

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

**Einfluss der Weichmachermetaboliten
Monoethylhexyl-Phthalat (MEHP) und 4-Heptanon
auf die Transkriptionsfaktoren PPAR α und PPAR γ
in humanen Leber- und Endothelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Britta Friederichs
aus Süchteln

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
15.05.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. Dr. Hans Günther Wahl

1. Korreferent: Prof. Dr. Ralf Jacob

1. Einleitung	1
1.1. PVC	1
1.2. Weichmacher	2
1.2.1. Phthalate	3
1.2.2. Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) und seine Metaboliten	3
1.2.3. Pharmakokinetik von DEHP	5
1.2.4. Exposition der Bevölkerung gegenüber Phthalaten	5
1.2.4.1. Risikogruppen	6
1.2.5. Toxizität von DEHP und seinen Metaboliten	7
1.3. Peroxisome proliferator-activated receptors	10
1.3.1. Molekulare Struktur und Eigenschaften der PPARs	11
1.3.2. Eigenschaften der verschiedenen PPAR-Isoformen	13
1.3.2.1. PPAR α	13
1.3.2.2. PPAR β/δ	14
1.3.2.3. PPAR γ	15
1.5. Ziel der vorliegenden Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.2. Methoden	21
2.2.1. Zellkultur	21
2.2.2. Stimulation der Chang Liver Zellen	22
2.2.3. Stimulation der Endothelzellen	23
2.2.4. RNA-Extraktion	24
2.2.5. DNA-Aufreinigung	25
2.2.6. RNA-Konzentrationsbestimmung	25
2.2.7. Reverse Transkription	26
2.2.8. Primerdesign	26
2.2.9. Polymerase – Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.10. Prinzip der PCR am LightCycler	29
2.2.11. Quantifizierung der Real-Time-PCR	30
2.2.12. Normierung der Proben über „housekeeping genes“	32
2.2.13. Gelelektrophorese	32
3. Ergebnisse	34

3.1. Methodenentwicklung	34
3.1.1. Primerdesign	34
3.1.2. Normalisierung der Proben über GAPDH	36
3.2. Ergebnisse der In-vitro-Zellversuche mit humanen Leberzellen	39
3.2.1. Einfluss von MEHP auf humane Leberzellen	39
3.2.1.1. Regulation des PPAR α durch MEHP in humanen Leberzellen	39
3.2.1.2. Regulation des PPAR γ durch MEHP in humanen Leberzellen	41
3.2.1.3. Regulation des PPAR γ 2 durch MEHP in humanen Leberzellen	43
3.2.2. Einfluss von 4-Heptanon auf humane Leberzellen	45
3.2.2.1. Regulation des PPAR α durch 4-Heptanon in humanen Leberzellen	45
3.2.2.2. Regulation des PPAR γ durch 4-Heptanon in humanen Leberzellen	47
3.2.2.3. Regulation des PPAR γ 2 durch 4-Heptanon in humanen Leberzellen	49
3.3. Einfluss von DMSO auf humane Leberzellen	51
3.4. Ergebnisse der In-vitro-Zellversuche mit humanen Endothelzellen	52
3.4.1. Einfluss von MEHP auf humane Endothelzellen	52
3.4.1.1. Regulation des PPAR α und MEHP in Endothelzellen	52
3.4.1.2. Regulation des PPAR γ durch MEHP in Endothelzellen	53
3.4.1.3. Regulation des PPAR γ 2 durch MEHP in Endothelzellen	53
3.4.2. Einfluss von 4-Heptanon auf humane Endothelzellen	55
3.4.2.1. Regulation des PPAR α durch 4-Heptanon in Endothelzellen	55
3.4.2.2. Regulation des PPAR γ durch 4-Heptanon in Endothelzellen	55

3.4.2.3. Regulation des PPAR γ 2 durch 4-Heptanon in	
Endothelzellen	56
4. Diskussion	59
4.1. Methodenentwicklung	59
4.1.1. Normalisierung der Proben	59
4.1.2. Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel	60
4.2. MEHP als PPAR-Ligand in humanen Leber- und Endothelzell-	
kulturen	61
4.3. 4-Heptanon als PPAR-Ligand in humanen Leber- und	
Endothelzellkulturen	65
4.4. Bedeutung der DEHP-Belastung für den Menschen	66
5. Zusammenfassung	70
5.1. Summary	73
6. Anhang: Abkürzungsverzeichnis	75
7. Literaturverzeichnis	77
Lebenslauf	
Verzeichnis der Akademischen Lehrer	
Ehrenwörtliche Erklärung	
Danksagung	

1. Einleitung

Am 5. Juli 2005 wurde nach achtjähriger Diskussion eine Richtlinie durch das Europäische Parlament verabschiedet, die die Verwendung von bestimmten Weichmachern in Kinderspielzeug und Babyartikeln verbietet. Betroffen sind die sechs Phthalate Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), Dibutylphthalat (DBP), Benzylbutylphthalat (BBP), Di-(isononyl)phthalat (DINP), Di-(isodecyl)phthalat (DIDP) und Di-n-octylphthalat (DNOP), die künftig in den betroffenen Produkten nicht zu mehr als 0,1 Masse-% enthalten sein dürfen. Bereits 1999 wurde die Verwendung von diesen Phthalaten in denjenigen Spielwaren und Babyartikeln vorübergehend verboten, die dazu bestimmt sind, von Kindern unter drei Jahren in den Mund genommen zu werden. Diese Entscheidung wurde mehrfach verlängert. In der nun verabschiedeten Richtlinie wurden DEHP, DBP und BBP als fortpflanzungsgefährdende Stoffe eingestuft und dürfen daher künftig grundsätzlich nicht mehr in der Herstellung von Spielwaren und Babyartikeln verwendet werden. Obwohl diesbezüglich zu DINP, DIDP und DNOP keine oder nur widersprüchliche wissenschaftliche Informationen vorhanden sind, konnte eine von diesen Stoffen ausgehende potenzielle Gefahr nicht ausgeschlossen werden. Sie dürfen daher nicht in Spielzeug und Babyartikeln verwendet werden, die von Kindern in den Mund genommen werden können. Mit der Verabschiedung dieser Richtlinie ist die Diskussion um Weichmacher im Europäischen Parlament jedoch nicht abgeschlossen. Auch Produkte anderer Anwendungsbereiche, die aus weichmacherhaltigem Material bestehen, sollen überprüft werden, vor allem Medizinprodukte [70].

