aktivität sowie einer vermehrten Nahrungszufuhr zugeschrieben.

Wasserlösliche Bestandteile des Zigarettenrauches können über die Zirkulation in verschiedene Organe gelangen und dort die Entstehung von Krankheiten wie beispielsweise die Atherosklerose begünstigen. Prinzipiell ist es daher denkbar, dass auch Fettgewebe über

diesen Weg durch Zigarettenrauch in seiner Funktion beeinträchtigt werden kann. Somit scheint es plausibel, dass Komponenten des Zigarettenrauchs auch direkte Effekte auf Adipozyten ausüben können. Da ein niedriges Körpergewicht wie oben beschrieben begünstigend auf die Entwicklung einer COPD wirkt, wäre dies ein möglicher Mechanismus, über systemische Effekte die Entstehung und den Verlauf einer COPD zu beeinflussen.

Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 1 die hier behandelten Einflussfaktoren bei der Pathogenese des Lungenemphysems unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen Rolle von Adipozyten skizziert.

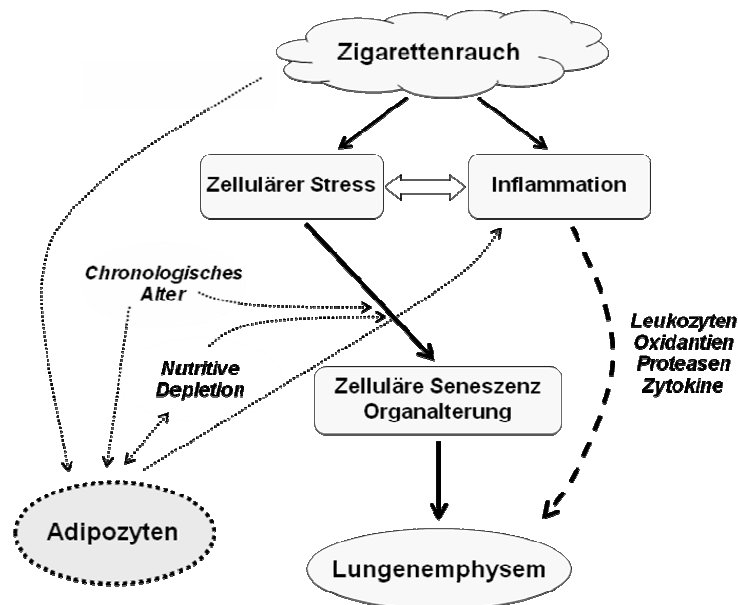


Abbildung 1: Schema zentraler Faktoren bei der Pathogenese des Lungenemphysems und die mögliche Rolle von Adipozyten im Krankheitsprozess; erweitert nach Karrasch *et al.* [2008].

### **3. Ziel der Arbeit**

Angesichts der Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Rauchen, COPD und Adipozyten (siehe 2.4) wird in dieser Arbeit untersucht, ob die Exposition von Präadipozyten gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE) *in vitro* Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Funktion dieser Zellen ausübt.

Für die Versuche wurde eine Präadipozytenzelllinie der Maus (3T3-L1) verwendet, welche ein viel untersuchtes Zellmodell für die Präadipozytendifferenzierung darstellt. Nach Anzucht der Zellen wurde die Differenzierung 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz durch Zugabe eines Differenzierungscocktails aus Insulin, Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Dexamethason eingeleitet. Drei Stunden nach Beginn der Differenzierung wurden die Zellen mit 5 % CSE benetzt. Zu den als Kontrolle dienenden Zellen wurde in analoger Weise Kulturmedium gegeben. Um zu prüfen, ob direkte Auswirkungen von CSE auf die Präadipozyten prinzipiell möglich sind, wurden die Zellen einer dauerhaften Exposition ausgesetzt. Jeweils in Doppelbestimmung erfolgten in beiden Versuchsarmen Messungen der Zellzahl, des Lipidgehaltes, der Aktivität der Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH) als Adipozyten-spezifisches Enzym sowie des Proteingehaltes.

Mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Effekt hat die Exposition gegenüber CSE auf die Proliferation von Präadipozyten bzw. Adipozyten?
- Welchen Effekt hat die Exposition gegenüber CSE auf die Lipideinlagerung in Adipozyten?
- Welchen Effekt hat die Exposition gegenüber CSE auf die Aktivität der GPDH, einem Enzym der Fettsäuresynthese und einem Marker der Präadipozytendifferenzierung?
- Welchen Effekt hat die Exposition gegenüber CSE auf den Proteingehalt von Präadipozyten bzw. Adipozyten?

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Material**

#### **Chemikalien**

β-Mercaptoethanol (Fluka)

β-Nicotinamide Adenine Dinucleotid (NADH, Sigma)

Bovine serum albumin (Albumin Fraktion V, Roth)

Desinfektionslösung (Bacillol, Bode)

Dexamethason (Sigma)

Dihydroxyacetonphosphate (Fluka)

Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (ATCC)

Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose (Gibco)

Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS, Gibco)

EDTA (Merck)

Eindeckmittel (Aquatex, Merck)

Fibronektin (Fibronectin from human plasma 0,1 % solution, Sigma)

Formalin (10 %, Roti-Histofix, Roth)

Fötale Rinderserum (Fetal calf serum (FCS), Gibco)

Gentamycin (Gibco)

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity assay kit (TaKaRa)

Hände-Desinfektionsmittel (Sterillium, Bode)

Hanks balanced salt solution (HBSS, Gibco)

Insulin solution human (10 mg/ml, Sigma)

3-Isobutyl-1-methylxanthine (IMBX, Sigma)

Isopropanol (Merck)

Oil Red O (Sigma)

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Gibco)

Roti Nanoquant Konzentrat (Roth)

Serum neugeborener Kälber (Newborn calf serum (NCS), Biochrom AG Seromed)

Steriles Wasser (Aqua ad injectabilia, Braun)

Triäthanolamin (Sigma)

Tris (Sigma)

Trypanblau – Lösung (Fluka)

Trypsin-EDTA (Gibco)

### **Geräte**

Absaugpumpe (Laboport-Membran-Vakuumpumpe N86KN18, Roth)

Brenner (Gasprofi 1 SCS, Wild-Tec)

Brutschrank (BB 6060, Heraeus; sowie CB 210, Binder GmbH)

Digitalkamera (Canon PowerShot A95)

Gaschromatograph (Trace GC, Thermo Electron Corporation)

Lichtmikroskop (Leitz Labor Luxs Typ 020505030, Leica)

Modifiziertes inverses Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss AG)

Photometer (UV-1602, Shimadzu; sowie LP 700, Dr. Lange)

Sterile Werkbank (BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH)

Vortexer (MS1 Minishaker, IKA)

Wasserbad und Pumpe (M12, Lauda)

Waage (H54AR, Mettler)

Zellzählgerät (Ferrari)

Zentrifuge (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, sowie Labofuge 400, Function Line, Heraeus)

### **Sonstige Materialien**

Deckglas (Cover Glass, VWR International)

Einkanalpipetten (Eppendorf Reference, variables Volumen)

Einwegküvette (UV-Küvette mikro, Brand)

Filter (Filtropur S 0,2, Sarstedt)

Kulturflaschen (TC 75, Sarstedt)

Kryoröhrchen (Cryovial sterile 2 mL, Simport Quebec)

Latexhandschuhe (powder-free, Semper carl edition)

Neubauer Zählkammer (Neubauer improved, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>)

Objektträger (76 × 26 mm, Menzel-Gläser)

Pasteur-Pipetten (Brand)

Pipettenspitzen (Filterspitzen Typ M (1250 µL) und Typ A (100 µL), Sarstedt; Multi Guard

Barrier Tips (1-10 µL), Sorenson BioScience; Aerosol pipet tips with high recovery filter/wide orifice (200µL), VWR International)



Plättchen (Tissue Culture Coverslips 13 mm, Sarstedt)

Präadipozyten der Maus (3T3-L1 Embryo Fibroblasts Mouse, Bezugsquelle ATCC, Product CL-173, CCL-92.1)

Röhrchen (15 mL, 50 mL, Sarstedt)

Serologische Pipetten (2mL, 5mL, 10 mL, 25 mL, Sarstedt)

Sterile Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm, Sarstedt)

Transferpipetten (3,5 mL, Sarstedt)

Vacuum Driven Disposable Filtration System Stericup, Millipore

Waschflasche (Impinger, DEHA Haan & Wittmer GmbH)

24-Well-Platten (Sarstedt)

Zellspachtel (TPP)

Zigaretten (Gauloise Blondes)

## **4.2 Gewinnung des Zigarettenrauchextrakts**

Um die Auswirkungen des Rauchens auf Strukturzellen zu bestimmen, wurde ein Modell der Exposition von Zellkulturen gegenüber Zigarettenrauch (CSE = cigarette smoke extract) etabliert. Dabei wurde in einem standardisierten Verfahren Zigarettenrauch in ein Kulturmedium aufgenommen, so dass hauptsächlich die wasserlöslichen Bestandteile des Zigarettenrauches gewonnen wurden. Um Schwankungen der Nikotinkonzentration auszuschließen, wurde diese mittels Gaschromatographie (Trace GC, Thermo Electron Corporation) bestimmt. Die Messung wurde zugleich als Grundlage der Definition der Nikotinkonzentration für die Vergleichsexperimente verwendet.

### **4.2.1 Abrauchen der Zigaretten**

Um den Zigarettenrauchextrakt zu gewinnen, wurden Zigaretten mit Hilfe einer motorbetriebenen Probennahmepumpe oder einer Wasserstrahlpumpe unter einem Abzug abgeraucht. Der hierbei innerhalb von 5 Minuten entstehende Hauptstromrauch wurde durch einen kurzen Schlauch geleitet und mittels einer Waschflasche (Impinger, DEHA Haan & Wittmer GmbH) mit Fritte in 10 mL D-MEM-Kulturmedium (low glucose, Gibco) aufgenommen (siehe Abb. 2). Die Waschflasche, die seitens des Herstellers speziell für eine derartige Probennahme konstruiert wurde, war mit 30 mL D-MEM gefüllt, was das aufeinander folgende Abrauchen von 3 Zigaretten erlaubte. Die Absaugrate war so eingestellt, dass in 5 Minuten die Zigarette bis kurz vor Beginn des Filters abgeraucht wurde. Bei diesem

Verfahren entwich Nebenstrom des erzeugten Zigarettenrauchs in den Abzug, so dass nicht der gesamte entstandene Rauch in das Kulturmedium aufgenommen wurde. Im Anschluss an den Abrauchvorgang wurde die Fritte mittels eines trockenen Tuches von den entstandenen Teerablagerungen gereinigt, um ein Verstopfen zu verhindern.

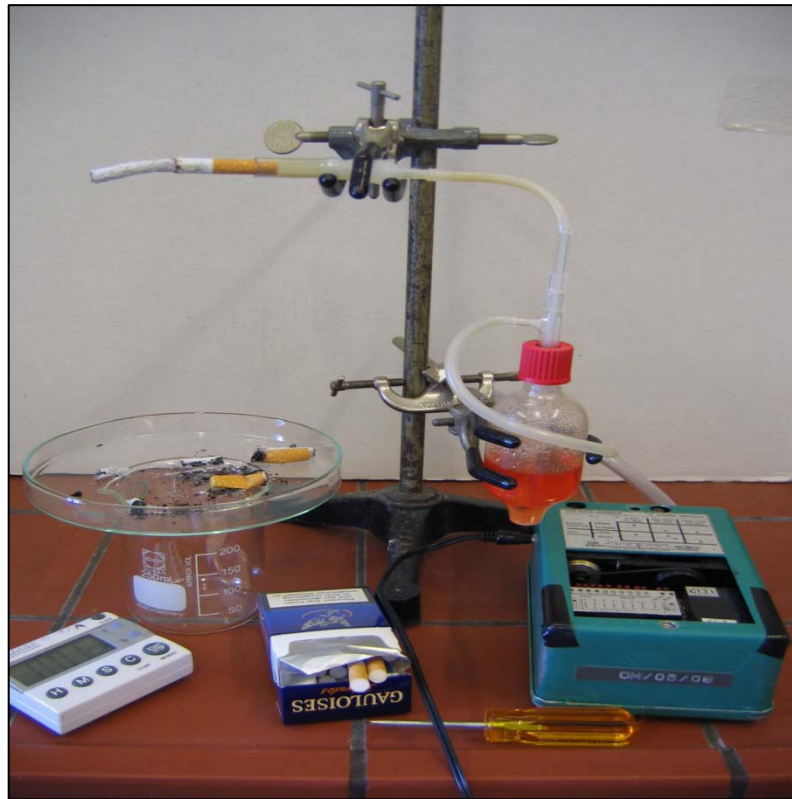


Abbildung 2: Aufbau des Versuchs zum standardisierten Abrauchen der Zigaretten. Zu sehen sind die Saugpumpe, Waschflasche (Impinger) und das kurz gehaltene Schlauchsystem zwischen Zigarette und der Impinger.

Um so weit wie möglich realitätsnahe Bedingungen zu erzeugen, wurden - im Unterschied zu anderen in der Literatur beschriebenen Versuchen - Zigaretten mit Filter eingesetzt. Da Filter die Zusammensetzung des Rauchs verändern, indem sie hoch siedende (vorwiegend kanzerogene) Bestandteile absorbieren, verblieben die Filter auch beim Abrauchen auf den Zigaretten. Dadurch wurde verhindert, dass Substanzen des Zigarettenrauchs, die beim üblichen Rauchen relativ zum Gesamtrauch teilweise ausgefiltert werden, im gelösten Medium überrepräsentiert waren. Um die Bedingungen weiter realitätsnah zu halten, wurden außerdem bei allen Versuchen handelsübliche Zigaretten der Marke Gauloise Blondes (nominell Teer 10 mg, Nikotin 0,8 mg) verwendet. Diese haben im Gegensatz zu den sonst häufig eingesetzten Kentucky-Referenzzigaretten einen höheren Teer- bzw. Nikotingehalt.

Aus methodologischen Gesichtspunkten wurde insbesondere auf die Reproduzierbarkeit

der Extraktzusammensetzung großen Wert gelegt. Mittels regelmäßiger Messungen des Nikotingehaltes wurde die Standardisierung sichergestellt. Die gemessenen Nikotinkonzentrationen im CSE betrugen zwischen 132 und 200 µg/mL und lagen im Mittel bei 168 µg/mL. Wiederholungsmessungen ergaben einen Variationskoeffizienten der Nikotinbestimmung von 8-10 %.

#### **4.2.2 Verarbeitung des Zigarettenrauchextrakts**

Nach Gewinnung des in D-MEM aufgenommenen Zigarettenrauchextrakts wurde dieser steril filtriert (sterile 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter oder alternativ Vacuum Driven Disposable Filtration System Stericup, Millipore) und anschließend in Aliquots bei -32°C gelagert. Alle Expositionen wurden mit wieder aufgetautem Zigarettenrauchextrakt durchgeführt. Dies erfolgte unter der Annahme, dass Aliquots, die aus der Zusammenfassung einer größeren Probe von Zigaretten (>15) erzeugt wurden, geringere Schwankungen aufweisen, als dies beim Abrauchen einzelner Zigaretten und Verwendung nativer Rauchproben der Fall gewesen wäre. Des Weiteren hätte die Gewinnung des Zigarettenrauchs bei jedem einzelnen Versuch einen deutlichen zusätzlichen experimentellen Aufwand bedeutet. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass keine Unterschiede zwischen eingefrorenem und nativem Zigarettenrauchextrakt in Bezug auf den Nikotingehalt und die Wirkung auf das Wachstum von Lungenfibroblasten bestanden. Der nach dem beschriebenen Verfahren gewonnene Zigarettenrauchextrakt wurde als Stammlösung der Konzentration 100 % definiert.

### **4.3 Zellkultur und Exposition**

#### **4.3.1 Zellkulturbedingungen**

Die Präadipozyten der Maus (3T3-L1 Embryo Fibroblasts Mouse, Bezugsquelle: American Type Culture Collection (ATCC), Product CL-173 (CCL-92.1)) wurden im Brutschrank (BB 6060, Heraeus sowie CB 210, Binder GmbH) unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) angezogen. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, war der Boden des Brutschrankes mit 3-4 L sterilem Wasser gefüllt. Als Kulturmedium wurde das für diesen Zelltyp empfohlene D-MEM mit hohem (4500 mg/L) Glukose-Gehalt (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ATCC) verwendet, welchem zusätzlich 10 % Serum neugeborener Kälber (Newborn calf serum [NCS], Biochrom AG Seromed) sowie die Antibiotika Streptomycin,

Gentamycin und Penicillin beigefügt wurden. Ab der Zugabe des Differenzierungscocktails wurde das Kulturmedium mit fötalem Rinderserum (Fetal calf serum (FCS), Gibco) anstatt des NCS versetzt. Alle 2-3 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt.

Die Arbeit mit den Zellkulturen erfolgte zumeist unter der sterilen Werkbank (BDK, Luft und Reinraumtechnik GmbH). Es wurden nur sterile und / oder pyrogenfrei gekennzeichnete Einmalartikel oder autoklavierte Geräte verwendet. Die Arbeit unter der sterilen Werkbank wurde erst nach einer Vorlaufzeit von mindestens einer halben Stunde begonnen. Vor, zwischen und nach der Arbeit wurde die Arbeitsfläche per Wischdesinfektion mit Bacillol gereinigt. Ebenso wurden alle Gefäße und Geräte vor Verwendung unter der sterilen Werkbank gründlich desinfiziert. Vor der Arbeit mit den Zellkulturen erfolgte eine ausführliche Händedesinfektion, auch die während der sterilen Arbeit getragenen Latexhandschuhe wurden zuvor mit Sterillium desinfiziert.

#### **4.3.2 Anzucht der Zellen und Mediumwechsel**

Die Anlieferung der Präadipozyten der Maus erfolgte im kryokonservierten Zustand. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in eine Kulturflasche (TC75, Sarstedt) gegeben, welche bereits 9 mL des auf 37°C vorgewärmten NCS-Kulturmediums enthielt. Im Folgenden wurden die Zellen im Brutschrank unter oben beschriebenen Kulturbedingungen (siehe 4.3.1) angezogen, wobei das Kulturmedium in der Regel montags, mittwochs und freitags gewechselt wurde. Hierzu wurde das Medium mittels einer vorher abgeflamnten Pasteur-Pipette (Brand) aus der Kulturflasche abgesaugt und frisches NCS-Kulturmedium (montags und mittwochs 9 mL, freitags 12 mL) mittels einer serologischen Pipette (Sarstedt) in die Kulturflasche gegeben. Anschließend wurden der Flaschenhals sowie die Kappe kurz abgeflamnt, die Flasche verschlossen und in den Brutschrank gegeben. Dort wurde die Kappe auf halboffen gestellt, um einen guten Gasaustausch zu ermöglichen.

#### **4.3.3 Passagieren der Zellen**

Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 5-6 Tage bei 60-80 % Konfluenz. Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums und dreimaligem Waschen mit je 3 mL HBSS (Hanks balanced salt solution, Gibco) mit 3 mL Trypsin-EDTA (Gibco) für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, so dass sie sich durch leichtes Klopfen ablösen ließen. Durch Zugabe

von 3 mL NCS-haltigen Kulturmediums wurde die Trypsinisierung gestoppt. Nach dem Zentrifugieren der Zellen (Raumtemperatur, 8 Minuten, 1400 Upm, Labofuge 400, Function Line, Heraeus) wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment in NCS-haltigem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellen erneut in Kulturflaschen (TC75, Sarstedt, 20.000 Zellen/Kulturflasche in je 9 mL NCS-Medium) oder für den Versuchsansatz in 24-Loch-Platten (Sarstedt, 20.000 Zellen/Well in je 500 µL NCS-Medium) ausgesät. Die nicht benötigten Zellen wurden eingefroren und in Flüssigstickstoff aufbewahrt (siehe 4.3.4).

#### **4.3.4 Kryokonservierung der Zellen**

Für die Aufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden sie wie oben beschrieben trypsinisiert, zentrifugiert und in NCS-haltigem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden sie unter Zugabe von 10 % DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma) auf Kryoröhrchen im Eisbett verteilt. In Alufolie und einem Luftpolsterumschlag verpackt erfolgte eine Abkühlung im Gefrierschrank auf minus 32°C. Am folgenden Tag wurden die Zellen in die Gasphase des Flüssigstickstoffes überführt, wo sie für mindestens 24 Stunden gelagert wurden. Anschließend erfolgte eine dauerhafte Konservierung in der Flüssigphase des Stickstoffes.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Flüssigstickstoff entnommen und bei 37°C erwärmt. Nach Erreichen der flüssigen Phase wurden sie umgehend mit vorgewärmtem NCS-Kulturmedium (37°C) versetzt, in 15 mL Röhrchen (Sarstedt) überführt, zentrifugiert (Raumtemperatur, 5 Minuten, 1300 Upm, Labofuge 400, Function Line, Heraeus) und nach Absaugen des Kryokonservierungsmediums erneut in NCS-Kulturmedium resuspendiert. Die weitere Anzucht erfolgte wie oben beschrieben in Kulturflaschen (TC 75) im Brutschrank.

#### **4.3.5 Versuchsansatz in 24-Loch-Platten**

Die Versuche wurden in 24-Loch-Platten (Sarstedt) durchgeführt. Randeffekte konnten durch eine geeignete Belegung der Platten mit parallelen Ansätzen verhindert werden. Pro Versuchstag wurde eine separate Platte verwendet. Insgesamt wurden je Platte 12 Wells zur Auswertung benötigt. Hiervon dienten je 4 Wells für die Bestimmung der Lipidmenge, der GPDH-Aktivität/Proteinmenge sowie für die Zellzählung (je 2 Kontroll- und 2 CSE-Wells für die Doppelbestimmung). Jedoch wurden zur Sicherheit zusätzliche Wells mit Zellen belegt, da es gelegentlich zur Beschädigung bzw. Ablösung des Zellrasens sowie zum Pilzbefall kam

und die entsprechenden Wells nicht mehr zur Versuchsauswertung zur Verfügung standen. Zur Bestimmung der Lipidmenge mittels Bildauswertung (siehe 4.4.2) wurden vor Aussaat der Zellen mindestens 4 Wells jeder 24-Loch-Platte mit Hilfe einer sterilen Pinzette mit kleinen Plättchen (Tissue Culture Coverslips 13 mm, Sarstedt) belegt.

Initial wurden ca. 20.000 Zellen pro Well in je 500  $\mu$ L NCS-Kulturmedium eingesät. In der Regel wurden die Kulturen nach 5-6 Tagen konfluent und wurden währenddessen einmalig mit zusätzlichen 500  $\mu$ L Kulturmedium plus 10 % NCS versorgt. Die Einleitung der Differenzierung sowie die erste Auswertung erfolgten 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz und somit in der Regel an Tag 7-8 nach Einsäen der Zellen.

#### **4.3.6 Differenzierung der Zellen**

Die Differenzierung wurde mittels Gabe von Isobutylmethylxanthin (IMBX, Sigma), Dexamethason (Sigma) and Insulin (Sigma) eingeleitet, sobald die Kulturen über 2 Tage konfluent waren. Von diesem Zeitpunkt an wurde das Kulturmedium mit 10 % FCS (Fetal calf serum, Gibco) anstelle des NCS versetzt. Die Endkonzentrationen im Differenzierungscocktail lagen bei 0,5 mM IMBX, 1  $\mu$ M Dexamethason und 10 $\mu$ g/mL Insulin. Da vor Zugabe des Cocktails noch 500  $\mu$ L Medium pro Well verblieben und 3 Stunden später in jedes Well noch 500  $\mu$ L CSE-Lösung bzw. Kontrollösung hinzugefügt wurden, das Endvolumen jedoch kapazitätsbedingt nicht mehr als 2 mL pro Well betragen konnte, wurde der Cocktail in doppelter Konzentration angesetzt und auf die Zellen gegeben (1mL pro Well).

#### **4.3.7 Exposition der Zellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt**

Drei Stunden nach Beginn der Differenzierung wurde den Zellen CSE beigefügt, so dass eine Endkonzentration von 5 % CSE entstand (Tag 0, Ausgangswert). Die als Kontrolle dienenden Zellen wurden mit reinem FCS-Kulturmedium in analoger Weise zur Zigarettenrauchexposition behandelt.

Zwei Tage nach Einleitung der Differenzierung und Beginn der Exposition wurde der Differenzierungscocktail mittels Einkanalpipette entfernt und durch Kulturmedium mit 10 % FCS (2 mL pro Well) ersetzt. Im Folgenden wurde das Medium alle 2 Tage partiell gewechselt. Hierzu wurden von den im Well vorhandenen 2 mL Medium je 1 mL vorsichtig mittels Einkanalpipette abgesaugt. Anschließend wurde 1 mL Medium mittels Transferpipette sanft in die Mitte jedes Wells getropft. Durch diesen vorsichtigen und nur partiellen

Mediumwechsel konnte ein initial aufgetretenes Ablösen der Zellen vom Grund weitgehend verhindert werden. Beim Wechsel des Kulturmediums wurden die CSE-exponierten Zellen weiterhin mit Medium (plus 10 % FCS) mit 5 % CSE versorgt, um eine dauerhafte Exposition zu erreichen. Die als Kontrolle dienenden Zellen erhielten analog reines FCS-Kulturmedium.

Nach Zugabe des Differenzierungscocktails sowie nach Exposition wurde die Entwicklung der Zellen über mindestens 7 weitere Tage und maximal 14 Tage beobachtet und dokumentiert.

## **4.4 Messungen**

Pro Auswertungstag wurden die Zellen einer 24-Loch-Platte analysiert. In der Regel erfolgte die Auswertung an Tag 7 nach Einleitung der Umdifferenzierung und Exposition mit CSE. In einigen Fällen wurden jedoch auch an den Tagen 2, 5, 11 und 14 Messungen durchgeführt.

### **4.4.1 Zellzählung**

An den Tagen 0 und 7, sowie in einigen Fällen auch an den Tagen 2, 5, 11 und 14, wurde die Zellzahl pro Well durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Leitz Labor Luxs Typ 020505030, Leica) ermittelt. Hierzu wurden die Zellen eines Wells nach einmaligem Waschen mit HBSS trypsinisiert (400  $\mu$ L Trypsin/Well) und 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 400  $\mu$ L Trypanblau und 400  $\mu$ L PBS sowie gutem Durchmischen mittels Pipette erfolgten je drei Zellzählungen in der Neubauer-Zählkammer. Mittels Division des Mittelwertes durch 4 wurde die Zellzahl pro Großquadrat ermittelt. Diese wurde wiederum mit 10.000 multipliziert, woraus die Zellzahl pro mL resultierte. Hieraus konnte durch Multiplikation mit 1,2 die Zellzahl pro Well berechnet werden.

### **4.4.2 Lipidgehalt**

An den Tagen 0, 5, 7 und 14 sowie einmalig an Tag 11 wurde der Lipidgehalt der Zellen mittels Ölrot-Färbung (Oil Red O) und Bildverarbeitung ermittelt. Hierzu wurden die mit Kunststoffplättchen (Sarstedt) belegten Wells verwendet.

Zur Färbung wurden die Zellen zunächst zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend

für mindestens 1,5 Stunden mit 1,5 mL Formalin pro Well (10 %, Roti-Histofix, Roth) fixiert. Nach Entfernen des Formalins und zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Zellen eines Wells mit 500 µL Ölrot-Farbstoff benetzt (0,36 % Oil Red O (Sigma) in 60%-igem Isopropanol (Merck)). Nach 15 Minuten wurde die Ölrotlösung entfernt und die Zellen wurden erneut dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde das Kunststoffplättchen mittels einer Pinzette aus der Vertiefung der 24-Loch-Platte entnommen, auf einem Objektträger in Eindeckmittel eingebettet (Aquatex, Merck) und mit einem Deckglas versehen. Die Ölrot-Färbung der in den Zellen befindlichen Lipide wurde auf diese Weise in einen stabilen Zustand versetzt, so dass die Präparate über Monate gelagert werden konnten.

Mittels einer Digitalkamera (Canon PowerShot A95) wurden durch ein modifiziertes inverses Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss AG) Bilder der gefärbten Präparate im RGB-Format angefertigt. Die Bildauswertung erfolgte mittels eines Bildanalyseprogramms (ImageJ, NIH) sowie der Überführung und Bearbeitung der Daten in Microsoft Excel. Hierzu wurde das zum Rotbild komplementäre Grünbild ausgewertet, in dem sich die Lipidtröpfchen dunkel darstellten und sich klar vom hellen Hintergrund abgrenzten. Die Pixelintensität (Helligkeit) im Bildanalyseprogramm wurde mit Werten zwischen 0 und 255 angegeben. Der Abschnittspunkt für die Pixelintensität (Cutoff-Wert) wurde mit 110 so gesetzt, dass nur die Pixel der klar erkennbaren Lipidtröpfchen gezählt wurden und der Hintergrund nicht mit in die Zählung einging. Nach diesen Kriterien wurden Pixelintensitäten bis maximal 110 als Lipidtröpfchen gewertet und höhere Intensitäten als irrelevant bzw. Rauschen eingestuft. Aufgrund der durch das optische System entstandenen Vignettierung konnte das Gesamtbild nicht unmittelbar ausgewertet werden. Daher wurde ein möglichst großes Rechteck (in der Regel zwischen 4200000 und 4300000 Pixel) durch den verwertbaren Bildabschnitt gelegt, um die geschwärzten Ecken auszublenden. Die innerhalb des Rechtecks unter dem Cutoff-Wert liegenden Pixel, die den Lipidtröpfchen entsprachen, wurden anschließend auf das normierte Gesamtfeld (5038848 Pixel) hochgerechnet. Es wurden in der Regel von einem Ölrot-Präparat 5 Fotos aus unterschiedlichen Regionen angefertigt und ausgewertet. Hieraus wurde dann ein Mittelwert für die unter dem Cutoff-Wert liegende Pixelzahl ermittelt.

Diese neu entwickelte Methode erwies sich im Vergleich zum klassischen photometrischen Assay als vorteilhaft, insbesondere da hierbei keine Ungenauigkeiten der Messungen durch Schlieren des Farbstoffes auf dem Zellrasen sowie durch Adsorption des Farbstoffes an den Wänden der Messküvette auftraten. In Vorversuchen konnte eine Korrelation zwischen den photometrisch ermittelten und den mittels Bildverarbeitung gewonnenen Werten gezeigt werden (siehe Abb. 9).



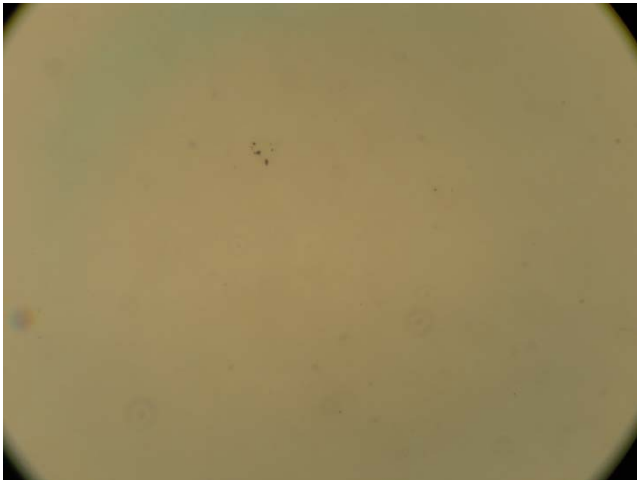


Abbildung 3: Das unter einem modifizierten inversen Mikroskop angefertigte Foto zeigt 3T3-T1 Präadipozyten nach Ölrot-Färbung an Tag 0 (2 Tage postkonfluent, vor Gabe des Differenzierungscocktails). Es zeigen sich nur minimale Lipidtröpfchen, welche rot angefärbt sind.

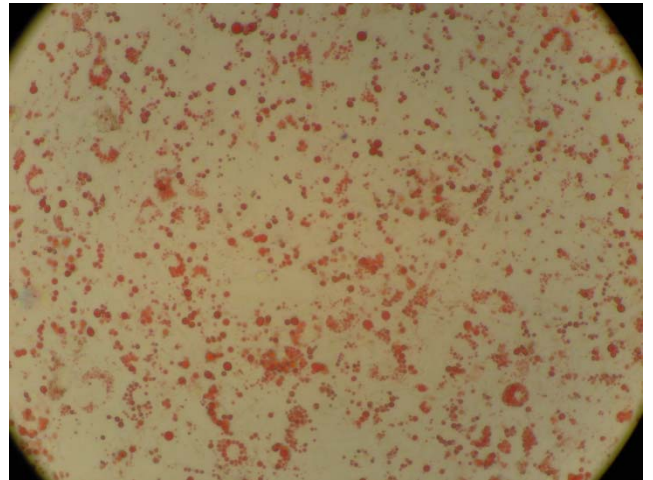


Abbildung 4: Das unter einem modifizierten inversen Mikroskop angefertigte Foto zeigt reife Adipozyten an Tag 7 nach Gabe des Differenzierungscocktails. Die Lipidtröpfchen stellen sich rot dar.

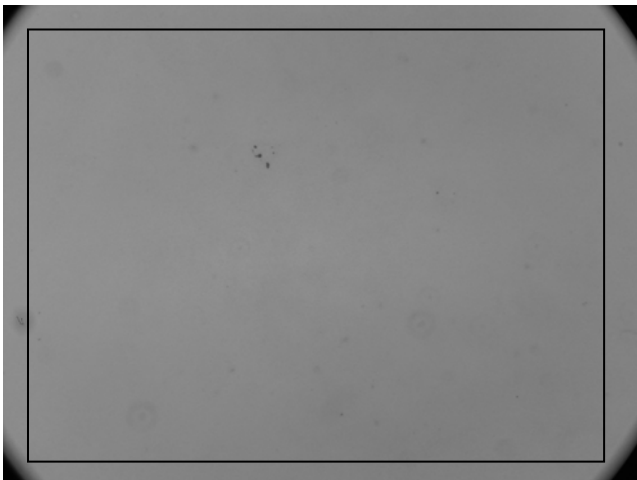


Abbildung 5: Darstellung des Fotos aus Abb. 3 im zum Rotbild komplementären Grünbild im Bildanalyseprogramm Image J. Dargestellt sind Präadipozyten (Tag 0, vor Gabe des Differenzierungscocktails). Die vereinzelt kleinen Lipidtröpfchen heben sich als dunkle Flecken vom helleren Hintergrund ab. Um zu verhindern, dass die durch das optische System entstandene Vignettierung die Auswertung verfälschte, wurde ein Rechteck (4200000 bis 4300000 Pixel) durch den verwertbaren Bildausschnitt gelegt und somit wurden die schwarzen Ecken ausgeblendet. Ausgewertet wurde der Inhalt des Rechtecks mittels Histogramm (siehe Abb. 7), das Ergebnis wurde auf das normierte Gesamtbild (5038848 Pixel) hochgerechnet.

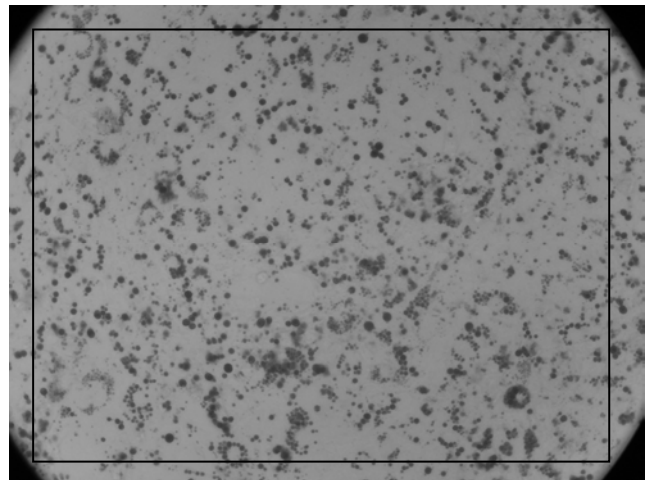
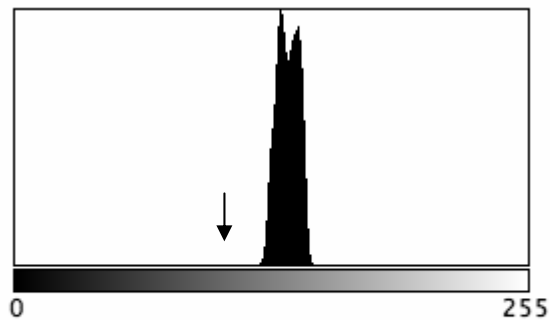
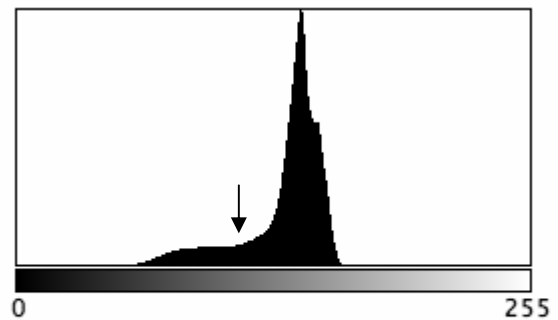


Abbildung 6: Darstellung des Fotos aus Abb. 4 im zum Rotbild komplementären Grünbild im Bildanalyseprogramm Image J. Die Lipidtröpfchen der reifen Adipozyten (Tag 7) heben sich als dunkle Flecken vom helleren Hintergrund ab. Um zu verhindern, dass die durch das optische System entstandene Vignettierung die Auswertung verfälschte, wurde ein Rechteck (4200000 bis 4300000 Pixel) durch den verwertbaren Bildausschnitt gelegt und somit wurden die schwarzen Ecken ausgeblendet. Ausgewertet wurde der Inhalt des Rechtecks mittels Histogramm (siehe Abb. 8), das Ergebnis wurde auf das normierte Gesamtbild (5038848 Pixel) hochgerechnet.



Count: 4296627    Min: 0  
 Mean: 135.704    Max: 152  
 StdDev: 5.459    Mode: 132 (273782)

Abbildung 7: Histogramm von Pixelzahl (vertikal) gegen Intensität (horizontal) an Tag 0 (vgl. Abb. 5). Der Pfeil markiert den Cutoff-Wert der Intensität (=110). Alle Pixel mit einer Intensität von  $\leq 110$  (dunkel) wurden als Lipidtröpfchen gewertet, höhere Pixelintensitäten (hell) stellten den Hintergrund dar.



Count: 4235625    Min: 40  
 Mean: 133.034    Max: 167  
 StdDev: 20.247    Mode: 141 (198722)

Abbildung 8: Histogramm von Pixelzahl (vertikal) gegen Intensität (horizontal) an Tag 7 (vgl. Abb. 6). Der Pfeil markiert den Cutoff-Wert der Intensität (=110). Alle Pixel mit einer Intensität von  $\leq 110$  (dunkel) wurden als Lipidtröpfchen gewertet, höhere Pixelintensitäten (hell) stellten den Hintergrund dar.

#### **4.4.3 Aktivität der Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH)**

Die Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH) ist ein Schlüsselenzym der Triglyceridsynthese, und seine Aktivität wird routinemäßig zur Erfassung der Adipozytendifferenzierung bestimmt. Es katalysiert die Konversion von Dihydroxy-acetonphosphat zu Glycerol-3-phosphat. Die hierbei ablaufende Oxidation von NADH als Coenzym kann photometrisch bei 340 nm erfasst werden.

Die Aktivität der Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH) als Marker der Adipogenese wurde an den Tagen 0, 7 und 14 ermittelt. Die Messungen erfolgten bei dem ersten Teil der Versuche mittels eines kommerziellen Kits (TaKaRa). Da sich einige Substanzen des Kits als instabil und nur kurz haltbar erwiesen, wodurch es teilweise zu sehr unterschiedlichen Messwerten kam, wurde in unserem Labor eine Methode zur Bestimmung der GPDH-Aktivität ohne Anwendung des Kits etabliert. Diese kam bei den späteren Versuchen zur Anwendung.

Hierzu wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 500  $\mu\text{L}$  einer eigens angesetzten Homogenisierungslösung (20 mM Tris (Sigma), 1 mM EDTA (Merck), 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Fluka), pH 7,3 [Sottile & Seuwen 2001]) hinzugefügt und die Zellen mit dem Zellschaber vom Boden der 24-Loch-Platte abgelöst. Das

Homogenisat wurde sodann bei  $-32^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt.

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese mit Hilfe des Vortexers gemischt und in der Kühlzentrifuge bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 10 000 Upm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Einfrieren und Auftauen diente der Enzymextraktion durch Zelledestruktion. Nach dem Zentrifugieren wurde der klare Überstand, der sich zwischen dem Pellet und den oben aufschwimmenden Zellbestandteilen und Lipiden befand, entnommen. Ein Teil wurde zwecks der Proteinbestimmung erneut eingefroren, der andere Teil wurde mit Homogenisierungslösung erneut 1:2 und 1:4 verdünnt und als Probe für die GPDH-Messung sogleich verwendet. In eine Einwegküvette (UV-Küvette mikro, Brand) wurden  $100\ \mu\text{L}$  der verdünnten Probe gegeben. Hierzu wurden  $90\ \mu\text{L}$  einer frisch zubereiteten Reaktionslösung ( $0,1\ \text{M}$  Triäthanolamin (Sigma),  $2,5\ \text{mM}$  EDTA (Merck),  $0,1\ \text{mM}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (Fluka),  $334\ \mu\text{M}$  NADH (Sigma), pH 7,7 [Sottile & Seuwen 2001]) beigefügt. Anschließend wurde die gefüllte Küvette für 10 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $10\ \mu\text{L}$  in Aqua dest. gelösten Dihydroxyacetonphosphats ( $4\ \text{mM}$ , Fluka) gestartet. Photometrische Messungen erfolgten bei  $340\ \text{nm}$  jede Minute über 20 Minuten (Photometer LP 700, Dr. Lange) gegen einen Leerwert. Hierbei wurde die Temperatur mit Hilfe eines an das Photometer angeschlossenen Wasserbades mit Wasserpumpe auf  $37\ ^{\circ}\text{C}$  gehalten. Die Enzymaktivität wurde anhand der mittleren maximalen Extinktionsänderung pro Minute nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{GPDH - Aktivität (unit/ml)} = \frac{\Delta E_{340} \times f}{6,22 \times s}$$

$\Delta E_{340}$ : mittlere maximale Extinktionsänderung pro Minute

$f$ : Verdünnungsfaktor

$6,22\ (\text{mL}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm}))$ : Extinktionskoeffizient für NADH bei  $340\ \text{nm}$

$s\ (\text{cm})$ : Schichtdicke der Küvette

#### **4.4.4 Proteingehalt**

Die Messung der Proteinmenge wurde mittels des Verfahrens nach Bradford (Roti-Nanoquant, Roth) an den Tagen 0, 7 und 14 durchgeführt. Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine Standardverdünnungsreihe mit BSA (Albumin-Fraktion V, Roth) angesetzt (siehe Tab. 2). Hierbei wurde die Homogenisierungslösung entsprechend ihrer vorhandenen Menge in der Messprobe beigefügt, um mögliche Verfälschungen der Messung durch Bestandteile

dieser Lösung zu verhindern. Die Messungen wurden in einem Photometer (UV-1602, Shimadzu) bei 590 nm und 450 nm durchgeführt.

Nach Bildung der Eichkurve wurden die eingefrorenen Probenlösungen zur Proteinbestimmung (siehe 4.4.3) aufgetaut und hiervon je 20 µL in eine mit 400 µL Arbeitslösung (1:5 verdünnt mit Aqua dest., Roti Nanoquant, Roth) sowie 80 µL Aqua dest. gefüllte Küvette gegeben. Die Messung erfolgte analog der Standardverdünnungsreihe bei 590 nm und 450 nm im Photometer. Nach Bildung des Quotienten der bei beiden Wellenlängen erhaltenen Messwerte (E590nm/E450nm) konnte der entsprechende Proteinwert anhand der Eichkurve abgelesen werden.

Nummer	Stock-Standard (10 mg Albumin/mL Aqua bidest) µL	Standard-Verdünnung Nr. 7 µL	Homogenization So- lution Arb.lösung µL	Aqua bidest µL	Verdünnungs- faktor	Erhaltene Konzentration µg/100 µL
9	20		200	780	1:50	20
8	16		200	784	1:62,5	16
7	10		200	790	1:100	10
6	5		200	795	1:200	5
5	4		200	796	1:250	4
4	2		200	798	1:500	2
3		100	200	700	1:10	1
2		50	200	750	1:20	0,5
1		10	200	790	1:100	0,1
0			200	800		Leerwert

Tabelle 2: Ansatz der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Eichkurve zur Proteinbestimmung

## **4.5 Auswertung und statistische Analyse**

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden konventionelle arithmetische Mittelwerte und Standardfehler (SEM) berechnet. Prozentuale Änderungen wurden als geometrische Mittel und Standardfehler ausgedrückt, um Verzerrungen durch die Asymmetrie der Werte zu vermeiden; hierbei wurde der geometrische Standardfehler als Faktor des geometrischen Mittelwertes angegeben. In den Graphiken wurden - neben der Darstellung paarweiser Einzelwerte - Mediane und Perzentile zur Darstellung gewählt, um die Verteilung der Daten zu veranschaulichen und Redundanzen gegenüber den in den Tabellen angegebenen Werten zu vermeiden.

Die statistischen Vergleiche zwischen den verschiedenen Zeitpunkten und den unterschiedlichen Behandlungen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) im Repeated-Measures-Design durchgeführt. Bei Auftreten signifikanter Unterschiede erfolgten *post-hoc*-Analysen nach Newman-Keuls. Hierdurch wurde die Multiplizität der Vergleiche berücksichtigt. Die Varianzanalysen erfolgten wahlweise in einem Design, in dem entweder die eingeschlossenen Versuche als gleichwertig behandelt oder gemäß einer Vierfeldertabelle nach Zeitverlauf und Exposition aufgeschlüsselt wurden. In letzterem Fall wurde auch der Interaktionsterm als Indikator eines möglichen Effektes des Zigarettenrauches ausgewertet. Da keines der konventionellen Designs die Datenstruktur zu 100 % beschrieb, wurden diese alternativen Designs mit dem Ziel gewählt, bei ähnlichem Ergebnis die statistische Aussage für gesichert zu halten. Zu Überprüfung bzw. dort, wo es die Struktur der Daten erforderte, erfolgten paarweise t-Tests ohne Multiplizitätskorrektur. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  bestimmt. Alle Analysen wurden mittels der Programme Excel und Statistica für Windows durchgeführt.

## **5. Erfahrungen in den Vorversuchen und Etablierung der Methoden**

Die hier beschriebenen Methoden wurden zum großen Teil in unserem Labor neu etabliert. Im Folgenden soll kurz über die hierbei gemachten Erfahrungen und Probleme sowie die hieraus resultierenden Konsequenzen berichtet werden.

### **5.1 Versuch mit Lungenfibroblasten**

Initial wurde ein Versuch unternommen, zu eruieren, ob bei Lungenfibroblasten eine Adipogenese durch Zugabe des Differenzierungscocktails zu erreichen ist, da lipidbeladene Fibroblasten (Lipofibroblasten) in der Literatur beschrieben worden sind [McGowan & Torday 1997]. Hierzu wurden aus Operationspräparaten gewonnene humane Lungenfibroblasten auf Kunststoffplättchen (Sarstedt) in einer 24-Loch-Platte angezogen. Als Kulturmedium wurde D-MEM (low glucose, Gibco) mit 10 % FCS und den Antibiotika Gentamycin, Streptomycin und Penicillin verwendet. Als die Zellen 2 Tage konfluent waren, wurde der zuvor zubereitete Cocktail aus Isobutylmethylxanthin (IMBX, 0,5 mM, Sigma), Dexamethason (1  $\mu$ M, Sigma) and Insulin (10  $\mu$ g/mL, Sigma) auf die Zellen gegeben. Nach 2 Tagen wurden diese Substanzen entfernt und durch FCS-haltiges Kulturmedium ersetzt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen mit 10 % Formalin fixiert und mit Ölrot-Lösung (0,36 % Oil Red O in 60%-igem Isopropanol) angefärbt. Nach ausgiebigem Waschen mit Aqua dest. wurde das Kunststoffplättchen aus dem Well entnommen, auf einem Objektträger in Eindeckmittel eingebettet und mit einem Deckglas versehen.

Lichtmikroskopisch konnten keine Lipidtröpfchen in den Zellen nachgewiesen werden. Angesichts der fehlenden Adipogenese entschlossen wir uns, direkt auf eine konventionelle Zelllinie von Präadipozyten zur Adipozytendifferenzierung zurückzugehen und Versuche mit anderen Zellen zur Methodenetablierung zu vermeiden.

### **5.2 Anzucht und Differenzierung der Präadipozyten**

Da die 3T3-L1-Präadipozyten der Maus ein viel untersuchtes und in der Literatur ausführlich beschriebenes Zellmodell für die Adipozytendifferenzierung bieten, entschlossen wir uns zur Durchführung der Versuche mit dieser Zellreihe. Die Anzucht erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers (siehe 4.3.1 – 4.3.3). Nach ca. 4-5 Passagen waren ausreichend viele Zellen für die geplanten Versuche vorhanden, so dass die Präadipozyten in 24-Loch-

Platten eingesät wurden und die Differenzierung und Exposition 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz eingeleitet wurde (Tag 0, siehe 4.3.5 – 4.3.7). Nach weiteren 2 Tagen wurde der Differenzierungscocktail entfernt und durch Kulturmedium bzw. CSE-haltiges Medium ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt zeigte sich der Zellrasen zunehmend fragil, so dass sich sowohl beim partiellen Absaugen des Mediums mittels Pasteur-Pipette und Absaugpumpe als auch beim erneuten Zugeben von Medium mittels Einkanalpipette häufig ein Teil der Zellen vom Boden ablöste. Dies geschah auch dann, wenn beim Mediumwechsel noch 500 bzw. 1000  $\mu\text{L}$  Restmedium im Well verblieben. Durch die hierbei entstandenen Löcher in der Zellschicht war eine sinnvolle Auswertung der betroffenen Wells nicht mehr möglich. Dieser Effekt trat auch nach Verwendung von frühen Passagen auf. Um die Ablösung der Zellen vom Untergrund zu verhindern, wurde ein Versuch mit einer Fibronectin-beschichteten 24-Loch-Platte durchgeführt. Zur Beschichtung wurden in jedes Well 100  $\mu\text{L}$  einer Fibronectin-Lösung (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) gegeben und für mindestens 1 Stunde belassen. Im Anschluß war das Fibronectin weitgehend angetrocknet, minimale flüssige Reste wurden mittels Einkanalpipette abgesaugt. Nach mindestens einer weiteren Stunde wurden Zellen in die Wells eingesät. Auch bei dieser Technik kam es jedoch zu einer Ablösung von Zellen während des Wechselns des Mediums.

Letztendlich konnten die Löcher im Zellrasen weitgehend verhindert werden, indem beim Wechseln des Mediums mit der Einkanalpipette (Eppendorf Reference) nur 1 mL von den im Well vorhandenen 2mL möglichst sanft aus der Mitte des Wells abgesaugt wurde. Zu dem restlichen im Well verbliebenen D-MEM wurde 1 mL frisches Kulturmedium durch vorsichtige, tropfenweise Zugabe in die Mitte des Wells mittels Transferpipette (3,5 mL, Sarstedt) gegeben. Unter dieser Vorgehensweise bildeten sich nur noch in Ausnahmefällen Risse im Zellrasen. Die entsprechenden Wells gingen nicht in die Auswertung mit ein, da die Zellzahl in undefinierter Weise verändert worden war.

### **5.3 Lipidanalyse mittels Bildverarbeitung versus Photometrie**

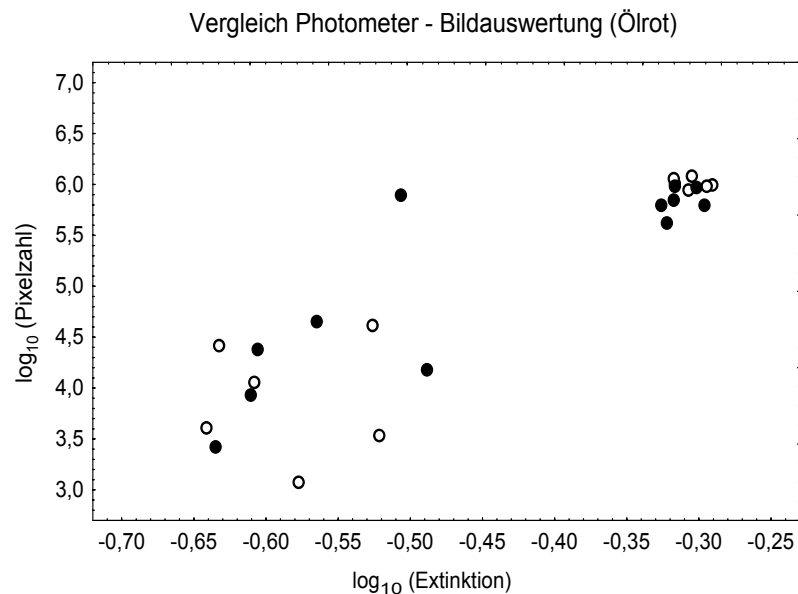
Die Bestimmung der Lipidmenge durch Lipidanfärbung mittels Ölrot sowie photometrische Auswertung ist ein in der Literatur häufig beschriebenes Verfahren.

Hierzu wurden die Zellen, die sich in einer Vertiefung der 24-Loch-Platte befanden, zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mindestens 1,5 Stunden mit Formalin (10 %) fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden 500  $\mu\text{L}$  einer frisch gefilterten Ölrot-Lösung (0,36 % Ölrot in 60 % Isopropanol) hinzugegeben und 15 Minuten auf den Zellen belassen. Im Anschluss wurden die Zellen drei Mal mit Aqua

dest. gewaschen. Die Extraktion des Farbstoffes erfolgte nach Absaugen des Aqua dest. durch Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  Isopropanol. Die Lösung wurde aus dem Well abpipettiert, in eine Einwegküvette gegeben und ihre Extinktion im Photometer (UV-1602, Shimadzu) bei 510 nm gegen einen Leerwert gemessen. Bei dieser Methode traten allerdings erhebliche Messungenauigkeiten durch verbliebene Farbstoffschlieren auf den Zellen sowie durch Adhäsion des Farbstoffes an die Wand des Wells und die Küvettenwand auf. Versuche, diese Artefakte durch stärkeres Waschen zu vermindern oder zu umgehen, führten nicht selten zu weiteren Fehlern.

Wir entwickelten daher eine neue Methode zur Bestimmung der Lipidmenge mittels Bildanalyse, die sich, der Streuung der Daten und Handhabbarkeit nach zu urteilen, der oben beschriebenen Methode als überlegen erwies. Diese Analysemethode ist ausführlich unter 4.4.2 beschrieben.

Im Vergleich der beiden Methoden zur Messung der Lipidmenge zeigte sich bei logarithmischer Auftragung eine statistisch signifikante Korrelation ( $p < 0,0001$ ) der photometrisch gewonnenen und der mittels Bildanalyse erhaltenen Werte (siehe Abb. 9).



**Abbildung 9:** Zusammenhang zwischen Pixelzahl und Extinktion gemäß den Vorversuchen in Form einer logarithmischen Auftragung der photometrisch gewonnenen Werte (Extinktion) und der mittels Bildanalyse gewonnenen Werte (Pixelzahl) zur Erfassung der Lipidmenge an Tag 0 (links) und Tag 7 (rechts). Die offenen Kreise stehen für Kontrollversuche, die geschlossenen für Experimente mit Gabe von CSE.



## 6. Ergebnisse der Hauptversuche

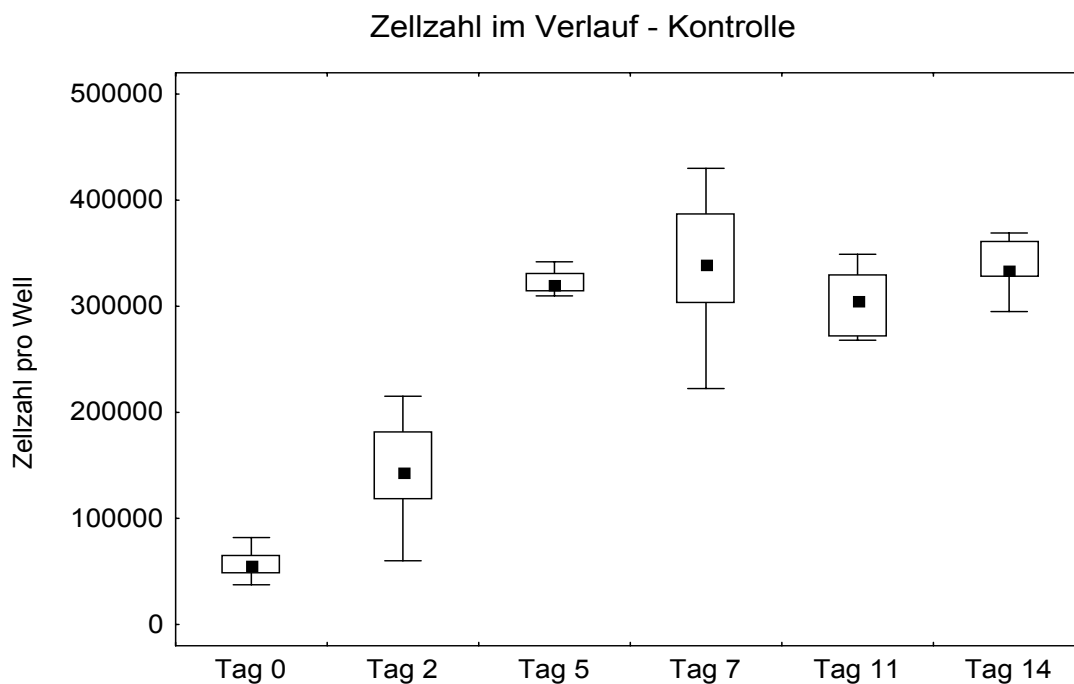
### 6.1 Zellzahl

Die Zellzahl wurde vorwiegend an den Tagen 0 (n=16) und 7 (n=14) ermittelt. Um eine Vorstellung über den Verlauf der Wachstumskurve bis Tag 14 zu erhalten, wurden in geringerer Anzahl auch Zellzählungen an den Tagen 2, 5, 11, und 14 durchgeführt (n=4-10). Der entsprechende Verlauf der Zellzahl zu allen Messzeitpunkten ist in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt. Aus Tabelle 3 können die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen des Mittelwertes entnommen werden. Die Inkubation mit dem Differenzierungscocktail plus CSE oder Kontrollmedium erfolgte von Tag 0 bis Tag 2. An Tag 0 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Zellzahl in der Kontroll- und in der CSE-Gruppe. In beiden Gruppen kam es bis Tag 7 zu einem statistisch signifikanten Anstieg ( $p < 0,01$ ;  $n=14$ ) der Zellzahl im Mittel ( $\pm$ SEM) um  $493 \pm 44$  % (Kontrolle) und  $392 \pm 51$  % (CSE). An Tag 7 fand sich in der CSE-Gruppe im Mittel ( $\pm$ SEM) eine um  $21,3 \pm 3,6$  % erniedrigte Zellzahl im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Dies zeigte sich auch im paarigen t-Test ( $p < 0,001$ ). Interessanterweise wies die Zellzahl der CSE-Gruppe an Tag 2 im Vergleich zum Ausgangswert bei einem Signifikanzniveau von  $p=0,05$  (Newman-Keuls-Test) noch keinen Unterschied auf, wohingegen die Zellzahl der Kontrollgruppe bereits signifikant angestiegen war. Dies deutet auf einen verzögerten bzw. verlangsamten Proliferationsbeginn in der CSE-Gruppe hin.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0, Gabe des Cocktails (n=16)	$56655 \pm 3278$	$55318 \pm 3399$
Tag 2, Entfernung des Cocktails (n=10)	$146491 \pm 14354$	$72510 \pm 6774$
Tag 5 (n=4)	$337000 \pm 6830$	$274657 \pm 17866$
Tag 7 (n=14)	$338291 \pm 15787$	$267957 \pm 19487$
Tag 11 (n=6)	$304650 \pm 12929$	$238665 \pm 8381$
Tag 14 (n=6)	$322751 \pm 10786$	$266874 \pm 10253$

Tabelle 3: Zellzahlen pro Well der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.