1.1 Polyvinylchlorid (PVC)

Polyvinylchlorid (PVC) gehört zu den am meisten verwendeten Kunststoffen. Die Massenproduktion in den westlichen Industrieländern begann bereits in den sechziger und siebziger Jahren. Entsprechend der vielfältig einstellbaren Eigenschaften wird es in verschiedensten Anwendungsfeldern eingesetzt. Um diese vielfältigen Eigenschaften zu erlangen, müssen dem harten Roh-PVC Additive zugesetzt werden wie Stabilisatoren, Füllstoffe, Gleitmittel, Pigmente, Flammschutzmittel und Weichmacher [12].

Das produzierte PVC wird zu 65 % als Hart-PVC und zu 35 % als Weich-PVC verwendet. Weich-PVC entsteht durch Zusatz von Weichmachern, die das ursprünglich harte Material dehnbarer und flexibler machen, ohne seine Formstabilität herabzusetzen. Die Weichmacher werden jedoch nicht chemisch an das PVC gebunden und können daher wieder ausgasen oder ausgewaschen werden. Der Einsatz von Weich-PVC erstreckt sich von Produkten im medizinischen Bereich wie Blutbeuteln, Dialyse- und Infusionsschläuchen bis hin zu Elektrokabeln, Haushaltswaren, Lebensmittelverpackungen, Fußbodenbelägen und Kinderspielzeug.

In der Medizin ist PVC mit einem Anteil von ca. 30 % der mit Abstand am häufigsten genutzte Kunststoff. Etwa 10 000 Tonnen werden in Deutschland jährlich auf diesem Sektor verbraucht. Der Grund hierfür liegt darin, dass PVC durch seine vielfältigen Eigenschaften den hohen Anforderungen im medizinischen Bereich am besten gerecht wird. Beispielsweise zeichnet es sich durch eine gute Sterilisierbarkeit aus. Bei der Herstellung von Blutbeuteln ist sowohl die Kälteelastizität des PVC von Bedeutung als auch die Eigenschaft des Materials, auch nach dem Auftauen flexibel zu bleiben. Seine Transparenz macht die Beurteilung der Füllhöhe und des Zustands des Beutelinhaltes möglich. Auch bietet PVC die Möglichkeit des Hochfrequenzschweißens, wodurch äußerst feste und porenfreie Schweißnähte die Blutbeutel verschließen [155].

1.2 Weichmacher

Häufig verwendete Weichmacher sind Phthalate, Adipate, Citrate, Phosphate und Trimellitate. Sie sind Ester der entsprechenden Säuren mit Alkoholen der Kettenlängen C_1 bis C_{17} . Idealerweise sollten sie geruchlos, farblos, licht-, temperatur- und wasserbeständig, nicht gesundheitsschädlich und möglichst wenig flüchtig sein [32].

Adipate haben eine relativ hohe Flüchtigkeit und treten damit vermehrt aus den Materialien aus, denen sie zugesetzt sind. Im Vergleich zu Phthalaten zeichnen sie sich außerdem durch eine geringere Viskosität aus und sind weitaus teurer. Aus diesem Grund werden sie nur in wenigen Anwendungsgebieten eingesetzt.

Citrate werden in medizinischen Produkten und Lebensmittelverpackungen eingesetzt. Sie sind sehr hitzestabil und werden daher auch beispielsweise in der Elektroindustrie verwendet. Phosphate haben die Eigenschaft, hemmend auf Feuer zu wirken. Zusätzlich haben sie auch bei niedrigen Temperaturen gute Eigenschaften und sind wenig flüchtig. Durch diese Vielseitigkeit werden sie in verschiedensten Bereichen eingesetzt. Trimellitate werden aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit für die Innenraumausstattung von Kraftfahrzeugen und bei der Herstellung von Elektrokabeln verwendet.

Die am häufigsten verwendeten Weichmacher mit einem Marktanteil von 90 % sind jedoch die Phthalate [156].

1.2.1 Phthalate

Jährlich werden schätzungsweise mehr als 3,5 Millionen Tonnen Phthalate weltweit produziert, wobei annähernd 50 % allein durch DEHP entstehen [13].

Weich-PVC (Polyvinylchlorid) kann bis zu 80 % Phthalate enthalten [136]. In medizinischen Produkten liegt der Gewichtsanteil durchschnittlich im Bereich von 20 % bis 40 % [130].

Verwendung finden Phthalate als Trägersubstanzen für Duftstoffe, zum Beispiel in Parfums, Nagellacken und Haarsprays, in Textilien und als Formulierungsmittel in Pestizidanwendungen [46]. Durch ihre Verwendung in Kunststoffen findet man sie vor allem in Bodenbelägen, Lebensmittelverpackungen und vielen medizinischen Produkten wie Blut-, Infusions-, Dialyse- und Urinbeuteln, Kathetern und verschiedensten Schlauchsystemen [46].

1.2.2 Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) und seine Metaboliten

Der am meisten genutzte Weichmacher in PVC ist Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) [150]. Auch in medizinischen Produkten wird überwiegend DEHP als Weichmacher eingesetzt. Der Grund besteht darin, dass medizinische und technische Ansprüche gut erfüllt werden und seine Produktion kostengünstig ist.

In Tierversuchen mit DEHP konnten toxische Effekte auf unterschiedliche Organsysteme wie Lunge, Leber, Nieren, Fortpflanzungsorgane und Herz nachgewiesen werden [28]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Effekte nicht nur durch DEHP selbst entstehen, sondern dass vielmehr seine Metaboliten Auswirkungen auf die verschiedenen Organsysteme haben [79, 88, 124, 140].

Die Metaboliten Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP) und 2-Ethylhexanol entstehen in vivo schnell durch Hydrolyse von DEHP. 2-Ethylhexanol wird zu 2-Ethylhexansäure weiteroxidiert. β -Oxidations-Produkte der 2-Ethylhexansäure sind 2-Ethyl-3-hydroxy-hexansäure, 2-Ethyl-3-oxo-hexansäure und schließlich 4-Heptanon, beziehungsweise 2-Heptanon [150]. (Abb.1)

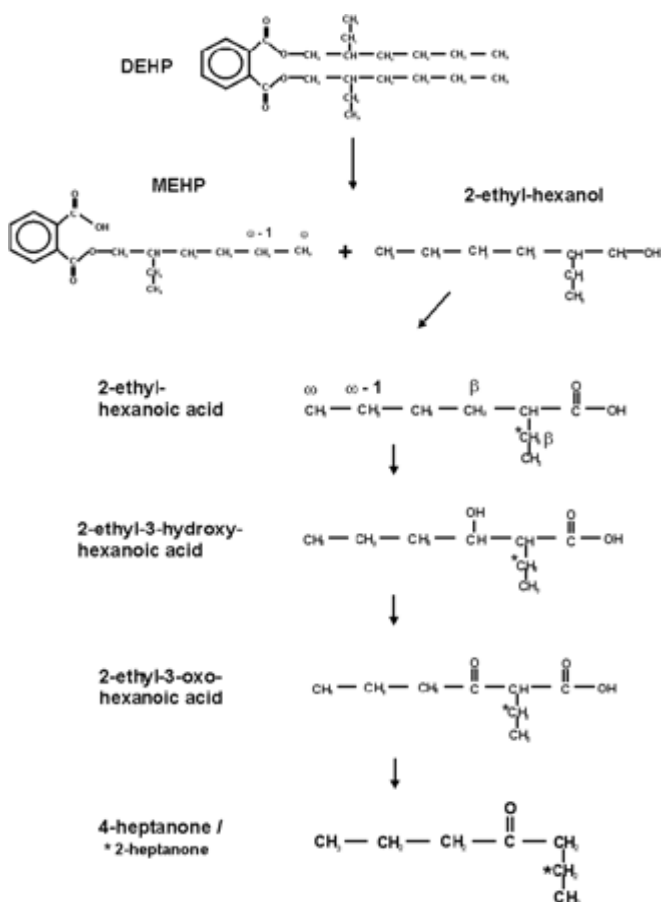


Abb. 1: Metabolisation von DEHP [150]

1.2.3 Pharmakokinetik von DEHP

Aufgenommen werden können die Weichmacher sowohl oral und dermal als auch intravenös und inhalativ. DEHP wird je nach Aufnahmeweg unterschiedlich stark metabolisiert.

Seine Hydrolyse wird am effektivsten durch die Pankreaslipase im Darmlumen katalysiert. Auch in der Leber und anderen Geweben gibt es Enzyme, die DEHP hydrolysieren. Im Vergleich zur Pankreaslipase ist deren Menge jedoch sehr gering [1, 47]. Aus diesem Grund entstehen die toxischen Abbauprodukte bei oraler Aufnahme in viel größerem Ausmaß als bei intravenöser oder inhalativer Aufnahme [28, 130]. MEHP wird durch den Darm resorbiert und gelangt so in die systemische Zirkulation. DEHP wird demgegenüber bei oraler Aufnahme fast gar nicht resorbiert [130]. Die dermale Aufnahme von DEHP ist nur sehr gering [130]. DEHP passiert die Plazentaschranke und wurde auch schon in der Muttermilch nachgewiesen [130].

Mit einer Plasma-Halbwertszeit von 10-18 Stunden wird DEHP verhältnismäßig schnell ausgeschieden. Die Plasma-Halbwertszeit von MEHP beträgt sogar nur 3-6 Stunden [11]. Während die Phthalate bei Gesunden relativ leicht über die Nieren ausgeschieden werden, können besonders bei Risikogruppen wie Dialysepatienten oder Neugeborenen erhöhte Werte im Plasma nachgewiesen werden [34, 35, 95]. Daher ist insbesondere der Einsatz von Weichmachern in medizinischen Produkten als bedenklich einzustufen [8, 17, 23, 94, 109].

1.2.4 Exposition der Bevölkerung gegenüber Phthalaten

Phthalate kommen ubiquitär auf der Erde vor, wodurch der Mensch ihnen ständig ausgesetzt ist. Angaben zur Expositionshöhe schwanken jedoch sehr stark, da das Ausmaß des Herauslösens der Phthalate aus den verschiedenen Materialien von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird. Beispielsweise ist die Menge der aus PVC-Beuteln ausgewaschenen Phthalate abhängig von der Lagerungs- und Anwendungsdauer, von der Temperatur und von der Zusammensetzung des Inhalts. Phthalate sind lipidlöslich und werden daher leicht durch Blut und andere lipidhaltige Lösungen ausgewaschen. Durch den Kontakt mit wässrigen Lösungen dagegen entweichen sie nur schwer [136].

Die Exposition der Allgemeinbevölkerung gegenüber DEHP wird auf 3-30 µg/kg Körpergewicht pro Tag geschätzt [11, 47, 86]. Sie entsteht hauptsächlich durch die Nahrung [18], die Innenraumluft und in geringerem Maß auch durch den Hausstaub [28].

1.2.4.1 Risikogruppen

Bestimmte Menschen sind weitaus höheren Mengen von Phthalaten ausgesetzt als die Allgemeinbevölkerung.