Offenbar erreichte spätestens ab Tag 7 die Zellzahl sowohl für die Kontrollen als auch für Zigarettenrauch ein Plateau. Aufgrund der Versuchsplanung konnten die Werte von Tag 7 nicht in verbundenen (paarweisen) Tests mit denen der Tage 11 und 14 verglichen werden. Dies war hingegen für Tag 0, 2, 5, 11 und 14 möglich (jeweils  $n=4$ ). Hierbei fand sich für beide Behandlungen kein signifikanter Unterschied für die Werte ab Tag 5. Hingegen unterschieden sich diese Werte von denen an Tag 0 und 2 (Newman-Keuls,  $p<0,05$ ), die überdies bei der Kontrolle voneinander verschieden waren. Beim Vergleich von Kontrolle und Zigarettenrauch ergaben sich sowohl an Tag 11 als auch an Tag 14 signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (paariger t-Test, jeweils  $p<0,005$ ). Somit blieben die an Tag 7 beobachteten Unterschiede bis zum Versuchsende erhalten.



**Abbildung 10:** Zellzahl pro Well im Verlauf – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 3.

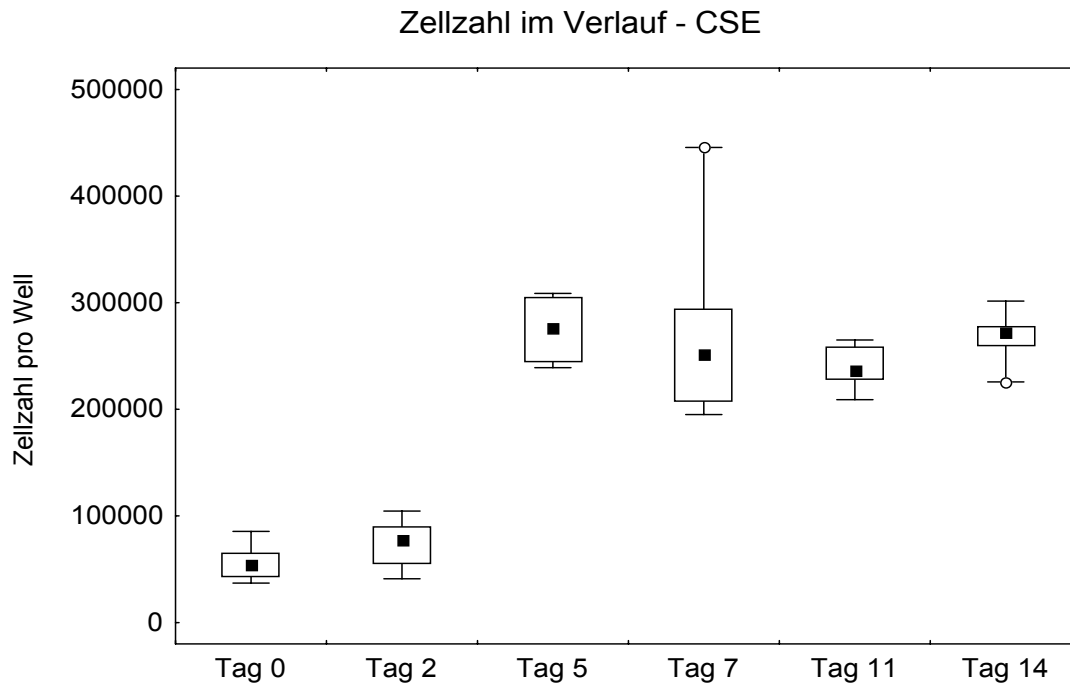


Abbildung 11: Zellzahl pro Well im Verlauf – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 3.

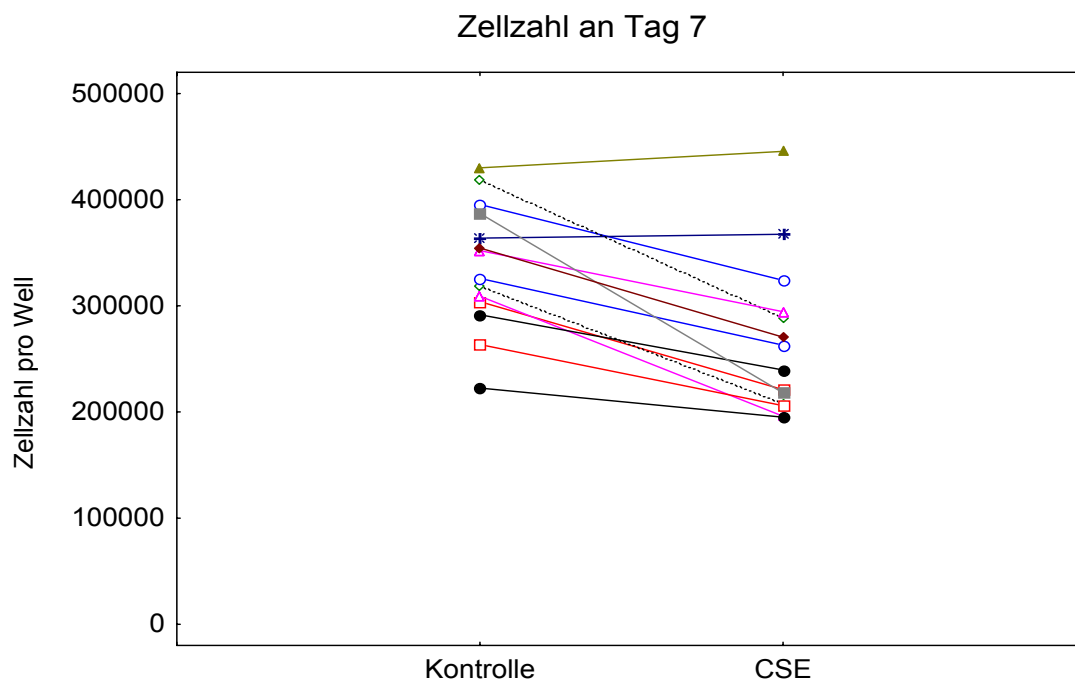


Abbildung 12: Zellzahl pro Well – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

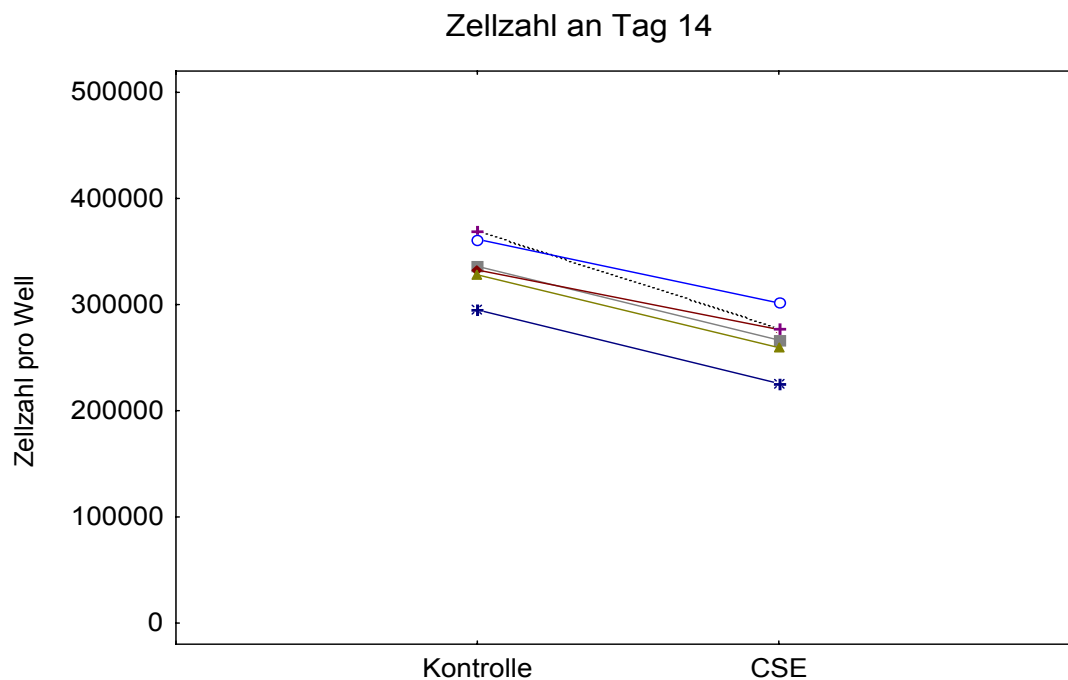


Abbildung 13: Zellzahl pro Well – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

## **6.2 Proteingehalt**

### **6.2.1 Proteingehalt absolut**

Der Proteingehalt ( $\mu\text{g}$  Protein pro Well) wurde mittels des Verfahrens nach Bradford an den Tagen 0 und 7 ( $n=14$ ) sowie in geringerer Anzahl an Tag 14 ( $n=6$ ) gemessen. Die Proteinmenge nahm in beiden Gruppen zwischen Tag 0 und Tag 7 signifikant zu (paariger t-Test, jeweils  $p<0,001$ ), ebenso an Tag 14 gegenüber Tag 0 (jeweils  $p<0,005$ ). Der prozentuale Anstieg bis Tag 7 lag in der Kontrollgruppe im Mittel ( $\pm\text{SEM}$ ) bei  $1065 \pm 178 \%$  und in der CSE-Gruppe bei  $941 \pm 177 \%$ . Sowohl an Tag 0 als auch an Tag 14 war der Proteingehalt zwischen der Kontroll- und CSE-Gruppe nicht signifikant verschieden. Allerdings wies die Kontrollgruppe an Tag 7 im Vergleich zur mit CSE behandelten Gruppe eine geringfügig höhere Proteinmenge auf (paariger t-Test,  $p=0,017$ ).

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0, Gabe des Cocktails (n=16)	23,2 ± 3,1	22,9 ± 2,8
Tag 7 (n=14)	199,0 ± 18,8	188,7 ± 18,3
Tag 14 (n=6)	239,5 ± 10,3	234,9 ± 8,7

Tabelle 4: Proteingehalt pro Well ( $\mu\text{g}$ ) der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.

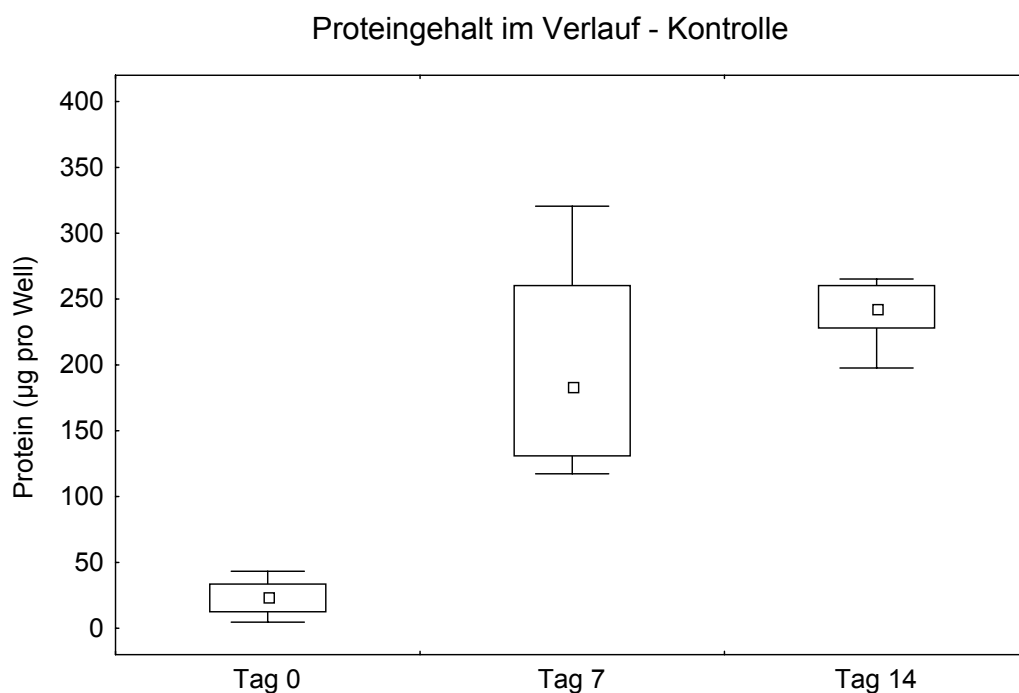


Abbildung 14: Proteingehalt pro Well im Verlauf ( $\mu\text{g}$ ) – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 4.

Proteingehalt im Verlauf - CSE

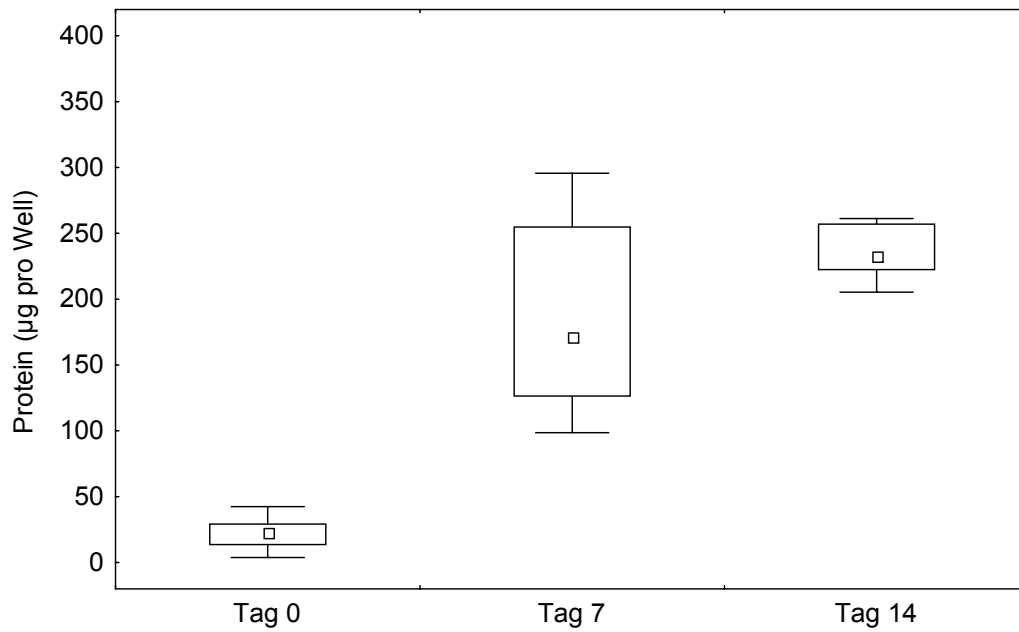


Abbildung 15: Proteingehalt pro Well im Verlauf ( $\mu\text{g}$ ) – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 4.

Proteingehalt an Tag 7

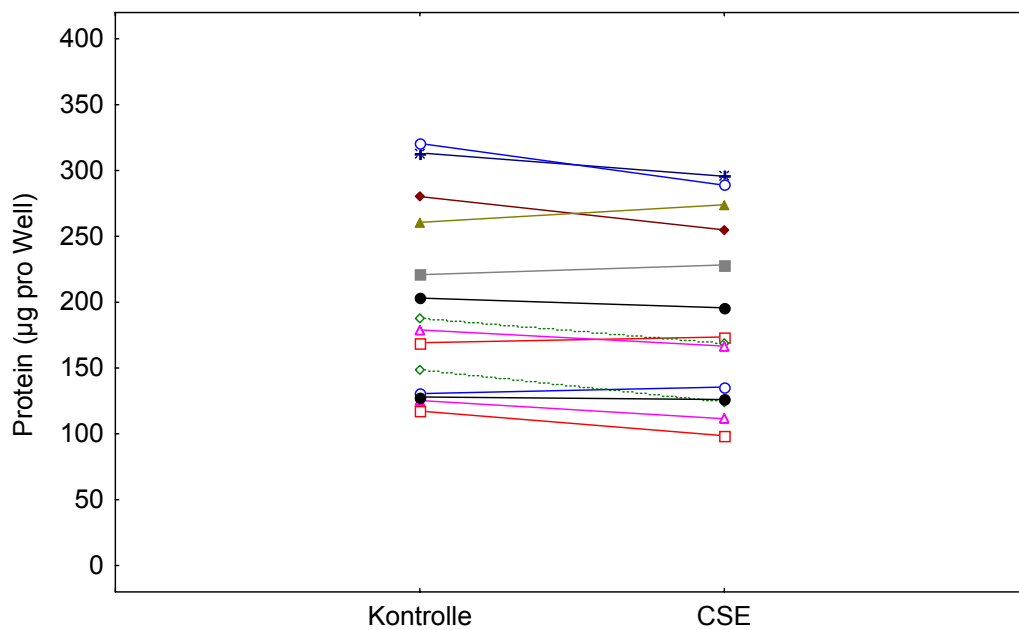


Abbildung 16: Proteingehalt pro Well ( $\mu\text{g}$ ) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

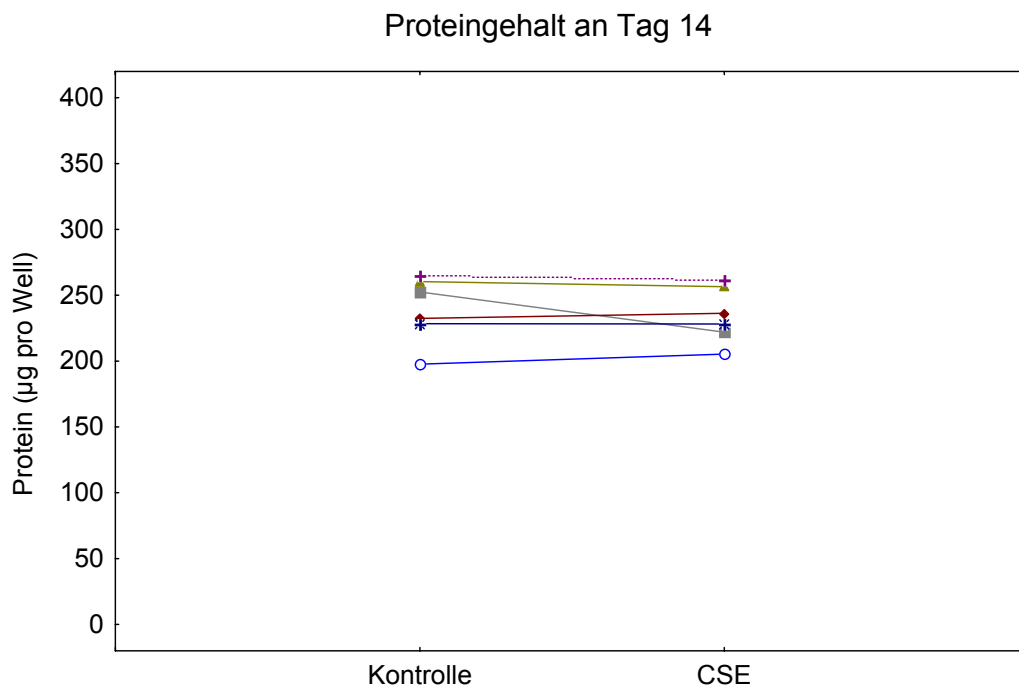


Abbildung 17: Proteingehalt pro Well ( $\mu\text{g}$ ) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

### **6.2.2 Proteingehalt pro Zellzahl**

Im Weiteren wurde die Proteinmenge pro Zellzahl ermittelt. Zwischen Tag 0 und Tag 7 kam es in beiden Gruppen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Proteinmenge pro Zelle ( $n=14$ ;  $p<0,01$ ), welcher in der Kontrollgruppe im Mittel ( $\pm\text{SEM}$ )  $121 \pm 41$  % und in der CSE-Gruppe  $159 \pm 63$  % betrug. An Tag 7 zeigte sich bei einem Signifikanzniveau von  $p<0,05$  ( $n=14$ ) eine im Mittel ( $\pm\text{SEM}$ ) um  $22,9 \pm 5,9$  % erhöhte Proteinmenge pro Zelle in der CSE-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Daten weisen somit auf einen höheren zellulären Proteingehalt in der CSE-Gruppe an Tag 7 hin. Dieser Effekt war bei einem Signifikanzniveau von  $p=0,01$  im multiplen Test (Newman-Keuls) allerdings nicht mehr nachweisbar. An Tag 14 fand sich im paarweisen Vergleich immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen Zigarettenrauch und Kontrolle ( $p=0,002$ ), der relativ gesehen geringfügig größer als an Tag 7 war.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0, Gabe des Cocktails (n=16)	45,2 ± 7,7	46,1 ± 7,5
Tag 7 (n=14)	60,5 ± 5,7	72,8 ± 6,3
Tag 14 (n=6)	71,5 ± 3,5	89,4 ± 5,3

Tabelle 5: Proteingehalt pro 100.000 Zellen ( $\mu\text{g}$ ) der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.

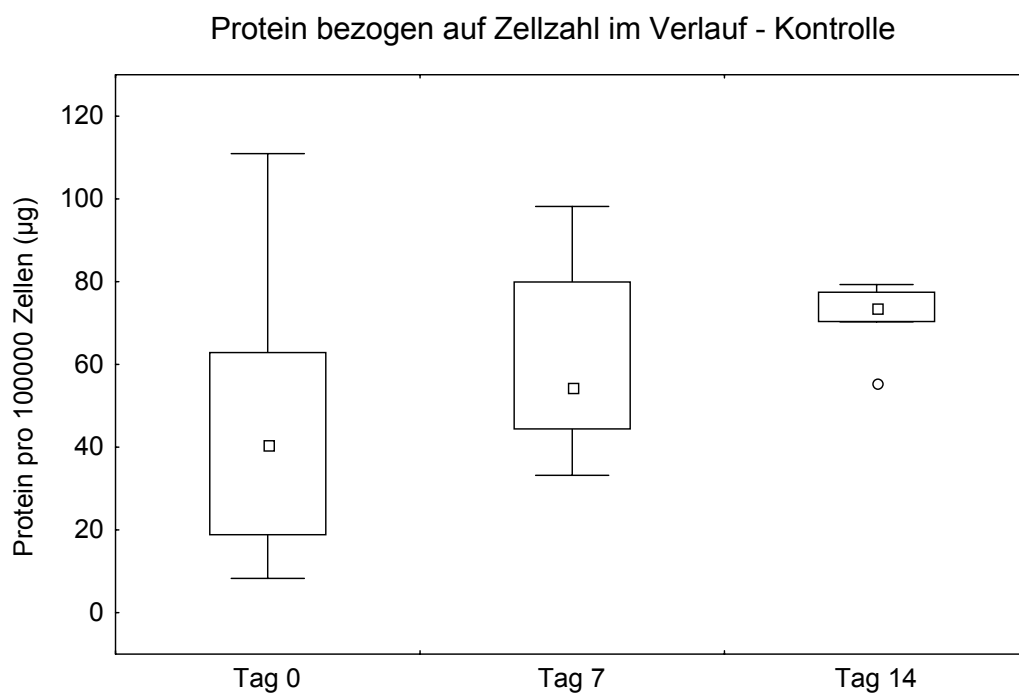
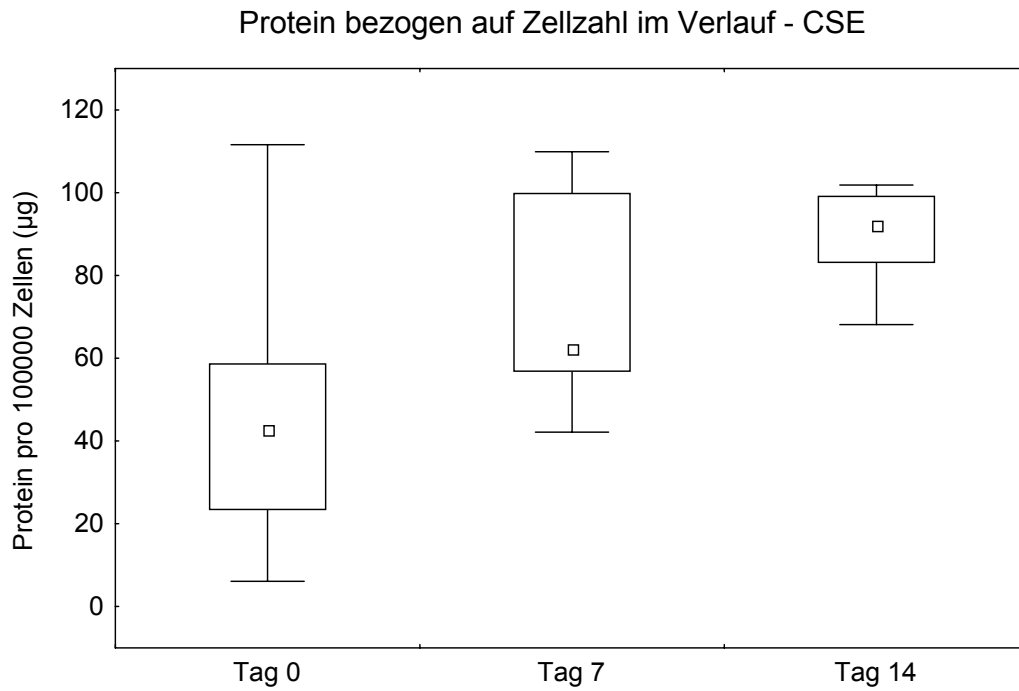
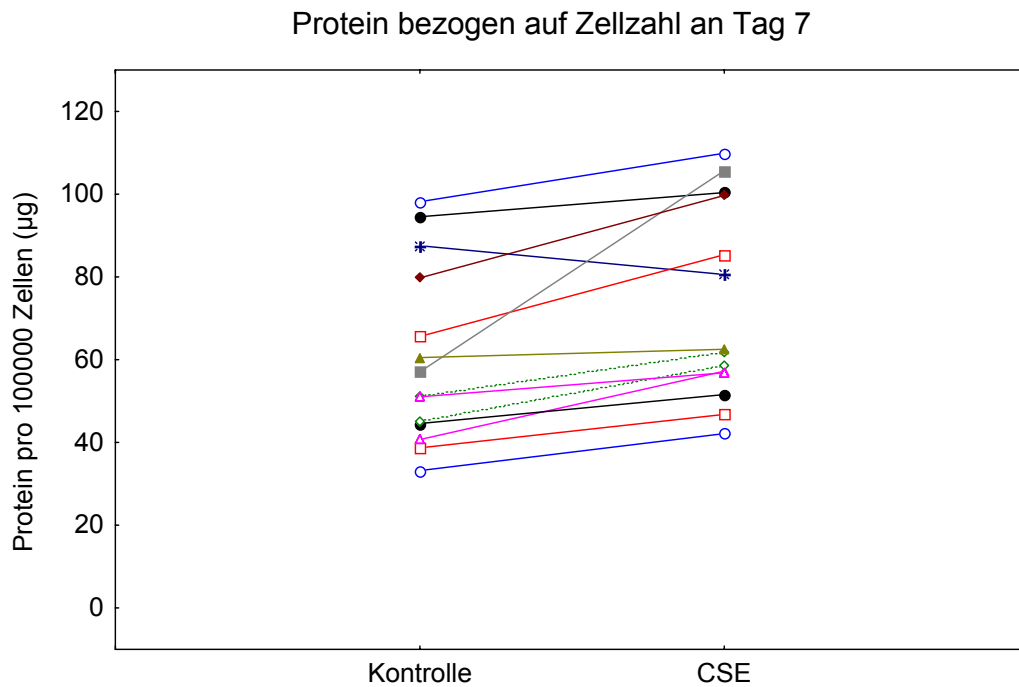


Abbildung 18: Proteingehalt pro Zellzahl (100.000 Zellen) im Verlauf ( $\mu\text{g}$ ) – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 5.





**Abbildung 19:** Proteingehalt pro Zellzahl (100.000 Zellen) im Verlauf ( $\mu\text{g}$ ) – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 5.