So können zum Beispiel sehr hohe DEHP-Konzentrationen an Arbeitsplätzen entstehen, an denen DEHP produziert und verarbeitet wird oder die mit DEHP-haltigen Materialien ausgestattet sind. Hier wurde eine Exposition von 700 bis 1400 µg/kg Körpergewicht pro Tag gemessen, die hauptsächlich auf Inhalation beruhte [11].

Medizinische Produkte bestehen bis zu 40 % aus DEHP [11, 125]. Durch intensiven Kontakt mit diesen Produkten, zum Beispiel durch Hämodialyse, kann eine deutlich höhere Exposition entstehen. Bei langjährigen Dialysepatienten wurde eine Expositionshöhe von bis zu 457 µg/kg Körpergewicht pro Tag festgestellt [11]. Bereits Anfang der siebziger Jahre wurden in Blut- und Thrombozytenbeuteln aus PVC 50 bis 70 mg/l bzw. 20 mg/Einheit DEHP gefunden [55-57, 80, 148]. Die daraufhin getesteten Alternativen konnten das DEHP aufgrund seiner vielfältigen Eigenschaften jedoch nicht ersetzen.

Der Einsatz einer Herzlungenmaschine bei herzchirurgischen Eingriffen führt durch die langen PVC-Schläuche zu einer erheblichen Belastung mit DEHP. Es konnte gezeigt werden, dass die DEHP-Belastung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Einsatz der Herzlungenmaschine bei koronaren Bypassoperationen zwischen 15,4 und 72,9 mg und bei Herztransplantationen zwischen 2,3 und 21 mg lag [6].

Eine weitere Gruppe, die in besonderem Maße DEHP gegenüber exponiert ist, sind Früh- und Neugeborene. Bei niedrigerem Körpergewicht und gleicher absoluter Belastung ist die Belastung pro kg Körpergewicht stark erhöht. Die DEHP-Belastung eines Neugeborenen auf der Intensivstation wird auf 10 bis 20 mg DEHP/kg Körpergewicht/Tag geschätzt [75]. Erschwerend kommt hier

hinzu, dass die renale Clearance und die hepatische Glucuronidierung umso weniger ausgeprägt sind, je jünger die Kinder sind [96]. Dementsprechend höhere Dosen toxischer Metaboliten verbleiben im Körper. (Tab. 1)

Kleine Kinder werden durch Saugen oder Kauen an DEHP-haltigem Spielzeug zusätzlich mit DEHP belastet (Tab. 2). Aus diesem Grund kommt diese Substanz seit dem Herbst 2006 nicht mehr in solchen Spielzeugen vor.

Quelle	DEHP	Literatur
Austauschtransfusion	0,8-3,3 mg/kg	[132]
	1,7-4,2 mg/kg	[133]
	6,1-21,6 mg/l	[107]
i.v. Medikamente	0,03 mg/kg/Tag	[127]
parenterale Ernährung	2,5 mg/kg/Tag	[127]
künstlich beatmet	1-4,2 mg/kg/h	[123]
ECMO	3-10 mg/kg/Tag	[128]
	0,57 +/- 0,14 µg/ml/h	[62]
intensivpflichtig (gesamt)	10-20 mg/kg/Tag	[75]
Säuglingsartikel (Spielzeug)	0,004-0,32 mg/kg/Tag	[153]

Tab. 1: DEHP-Belastung bei Früh- und Neugeborenen

Altersgruppe	Median der DEHP-Aufnahme (µg/kg Körpergewicht pro Tag)
Säuglinge (0-6 Monate)	
- mit künstlicher Milch gefüttert	5,0
- mit Muttermilch gefüttert	7,3
Kleinkinder (7 Monate bis 4 Jahre)	25,8
Kinder (5-11 Jahre)	18,9
Jugendliche (12-19 Jahre)	10
Erwachsene (20-70 Jahre)	8,2

Tab. 2: Geschätzte DEHP-Aufnahme in verschiedenen Altersgruppen [19]

1.2.5 Toxizität von DEHP und seinen Metaboliten

Während Phthalate keine akut toxische Wirkung zu haben scheinen, sind chronisch toxische Wirkungen von DEHP und seinen Metaboliten in Bezug auf

verschiedene Organe bekannt, jedoch stützen sich die Nachweise dieser Toxizität meist auf Tierversuchsstudien [130].

Das wohl sensitivste Organ gegenüber DEHP ist der Hoden bei Heranwachsenden [11, 136]. Auch hier müssen Ergebnisse aus Tierexperimenten mit Ratten und Mäusen zur Beurteilung herangezogen werden. In verschiedenen Studien wurden durch den Einfluss von DEHP und MEHP histologische Veränderungen, verringerte Spermienzahlen und damit verbunden reduzierte Fertilität beobachtet [67, 110]. Die toxische Wirkung betrifft Sertolizellen [136], Leydingzellen und Gonozyten [96]. Es wurde gezeigt, dass durch MEHP vermehrt große multinukleäre Gonozyten entstehen und die Sertolizellproliferation gehemmt wird [73]. Weitere pathologische Veränderungen sind ein insgesamt reduziertes Hodengewicht, eine Verringerung des Keimepithels und ein verminderter Durchmesser der Samenkanäle [73].

Auch bei weiblichen Tieren wurde eine reduzierte Fertilität festgestellt [11]. Der toxische Effekt auf Ovarien äußert sich in anovulatorischen Zyklen und polyzystischen Veränderungen [76]. In einer Studie mit Krallenaffen wurde nach oraler Gabe von DEHP ein erhöhtes Uterus- und Ovariengewicht festgestellt [89].

Außerdem fand sich eine erhöhte 17β -Estradiol-Konzentration im Serum dieser Tiere [89]. In vitro konnte gezeigt werden, dass sowohl die FSH-stimulierte cAMP-Speicherung in Granulosazellen als auch die Progesteronproduktion durch MEHP gehemmt wird [144].

Da DEHP und seine Metaboliten die Plazentaschranke passieren, kann es zu teratogenen und fetotoxischen Effekten kommen [130]. Bei Nagetieren wurden teratogene Effekte durch DEHP in Form von Skelettanomalien, Neuralrohrdefekten und Fehlbildungen sowohl des Herz-Kreislaufsystems als auch der Augen beobachtet. Außerdem kam es zu vermehrter intrauteriner und postnataler Sterblichkeit sowie reduziertem fetalen Wachstum [97, 111, 112, 146].

Auswirkungen der Phthalate auf den Respirationstrakt sind ebenfalls beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass es bei Neugeborenen, die mit DEHP-haltigen Beatmungsschläuchen beatmet wurden, zu einer Atemdepression kam [123]. Außerdem ist eventuell eine Verschlechterung der Symptome bei Asthmatikern auf den Einfluss des Metaboliten 2-Ethylhexanol zurückzuführen [100]. In einer Studie von Bornehag et al. [10] wurde der Zusammenhang zwischen allergischen Symptomen von Kindern und dem Phthalatgehalt des Staubes in deren Wohnungen untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Vorkommen von DEHP im Hausstaub das Auftreten von asthmatischen Symptomen begünstigt. Diese Studie zeigt auch, dass DEHP-Konzentrationen, die üblicherweise in der Umwelt vorkommen, ausreichen, um eine toxische Wirkung beim Menschen zu erzielen.

In Experimenten mit Ratten konnte gezeigt werden, dass durch den Einfluss von DEHP das Entstehen von Nierenzysten begünstigt wird. Außerdem sank die Nierenfunktion und damit auch die Kreatinin-Clearance derjenigen Tiere, die DEHP ausgesetzt waren [23].

Die Leber ist im Hinblick auf die toxische Wirkung von DEHP am besten untersucht.

Unter dem Einfluss von DEHP kommt es durch Hyperplasie und Hypertrophie der Hepatozyten zu einer Lebervergrößerung [11]. Außerdem kommt es bei Nagetieren zu einer Proliferation der Peroxisomen in der Leber [66, 77, 90, 102]. In einer Studie mit Rhesusaffen kam es zu einer Einschränkung der Leberfunktion und zu histopathologischen Veränderungen [54, 63].

Es wurde auch gezeigt, dass DEHP in Tierexperimenten eine karzinogene Wirkung hat. In einer Studie mit Nagetieren kam es nach oraler Gabe von DEHP zu einer erhöhten Inzidenz von Leberzellkarzinomen. In der gleichen Studie wurde auch festgestellt, dass nach Beendigung der DEHP-Exposition alle Veränderungen der Leber reversibel waren [24].

1.3 Peroxisome proliferator-activated receptors

Der oben beschriebene Effekt der Peroxisomenproliferation wird nicht nur durch Phthalate induziert, sondern auch durch eine Reihe anderer Substanzen, zum Beispiel durch Fibrate [91]. Diese Substanzen werden zu der Gruppe der Peroxisomenproliferatoren zusammengefasst

Der Mechanismus, durch den diese Gruppe die Proliferation der Peroxisomen induziert, war lange Zeit nicht geklärt. Erst 1990 entdeckten Issemann und Green [52] einen Rezeptor der Kern-Hormon-Rezeptorsuperfamilie, der durch genau diese Gruppe aktiviert wird und die Proliferation der Peroxisomen vermittelt. Er wurde Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), also durch Peroxisomen-Proliferatoren aktivierter Rezeptor, genannt.

Rezeptoren der Kern-Hormon-Rezeptorsuperfamilie, zu der auch Retinolsäure-, Schilddrüsenhormon- und Vitamin D₃-Rezeptoren gehören, können durch Regulation der Transkription die Expression verschiedenster Gene beeinflussen. Durch PPARs wird eine große Breite physiologischer Prozesse reguliert, vor allem verschiedene Stufen des Fettstoffwechsels. Sie spielen jedoch ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung zahlreicher Erkrankungen wie Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas sowie kardiovaskulären, neoplastischen und entzündlichen Erkrankungen [149].

Es wurden drei verschiedene Isoformen der PPARs identifiziert. PPAR α , PPAR δ (auch PPAR β genannt) und PPAR γ , die sowohl in Bezug auf ihre Verteilung in den unterschiedlichen Geweben als auch in Bezug auf ihre physiologischen Eigenschaften spezifisch sind.

Humane Zellen zeigen im Vergleich zu murinen Zellen eine schwächere Reaktion auf Peroxisomenproliferatoren [45]. Dies kann daran liegen, dass die Peroxisomenproliferation in der Leber von Nagetieren durch die Aktivierung von PPAR α vermittelt wird [11, 52]. In humanen Leberzellen kommt PPAR α nur zu etwa 10 % der Menge in murinen Leberzellen vor [103, 104, 145]. Ob die Proliferation der Peroxisomen die Grundlage für die Entstehung eines Karzinoms darstellt, ist letztlich nicht geklärt [87]. Es wird angenommen, dass durch vermehrte Aktivität peroxisomaler Enzyme oxidativer Stress entsteht, der

zu einer DNA-Schädigung führt [21, 114, 116] und eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Wachstum und Apoptose bewirkt [44, 119, 120].

1.3.1 Molekulare Struktur und Eigenschaften der PPARs

Wie die anderen Mitglieder der Kern-Hormon-Rezeptorsuperfamilie haben die PPARs fünf bis sechs strukturelle Regionen mit vier funktionellen Domänen (Abb. 2).

	A/B	C	D	E	F	
N	AF1	DBD		LBD	AF2	C

Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der PPAR-Struktur [25]

N-terminal befindet sich die A/B-Region mit der ligandunabhängigen Aktivierungsdomäne AF1, gefolgt von der C-Region mit der hoch konservierten DNA bindenden Domäne (DBD), die zwei Zinkfinger bildet. Die Liganden bindende Domäne (LBD) in der E-Region ist durch eine als Scharnier dienende D-Region von der DBD getrennt. C-terminal befindet sich in der F-Region die ligandabhängige Aktivierungsdomäne AF2.