**Abbildung 20:** Proteingehalt pro Zellzahl (100.000 Zellen) in  $\mu\text{g}$  – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

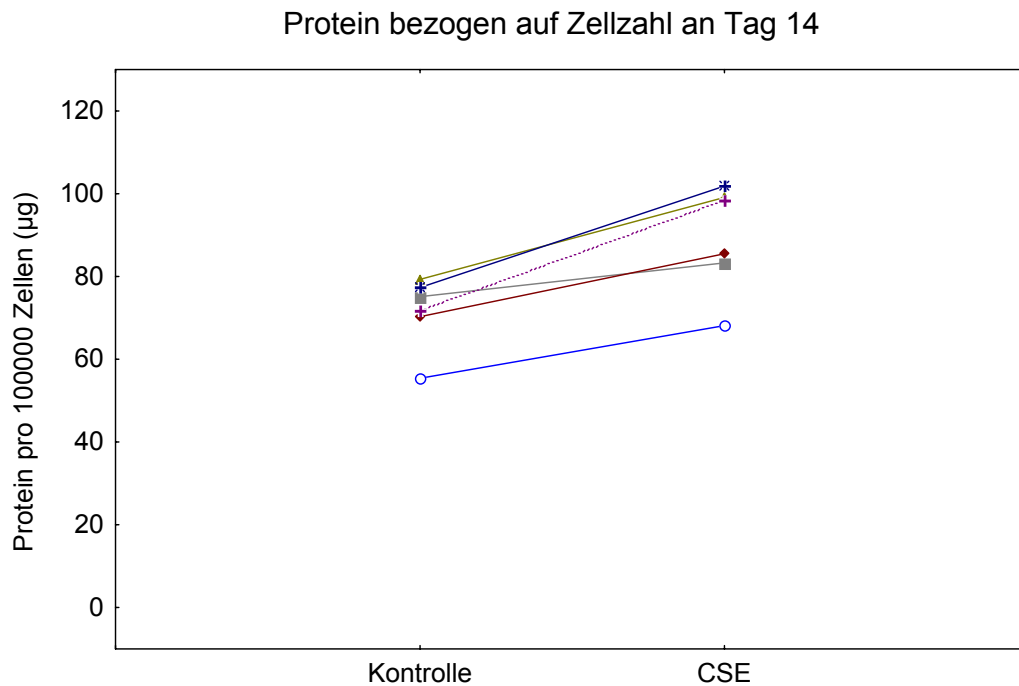


Abbildung 21: Proteingehalt pro Zellzahl (100.000 Zellen) in µg – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

## **6.3 Lipidgehalt**

### **6.3.1 Lipidgehalt absolut**

Der Lipidgehalt wurde mittels Ölrot-Färbung und Bildauswertung insbesondere an den Tagen 0 und 7 sowie in geringerer Anzahl auch an den Tagen 5, 11 und 14 bestimmt. Zur Darstellung wurde unmittelbar die Pixelzahl gewählt, die gemäß Abbildung 9 in direkter Beziehung zur Extinktion von Ölrot und damit zum Lipidgehalt steht. In Tabelle 6 sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen des Mittelwertes zusammengestellt.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
<b>Tag 0, Gabe des Cocktails (n=15,14)</b>	17034 ± 4650	15869 ± 3196
<b>Tag 5 (n=6)</b>	599923 ± 72495	312437 ± 68224
<b>Tag 7 (n=13,14)</b>	911319 ± 47525	629070 ± 51612
<b>Tag 11 (n=1)</b>	1151335	1019822
<b>Tag 14 (n=6)</b>	1467424 ± 24316	1279917 ± 67190

Tabelle 6: Lipidgehalt (Anzahl der Pixel unterhalb des Cutoff-Wertes, hochgerechnet auf das normierte Gesamtfeld von 5038848 Pixel) der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.

An Tag 0 fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und CSE-Gruppe. Der Lipidgehalt stieg in beiden Gruppen bis Tag 7 an. Hierbei wurde für die Kontrollgruppe im Mittel ( $\pm$ SEM) eine Lipidvermehrung von  $20835 \pm 7742$  % und bei der CSE-Gruppe von  $6636 \pm 1869$  nachgewiesen ( $n=12$ ;  $p<0,01$ ). An Tag 7 wies die CSE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine im Mittel ( $\pm$ SEM)  $34 \pm 3$  % geringere Lipidmenge auf ( $n=13$ ;  $p<0,01$ ). Eine statistisch signifikante Verminderung des Lipidgehaltes in der CSE- gegenüber der Kontrollgruppe ließ sich bereits an Tag 5 messen ( $n=6$ ;  $p=0,0019$ ). An Tag 14 war dieser zunächst deutliche Unterschied nur noch in geringem Maße vorhanden ( $n=6$ ;  $p=0,048$ ). Zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufes der Lipidanreicherung wurden die Daten in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt. Die Einzeldaten der Lipidanalyse an Tag 7 und 14 wurden in den Abbildungen 24 und 25 aufgetragen.

### Lipidgehalt gemäß Bildauswertung im Verlauf - Kontrolle

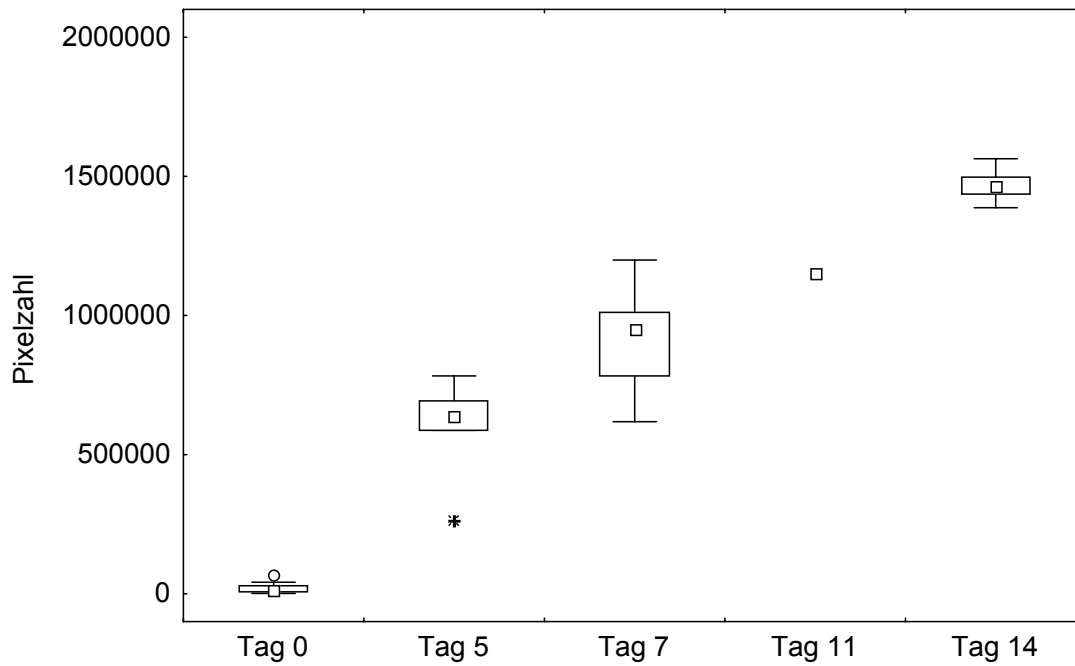


Abbildung 22: Lipidgehalt gemäß Bildauswertung (Pixelzahl unterhalb des Cutoff-Wertes, hochgerechnet auf das normierte Gesamtfeld von 5038848 Pixel) im Verlauf – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 6.

### Lipidgehalt gemäß Bildauswertung im Verlauf - CSE

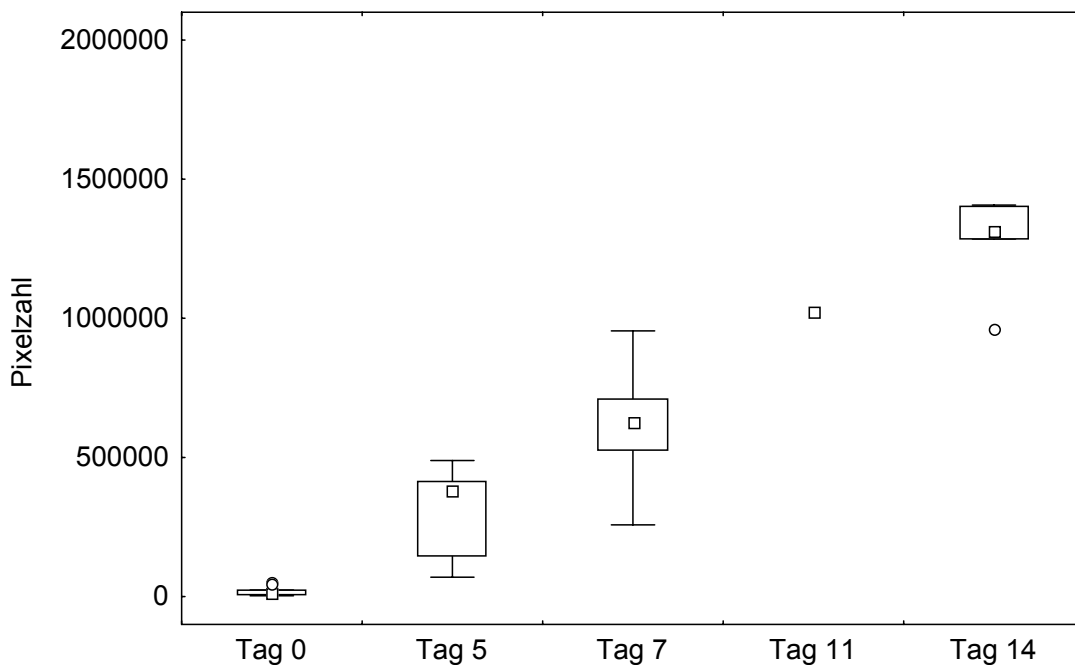


Abbildung 23: Lipidgehalt gemäß Bildauswertung (Pixelzahl unterhalb des Cutoff-Wertes, hochgerechnet auf das normierte Gesamtfeld von 5038848 Pixel) im Verlauf – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 6.

Lipidgehalt gemäß Bildauswertung - Tag 7

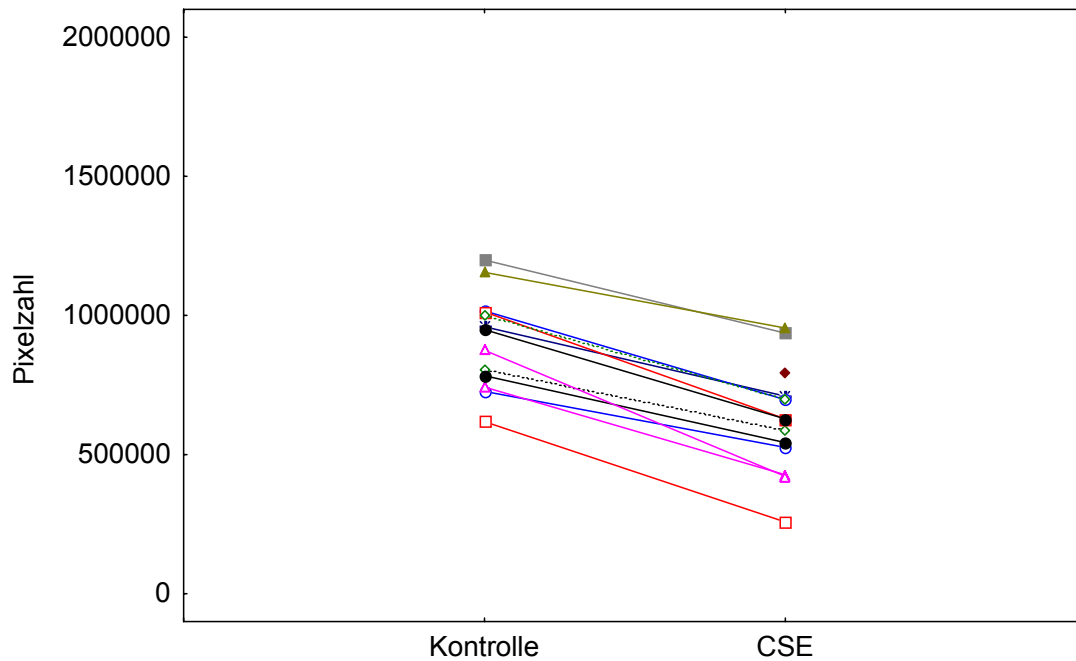


Abbildung 24: Lipidgehalt gemäß Bildauswertung (Pixelzahl unterhalb des Cutoff-Wertes, hochgerechnet auf das normierte Gesamtfeld von 5038848 Pixel) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

Lipidgehalt gemäß Bildauswertung - Tag 14

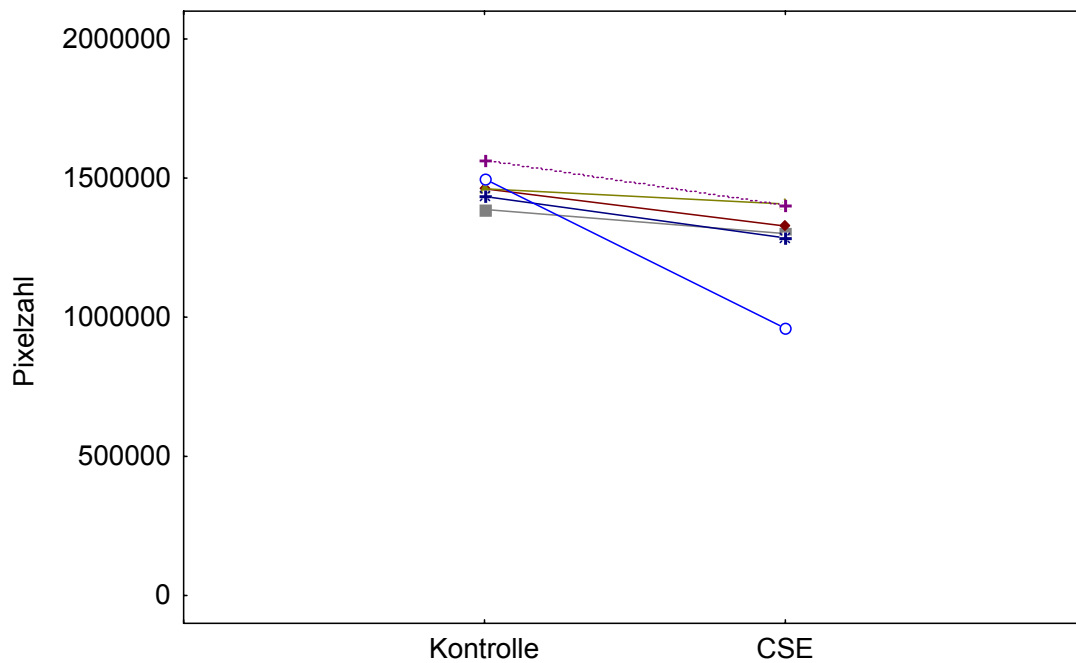


Abbildung 25: Lipidgehalt gemäß Bildauswertung (Pixelzahl unterhalb des Cutoff-Wertes, hochgerechnet auf das normierte Gesamtfeld von 5038848 Pixel) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

### **6.3.2 Lipidgehalt pro Zellzahl**

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die Daten der Lipidanalyse auf die Zellzahl bezogen. Auch hier war an Tag 0 kein Unterschied zwischen der CSE- und der Kontrollgruppe zu verzeichnen. In beiden Gruppen kam es bis Tag 7 zu einem signifikanten Anstieg des Lipidgehaltes pro Zelle, welcher im Mittel ( $\pm$ SEM)  $3710 \pm 1344$  % in der Kontrollgruppe und  $1321 \pm 303$  % in der CSE-Gruppe betrug ( $n=12$ ;  $p<0,05$ ). Der an Tag 7 beobachtete erhöhte Lipidgehalt pro Zelle in der Kontrollgruppe im Vergleich zur CSE-Gruppe war nicht signifikant ( $n=13$ ;  $p>0,05$ ). Aus Abbildung 28 ist jedoch ersichtlich, dass bei einem der Versuche nach CSE-Exposition an Tag 7 eine deutliche Erhöhung der Lipidmenge pro Zelle im Vergleich zur Kontrolle auftrat. Dieser Effekt ließ sich auf eine besonders starke Reduktion der Zellzahl bei CSE im Vergleich zur Kontrolle an Tag 7 zurückführen (siehe Abb. 12). Wurde dieser - von den anderen Versuchen qualitativ abweichende - Versuch nicht in die statistische Analyse miteinbezogen, so war die in der Kontrollgruppe vorhandene Lipidmenge pro Zelle signifikant höher als in der CSE-Gruppe ( $p<0,05$ ,  $n=12$ ). An Tag 14 war kein derartiger Unterschied mehr nachweisbar (paariger t-Test,  $p=0,16$ ).

<b>Versuchstag</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>CSE</b>
<b>Tag 0, Gabe des Cocktails (n=15,14)</b>	0,361 $\pm$ 0,115	0,279 $\pm$ 0,049
<b>Tag 5 (n=4)</b>	2,136 $\pm$ 0,154	1,518 $\pm$ 0,077
<b>Tag 7 (n=13,14)</b>	2,815 $\pm$ 0,183	2,487 $\pm$ 0,216
<b>Tag 11 (n=1)</b>	3,825	3,849
<b>Tag 14 (n=6)</b>	4,370 $\pm$ 0,112	4,885 $\pm$ 0,367

Tabelle 7: Lipidgehalt pro Zelle der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Die Werte (willkürliche Einheiten) ergeben sich aus dem Quotienten der Pixelanzahl unterhalb des Cutoff-Wertes (hochgerechnet auf das normierte Gesamtfeld von 5038848 Pixel) und der Zellzahl pro Well. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.

Lipidgehalt bezogen auf Zellzahl im Verlauf - Kontrolle

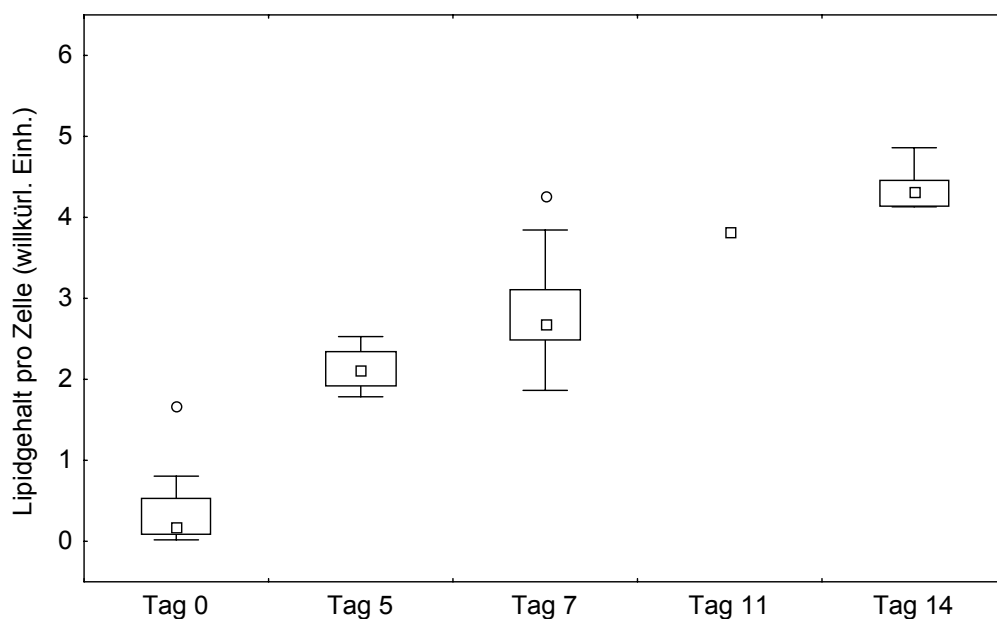


Abbildung 26: Lipidgehalt pro Zellzahl (willkürliche Einheiten, siehe Tabelle 7) im Verlauf – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 7.

Lipidgehalt bezogen auf Zellzahl im Verlauf - CSE

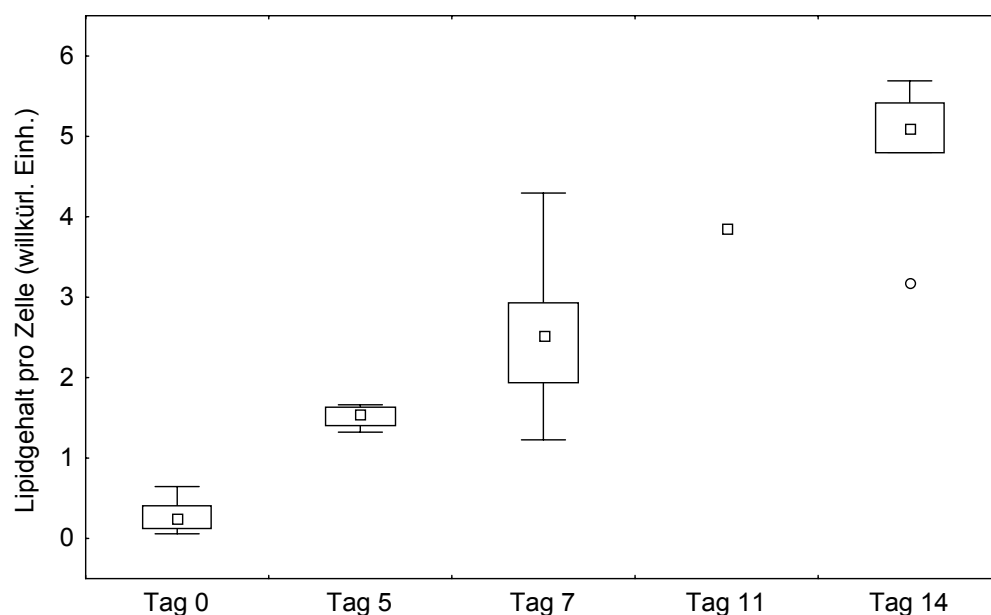


Abbildung 27: Lipidgehalt pro Zellzahl (willkürliche Einheiten, siehe Tabelle 7) im Verlauf – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 7.

Lipidgehalt bezogen auf Zellzahl an Tag 7

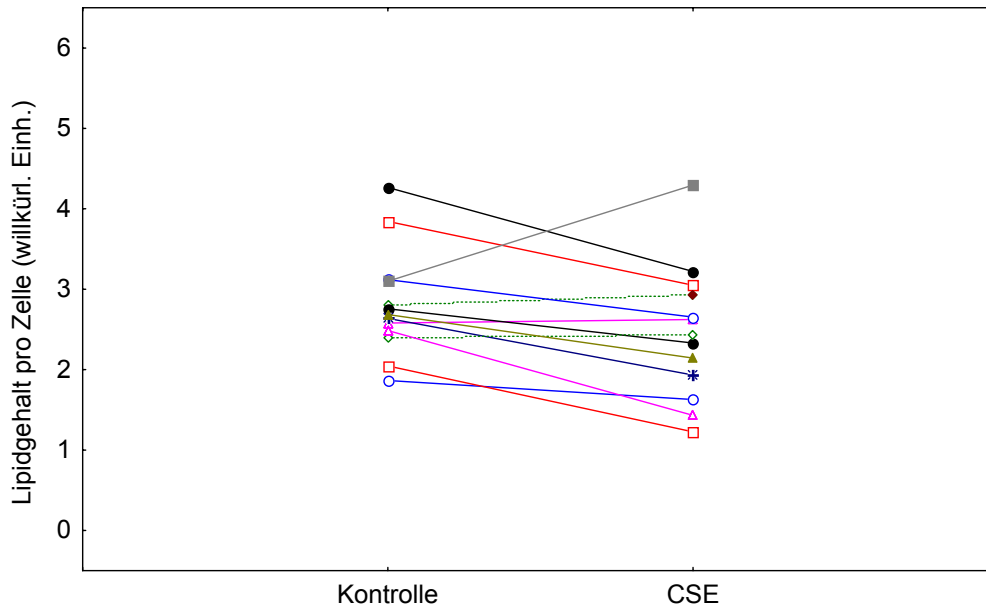


Abbildung 28: Lipidgehalt pro Zellzahl (willkürliche Einheiten, siehe Tabelle 7) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

Lipidgehalt bezogen auf Zellzahl an Tag 14

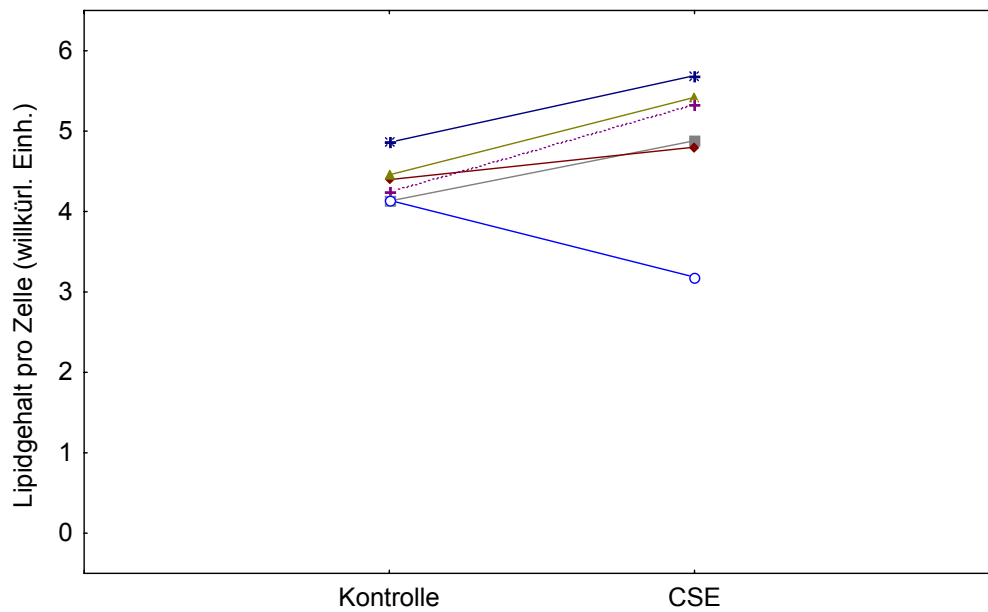


Abbildung 29: Lipidgehalt pro Zellzahl (willkürliche Einheiten, siehe Tabelle 7) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.



### 6.3.3 Lipidgehalt pro Protein

Wurde der Lipidgehalt in Bezug zur Proteinmenge pro Well gesetzt, kam es von Tag 0 bis Tag 7 zu einem Anstieg der Werte um im Mittel ( $\pm$ SEM)  $2189 \pm 913$  % in der Kontrollgruppe bzw.  $778 \pm 274$  % in der CSE-Gruppe ( $n=12$ ;  $p<0,05$ ). Weder an Tag 0 noch an Tag 7 fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $n=13$ ;  $p>0,05$ ).

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0, Gabe des Cocktails (n=15,14)	$1127 \pm 417$	$1313 \pm 629$
Tag 7 (n=13,14)	$5078 \pm 292$	$3541 \pm 229$
Tag 14 (n=6)	$6190 \pm 306$	$5441 \pm 167$

Tabelle 8: Lipidgehalt bezogen auf Proteinmenge pro Well der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Die Werte (willkürliche Einheiten) bilden sich aus dem Quotienten der Pixelanzahl unterhalb des Cutoff-Wertes (hochgerechnet auf das normierte Gesamtfeld von 5038848 Pixel) und der Proteinmenge pro Well ( $\mu$ g). Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.

Lipidgehalt bezogen auf Protein im Verlauf - Kontrolle

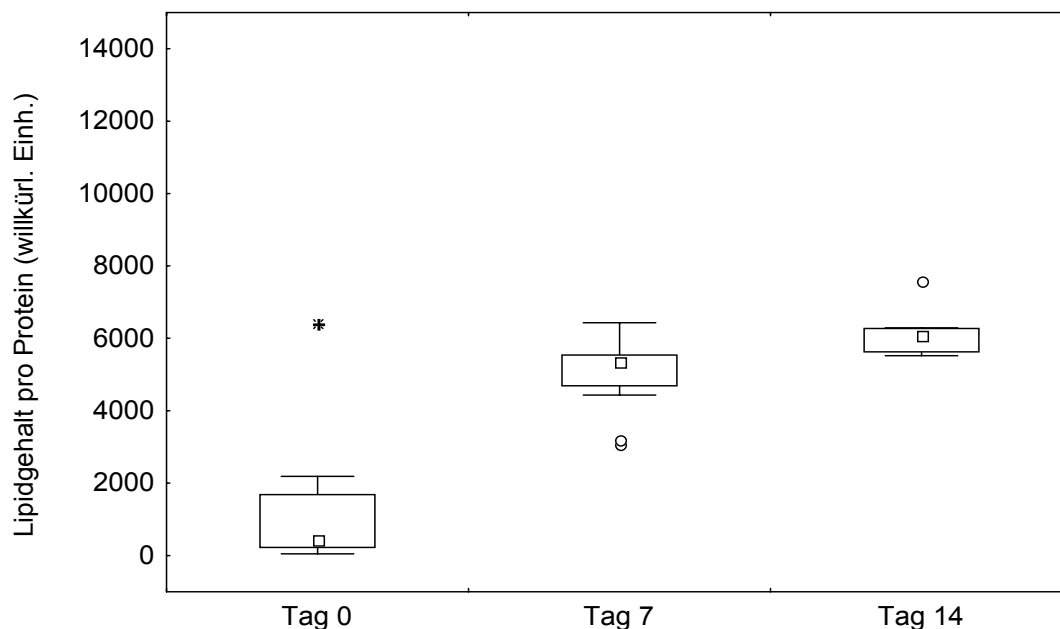


Abbildung 30: Lipidgehalt pro Protein (willkürliche Einheiten, siehe Tabelle 8) im Verlauf – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 8.