DNA binden PPARs an sogenannten PPAR-Antwortelementen (PPAR response-elements, PPRE), die in 5'-Richtung vor den durch PPARs regulierten Genen in einer Promotorregion liegen. PPRES bestehen aus einer Wiederholung der Sequenz AGGTCA, getrennt durch ein Nucleotid.

Für die DNA-Bindung ist eine Heterodimerisierung der PPARs mit dem 9-cis-Retinolsäure-Rezeptor (RXR) obligat (Abb. 3).

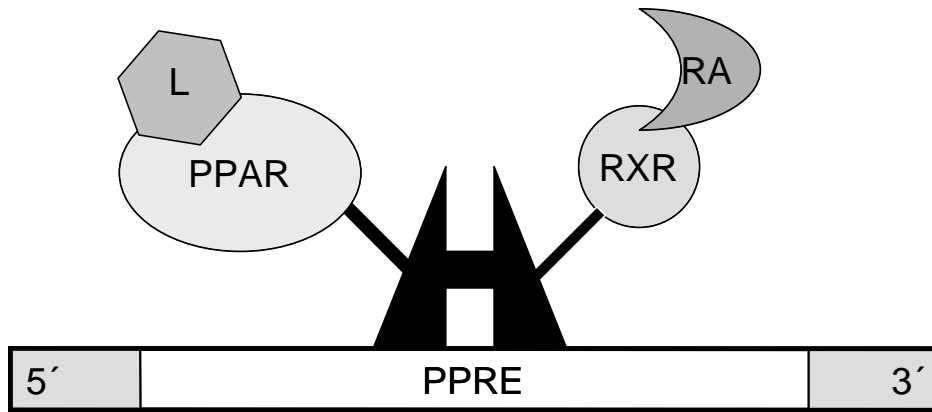


Abb. 3: Schematische Darstellung der Genregulation durch PPARs. (L: PPAR-Ligand; RA: Retinoic Acid = RXR-aktivierender Ligand; PPRE: PPAR Response Element) [40]

PPARs gehen außerdem mit weiteren Proteinen Bindungen ein. Inaktiviert können sie mit nuklearen Korepressoren (NCo-Rs) komplexiert sein [59]. Nach Ligandenbindung ändert sich die Konformation des Rezeptors und der Korepressor löst sich.

Für die Initiation der Transkription können neben RXR weitere Proteine wie nukleare Koaktivatoren (N-CoAs), zu denen cAMP-Antwortelement-bindendes Protein 300 (CBP/p300) und Steroidrezeptor-Koaktivator 1 (SRC1) gehören, essentiell sein. N-CoAs besitzen Histon-Acetyltransferase-Aktivität, wodurch sie die fest gepackte Chromatinstruktur auflockern und den Transkriptionsstart durch die RNA-Polymerase II ermöglichen [25, 72, 122, 149, 159].

Neben dieser Fähigkeit, die Transkription zu aktivieren, besteht für PPARs ebenfalls die Möglichkeit, über die Antagonisierung anderer Transkriptionsfaktoren diese zu verhindern. Dies geschieht hauptsächlich über drei verschiedene Wege. Zum einen benötigen einige andere Transkriptionsfaktoren die gleichen Koaktivatoren wie PPARs. In Situationen, in denen die Verfügbarkeit dieser Koaktivatoren das Ausmaß der Transkription bestimmt, hemmen PPARs durch Konkurrenz um die Koaktivatoren die Transkription. Der zweite Hemmungsweg besteht darin, dass PPAR-RXR-Heterodimere in der Lage sind, Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren zu bilden, wodurch beide inaktiviert werden. Der dritte Weg beinhaltet die Regulation der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade. Viele

Mitglieder dieser Kaskade werden durch Phosphorylierung aktiviert, was PPAR-RXR-Heterodimere inhibieren können [25].

1.3.2 Eigenschaften der verschiedenen PPAR-Isoformen

1.3.2.1 PPAR α

Der menschliche Körper muss seine physiologischen Prozesse flexibel gestalten können, um Veränderungen in der Umwelt zu tolerieren. Beispielsweise erfordert eine Veränderung in der Nahrungsaufnahme eine Umstellung biochemischer Prozesse. PPAR α dient hierbei durch seine Eigenschaft als globaler Regulator der Fettsäurekatabolisierung in Phasen geringer Nahrungsaufnahme der Aufrechterhaltung der Lipidhomeostase. Vorwiegend befindet er sich in der Leber, jedoch auch im Skelett- und Herzmuskel, in der Niere und im braunen Fettgewebe. Sowohl die mitochondriale als auch die peroxisomale Fettsäureoxidation wird durch PPAR α beeinflusst, indem die Transkription verschiedener Enzyme wie Acyl-CoA-Oxidase, Enoyl-CoA-Hydratase/Dehydrogenase und Keto-Acyl-CoA-Thiolase in Peroxisomen sowie Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase und Carnitin-Palmitoyl-Transferase I in Mitochondrien verstärkt wird [27]. Außerdem werden vermehrt Gene transkribiert, die intrazelluläre Fettsäuren zur β -Oxidation in Mitochondrien und Peroxisomen transportieren [25]. Passend zu seiner Rolle bezüglich der Umstellung in Phasen geringer Nahrungsaufnahme wird die Expression von PPAR α durch Insulin negativ und durch Glukokortikoide positiv beeinflusst [135].

Verschiedene natürlich vorkommende Fettsäuren sind in der Lage, PPAR α zu binden und zu aktivieren. Endogene Agonisten sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie α -Linolsäure, γ -Linolsäure und Arachidonsäure und einfach ungesättigte Fettsäuren wie Palmitinsäure und Ölsäure. Außerdem können einige mittelkettige gesättigte Fettsäuren PPAR α aktivieren [25].