Lipidgehalt bezogen auf Protein im Verlauf - CSE

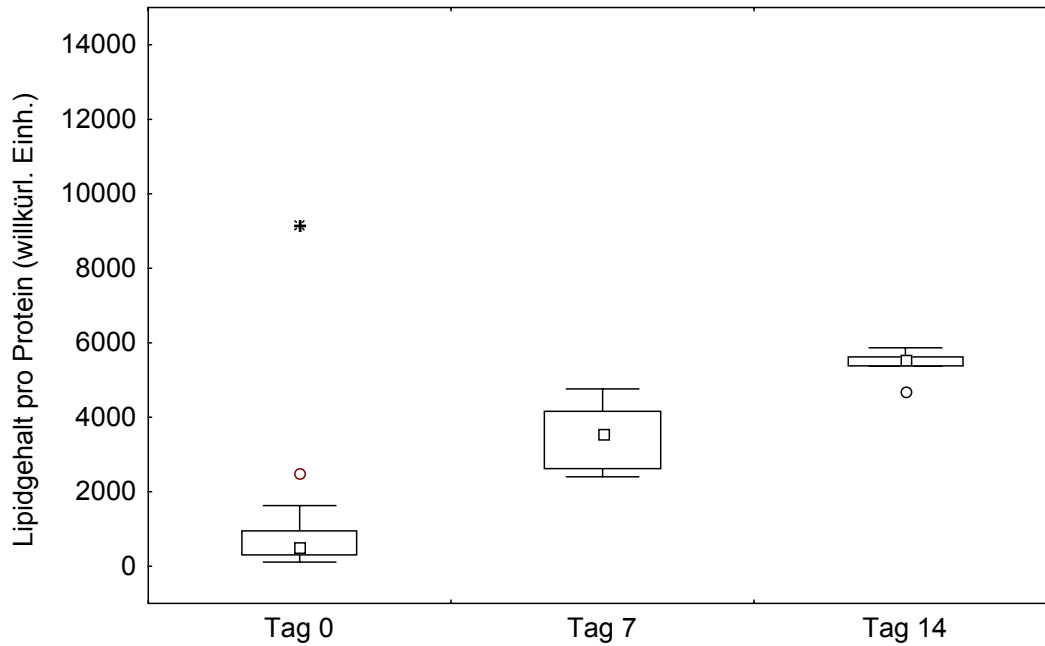


Abbildung 31: Lipidgehalt pro Protein (willkürliche Einheiten, siehe Tabelle 8) im Verlauf – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 8.

Lipidgehalt bezogen auf Protein an Tag 7

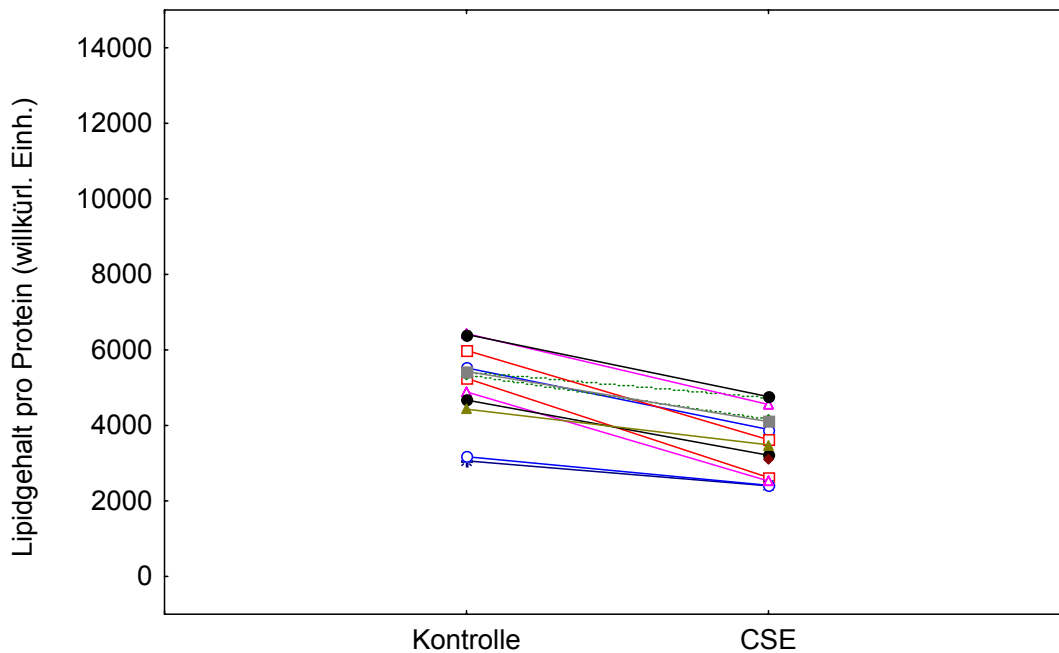


Abbildung 32: Lipidgehalt pro Protein (willkürliche Einheiten, siehe Tabelle 8) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

## Lipidgehalt bezogen auf Protein an Tag 14

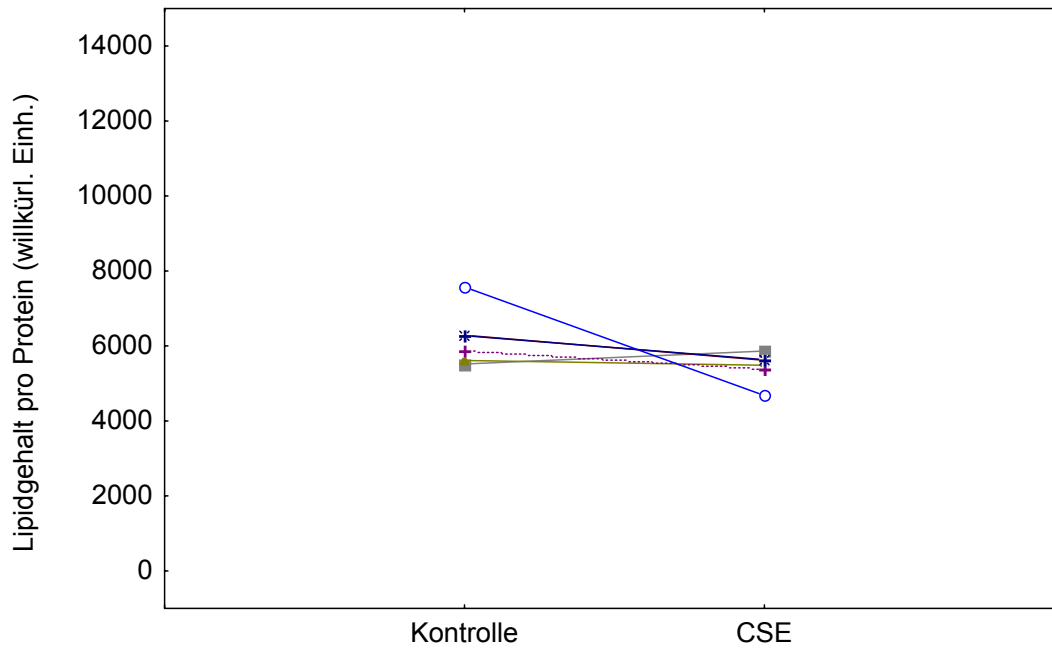


Abbildung 33: Lipidgehalt pro Protein (willkürliche Einheiten, siehe Tabelle 8) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

## **6.4 Aktivität der Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH)**

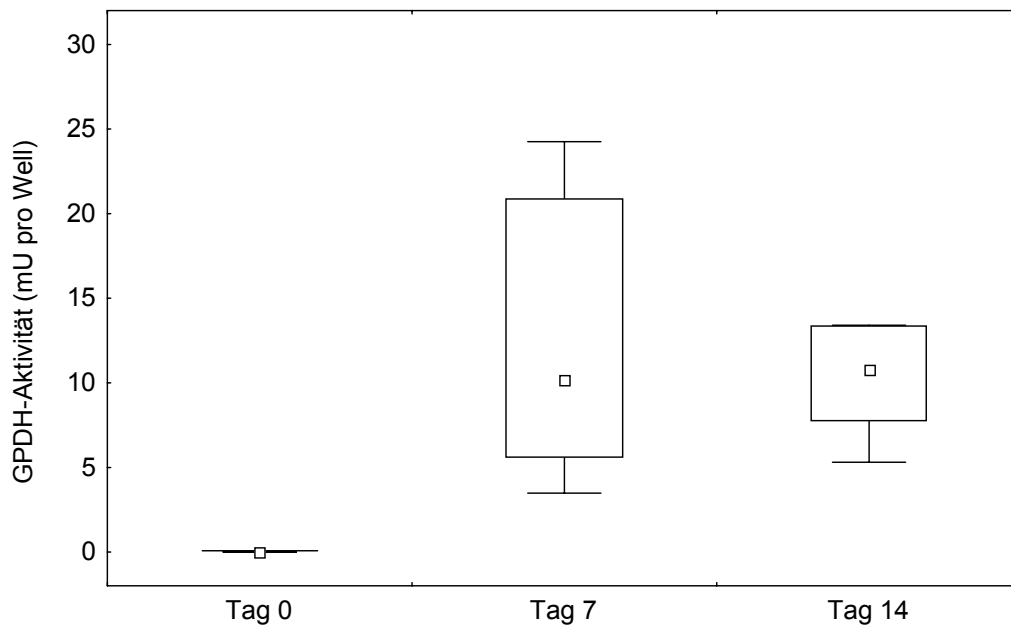
### **6.4.1 GPDH-Aktivität absolut**

Die GPDH-Aktivität wurde an den Tagen 0 (n=16), 7 (n=14) und 14 (n=6) gemessen. An Tag 0 konnte in keinem der Versuche eine GPDH-Aktivität festgestellt werden. An Tag 7 war die GPDH-Aktivität in der CSE-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle im Mittel um ( $\pm$ SEM)  $54,8 \pm 5,7$  % erniedrigt (n=14;  $p < 0,001$ ). Dieser Unterschied konnte auch an Tag 14 statistisch signifikant nachgewiesen werden (n=6;  $p = 0,011$ ).

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0, Gabe des Cocktails (n=16)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Tag 7 (n=14)	12,66 $\pm$ 2,09	6,47 $\pm$ 1,50
Tag 14 (n=6)	10,25 $\pm$ 1,42	7,51 $\pm$ 1,13

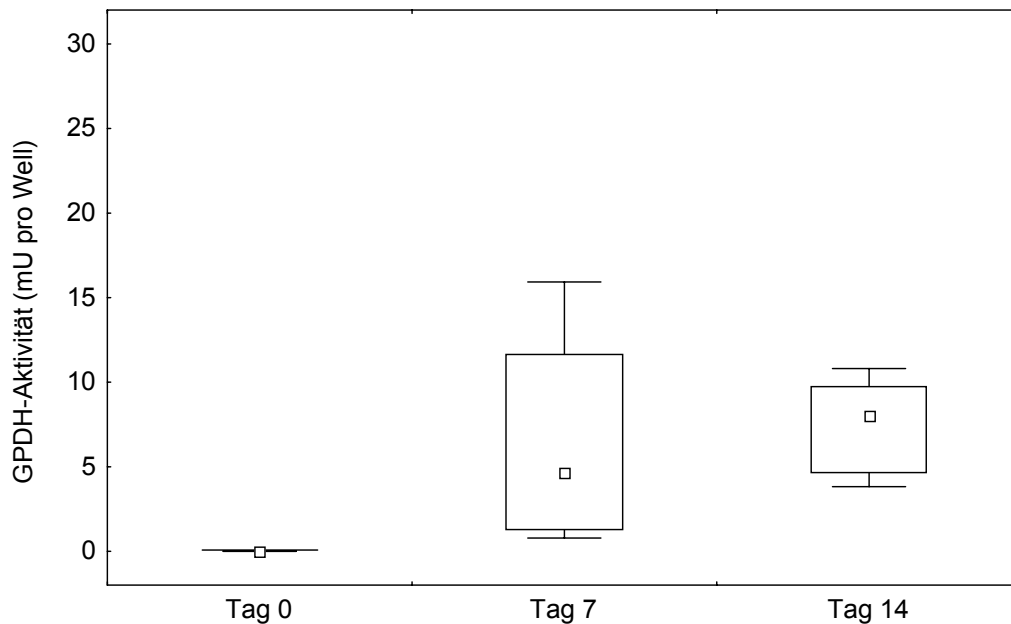
Tabelle 9: GPDH-Aktivität pro Well (mU) der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.

### GPDH-Aktivität im Verlauf - Kontrolle



**Abbildung 34:** GPDH-Aktivität pro Well (mU) im Verlauf – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 9.

### GPDH-Aktivität im Verlauf - CSE



**Abbildung 35:** GPDH-Aktivität pro Well (mU) im Verlauf – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 9.

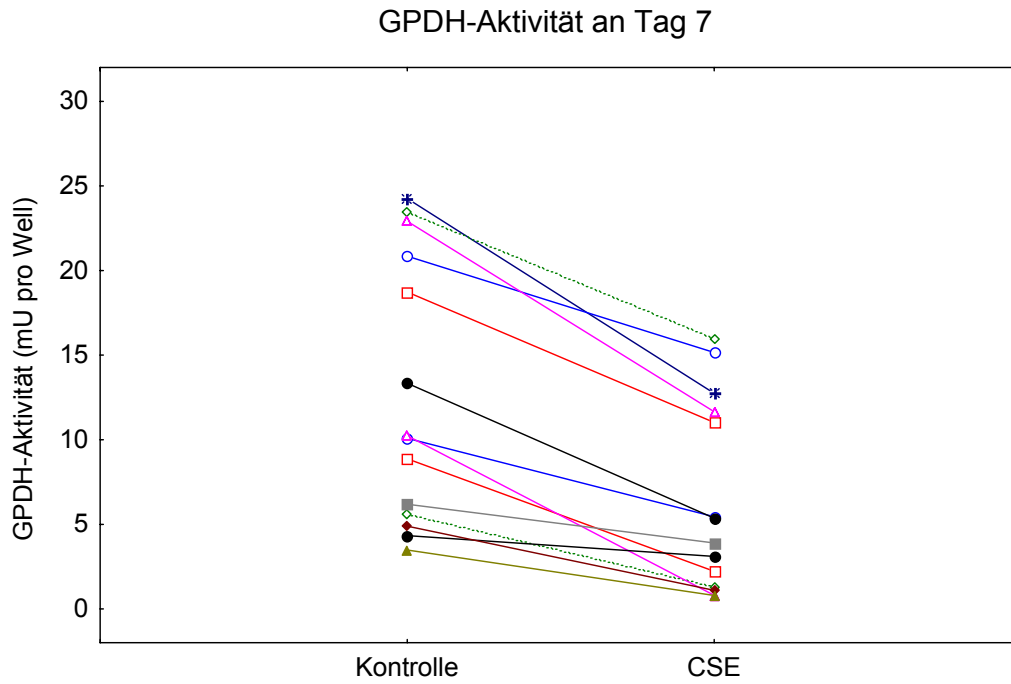


Abbildung 36: GPDH-Aktivität pro Well (mU) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

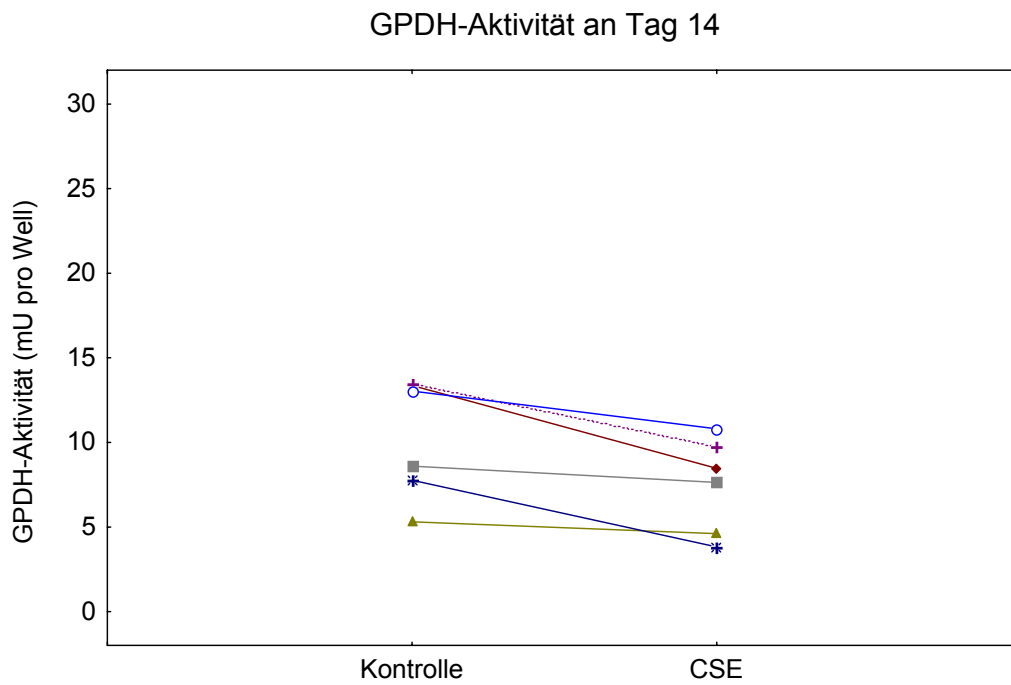


Abbildung 37: GPDH-Aktivität pro Well (mU) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

## 6.4.2 GPDH-Aktivität pro Zellzahl

Bei einer Betrachtung der GPDH-Aktivität pro Zelle zeigte sich an Tag 7 ein im Mittel ( $\pm$ SEM) um  $41,6 \pm 7,8$  % erniedrigter Wert für die CSE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=14$ ;  $p<0,01$ ). An Tag 14 ließ sich kein Unterschied mehr nachweisen.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0, Gabe des Cocktails (n=16)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Tag 7 (n=14)	3,88 $\pm$ 0,63	2,49 $\pm$ 0,55
Tag 14 (n=6)	3,03 $\pm$ 0,38	2,79 $\pm$ 0,36

Tabelle 10: GPDH-Aktivität (mU) pro 100.000 Zellen der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.

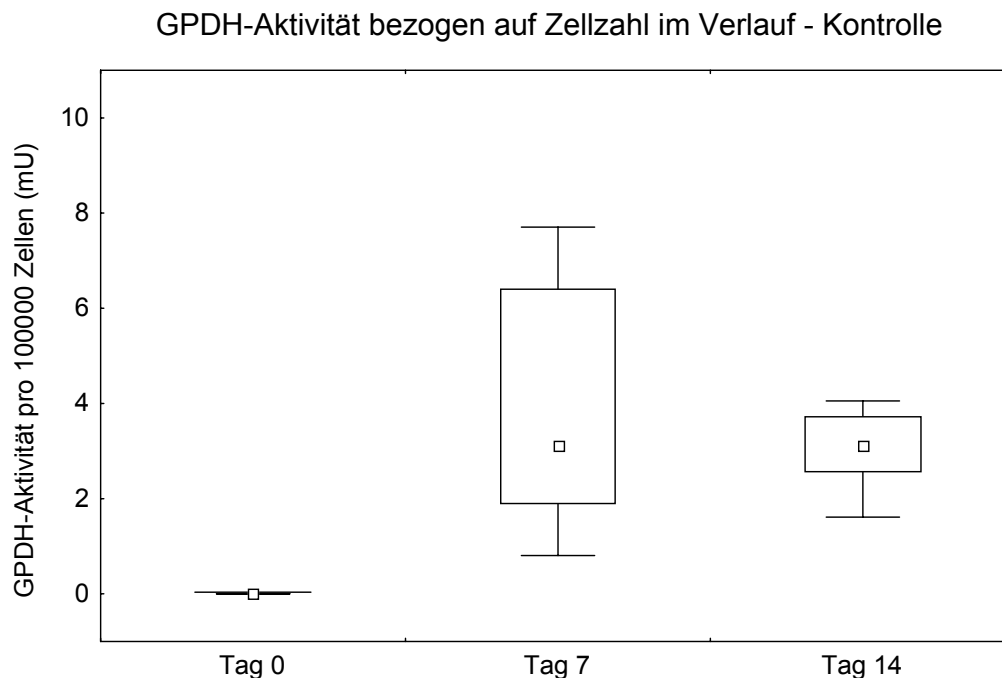


Abbildung 38: GPDH-Aktivität pro Zellzahl (100.000 Zellen) im Verlauf (mU) – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 10.

### GPDH-Aktivität bezogen auf Zellzahl im Verlauf - CSE

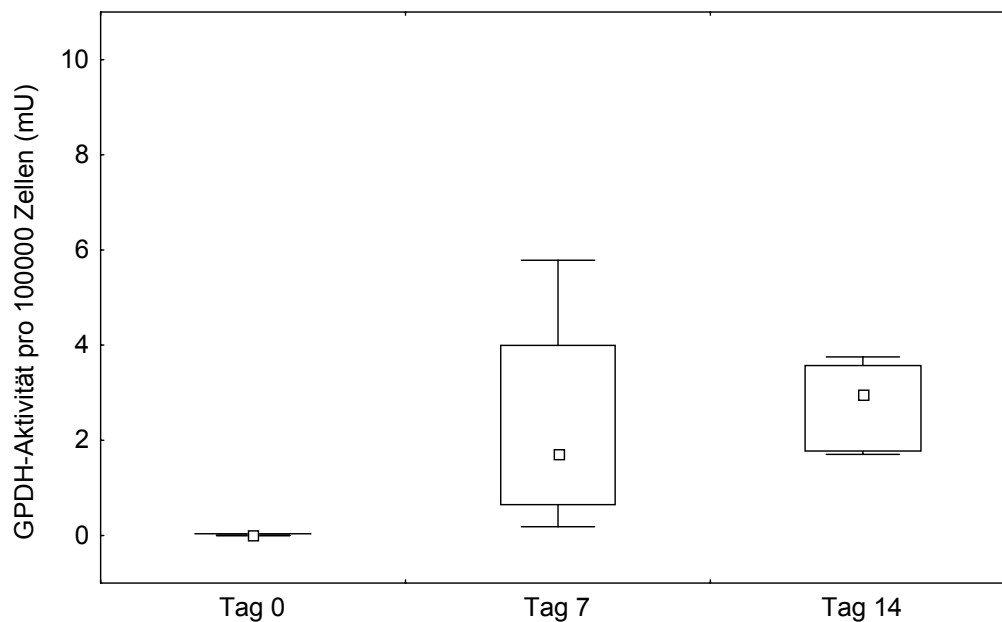


Abbildung 39: GPDH-Aktivität pro Zellzahl (100.000 Zellen) im Verlauf (mU) – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 10.

### GPDH-Aktivität bezogen auf Zellzahl an Tag 7

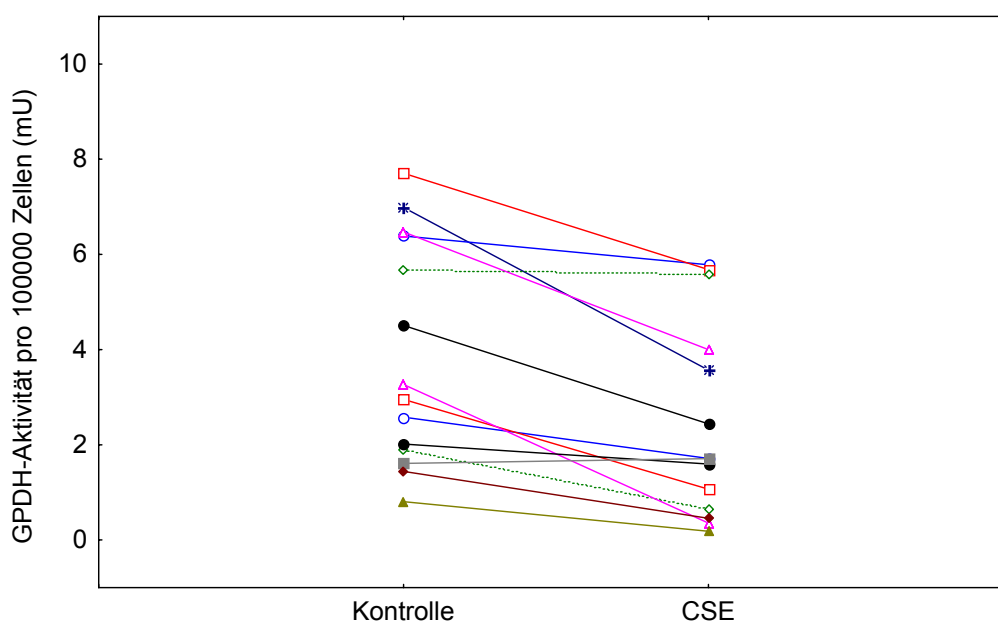
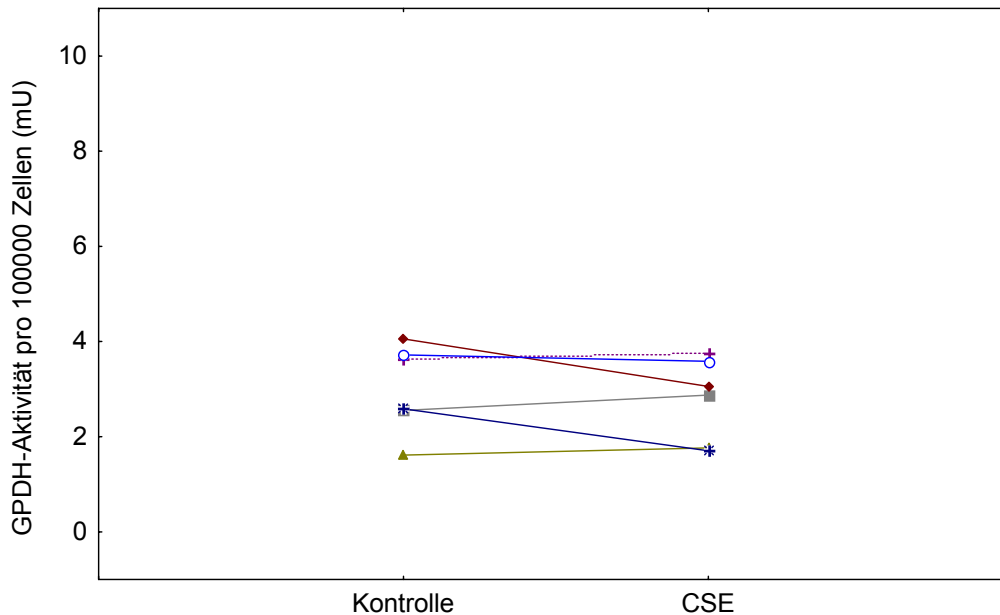


Abbildung 40: GPDH-Aktivität pro Zellzahl (100.000 Zellen) in mU – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

### GPDH-Aktivität bezogen auf Zellzahl an Tag 14



**Abbildung 41:** GPDH-Aktivität pro Zellzahl (100.000 Zellen) in mU – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

### **6.4.3 GPDH-Aktivität pro Proteingehalt**

Die GPDH-Aktivität bezogen auf die Proteinmenge war an Tag 7 in der CSE-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle im Mittel ( $\pm$ SEM) um  $52,7 \pm 5,9$  % erniedrigt ( $n=14$ ;  $p<0,01$ ). Auch an Tag 14 war dieser Unterschied noch nachweisbar ( $p=0,027$ ), wenngleich gering.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
<b>Tag 0, Gabe des Cocktails (n=16)</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>Tag 7 (n=14)</b>	6,96 $\pm$ 1,08	3,54 $\pm$ 0,76
<b>Tag 14 (n=6)</b>	4,35 $\pm$ 0,70	3,26 $\pm$ 0,55

**Tabelle 11:** GPDH-Aktivität (mU) pro 100  $\mu$ g Protein der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der auswertbaren Versuche an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben. CSE wurde an Tag 0 appliziert und war bis Versuchsende anwesend, indem er ab Tag 2 (Entfernung des Differenzierungscocktails) bei jedem partiellen Mediumwechsel zum Füttern der Zellen im Abstand von 2 Tagen erneut zugegeben wurde.



### GPDH-Aktivität bezogen auf Proteingehalt im Verlauf - Kontrolle

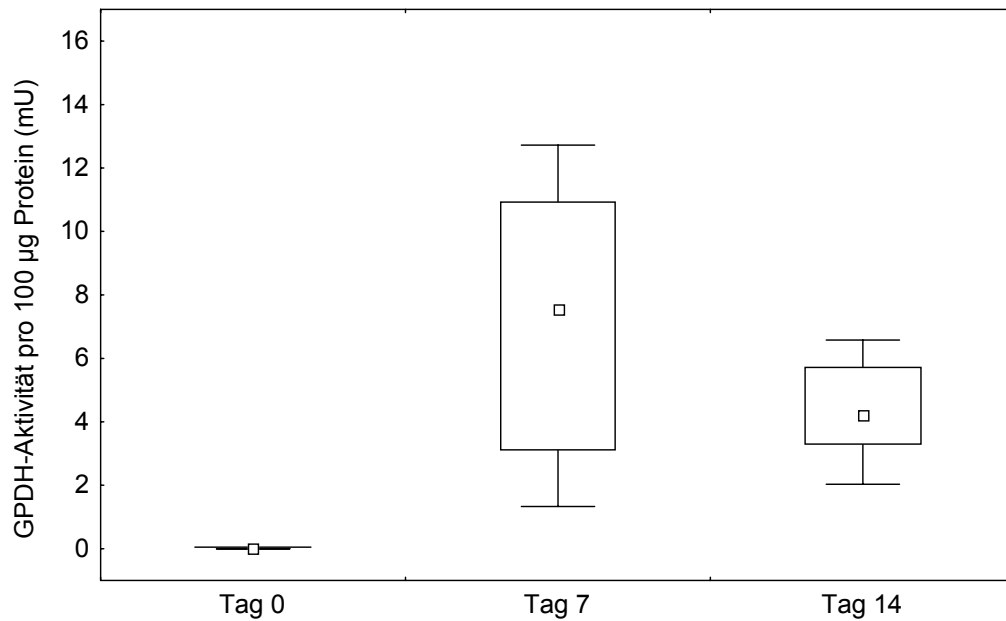


Abbildung 42: GPDH-Aktivität pro Proteingehalt (mU pro 100 µg Protein) im Verlauf – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 11.