Als weiterer natürlicher Ligand bindet und aktiviert das Eicosanoid Leukotrien B₄ (LTB₄) PPAR α . Leukotrien B₄ wird durch Immunzellen synthetisiert und in

erster Linie durch Peroxisomen in Leberzellen abgebaut. Es wirkt stark chemotaktisch und spielt dadurch eine große Rolle bei Entzündungen. Durch die Aktivierung von PPAR α durch LTB₄ werden Enzyme in den Peroxisomen vermehrt exprimiert, die LTB₄ abbauen, wodurch ein negatives Feedback entsteht und die Entzündung eingedämmt wird [20].

Wichtige synthetische Liganden des PPAR α sind die hypolipidämischen Fibrate. Ihre pharmakologische Wirkung besteht neben der Senkung der Serum-Triglyceride in einem Anstieg des HDL und einem Absinken des LDL, was das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen reduziert [65].

In verschiedenen Transfektionsstudien konnte gezeigt werden, dass Metaboliten des DEHP in der Lage sind, den humanen PPAR α zu aktivieren [9, 48, 68, 78]. Während DEHP selbst keinen Effekt erzielte, wurde MEHP als Ligand des PPAR α identifiziert. Bility et al. transfizierten in einer Studie murine Fibroblasten mit Plasmiden, die sowohl die Liganden bindende Domäne der PPARs enthielten als auch eine Luziferase kodierten. Es wurden humane und murine PPARs verwendet. Die Zellen wurden mit in DMSO gelöstem MEHP stimuliert. Anhand der Luziferaseaktivität wurde die Expression der PPARs bestimmt. Nach Stimulation mit mindestens 30 μ M MEHP wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Luziferaseaktivität und damit des PPAR α beobachtet [9]. Hurst et al. sowie Maloney et al. beobachteten in ihren Transfektionsstudien diesen Effekt ab einer MEHP-Konzentration von 4 μ mol/l bzw. 5 μ mol/l [48, 78].

1.3.2.2 PPAR β/δ

Anders als PPAR α ist PPAR β/δ weniger für bestimmte Gewebe spezifisch. Er ist relativ gleichmäßig in allen Geweben zu finden. Dies ist einer der Gründe, weswegen über PPAR β/δ am wenigsten bekannt ist. Trotzdem gibt es einige Unterschiede in seiner Verteilung. Im Vergleich zu Lunge oder Niere ist PPAR β/δ nur sehr gering in der Leber ausgebildet [72]. Außerdem gibt es ihn fast gar nicht in glatten Muskelzellen, während er in Skelett- und Herzmuskel exprimiert wird [11]. Außerdem scheint das Ausmaß der PPAR β/δ -Expression vom Wachstum oder Differenzierungsgrad der Zellen abzuhängen [2].

Wie PPAR α wird auch PPAR β/δ eine Rolle im Fettstoffwechsel zugeschrieben [65]. Auch PPAR β/δ ist in der Lage, nach Aktivierung HDL im Serum zu erhöhen und die Triglyceride zu senken [25]. Außerdem hat PPAR β/δ eine wichtige Aufgabe bei der Lipidaufnahme in Zellen [25]. In Mäusen ohne funktionierenden PPAR β/δ zeigte sich ein stark reduzierter Fettspeicher [106]. Außerdem wurden bei diesen Mäusen vermindertes Wachstum, Myelinisierungsdefekte des Corpus Callosum und eine verstärkte Hyperplasie der Epidermis als Folge einer Behandlung mit dem Phorbol-ester O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat festgestellt [65]. Entsprechend diesen Beobachtungen wird eine Involvierung von PPAR β/δ in Wachstumsprozesse, Hirnentwicklung und Keratinozytenproliferation angenommen [65, 122]. Ebenfalls angenommen wird, dass PPAR β/δ eine Rolle, wenn auch keine essentielle, bei der uterinen Implantation spielt [2].

Natürliche Liganden des PPAR β/δ sind wie bei PPAR α gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, jedoch ist deren Affinität zu PPAR β/δ etwas geringer [65].

Außerdem sind verschiedene Eicosanoide wie Prostaglandin A₁, Prostaglandin D₂ und Prostacyclin in der Lage, PPAR β/δ zu aktivieren [25].

Bei Nagetieren erfolgt eine Aktivierung des PPAR β/δ auch durch MEHP. Wie bei PPAR α ist nur der Metabolit ein Ligand des Rezeptors, nicht aber DEHP selbst. Die Wirkung von MEHP auf PPAR β/δ ist schwächer als die auf PPAR α [9, 68]. Bei einer Studie mit menschlichen Zellen konnte eine Aktivierung durch MEHP allerdings nicht nachgewiesen werden [9].

1.3.2.3 PPAR γ

PPAR γ spielt eine Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung bestimmter Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas, Atherosklerose und Karzinomentstehung [122, 149]. Es gibt zwei Isoformen des PPAR γ , wobei PPAR γ 2 N-terminal 30 zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zu PPAR γ 1 aufweist. Diese Variation entsteht durch unterschiedliche Promotoren und

unterschiedliches Splicen [122]. Während eine relativ hohe Expression von PPAR γ 2 selektiv im Fettgewebe zu finden ist, wird PPAR γ 1 in vielen Geweben in geringerem Ausmaß exprimiert [122, 149].

Es gibt verschiedene natürliche Liganden, die an PPAR γ binden können. Dazu gehören mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie α -Linolsäure, γ -Linolsäure, Arachidonsäure und Eicosapentaenolsäure, obwohl diese nur eine geringe Affinität zu PPAR γ besitzen [25]. Außerdem sind verschiedene Eicosanoide wie 9-HODE (Hydroxy-octadeca-9Z,11E-dienolsäure), 13-HODE und 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15dPGJ₂) in der Lage, PPAR γ zu aktivieren [25].