### GPDH-Aktivität bezogen auf Proteingehalt im Verlauf - CSE

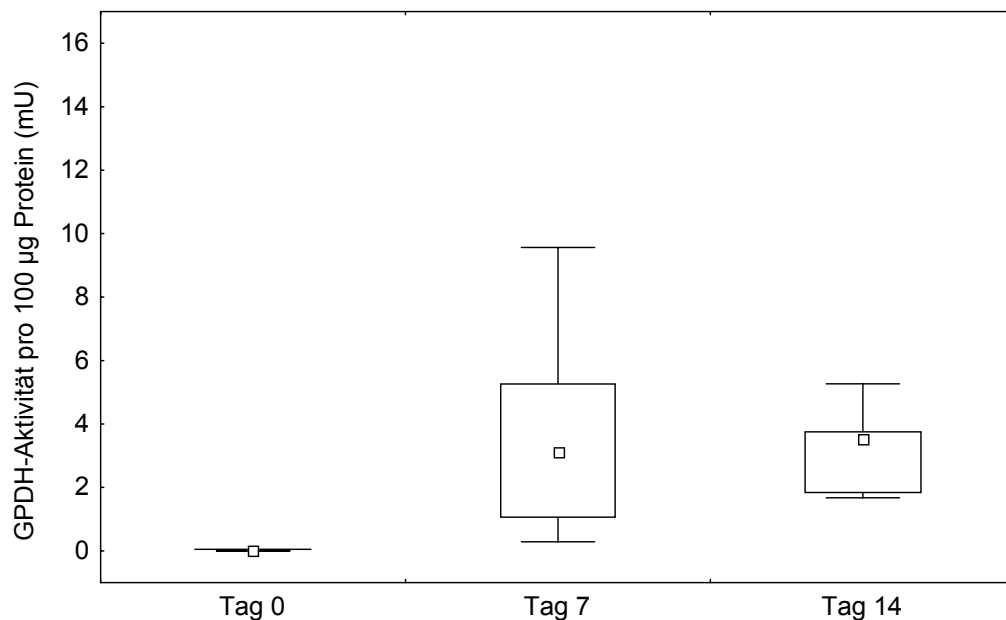


Abbildung 43: GPDH-Aktivität pro Proteingehalt (mU pro 100 µg Protein) im Verlauf – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 11.

GPDH-Aktivität bezogen auf Proteingehalt an Tag 7

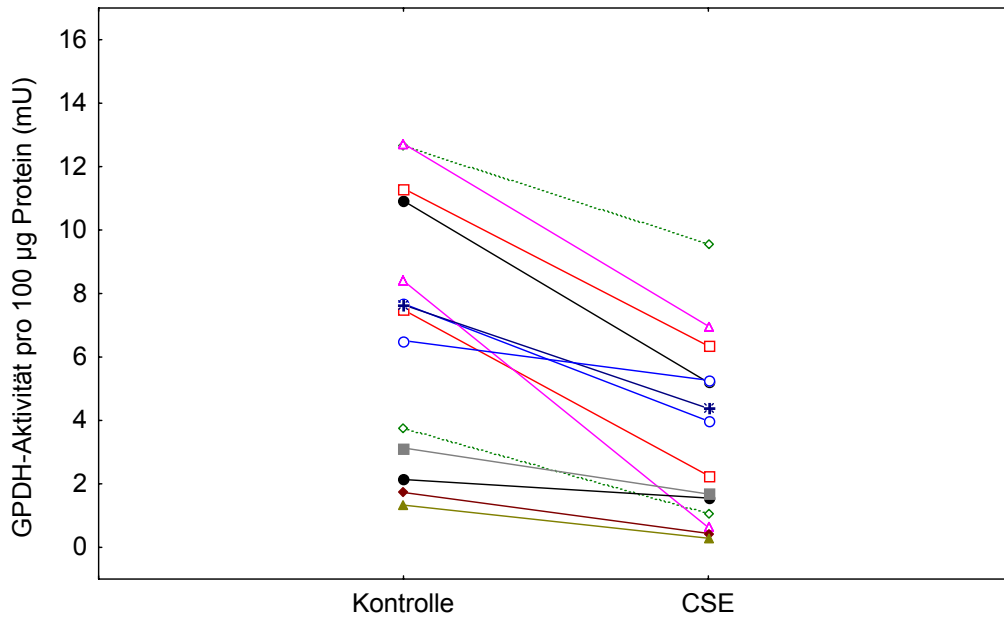


Abbildung 44: GPDH-Aktivität pro Proteingehalt (mU pro 100 µg Protein) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

GPDH-Aktivität bezogen auf Proteingehalt an Tag 14

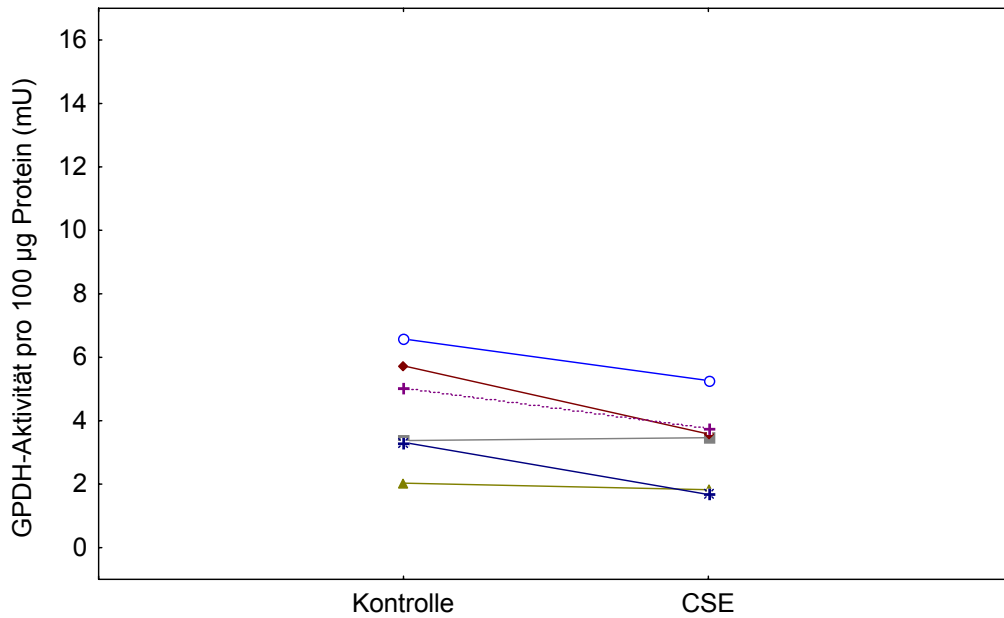


Abbildung 45: GPDH-Aktivität pro Proteingehalt (mU pro 100 µg Protein) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

#### **6.4.4 GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt**

Bezogen auf die Lipidmenge zeigte sich sowohl an Tag 7 (n=13) als auch an Tag 14 (n=6) gemessen an einem Signifikanzniveau von  $p=0,05$  kein Unterschied zwischen CSE- und Kontrollgruppe.

Versuchstag	Kontrolle	CSE
Tag 0, Gabe des Cocktails (n=15,14)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tag 7 (n=13,14)	14,63 ± 2,22	10,90 ± 2,44
Tag 14 (n=6)	6,96 ± 0,91	6,12 ± 1,23

Tabelle 12: GPDH-Aktivität (mU) bezogen auf den Lipidgehalt (Anzahl der Pixel unterhalb des Cutoff-Wertes, hochgerechnet auf das normierte Gesamtfeld von 5038848 Pixel) multipliziert mit 1000000 in der Kontroll- und der CSE-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der Auswertungen an den entsprechenden Tagen ist unterschiedlich und wird als n angegeben.

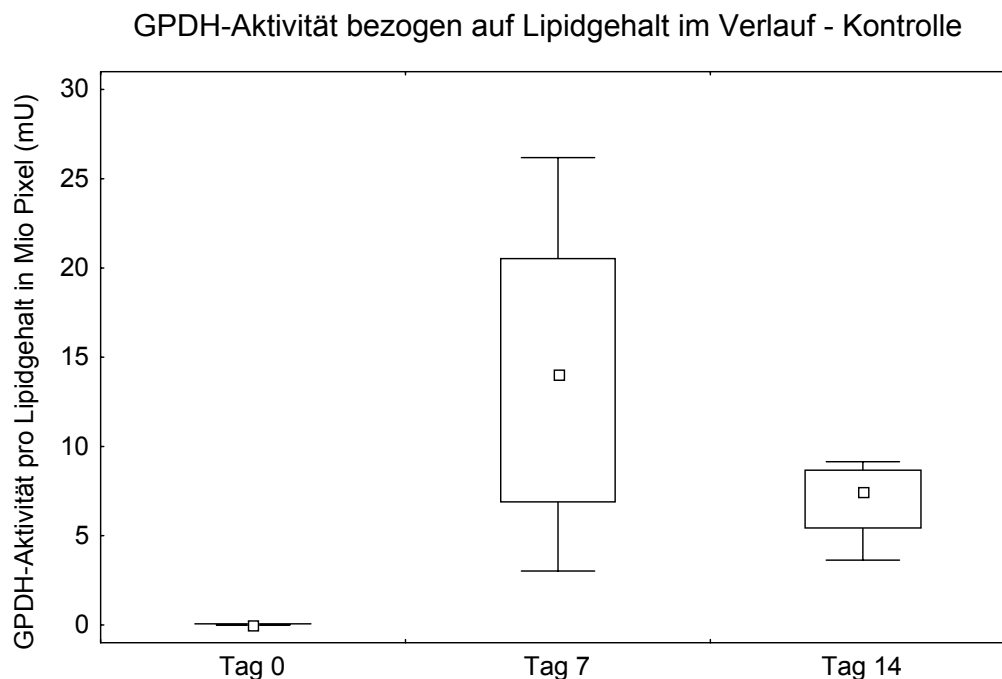


Abbildung 46: GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt in Mio Pixel (mU) im Verlauf – Kontrolle. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 12.

### GPDH-Aktivität bezogen auf Lipidgehalt im Verlauf - CSE

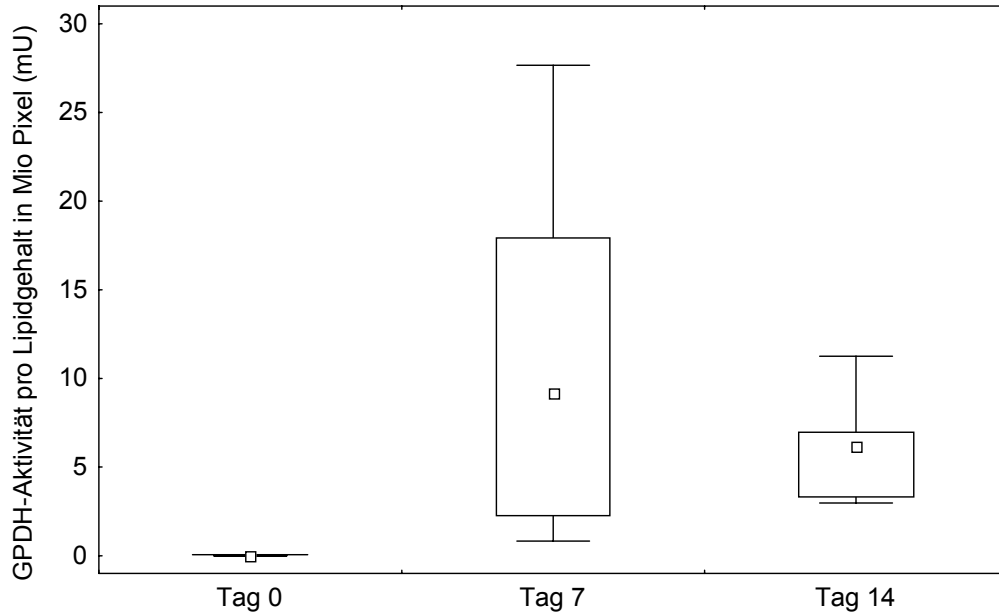


Abbildung 47: GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt in Mio Pixel (mU) im Verlauf – CSE. Graphisch dargestellt sind die Mediane (kleines Rechteck), die 25- und 75-Perzentile (Box), Minimum und Maximum (vertikale Balken; ohne Ausreißer) sowie die Ausreißer (kleine Kreise oder Sterne). Die Anzahl der Versuche findet sich in Tabelle 12.

### GPDH-Aktivität bezogen auf Lipidgehalt an Tag 7

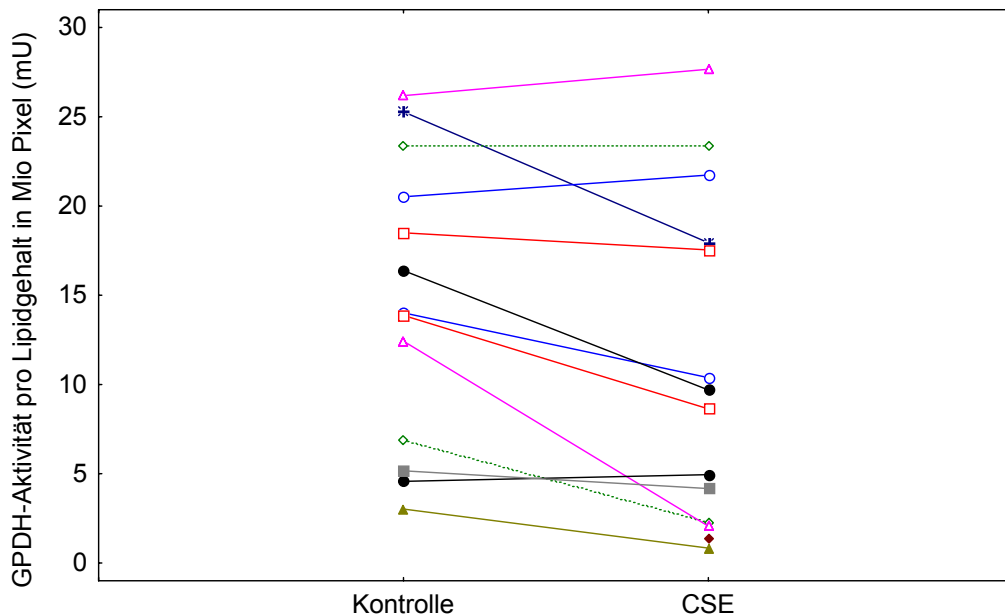


Abbildung 48: GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt in Mio Pixel (mU) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7.

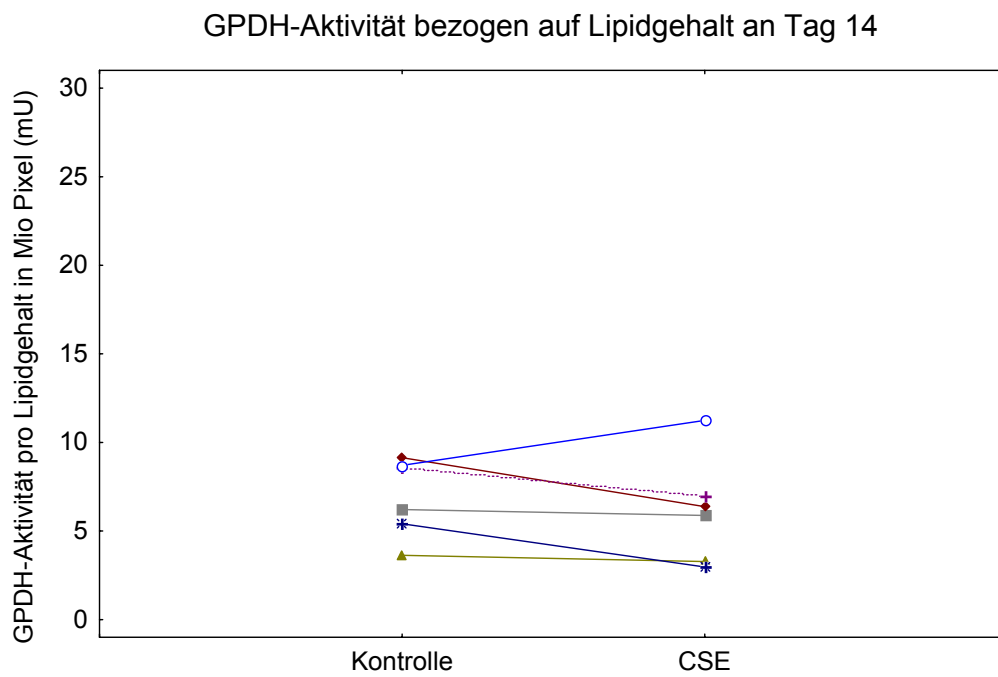


Abbildung 49: GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt in Mio Pixel (mU) – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14.

## **7. Diskussion**

Als Grundlage für die Diskussion der Ergebnisse werden im ersten Abschnitt die Vorgänge der Präadipozytendifferenzierung dargestellt. Anschließend erfolgen eine detaillierte Analyse der Daten und eine Interpretation der Ergebnisse. Zuletzt werden mögliche Mechanismen diskutiert, welche den beobachteten Phänomenen zugrunde liegen könnten.

### **7.1 Adipogenese**

Die Hauptfunktion von Adipozyten besteht in der Einlagerung von Triacylglycerinen während Phasen eines Nahrungsüberangebotes und in der Mobilisierung dieser Energiereserven bei mangelnder Nahrungszufuhr. Eine langfristige Zunahme der Fettspeicherung muss mit Änderungen der Größe und Zahl von Fettzellen einhergehen. Da sich differenzierte Adipozyten nicht teilen können, dienen Präadipozyten als Quelle für neues Fettgewebe. Diese können sich durch Differenzierung in reife Adipozyten umwandeln [Ntambi & Young-Cheul 2000].

Die in den durchgeführten Experimenten verwendete 3T3-L1-Zelllinie stellt eines der meist untersuchten Zellmodelle für die Präadipozytendifferenzierung dar. Voraussetzung für die Differenzierung ist zunächst die Konfluenz der Präadipozyten. Der hierbei entstehende Zell-Zell-Kontakt führt zum Proliferationsstopp und zur Expression von frühen Markern der Adipozytendifferenzierung wie beispielsweise Lipoprotein Lipase und Typ VI Kollagen. Die Differenzierung kann in dieser Phase durch mitogene und adipogene Stimulation angestoßen werden. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erfolgte dies in standardisierter Weise mittels Zugabe von Dexamethason, Insulin und Isobutylmethylxanthin (IBMX).

Dexamethason entfaltet seine Wirkung über den Glucocorticoid-Rezeptor, Insulin über den Rezeptor für IGF-1 und der cAMP-Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX über die Stimulierung cAMP-abhängiger Proteinkinasen. Die Zellen reagieren auf diese Stimulation mit mehreren postkonfluenten Zellteilungen. Anschließend erreichen sie eine Phase des Teilungsstops, in der sie beginnen, Marker der endgültigen Differenzierung zu exprimieren. Diese Marker entsprechen Enzymen und Proteinen, die für die Modulierung des Phänotyps eines reifen Adipozyten verantwortlich sind. [Ntambi & Young-Cheul 2000]. Die Differenzierung ist ca. 5-7 Tage nach deren Einleitung durch Zugabe des Differenzierungscocktails abgeschlossen.

Morphologisch ist der Prozess der Differenzierung durch eine Formänderung der

spindelförmigen Präadipozyten zu rundlichen Adipozyten, durch den Verlust der Teilungsfähigkeit sowie durch eine zunehmende Einlagerung von Lipidtröpfchen gekennzeichnet (siehe Abbildung 50).

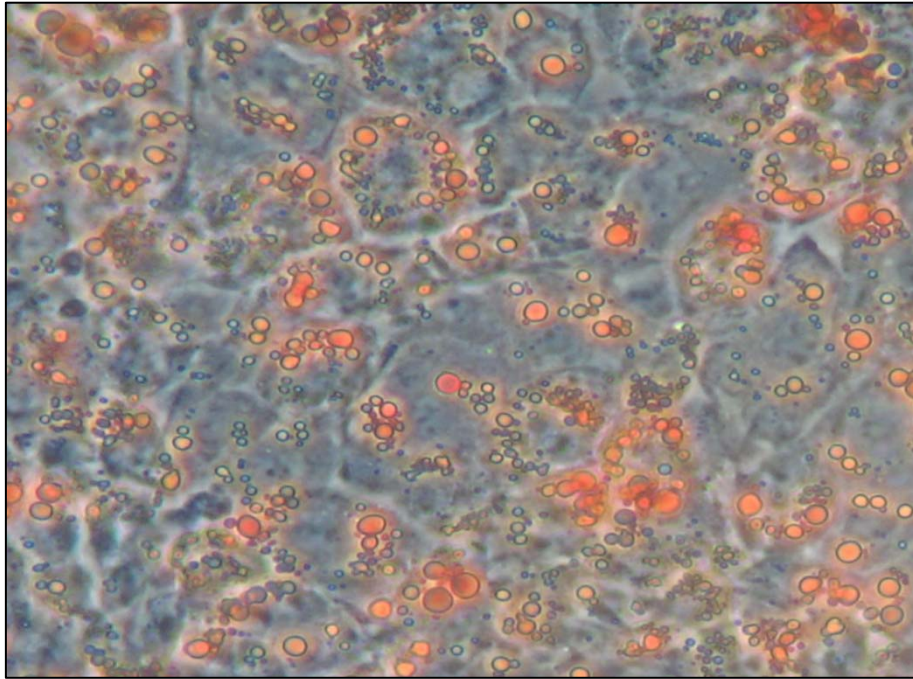


Abbildung 50: Anfärbung reifer Adipozyten mit Oil Red O. Die intrazellulären Lipidtröpfchen stellen sich rot dar.

Während der Differenzierung kommt es zu einer Kaskade von Ereignissen und Aktivierungen, wobei die Expression der Transkriptionsfaktoren Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) und CCAAT/Enhancer Binding Proteine (C/EBP) von besonderer Bedeutung ist. C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  gehören zu den ersten Transkriptionsfaktoren, die nach Gabe des Differenzierungscocktails induziert werden. Ihnen wird eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Differenzierungsprozesse zugeschrieben. Es wird angenommen, dass sie für die Expression von PPAR- $\gamma$  und C/EBP $\alpha$  verantwortlich sind, die schließlich die spezifische Genregulation beim reifen Adipozyten regulieren [Ntambi & Young-Cheul 2000, Morrison & Farmer 2000].

Die Differenzierung geht ebenfalls mit vielfältigen Änderungen der Genexpression einher. Hierbei wurden Auf- und Abregulationen von jeweils mehr als 800 Genen beschrieben [Burton *et al.* 2004]. Unter den zahlreichen nachgewiesenen beteiligten Komponenten nimmt die E2F-Familie Zellzyklus-regulierender Transkriptionsfaktoren eine wesentliche Stellung

ein. Diese bewirken den Übertritt der Zellen aus der Phase klonaler Expansion in den differenzierten Zustand. Hierbei wirken die verschiedenen Mitglieder der Familie teilweise gegensätzlich. Beispielsweise bewerkstelligt E2F1 nach hormoneller Stimulation in der initialen Phase die Adipozytendifferenzierung wohingegen E2F4 sie später hemmt. Die Vermittlung beider Effekte erfolgt jedoch wieder über PPAR- $\gamma$  [Fajas *et al.* 2002].

## **7.2 Interpretation der Ergebnisse**

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob die Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE) *in vitro* Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Funktion von Präadipozyten der Maus (3T3-L1) hatte.

In den Versuchen wurde CSE nach Zugabe des Differenzierungscocktails dauerhaft in einer Konzentration von 5 % auf den Zellen belassen, um herauszufinden, ob CSE prinzipiell eine Wirkung auf die Differenzierung bzw. Funktion ausüben konnte. Aufgrund der permanenten Exposition war jedoch eine Trennung zwischen akuten und dauerhaften Effekten auf die Funktion und Differenzierung nicht möglich. Im Gegensatz zu anderen Studien wurde das Insulin nach Entfernung des Differenzierungscocktails (Tag 2) nicht weiter verabreicht. Diese Entscheidung beruhte darauf, dass in Vorversuchen bei dauerhafter Insulingabe, d.h. optimaler Differenzierungsstimulation, der initial beobachtete Unterschied zwischen den Expositionen abgeschwächt erschien. Somit schien es nicht ratsam, die Differenzierung nach ihrem initialen Anstoßen in der Folge mit maximaler Kraft voranzutreiben.

Die Zellzählung ergab einen deutlichen Anstieg der Zellzahl zwischen Tag 0 und Tag 7 sowie anschließend das Erreichen eines Plateaus in beiden Gruppen. Dies war Ausdruck der durch den Differenzierungscocktail angeregten postkonfluenten Zellteilungen sowie des anschließend einsetzenden Teilungsstopps bei fortgeschrittener Differenzierung. Die Zellzahl in der Kontrollgruppe war abgesehen vom Ausgangswert (Tag 0) zu allen Messzeitpunkten signifikant höher als in der CSE-Gruppe. Interessanterweise war in der CSE-Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe an Tag 2 noch kein signifikanter Anstieg der Zellzahl gegenüber den Werten an Tag 0 zu verzeichnen. Insgesamt wiesen die Daten somit einerseits auf einen durch CSE verzögerten Proliferationsbeginn, andererseits auf eine verminderte maximal erreichbare Zellzahl der mit CSE behandelten Zellen hin.

Die gesamte Proteinmenge war - passend zur erhöhten Zellzahl - an Tag 7 in der Kontrollgruppe höher als in der CSE-Gruppe. Jedoch war dieser Effekt an Tag 14 -



möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl - nicht mehr statistisch nachweisbar. Im Gegensatz dazu ergab die Proteinmenge pro Zelle sowohl an Tag 7 als auch an Tag 14 höhere Werte für die mit CSE behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Diese Beobachtung lässt sich rein deskriptiv so interpretieren, dass die in der Proliferation und Differenzierung durch CSE gehemmten Zellen in eine relativ vermehrte Proteinbildung investierten, anstatt ihre metabolischen Reserven so weit als möglich für die Lipidspeicherung einzusetzen.

In der Tat war der mittels Bildverarbeitung gemessene Lipidgehalt an Tag 7 bei der Kontrolle im Vergleich zu CSE erhöht. An Tag 14 war dieser Unterschied zwar in geringerem Ausmaß, jedoch immer noch statistisch signifikant vorhanden. Auch bei der Messung der Lipidmenge pro Zelle deuteten sich an Tag 7 in der Kontrollgruppe höhere Werte als in der CSE-Gruppe an. Dieser Unterschied war zwar nur dann statistisch signifikant, wenn ein von den anderen Versuchen qualitativ abweichender Versuch nicht in die statistische Analyse miteinbezogen wurde (siehe 6.3.2), jedoch erschien dieses Vorgehen bei detaillierter Analyse der Einzeldaten legitim. An Tag 14 lag bezüglich der zellulären Lipidmenge kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen vor. Dies passte zu der Beobachtung, dass sowohl die Zellzahl als auch der Lipidgehalt bei Gabe von CSE erniedrigt waren.

Da der absolute Lipidgehalt der Kontrollgruppe im Vergleich zur CSE-Gruppe an Tag 7 deutlich erhöht war, der Unterschied im Proteingehalt beider Gruppen jedoch deutlich geringer ausfiel, wäre an Tag 7 ein signifikanter Unterschied der Lipidmenge bezogen auf den Proteingehalt zu erwarten gewesen, im Sinne eines erhöhten Wertes der Kontrolle. Die Messungen zeigten zwar eine Tendenz, jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied, was unter anderem auf die relativ geringe Fallzahl im Vergleich zur Streuung der Daten zurückzuführen sein dürfte.

Die beschriebenen Beobachtungen wiesen somit in die Richtung einer funktionellen Einschränkung der Adipozyten unter CSE-Exposition. Hierzu passten die Daten der GPDH-Aktivität als Marker der Adipozytendifferenzierung. Im Ausgangszustand fand sich keine Aktivität; somit waren die Zellen nicht bereits vorzeitig in eine Differenzierung eingetreten. Daher war der Versuchsansatz, der die Wirkung auf die Differenzierung der Adipozyten untersuchen sollte, valide. Die Messung der GPDH-Aktivität ergab erhöhte Werte für die Kontrollen im Vergleich zu CSE an Tag 7, aber auch noch an Tag 14. Auch gemessen pro Zelle war die GPDH-Aktivität an Tag 7 in der Kontrollgruppe höher als in der CSE-Gruppe, allerdings war an Tag 14 kein statistisch signifikanter Unterschied mehr nachweisbar. In

analoger Weise war auch die GPDH-Aktivität pro  $\mu\text{g}$  Protein an Tag 7 im Vergleich zur CSE-Gruppe signifikant erhöht. Dieser Unterschied war an Tag 14 deutlich geringer ausgeprägt als an Tag 7, jedoch noch statistisch signifikant.

Somit ergab sich in der Zusammenschau, dass die Daten der GPDH-Aktivität, sowohl absolut als auch pro Zelle oder Proteinmenge, sowie der Lipidmenge, sowohl absolut als auch pro Zelle, auf eine verminderte Adipogenese in der CSE-Gruppe an Tag 7 hindeuteten. Zugleich wies der Vergleich der Mittelwerte – ungeachtet der geringeren Fallzahl und somit Teststärke - darauf hin, dass diese Unterschiede nach 14 Tagen im Wesentlichen nicht mehr oder nur noch in geringem Ausmaß bestanden. Eine mögliche Erklärung für die Einebnung der Unterschiede könnte sein, dass die zwar reduzierte, jedoch immer noch deutlich vorhandene GPDH-Aktivität bei guter Nettoenergiespeicherung und Nährstoffversorgung im Hochglukosemedium schließlich eine Nivellierung der Lipidspeicherung bewirkte. Theoretisch wäre auch ein Toleranzeffekt gegenüber CSE denkbar, etwa durch eine persistierende Aufregulation der antioxidativen Abwehr. Unwahrscheinlich sind Selektionseffekte, da rein makroskopisch keine toxischen Effekte auf die Zellen beobachtet wurden. Auch waren die prozentualen Unterschiede der verschiedenen Messgrößen in der CSE- versus Kontrollgruppe in der Summe relativ gering; dies spricht ebenfalls gegen signifikante toxische Effekte.

In der vorliegenden Studie wurden keine Seneszenzmarker untersucht, jedoch ist eine durch CSE induzierte vorzeitige zelluläre Seneszenz denkbar, da sich alternde Adipozyten - zumindest in Kultur - zwar durch eine Verschlechterung in allen Aspekten der Funktionalität der Zelle auszeichnen, ungeachtet dessen jedoch immer noch eine effiziente Nettolipidspeicherung aufweisen [Yu & Zhu 2004]. Eine Seneszenz wäre daher mit den Beobachtungen an Tag 14 in Einklang zu bringen. Eine Beurteilung, ob eine zelluläre Alterung bei den hier beobachteten Effekten eine Rolle spielt, ist allerdings aufgrund der fehlenden Messung von Seneszenzmarkern nicht möglich. Dies festzustellen war jedoch nicht das Ziel der vorliegenden Untersuchung; diese sollte vielmehr prüfen, ob überhaupt CSE in einer nicht-toxischen Konzentration eine Wirkung auf Adipozyten ausübte und welche der Hauptkennzeichen der zellulären Funktion in welchem Maße und zeitlichem Verlauf beeinflusst wurden.

Zigarettenrauch enthält ca. 4800 Substanzen, von denen mindestens 250 als toxisch oder kanzerogen gewertet werden [Deutsches Krebsforschungszentrum 2008]. Zu beachten ist, dass der in den durchgeführten Untersuchungen angewandte Zigarettenrauchextrakt nur einen

Teil der vielen im Zigarettenrauch nachgewiesenen Stoffe enthält. Einerseits wurden nur die wasserlöslichen Bestandteile in das Medium aufgenommen, andererseits entwich Nebenstromrauch in den Abzug, welcher zahlreiche toxische Stoffe in höherer Konzentration enthält als der Hauptstromrauch. Die vorliegende Studie kann keine Aussage darüber treffen, welcher der einzelnen Stoffe des Zigarettenrauchextraktes für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Um dies zu eruieren, sind weitere Studien unter Verwendung einzelner definierter Inhaltsstoffe des CSE notwendig.

Auf den ersten Blick mag es nicht unbedingt plausibel erscheinen, dass der zahlreiche Oxidantien enthaltende Zigarettenrauch die Adipozytendifferenzierung hemmt, da zumindest eine endogene Oxidantienproduktion die Adipogenese fördern kann. So zeigte sich in einer früheren Untersuchung, dass eine indirekte, enzymatisch vermittelte Zufuhr von  $H_2O_2$  die Adipogenese antrieb [Krieger-Brauer & Kather 1995]. In die endogene  $H_2O_2$ -Erzeugung ist eine NADPH-abhängige, membranständige Oxidase involviert, deren Aktivierung durch Insulin und Insulin-like Growth Faktor I (IGF-1) erfolgen kann. Andererseits wurde berichtet, dass die Differenzierung durch Antioxidantien wie N-Acetylcystein oder Ascorbinsäure gehemmt werden konnte [Krieger-Brauer & Kather 1995]. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Aktivierung der Semicarbazid-sensitiven Amino-Oxidase (SSAO), die während der Adipogenese verstärkt exprimiert wird, die Differenzierung mittels der Erzeugung von  $H_2O_2$  fördert [Mercier *et al.* 2001]. Ähnliche eine Adipogenese fördernde Wirkungen konnten durch die Aktivierung der mitochondrialen Monamino-Oxidase (MAO), die ebenfalls  $H_2O_2$  erzeugt, erzielt werden [Carpéné *et al.* 2006]. Die beschriebenen Effekte ließen sich jedoch nicht eindeutig für direkt exogen appliziertes  $H_2O_2$  nachweisen [Krieger-Brauer & Kather 1995], was möglicherweise auf Stabilitätsprobleme zurückzuführen ist. Es ist zur Zeit nicht bekannt, in welchem Maße die Adipogenese auch von anderen extern zugefügten Oxidantien beeinflusst werden kann.

In den hier vorliegenden Versuchen kam es jedoch trotz der im Zigarettenrauch enthaltenen Oxidantien zu einer Einschränkung der Proliferation und Differenzierung der Präadipozyten, die sich in einer verminderten GPDH-Aktivität und Lipidakkumulation ausdrückte. Als nächstliegende Erklärung wäre denkbar, dass andere Komponenten außer Oxidantien in ihrer Wirkung dominierten. Dies gilt umso mehr, als CSE über den gesamten Versuchszeitraum anwesend war und somit den Zellen eine stete Abwehrleistung abforderte, die daher nicht mehr für die Lipidsynthese zur Verfügung stand. Diese Hypothese könnte in Versuchen getestet werden, in denen CSE nur temporär appliziert und nach wenigen Tagen wieder entfernt wird. In dieser Untersuchung wurde die kontinuierliche Exposition gewählt,

da sie – soweit *in-vitro*-Versuche überhaupt mit der *in-vivo*-Situation vergleichbar sind - eher der bei Rauchern vorliegenden Situation entspricht als die temporäre Gabe.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die im CSE enthaltenen Oxidantien die Differenzierung auf Kosten der Proliferation vorantrieben. Diese Hypothese wäre mit der in anderen Studien gezeigten differenzierungsfördernden Wirkung von Oxidantien vereinbar. Gegen diese Hypothese spricht, dass die Funktion der Adipozyten im Sinne der Lipidspeicherung und GPDH-Aktivität auch dann eingeschränkt war, wenn sie pro Zellzahl ausgewertet wurde. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die Anwesenheit von CSE vermutlich immer noch eine direkte Ableistung erforderte, die nicht für die eigentliche Adipozytenfunktion zur Verfügung stand. Man könnte spekulieren, dass eine mögliche differenzierungsfördernde Wirkung von CSE, soweit vom akuten Effekt trennbar, zum einen eine gesteigerte Funktionsfähigkeit der Zellen bewirken könnte, zum anderen aber auch eine geringere, indem die sozusagen vorzeitig differenzierten Zellen gegenüber regulär differenzierten Zellen in ihrer Funktionalität eingeschränkt sind. Bemerkenswert schien in jedem Fall, dass die Unterschiede zwischen den Expositionen im Zeitverlauf abnahmen, und zwar nicht nur bezüglich der kumulierten Lipidmenge, sondern auch bezüglich der GPDH-Aktivität. Anhand der hier erhobenen phänomenologischen Daten und wegen der kontinuierlichen Exposition lässt sich in dieser Untersuchung nicht zwischen diesen verschiedenen Erklärungen unterscheiden.

Insgesamt wiesen somit die Ergebnisse der vorliegenden Studie in die Richtung, dass sowohl die Proliferation und Differenzierungsgeschwindigkeit von Präadipozyten als auch die Funktionalität der entstandenen Adipozyten durch die kontinuierliche Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt in einer nicht-toxischen Konzentration *in vitro* verringert werden konnten. Da diese Effekte von CSE auf Präadipozyten bzw. Adipozyten auch in unabhängig durchgeführten Folgeversuchen im Rahmen einer anderen Doktorarbeit beobachtet wurden, kann man davon ausgehen, dass es sich um reproduzierbare Ergebnisse handelt.

### **7.3 Mögliche zugrundeliegende Mechanismen**

Die bisherigen Befunde lassen noch keine eindeutige Identifizierung der beteiligten Mechanismen zu. Im Folgenden werden mögliche Wirkungskanäle in Verbindung mit der Literatur diskutiert, die den beobachteten Ergebnissen zugrunde liegen könnten. Diese Erörterungen tragen allerdings zur Zeit primär spekulativen Charakter, um sinnvolle weitere Fragestellungen zu generieren.

Wie oben beschrieben (siehe 7.1) spielt PPAR- $\gamma$  bei der Adipozytendifferenzierung eine entscheidende Rolle. Daneben erscheinen die Familie der Transkriptionsfaktoren PPAR- $\gamma$  für die COPD bedeutsam, da ihre erhöhte Expression in Alveolarmakrophagen deren inflammatorische Aktivität vermindert und Alveolarmakrophagen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Atemwegsentzündung einnehmen [Valledor & Ricote 2004, Barnes 2004]. Es wird davon ausgegangen, dass PPAR- $\gamma$  seine antiinflammatorischen Effekte durch die Unterdrückung der Expression proinflammatorischer Gene erzielt. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die antiinflammatorischen Eigenschaften von PPAR- $\gamma$  bei der Behandlung entzündlicher Atemwegserkrankungen hilfreich sein könnten [Belvisi *et al.* 2006].

Des Weiteren wird die Fettmobilisierung bei kalorischer Restriktion über SIRT1 vermittelt, welches durch Repression PPAR- $\gamma$ -kontrollierter Gene die Lipolyse sowie die Hemmung der Adipogenese bewirkt [Picard *et al.* 2004]. Die Sirtuine gehören zur Klasse III der Histondeacetylasen und benötigen zur Deacetylierung NAD<sup>+</sup> als Kosubstrat. Hierdurch erscheinen sie an den Energiestoffwechsel der Zelle angekoppelt, was für diese Arbeit von besonderem Interesse ist. Beim Menschen gehören 7 Mitglieder zur Familie der Sirtuine (SIRT1-7). Sie sind wesentlich an der Regulierung von Zellzyklus, Apoptose, Metabolismus, Inflammation, Langlebigkeit und Alterungsvorgängen beteiligt [Yang *et al.* 2007, Rajendrasozhan *et al.* 2008]. Da alle diese Prozesse bei der Pathogenese der COPD eine Rolle spielen (siehe 2.3), scheint es plausibel, dass die Sirtuine eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung und Unterhaltung der Erkrankung einnehmen.

Sirtuine steuern Signalwege bei Einwirkung von Stressbedingungen, beispielsweise metabolische Veränderungen bei kalorischer Restriktion. Es ist bekannt, dass bei kalorischer Restriktion die Vermittlung der Langlebigkeit eng mit der Expression von SIRT1 bzw. seiner Homologen, z.B. SIR2 in der Hefe, gekoppelt ist. Auch die antiinflammatorische Wirkung der Sirtuine ist im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse. SIRT1 steuert die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine unter anderem durch Regulierung von NF- $\kappa$ B. Yang *et al.* [2007] konnten einen Abfall der SIRT1-Aktivität in MonoMac6-Zellen nach Exposition gegenüber CSE nachweisen. Dies ging mit erhöhter Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-8 einher. Sirtuin-Inhibitoren erhöhten die durch CSE induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wohingegen Sirtuin-Aktivatoren sie hemmten. Auch *in vivo* zeigte sich in den Lungen von Ratten nach Exposition gegenüber Zigarettenrauch eine reduzierte SIRT1-Aktivität, verbunden mit erhöhtem Nachweis von Entzündungsmediatoren in der BALF sowie im Lungengewebe [Yang *et al.* 2007].

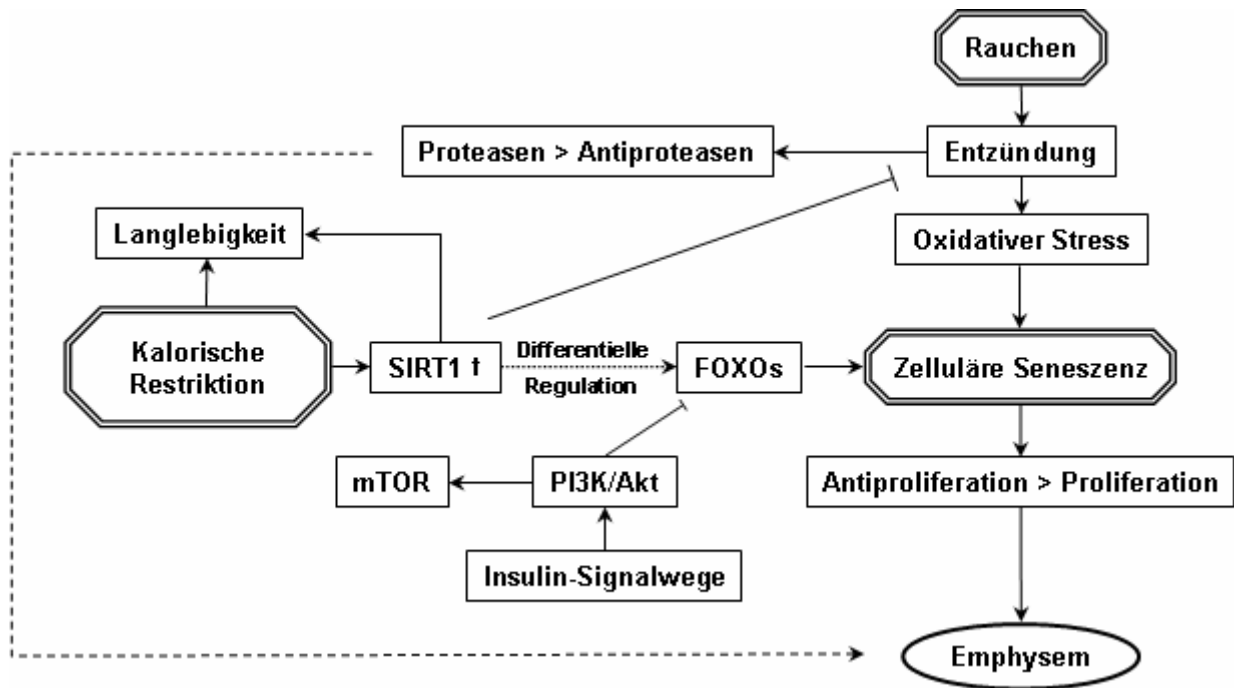


Abbildung 51: Mögliche Rolle von Sirtuinen und Insulin-Signalwegen beim Emphysem. mTOR steht für mammalian target-of-rapamycin kinase, PI3K/Akt für phosphatidylinositol 3-kinase bzw. serine-threonine-kinase, Mitglied der Proteinkinase B (PKB) Familie. Modifiziert nach Karrasch *et al.* [2008].

Erst kürzlich fanden Rajendrasozhan *et al.* [2008] eine Verminderung des SIRT1-Spiegels in Lungengewebe von Rauchern und Patienten mit COPD im Vergleich zu Nichtrauchern. Diese Reduktion von SIRT1 kann in der Aktivierung einer NF-κB gesteuerten abnormen chronischen Entzündungsreaktion resultieren, wie sie in Lungen von Rauchern und COPD-Patienten beobachtet wird. Die Bedeutung von SIRT1 für die Pathogenese der COPD wird noch unterstrichen durch die Beobachtung, dass eine genetische Ablation von SIRT1 in Mäuselungen zu einer vermehrten Infiltration mit Neutrophilen und somit zu vermehrter Inflammation führt [McBurney *et al.* 2003, Rajendrasozhan *et al.* 2008]. Die vorhandenen Daten weisen darauf hin, dass SIRT1 über die Steuerung vermehrter Neutrophileninfiltration und NF-κB-Aktivierung an der Vermittlung der Entzündungsreaktion in Lungen von Rauchern und COPD-Patienten beteiligt ist.

Neben der Vermittlung der Langlebigkeit bei kalorischer Restriktion sowie der anti-inflammatorischen Wirkung wird SIRT1 eine wesentliche Bedeutung für den Energiestoffwechsel zugeschrieben. Es ist bekannt, dass SIRT1 in die Steuerung des Metabolismus von Glucose, Fettsäuren und Cholesterol involviert ist [Boily *et al.* 2008]. Interessanterweise waren Mäuse ohne das SIRT1-Protein (SIRT1-Null-Mäuse) trotz ähnlicher Nahrungsaufnahme kleiner und weniger aktiv als ihre normalen Artgenossen. Außerdem

wiesen sie einen höheren Sauerstoffverbrauch sowie eine erhöhte Fettsäureoxidation auf [Boily *et al.* 2008]. Insgesamt implizierten die Daten der Studie eine ineffiziente Verwertung der aufgenommenen Kalorien sowie einen hypermetabolischen Stoffwechsel der SIRT1-Null-Mäuse. Die Ergebnisse unterstreichen die Rolle von SIRT1 als bedeutsamer Regulator des Energiemetabolismus.

Da SIRT1 wie oben beschrieben vermutlich an der pulmonalen Entzündungsreaktion bei Rauchern und COPD-Patienten mitwirkt sowie in den Energiestoffwechsel und die Vermittlung der Langlebigkeit bei kalorischer Restriktion involviert ist, wäre eine Beteiligung von SIRT1 an den in dieser Studie festgestellten Effekten von CSE auf die Adipozytendifferenzierung plausibel, sofern man den Anteil von Adipozyten an einer Entzündung mittels Adipokinen bedenkt sowie die Tatsache, dass Emphysem und Körpergewicht miteinander gekoppelt zu sein scheinen.

Interessanterweise scheinen auch Forkhead Box (FOX) Transkriptionsfaktoren an der Adipogenese beteiligt zu sein. Die transskriptionelle Aktivität von PPAR- $\gamma$  wird beispielsweise durch die Expression von FOXC2 gehemmt [Davis *et al.* 2004]. Dies wiederum führt zu einer reduzierten Expression von C/EBP $\alpha$  oder Adiponektin, einem charakteristischen Adipokin, welches die Reifung von Adipozyten selbst fördernd beeinflusst [Fu *et al.* 2005]. SIRT1 hat neben den Histonen auch Transkriptionsfaktoren wie p53 und solche des Typs Forkhead Box O (FOXO) zum Substrat [Motta *et al.* 2004]. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors FOXO3 bzw. FOXO3a scheint mittels Deacetylierung gesteuert zu werden. Hierdurch findet eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Proliferation, Zellzyklusarrest und Apoptose in Richtung Zellzyklusarrest statt [Brunet *et al.* 2004, Motta *et al.* 2004]. Es gibt Hinweise darauf, dass das Zusammenspiel zwischen SIRT1 und den FOXO-Transkriptionsfaktoren wesentlich an der zellulären Stressantwort beteiligt ist [Burgering & Kops 2002, Giannakou & Partridge 2004]. Inwieweit die Modulation der genannten Transkriptionsfaktoren, beispielsweise durch zigarettenrauchbedingten Stress, auf die Adipogenese bzw. die Funktion von Adipozyten Einfluss nimmt, ist derzeit nicht ausreichend untersucht, um daraus Schlüsse zu ziehen.

In Abbildung 51 sind wichtige der möglichen Einflussfaktoren und deren Zusammenhänge bei der Pathogenese der COPD in einer Übersicht dargestellt.

Zusammenfassend weisen die Befunde der Studie darauf hin, dass Komponenten des Zigarettenrauches *in vitro* hemmende Effekte auf die Differenzierung, Proliferation und Funktion von Präadipozyten bzw. Adipozyten ausüben. Prinzipiell können wasserlösliche Komponenten des Zigarettenrauches in die Zirkulation gelangen und dort extrapulmonale Krankheitsprozesse wie die Atherosklerose auslösen. Somit ist die Annahme einer Wirkung des Zigarettenrauches auf die Adipozyten und somit auf das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung nicht unrealistisch. Da wie oben beschrieben ein niedriges Körpergewicht die Entwicklung einer COPD begünstigt, wäre dies ein denkbarer Mechanismus, wie Zigarettenrauch über systemische Effekte die Entwicklung und den Verlauf einer COPD beeinflussen kann.



## **8. Ausblick**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben, dass wässriger Zigarettenrauchextrakt die Proliferation, enzymatische Funktion und Lipidspeicherung von Präadipozyten bzw. Adipozyten *in vitro* beeinträchtigen kann. Die Arbeit hatte den Nachweis derartiger Effekte zum Gegenstand, nicht jedoch die Abklärung, welche der zahlreichen Komponenten des Zigarettenrauches für diese Wirkung verantwortlich war. Daher wären weitere Untersuchungen sinnvoll, die den Effekt einzelner definierter Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchextrakts, beispielsweise Nikotin oder Oxidantien, auf die Präadipozytendifferenzierung untersuchen. In analoger Weise könnten die Wirkungen anderer, darunter auch arbeitsmedizinisch relevanter Noxen auf Präadipozyten analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde CSE dauerhaft auf den Zellen belassen. Daher kann nicht beurteilt werden, inwieweit die beobachteten Effekte reversibel sind oder auf durch den Zigarettenrauchextrakt induzierten persistierenden Störungen der Zellaktivität beruhen. Um dies weiter zu eruieren, müsste die Auswirkung einer temporären versus permanenten Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt untersucht werden.

Im Rahmen weiterer Experimente könnten auch Seneszenzmarker wie z.B. SA- $\beta$ -Galaktosidase erfasst werden, um zu prüfen, ob der Effekt von Zigarettenrauchextrakt auf die Präadipozytendifferenzierung mit einer vorzeitigen zellulären Seneszenz bzw. einer merklichen Stressantwort einhergeht. Darüber hinaus könnten Effekte auf die Freisetzung von Adipokinen und Entzündungsmediatoren sowie die internen Signalwege untersucht werden. Hier wäre besonders interessant, zu eruieren, ob und inwieweit Sirtuine an der Antwort beteiligt sind, da diese die Adipozytendifferenzierung beeinflussen können, durch Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren an der zellulären Stressantwort, Seneszenz und Apoptose beteiligt sind sowie mittels ihrer Wirkungen auf Histone im Prinzip auch längerfristige Regulationen direkt oder indirekt vermitteln können.

## **9. Zusammenfassung**

Die COPD ist eine der häufigsten Atemwegserkrankungen. Sie geht mit einer chronischen Entzündung der Atemwege, den Symptomen Husten, Dyspnoe und Schleimproduktion sowie einer chronischen Obstruktion einher, die unter antiobstruktiver Therapie bestehen bleibt.

Die COPD wird durch die Inhalation von Noxen verursacht, insbesondere Zigarettenrauch. Klinisch unterscheidet man zwei Phänotypen, die meist in unterschiedlicher Ausprägung gemeinsam vorkommen. Die chronisch-obstruktive Bronchitis zeichnet sich primär durch bronchiale Obstruktion und Mukushypersekretion aus, wohingegen beim Lungenemphysem ein irreversibler Abbau der Alveolen und Strukturverlust der Lunge im Vordergrund steht. Nach gängiger Auffassung führt die Noxe zu einer Atemwegsentzündung mit Verschiebung der Proteasen-Antiproteasen-, Oxidantien-Antioxidantien- und Apoptose-Proliferation-Gleichgewichte. Zudem gibt es Hinweise auf eine vorzeitige zelluläre Seneszenz.

Aufgrund zahlreicher extrapulmonaler Manifestationen wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Kachexie und muskuläre Dysfunktion wird die COPD zunehmend als systemische Erkrankung wahrgenommen. Insbesondere Patienten mit Lungenemphysem weisen häufig eine Kachexie auf. Auch ist möglicherweise ein niedrigeres im Vergleich zu einem höheren Körpergewicht bei Rauchern mit einem erhöhten Risiko für eine COPD assoziiert. Daher könnte ein niedriges Gewicht nicht nur Folge, sondern auch treibender Faktor für die Entwicklung einer COPD sein. Da Zigarettenrauchbestandteile über die Zirkulation in extrapulmonale Organe gelangen können, ist u.a. auch ein Einfluss auf Adipozyten denkbar, als möglicher Mechanismus, über einen systemischen Umweg die Erkrankung zu beeinflussen.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, den Effekt von Zigarettenrauchextrakt auf die Differenzierung von Präadipozyten zu untersuchen. Hierzu wurden 3T3-L1-Präadipozyten der Maus am 2. postkonfluenten Tag (Tag 0) mit einem Differenzierungscocktail aus IBMX, Dexamethason und Insulin inkubiert, der für 2 Tage belassen wurde. 3 Stunden nach Cocktailgabe wurde 5 % Zigarettenrauchextrakt (CSE) hinzugegeben; die Kontrollen wurden analog mit Kulturmedium behandelt. Nach 2 Tagen wurde der Differenzierungscocktail entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit reinem Kulturmedium (plus Antibiotika und FCS) bzw. in der CSE-Gruppe mit zusätzlichem CSE alle 2 Tage gefüttert. Die Auswertungen erfolgten primär an den Tagen 0, 7 und 14 sowie in geringerer Anzahl auch an den Tagen 2, 5 und 11. Die adipozytenspezifischen Methoden mussten zunächst im Labor etabliert werden. Gemessen wurden Lipidmenge, GPDH-Aktivität (Enzym der Triglyceridsynthese, Marker der Adipozyten-Differenzierung), Proteinmenge (Bradford) sowie Zellzahl (Neubauer-

Zählkammer). Die Lipidbestimmung mittels Bildauswertung wurde im Rahmen dieser Arbeit als Alternative zur klassischen photometrischen Methode neu entwickelt. Hierzu wurden mittels Digitalkamera Fotos der Ölrot-gefärbten Präparate durch ein inverses Mikroskop angefertigt und mittels Bildanalyseprogramm ausgewertet. Hierbei konnten nach Festlegung eines geeigneten Cutoff-Wertes der Pixelintensität die Lipidtröpfchen vom Hintergrund abgegrenzt und somit die Menge der Lipide bestimmt werden.

Die Experimente (jeweils  $n=4-16$ ) ergaben einen statistisch signifikanten ( $p<0,01$ ) Anstieg der Zellzahl über die Zeit mit Bildung eines Plateaus ab Tag 5 in beiden Gruppen. An allen auf Tag 0 folgenden Tagen war die Zellzahl in der Kontrollgruppe signifikant ( $p<0,01$ ) höher als in der CSE-Gruppe. Die GPDH-Aktivität zeigte sowohl absolut als auch bezogen auf Proteinmenge oder Zellzahl an Tag 7 höhere Werte für die Kontrollen als für CSE ( $p<0,01$ ), doch war an Tag 14 der Effekt auf die GPDH-Aktivität pro Zellzahl nicht mehr nachweisbar und der Unterschied bezogen auf den Proteingehalt nur noch gering. Die absolute Lipidmenge ergab an Tag 7 signifikant höhere Werte in der Kontrolle verglichen mit CSE ( $p<0,01$ ); auch bezogen auf die Zellzahl wiesen die Kontrollen höhere Werte auf, dies war jedoch nicht statistisch signifikant. An Tag 14 zeigte der absolute Lipidgehalt nur noch einen geringen Unterschied zwischen den Gruppen und bezogen auf die Zellzahl keinen Unterschied mehr.

In der Zusammenschau wiesen diese *in-vitro*-Ergebnisse in Richtung einer beeinträchtigten Adipogenese der mit CSE behandelten Zellen, vor allem an Tag 7, wobei sich die Unterschiede an Tag 14 weitgehend nivellierten. Die Befunde sind insofern lehrreich, als endogene Oxidantien als der Adipogenese förderlich gelten. Dies scheint für das externe Oxidanz CSE nicht zu gelten. Denkbar wäre eine Beteiligung der multifunktionalen (Histon-)Deacetylase SIRT1, da dieses Sirtuin an der Regulierung von Zellzyklus, Apoptose, Inflammation, aber auch von Metabolismus, Langlebigkeit und Adipogenese beteiligt ist und beispielsweise in der Lunge von Rauchern und Patienten mit COPD vermindert gefunden wurde.

Insgesamt passen die Daten zu der Hypothese, dass Rauchen über lokale Auswirkungen in der Lunge hinaus im Prinzip auch systemische Effekte auf hormonell aktive Zellen wie Adipozyten bzw. Präadipozyten ausüben kann. Neben den bekannten Wegen wäre auch so ein Einfluss von Zigarettenrauch auf Körpergewicht und –zusammensetzung denkbar und somit indirekt ebenfalls auf Entstehung und Fortschreiten eines Lungenemphysems. Weitere Untersuchungen müssen prüfen, welche Komponenten des Zigarettenrauchs für den Effekt verantwortlich sind und ob diese Effekte reversibel sind oder persistierende Störungen der Zellaktivität darstellen.

## **10. Literaturverzeichnis**

- Abboud RT, Fera T, Richter A, Tabona MZ, Johal S (1985). Acute effect of smoking on the functional activity of alpha1-protease inhibitor in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 131:79-85.
- Agustí AGN, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X (2003). Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21:347–360.
- Agustí AGN (2005). Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:367-370
- Aikata H, Takaishi H, Kawakami Y, Takahashi S, Kitamoto M, Nakanishi T, Nakamura Y, Shimamoto F, Kajiyama G, Ide T (2000). Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation. *Exp Cell Res* 256:578-582.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10114-10118.
- American Thoracic Society (2000). What constitutes an adverse health effect of air pollution? Official statement of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Medicine* 161:665-673.
- American Thoracic Society (2002). American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. [www.thoracic.org/sections/publications/statements/pages/eoh/burden1-11.html](http://www.thoracic.org/sections/publications/statements/pages/eoh/burden1-11.html).
- Anderson JA, Dunnill MS, Ryder RC (1972). Dependence of the incidence of emphysema on smoking history, age, and sex. *Thorax* 27:547-551.
- Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP (2002). Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *Am J Respir Crit Care Med* 166:675-679.
- Anzueto A (2006). Clinical course of chronic obstructive pulmonary disease: review of therapeutic interventions. *Am J Med* 119(10 Suppl 1):46-53.
- Barnes PJ (2000). Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 343:269-280.
- Barnes PJ (2004). Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* 1:59-70.
- Bartal M (2005). COPD and tobacco smoke. *Monaldi Arch Chest Dis* 63:213-225.
- Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R (2003). Neutrophilic inflammation in induced sputum of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 20:138-143
- Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 533:101-109.
- Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y (1999). Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1985-1991.
- Bischoff C, Graakjaer J, Petersen HC, Hjelmberg JB, Vaupel JW, Bohr V, Koelvraa S, Christensen K (2005a). The heritability of telomere length among the elderly and oldest-old. *Twin Res Hum Genet* 8:433-439.
- Bischoff C, Graakjaer J, Petersen HC, Jeune B, Bohr VA, Koelvraa S, Christensen K (2005b). Telomere length among the elderly and oldest-old. *Twin Res Hum Genet* 8:425-432.
- Blüher M, Kahn BB, Kahn CR (2003). Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572-574.

- Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, Hong He X, Sabourin G, Estey C, Moffat C, Crawford S, Saliba S, Jardine K, Xuan J, Evans M, Harper M-E, McBurney MW (2008). SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS ONE* 3: e1759.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303:2011-2015.
- Budweiser S, Heinemann F, Meyer K, Wild PJ, Pfeifer M (2006). Weight gain in cachectic COPD patients receiving noninvasive positive-pressure ventilation. *Respir Care* 51:126-132.
- Budweiser S, Hitzl AP, Jörres RA, Heinemann F, Arzt M, Schroll S, Pfeifer M (2007). Impact of noninvasive home ventilation on long-term survival in chronic hypercapnic COPD: a prospective observational study. *Int J Clin Pract* 61:1516-1522.
- Budweiser S, Meyer K, Jörres RA, Heinemann F, Wild PJ, Pfeifer M (2008). Nutritional depletion and its relationship to respiratory impairment in patients with chronic respiratory failure due to COPD or restrictive thoracic diseases. *Eur J Clin Nutr* 62:436-443.
- Burgering BM, Kops GJ (2002). Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 27:352-360.
- Burrows B, Bloom JW, Traver GA, Cline MG (1987). The course and prognosis of different forms of chronic airways obstruction in a sample from the general population. *N Engl J Med* 317:1309-1314.
- Burton GR, Nagarajan R, Peterson CA, McGehee RE Jr (2004). Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* 329:167-185.
- Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, Rea F, Loy M, Zuin R, Marulli G, Baraldo S, Saetta M, Valente M (2005). Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Res* 10;6:14.
- Calverley PM, Walker P (2003). Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 362:1053-1061.
- Campisi J, Kim S, Lim C, Rubio M (2001). Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Geront* 36:1619-1637
- Campisi J (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513-522.
- Carpéné C, Daviaud D, Boucher J, Bour S, Visentin V, Gres S, Duffaut C, Fontana E, Testar X, Saulnier-Blache JS, Valet P (2006). Short- and long-term insulin-like effects of monoamine oxidases and semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates in cultured adipocytes. *Metabolism* 55:1397-1405.
- Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, de Oca MM, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ (2004). The body-mass index, airflow obstruction, dyspnoea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350:1105-1012
- Celli BR (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: from unjustified nihilism to evidence-based optimism. *Proc Am Thorac Soc* 3:58-65.
- Celli BR, Thomas NE, Anderson JA, Ferguson GT, Jenkins RC, Jones PW, Vestbo J, Knobil K, Yates JC, Calverley PM (2008). Effect of pharmacotherapy on rate of decline of lung function in chronic obstructive pulmonary disease: results from the TORCH study. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 332-338.
- Chailleux E, Laaban JP, Veale D (2003). Prognostic value of nutritional depletion in patients with COPD treated by long-term oxygen therapy. *Chest* 123:1460-1466.

- Chang E, Harley CB (1995). Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci* 92:11190-11194.
- Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MH (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 265:294-303.
- Cockcroft A, Seal RM, Wagner JC, Lyons JP, Ryder R, Andersson N (1982). Post-mortem study of emphysema in coalworkers and non-coalworkers. *Lancet* 2:600-603.
- Cook VJ, Coxson HO, Mason AG, Bai TR (2001). Bullae, bronchiectasis and nutritional emphysema in severe anorexia nervosa. *Can Respir J* 8:361-365.
- Coultas DB (1998). Passive smoking and risk of adult asthma and COPD: an update, *Thorax* 53:381-387.
- Coxson HO, Chan IH, Mayo JR, Hlynsky J, Nakano Y, Birmingham CL (2004). Early emphysema in patients with anorexia nervosa. *Am J Respir Crit Care Med* 170:748-752.
- Crapo RO (1993). The aging lung. In: *Pulmonary disease in the elderly patient*, ed. Mahler DA. Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 1-21.
- Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ (1999). Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1635-1639.
- Dahse R, Fiedler W, Ernst G (1997). Telomere und Telomerase. *Der Pathologe* 18:425-429.
- Davis KE, Moldes M, Farmer SR (2004). The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:42453-42461.
- Decramer M, De Benedetto F, Del Ponte A, Marinari S (2005). Systemic effects of COPD. *Respir Med* 99 Suppl B:S3-10.
- Dekhuijzen PNR, Aben KHH, Dekker I, Aarts LPHJ, Wielders PLM, van Herwarden CLA, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease (1996). *Am J Respir Crit Care Med* 154:813-816.
- Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG (2006). Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 7:53.
- Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) (2008). *Fakten zum Rauchen: Tabakrauch – ein Giftgemisch*. Heidelberg. Zugänglich unter: <http://www.tabakkontrolle.de>.
- Devereux, G. (2006). ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors. *Bmj* 332, 1142-4.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367.
- Dodge R, Cline MG, Burrows B (1986). Comparisons of asthma, emphysema, and chronic bronchitis diagnoses in a general population sample. *Am Rev Respir Dis* 133:981-986.
- Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I (1994). Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ* 309:901-911.
- Doll R (1999). Risk from tobacco and potentials for health gain. *Int J Tuberc Lung Dis* 3:90-99.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17312-17315.
- Erusalimsky JD, Kurz DJ (2005). Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol* 40:634-642.

- Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J (2002). E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* 3:39-49.
- Fera T, Abboud RT, Johal SS, Richter AM, Gibson N (1987). Effect of smoking on functional activity of plasma alpha 1-protease inhibitor. *Chest* 91:346-350.
- Ferlicot S, Durrbach A, Ba N, Desvaux D, Bedossa P, Paradis V (2003). The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol* 34:924-928.
- Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A (2004). Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev* 5:95-103.
- Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM (1997). Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 156:240-247.
- Fletcher C, Peto R (1977). The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1:1645-1648.
- Frances C, Boisnic S, Hartmann DJ, Dautzenberg B, Branchet MC, Charpentier YL, Robert L (1991). Changes in the elastic tissue of the non-sun-exposed skin of cigarette smokers. *Br J Dermatol* 125:43-47.
- Freiman A, Bird G, Metelitsa AI, Barankin B, Lauzon GJ (2004). Cutaneous effects of smoking. *J Cutan Med Surg* 8:415-423.
- Friedrich U, Griesse E, Schwab M, Fritz P, Thon K, Klotz U (2000). Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech Ageing Dev* 119:89-99.
- Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 46:1369-1379.
- Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD (2004). Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systemic review and a meta-analysis. *Thorax* 59:574-480
- Giannakou ME, Partridge L (2004). The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* 14:408-412.
- GOLD (2008). Global initiative for the chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease – 2008 update. Zugänglich unter: <http://www.goldcopd.com>.
- Gold DR, Wang X, Wypij D, Speizer FE, Ware JH, Dockery DW (1996). Effects of Cigarette Smoking on Lung Function in Adolescent Boys and Girls, *N Engl J Med* 335(13): 931 - 937.
- Gross NJ (2001). Extrapulmonary effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 7:84-92.
- Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM (2006). Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*.2006; 28: 523-532.
- Harik-Khan RI, Fleg JL, Wise RA (2002). Body mass index and the risk of COPD. *Chest* 121:370-6. Comment in: *Chest* 2003;123:307; author reply 307-308.
- Harkema JR, Mauderly JL, Gregory RE, Pickrell JA (1984). A comparison of starvation and elastase models of emphysema in the rat. *Am Rev Respir Dis* 129: 584-591.
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346:866-868.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
- Heilbronn LK, Ravussin E (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78:361-369.

- Herbig U, Ferreira M, Condell L, Carey D, Sedivy JM (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science* 311:1257.
- Hirayama T (1981). Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *BMJ* 282:183-185.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD (2004). The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350:2645-2653.
- Holz O, Zühlke I, Jaksztat E, Müller KC, Welker L, Nakashima M, Diemel KD, Branscheid D, Magnussen H, Jörres RA (2004). Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 24:575-579.
- Hsieh EA, Chai CM, Hellerstein MK (2005). Effects of caloric restriction on cell proliferation in several tissues in mice: Role of Intermittent Feeding. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E965-972.
- Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM (2005). Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 25:250-258.
- Ischaki E, Papatheodorou G, Gaki E, Papa I, Koulouris N, Loukides S (2007). Body mass and fat-free mass indices in COPD. *Chest* 132:164-169.
- Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ (2005). Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 352:1967-1976.
- Janssens JP, Pache JC, Nicod LP (1999). Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 13:197-205.
- Jiang JC, Jaruga E, Repnevskaya MV, Jazwinski SM (2000). An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J* 14:2135-2137.
- Jinno S, Kida K and Ootsubo K (1994). Epidemiology of emphysema: analysis by autopsy in a series of elderly patients. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 32 Suppl:193-199.
- Jörres, RA, Kronseder A, Uhlmann S, Holz O, Welker L, Hessel H, Branscheid D, Magnussen H, Nowak D (2005). Replicative senescence of lung fibroblasts after exposure to hydrogen peroxide or cigarette smoke extract. *Eur Respir J* 26 (suppl 49):102s (abstract).
- Just M, Monso E, Ribera M, Lorenzo JC, Morera J, Ferrandiz C (2005). Relationships between lung function, smoking and morphology of dermal elastic fibres. *Exp Dermatol* 14:744-751.
- Just M, Ribera M, Monso E, Lorenzo JC, Ferrandiz C (2007). Effect of smoking on skin elastic fibres: morphometric and immunohistochemical analysis. *Br J Dermatol* 156:85-91.
- Kanazawa H, Asai K, Hirata K, Yoshikawa J. (2003). Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med* 114:354-358.
- Karrasch S, Holz O, Jörres RA (2008). Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respir Med* 102:1215-1230.
- Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF (2000). Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 106:1311-1319.
- Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ (1996). Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153:530-534.



- Krieger-Brauer HI, Kather H (1995). Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in 3T3 L1-cells. *Biochem J* 307:549-556.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113:3613-3622.
- Lane MA, Mattison J, Ingram DK, Roth GS (2002). Caloric restriction and aging in primates: Relevance to humans and possible CR mimetics. *Microsc Res Tech* 59:335-338.
- Lang MR, Fiaux GW, Gillyooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D (1994). Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax* 49:319-326.
- Leco K, Waerhouse P, Sanchez O, Gowing K, Poole A, Wakeham A, Mak T, Khokha R (2001). Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 108:817-829.
- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999). Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285:1390-1393.
- Leung WC, Harvey I (2002). Is skin ageing in the elderly caused by sun exposure or smoking? *Br J Dermatol* 147:1187-1191.
- Li MD, Parker SL, Kane JK (2000). Regulation of feeding-associated peptides and receptors by nicotine. *Mol Neurobiol* 22:143-165.
- Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ (1991). In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* 256:45-48.
- Loppow D, Schleiss MB, Kannies F, Taube C, Jörres RA, Magnussen H (2001). In patients with chronic bronchitis a four week trial with inhaled steroids does not attenuate airway inflammation. *Respir Med* 95:115-121.
- MacNee W (2005a). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:258-266; discussion 290-291.
- MacNee W (2005b). Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:50-60.
- Mador MJ, Bozkanat E (2001). Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2:216-224.
- Marcotte R, Lacelle C, Wang E (2004). Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech Ageing Dev* 125:777-783.
- Massaro D, Massaro GD (2004). Hunger disease and pulmonary alveoli. *Am J Respir Crit Care Med* 170:723-724.
- Massaro D, Massaro GD, Baras A, Hoffman EP, Clerch LB (2004). Calorie-related rapid onset of alveolar loss, regeneration, and changes in mouse lung gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L896-906. Erratum in: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L1349.
- Massaro D, Alexander E, Reiland K, Hoffman EP, Massaro GD, Clerch LB (2007). Rapid onset of gene expression in lung, supportive of formation of alveolar septa, induced by refeeding mice after calorie restriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:doi:10.1152/ajplung.00146.2006.
- McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, Lansdorp PM, Lemieux M (2003). The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23:38-54.

- McGowan SE, Torday JS (1997). The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annu Rev Physiol* 59:43-62.
- Melk A, Ramassar V, Helms LM, More R, Rayner D, Solez K, Halloran PF (2000). Telomere shortening in kidneys with age. *J Am Soc Nephrol* 11:444-453.
- Mercier N, Moldes M, El Hadri K, Feve B (2001). Semicarbazide-sensitive amine oxidase activation promotes adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem J* 358:335-342.
- Merry BJ (2002). Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1340-1354.
- Meyer P A, Mannino D M, Redd S C, Olson D R (2002). Characteristics of adults dying with COPD. *Chest* 122:2003-2008.
- Miller JD, Foster T, Boulanger L, Chace M, Russel MW, Marton JP, Menzin J (2005). Direct costs of COPD in the U.S.: an analysis of Medical Expenditure Panel Survey (MEPS) data. *Chest* 127:311-318.
- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Kunieda T, Komuro I (2004). Vascular cell senescence and vascular aging. *J Mol Cell Cardiol* 36:175-183.
- Montuschi P, Kharitonov SA, Barnes PJ (2001). Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest* 120:496-501.
- Morrison RF, Farmer SR (2000). Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130:3116S-3121S.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116:551-563.
- Müller KC, Welker L, Paasch K, Feindt B, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Krug N, Nakashima M, Branscheid D, Magnussen H, Jörres RA, Holz O (2006). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res* 7:32.
- Murray, C.J. and Lopez, A.D. (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349, 1498-504.
- Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Aoyagi Y, Fujiwara M, Tsuchiya E, Kobayashi Y, Kato M, Oshimura M, Sasajima K, Nakachi K, Takubo K (2002). Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium. *J Invest Dermatol* 119:1014-1019.
- Nowak D, Berger K, Lippert B, Kilgert K, Caeser M, Sandtmann R (2005). Epidemiology and health economics of COPD across Europe: a critical analysis. *Treat Respir Med* 4:381-395.
- Ntambi JM, Young-Cheul K (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S.
- Nyunoya T, Monick MM, Klingelhutz A, Yarovinsky TO, Cagley JR, Hunninghake GW (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:681-688.
- Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Kontinen YT (1998). Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 78:1077-87.
- Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, Fabbri LM, Johnston SL (2006). Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1114-1121.
- Patel BD, Loo WJ, Tasker AD, Sreaton NJ, Burrows NP, Silverman EK, Lomas DA (2006). Smoking related COPD and facial wrinkling: is there a common susceptibility? *Thorax* 61:568-571.

- Pauwels RA, Rabe KF (2004). Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet* 364:613-620.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429:771-776. Erratum in: *Nature* 2004;430:921.
- Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, Lange P, Vestbo J. (1997). Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study, *Eur Respir J* 10: 822-827.
- Prescott E, Lange P, Vestbo J (1999). Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study, *Eur Respir J* 13: 1109-1114.
- Prescott E, Almdal T, Mikkelsen KL, Tofteng CL, Vestbo J, Lange P (2002). Prognostic value of weight change in chronic obstructive pulmonary disease: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 20:539-544.
- Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I (2008). SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 177:861-870.
- Ranes J, Stoller JK (2005). A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *Semin Respir Crit Care Med* 26:154-166.
- Reinhardt N, Chen CI, Loppow D, Schink T, Kleinau I, Jörres RA, Wahn U, Magnussen H, Paul KP (2003). Cellular profiles of induced sputum in children with stable cystic fibrosis: comparison with BAL. *Eur Respir J* 22:497-502.
- Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC (2001). Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 164:469-473.
- Richter K, Holz O, Jörres RA, Mücke M, Magnussen H (1999). Sequentially induced sputum in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 14:697-701.
- Roberts SB, Pi-Sunyer X, Kuller L, Lane MA, Ellison P, Prior JC, Shapses S (2001). Physiologic effects of lowering caloric intake in nonhuman primates and nonobese humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56 Spec No 1:66-75.
- Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, Barnes PJ (2002). Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:867-873.
- Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Calcagni P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM (1994). Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 150:1646-1652.
- Sahebjami H, Wirman JA (1981). Emphysema like changes in lungs of starved rats. *Am Rev Respir Dis* 124:619-624.
- Schünemann HJ, Dorn J, Grant BJB, Winkelstein W, Trevisan M (2000). Pulmonary function is a long-term predictor of mortality in the general population: 29-year follow-up of the buffalo health study. *Chest* 118:656-664.
- Serrano M, Blasco MA (2001). Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13:748-753.
- Shapiro SD, Ingenito EP (2005). The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Advances in the Past 100 Years. Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 367-372.
- Sherr CJ, DePinho RA (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102:407-410.

- Silverman, E.K. (2006). Progress in chronic obstructive pulmonary disease genetics. *Proc Am Thorac Soc* 3, 405-8.
- Sin DD, Man SF (2003). Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? *Circulation* 107:1514-1519.
- Sin DD, Man SF (2005). Chronic obstructive pulmonary disease as a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. *Proc Am Thorac Soc* 2:8-11.
- Skogstad M, Kjærheim K, Fladseth G, Gjølstad M, Daae HL, Olsen R, Molander P, Ellingsen DG (2006). Cross shift changes in lung function among bar and restaurant workers before and after implementation of a smoking ban. *Occupational and Environmental Medicine* 63:482-487.
- Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI (1994). Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 55:876-882.
- Snider GL (1989). Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Annu Rev Med* 40:411-429.
- Sottile V, Seuwen K (2001). A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Anal Biochem* 293:124-128.
- Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto K, Kawakami Y (1998). Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J* 12:1033-1039.
- Taube C, Holz O, Mücke M, Jörres RA, Magnussen H (2001). Airway response to inhaled hypertonic saline in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1810-1815.
- Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A (2004). Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:643-649.
- Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 174:886-893.
- Tuder RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, Flores SC (2003). Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:88-97.
- Valledor AF, Ricote M (2004). Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 15:201-212.
- Vaziri H, Schächter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB (1993). Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 52:661-667.
- Vestbo J, Prescott E, Almdal T, Dahl M, Nordestgaard BG, Andersen T, Sørensen TIA, Lange P (2006). Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample. *Am J Respir Crit Care Med* 173:79-83.
- Vogelmeier C, Koczulla R, Fehrenbach H, Bals R (2006). Pathogenese der COPD. *Der Internist* 47:885-894.
- Walton AG and Blackwell J (1973). In: *Biopolymers*. Academic Press, New York & London, 1973, pp. 433-440.
- Watz H, Magnussen H (2006). Komorbiditäten bei COPD. *Der Internist* 47:895-900.
- West JB (1987). *Pulmonary Pathophysiology*. 3.ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1987.
- WHO (2008). *World Health Statistics*. [http://www.who.int/whosis/whostat/EN\\_WHS08\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf).

- Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 16:935-942.
- Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I (2007). Sirtuin regulates cigarette smoke induced pro-inflammatory mediators release via RelA/p65 NF- $\kappa$ B in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L567-L576.
- Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A; Respiratory Failure Research Group in Japan (2004). Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 125:626-632.
- Yokoyama E, Nambu Z, Uchiyama I, Kyono H (1987). An emphysema model in rats treated intratracheally with elastase. *Environ Res* 42: 340-352.
- Yu YH, Zhu H (2004). Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E402-410.

# 11. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen

	Seite
Abbildung 1	Schema zentraler Faktoren bei der Pathogenese des Lungenemphysems und die mögliche Rolle von Adipozyten im Krankheitsprozess . . . . . 22
Abbildung 2	Aufbau des Versuchs zum standardisierten Abrauchen der Zigaretten . . . . . 27
Abbildung 3	Präadipozyten nach Ölrot-Färbung an Tag 0 . . . . . 34
Abbildung 4	Reife Adipozyten an Tag 7 nach Gabe des Differenzierungscocktails . . . . . 34
Abbildung 5	Foto aus Abb. 3 im zum Rotbild komplementären Grünbild . . . . . 34
Abbildung 6	Foto aus Abb. 4 im zum Rotbild komplementären Grünbild . . . . . 34
Abbildung 7	Histogramm von Pixelzahl (vertikal) gegen Intensität (horizontal) an Tag 0 . . . . . 35
Abbildung 8	Histogramm von Pixelzahl (vertikal) gegen Intensität (horizontal) an Tag 7 . . . . . 35
Abbildung 9	Zusammenhang zwischen Pixelzahl und Extinktion . . . . . 41
Abbildung 10	Zellzahl pro Well im Verlauf – Kontrolle . . . . . 43
Abbildung 11	Zellzahl pro Well im Verlauf – CSE . . . . . 44
Abbildung 12	Zellzahl pro Well – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7 . . . . . 44
Abbildung 13	Zellzahl pro Well – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14 . . . . . 45
Abbildung 14	Proteingehalt pro Well im Verlauf – Kontrolle . . . . . 46
Abbildung 15	Proteingehalt pro Well im Verlauf – CSE. . . . . 47
Abbildung 16	Proteingehalt pro Well – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7 . . . . . 47
Abbildung 17	Proteingehalt pro Well – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14 . . . . . 48
Abbildung 18	Proteingehalt pro Zellzahl im Verlauf – Kontrolle . . . . . 49
Abbildung 19	Proteingehalt pro Zellzahl im Verlauf – CSE . . . . . 50
Abbildung 20	Proteingehalt pro Zellzahl – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7 . . . . . 50
Abbildung 21	Proteingehalt pro Zellzahl – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14 . . . . . 51
Abbildung 22	Lipidgehalt gemäß Bildauswertung im Verlauf – Kontrolle . . . . . 53
Abbildung 23	Lipidgehalt gemäß Bildauswertung im Verlauf – CSE. . . . . 53
Abbildung 24	Lipidgehalt gemäß Bildauswertung – Paarweiser Vergleich zw. Kontrolle u. CSE an Tag 7. . . . . 54
Abbildung 25	Lipidgehalt gemäß Bildauswertung – Paarweiser Vergleich zw. Kontrolle u. CSE an Tag 14. . . . . 54
Abbildung 26	Lipidgehalt pro Zellzahl im Verlauf – Kontrolle . . . . . 56

Abbildung 27	Lipidgehalt pro Zellzahl im Verlauf – CSE . . . . .	56
Abbildung 28	Lipidgehalt pro Zellzahl – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7 . . . .	57
Abbildung 29	Lipidgehalt pro Zellzahl – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14 . . .	57
Abbildung 30	Lipidgehalt pro Protein im Verlauf – Kontrolle . . . . .	58
Abbildung 31	Lipidgehalt pro Protein im Verlauf – CSE . . . . .	59
Abbildung 32	Lipidgehalt pro Protein – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7 . . . .	59
Abbildung 33	Lipidgehalt pro Protein – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14 . . . .	60
Abbildung 34	GPDH-Aktivität pro Well im Verlauf – Kontrolle . . . . .	61
Abbildung 35	GPDH-Aktivität pro Well im Verlauf – CSE . . . . .	61
Abbildung 36	GPDH-Aktivität pro Well – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 7 . . .	62
Abbildung 37	GPDH-Aktivität pro Well – Paarweiser Vergleich zwischen Kontrolle und CSE an Tag 14 . .	62
Abbildung 38	GPDH-Aktivität pro Zellzahl im Verlauf – Kontrolle . . . . .	63
Abbildung 39	GPDH-Aktivität pro Zellzahl im Verlauf – CSE . . . . .	64
Abbildung 40	GPDH-Aktivität pro Zellzahl – Paarweiser Vergleich zw. Kontrolle u. CSE an Tag 7 . . . . .	64
Abbildung 41	GPDH-Aktivität pro Zellzahl – Paarweiser Vergleich zw. Kontrolle u. CSE an Tag 14 . . . .	65
Abbildung 42	GPDH-Aktivität pro Proteingehalt im Verlauf – Kontrolle . . . . .	66
Abbildung 43	GPDH-Aktivität pro Proteingehalt im Verlauf – CSE . . . . .	66
Abbildung 44	GPDH-Aktivität pro Proteingehalt – Paarweiser Vergleich zw. Kontrolle u. CSE an Tag 7 . .	67
Abbildung 45	GPDH-Aktivität pro Proteingehalt – Paarweiser Vergleich zw. Kontrolle u. CSE an Tag 14 .	67
Abbildung 46	GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt im Verlauf – Kontrolle . . . . .	68
Abbildung 47	GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt im Verlauf – CSE . . . . .	69
Abbildung 48	GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt – Paarweiser Vergleich zw. Kontrolle und CSE an Tag 7 . .	69
Abbildung 49	GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt – Paarweiser Vergleich zw. Kontrolle und CSE an Tag 14 .	70
Abbildung 50	Anfärbung reifer Adipozyten mit Oil Red O . . . . .	72
Abbildung 51	Mögliche Rolle von Sirtuinen und Insulin-Signalwegen beim Emphysem . . . . .	79

## **Tabellen**

Tabelle 1	Einteilung des Schweregrades einer COPD nach GOLD- und DGP-Leitlinien . . . . .	4
Tabelle 2	Ansatz der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Eichkurve zur Proteinbestimmung . . . . .	37

Tabelle 3	Zellzahlen pro Well der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	42
Tabelle 4	Proteingehalt pro Well der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	46
Tabelle 5	Proteingehalt pro Zellzahl der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	49
Tabelle 6	Lipidgehalt gemäß Bildauswertung der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	52
Tabelle 7	Lipidgehalt pro Zellzahl der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	55
Tabelle 8	Lipidgehalt pro Protein der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	58
Tabelle 9	GPDH-Aktivität pro Well der Kontroll- und der CSE-Gruppe . . . . .	60
Tabelle 10	GPDH-Aktivität pro Zellzahl der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	63
Tabelle 11	GPDH-Aktivität pro Proteingehalt der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	65
Tabelle 12	GPDH-Aktivität pro Lipidgehalt der Kontroll- und CSE-Gruppe . . . . .	68



## **12. Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
AP-1	Activating-protein-1
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BMI	Body mass-index
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin-dependent kinase
C/EBP	CCAAT/Enhancer binding protein
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C-reaktives Protein
CSE	Cigarette smoke extract
DLCO	Einatemzug-Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F	Familie von Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal calf serum
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 s
FOX(O)	Forkhead box transcription factor (O)
FVC	Forcierte (expiratorische) Vitalkapazität
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GPDH	Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase
HBSS	Hanks balanced salt solution
HDAC	Histon-deacetylase
HRCT	Hochauflösendes Computertomogramm
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IGF-1	Insulin-like growth factor I
ITGV	Intrathorakales Gasvolumen
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MAO	Monamino-Qxidase
NAC	N-Acetylcystein
NAD+	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NCS	Newborn calf serum

NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B (Transkriptionsfaktor)
NPY	Neuropeptid Y
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor am Genlocus <i>INK4a</i>
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor am Genlocus <i>CIP1/WAF1/Sdi1</i>
p53	Tumorsuppressorprotein vom Molekulargewicht 53 kDa
p	Signifikanzniveau (Fehler erster Art)
PBS	Phosphate-buffered saline
PPAR- $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Rb	Retinoblastoma-Protein
RV	Residualvolumen
SA- $\beta$ -Gal	Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SIRT1	Silent information regulator 1
SSAO	Semicarbazid-sensitive Amino-oxidase
Tab.	Tabelle
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

## **A.1 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Betreuer Herrn PD Dr. rer. nat. R. A. Jörres, der mir die Arbeit an diesem Thema ermöglicht hat und sich mit größtem Engagement und höchster Ausdauer für das Gelingen meiner Arbeit eingesetzt hat. Er stand mir mit seinem ausgiebigen wissenschaftlichen Rat, hilfreichen Diskussionen und intensiver Betreuung jederzeit zur Seite.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Nowak für die Ermöglichung meiner wissenschaftlichen Betätigung am Institut für Arbeits- und Umweltmedizin und seine Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung dieser Dissertation bedanken.

Für die Einarbeitung in die wissenschaftliche Laborarbeit, ihre große Hilfsbereitschaft und die vielen Anregungen bei der Etablierung der verwendeten experimentellen Methoden möchte ich mich bei Frau Angelika Kronseder bedanken.

Zudem danke ich Herrn Dr. rer. nat. O. Holz für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir die Möglichkeit gegeben haben, mein Studium zu absolvieren und die mich auch während meiner Doktorarbeit umfassend unterstützt haben. Schließlich möchte ich meinem Freund Marcus für die fortwährende Motivation und Unterstützung danken.

## **A.2 Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Mitteln angefertigt zu haben.

Birgit Machata