Die Aktivierung von PPAR γ im Fettgewebe führt sowohl zu einem Anstieg der Adipozytenzahl als auch zu einem Anstieg der Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT 4), des fettsäurebindenden Proteines aP2, des Fettsäuretransportproteins (FATP), der Acyl-CoA-Synthetase, der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), des Malatenzyms und der Lipoproteinlipase, wodurch entscheidende Schritte der Lipidakkumulation stimuliert werden [7, 15, 42, 64, 71, 72, 99, 129, 141, 143].

Im Vergleich zu natürlichen Liganden haben synthetische Liganden wie die Klasse der Thiazolidinedione (TZD) eine sehr viel höhere Affinität zu PPAR γ [20, 25]. Diese insulinsensitivierenden Medikamente erhöhen die Adipozytendifferenzierung im Fettgewebe. Auch im Skelettmuskel kommt es durch den Einfluss von TZD zu einem Anstieg der Expression von GLUT 4 und der Lipoproteinlipase. Durch diese Veränderung kommt es über die Aktivierung des PPAR γ durch TZD zu einer verbesserten Insulinsensitivität, einer gesteigerten Glukosemetabolisation und einer geringeren Triglyceridkonzentration im Serum [7, 42, 64, 71, 99].

Als negativer Effekt kommt PPAR γ bei der Entstehung der Atherosklerose eine entscheidende Bedeutung zu. Durch die Aktivierung von PPAR γ durch oxidiertes LDL entstehen aus Monozyten Schaumzellen, die in atherosklerotischen Plaques zu finden sind [142]. Außerdem kommt es durch die Aktivierung von PPAR γ zu einem Anstieg der Expression des

Oberflächenrezeptors CD36, was mit einer erhöhten Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Schaumzellen verbunden ist [142]. Auf der anderen Seite gibt es auch positive Effekte auf die Entstehung der Atherosklerose, die über PPAR γ vermittelt werden [121]. Hierzu gehört, dass in verschiedenen Tiermodellen der Blutdruck durch TZDs gesenkt werden konnte [122], außerdem wurden durch TZDs die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen inhibiert und proinflammatorische Signale in Makrophagen der Gefäßwand wie Interleukin (IL)-6, IL-1 β und TNF- α supprimiert [60, 118].

Es wird angenommen, dass PPAR γ eine Rolle in der Entstehung verschiedener Karzinome besitzt. Synthetische Liganden bewirken eine deutliche Reduktion des Zellwachstums in vielen Kolonkarzinom-Zelllinien [122], in denen seine Expression besonders hoch ist. Außerdem zeigen Prostatazelllinien durch die Behandlung mit TZDs eine Reduktion des Zellwachstums sowie eine verminderte Sekretion des Tumormarkers PSA (prostataspezifisches Antigen) [93, 122].

Ein weiterer Ligand des PPAR γ ist MEHP [9, 48, 68, 78]. In Transfektionsstudien wurde eine Aktivierung des Rezeptors nach Stimulationen mit MEHP-Konzentrationen im Bereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 200 $\mu\text{mol/l}$ beobachtet [9, 48, 78]. Bility et al. beobachteten durch Stimulation mit mindestens 10 μM MEHP einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Luziferaseaktivität [9]. Hurst et al. konnten diesen Effekt ab einer MEHP-Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ zeigen, während Maloney et al. schon bei der Stimulation mit 1 μM MEHP einen Anstieg der Aktivität beobachteten [48, 78]. Wie für die anderen Isoformen ist DEHP auch für PPAR γ kein Ligand.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von MEHP und 4-Heptanon auf die Expression der PPAR-Isoformen PPAR α , PPAR γ und PPAR γ 2 in humanen Leber- und Endothelzellen. Dazu wurden Zellkulturen für humane Leber- und Endothelzellen etabliert und eine quantitative Real-Time-

PCR zur Bestimmung verschiedener PPAR-Isoformen entwickelt, evaluiert und optimiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Ambion	DNA-free™ DNase Treatment and Removal, Reagents, DNase I, 10x DNase Buffer, DNase Inactivation Reagent
Amersham pharmacia biotech	UV/Visible Spectrophotometer, Ultrospec® 3100pro, GeneQuant II Photometer
Biometra	TRIO-Thermoblock
Biozym Diagnostik GmbH	SafeSeal-Tips® sterile Filter-Spitzen (10µl, 100µl, 1000µl)
Eppendorf AG 100µl)	Pipetten, ep T.I.P.S. sterile Filter-Spitzen (10µl, 100µl)
Greiner bio one Röhrchen	Cellstar® Stabpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), (15ml, 50ml)
HLC Haep Labor Consult	Thermoblock Modell KTM 100 RP
Heraeus	Biofuge fresco, Megafuge 1,0R
Hettich	Zentrifuge Mikro 22R
Hirschmann Laborgeräte	pipetus®-akku
Invitek GmbH Berlin	Invisorb® Spin Cell RNA Mini Kit, Lysis Solution R, Wash Buffer R1, Wash Buffer R2, Elution Buffer R,

Invitrogen™ life technologies	DNA-Binding Spin Filter, RNA-Binding Spin Filter, Receiver-Tubes, Elution Tubes RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase, Random Primers, Ribonuclease H, 5x First Strand Buffer, 0,1 M DTT, 10mM dNTP Mix, MCDB 131 Medium, liquid (1x), Recombinant Human Epidermal Growth Factor (EGF)
metabion GmbH Martinsried	Primer (s.u.)
MWG-BIOTECH Gesellschaft für angewandte Biotechnologie	Geldokumentationsstation
Nunc™	Nunclon™ Δ Surface SoLo-Flasks, Nunclon™ Δ Surface 6-Well-Multidishes
Owl Separation Systems Portsmouth	Easycast™ Horizontal Electrophoresis System
QIAGEN	QuantiTect™ SYBR ^R Green PCR Kit: 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, HotStarTaq ^R DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, dNTP Mix mit dUTP, SyBR Green I, ROX, 5mM MgCl ₂ , Rnase-free water
PAA Laboratories GmbH	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) (PBS)
Pall Filtron Corporation Laboratory Products Division	Mini-KLEENPAK™ syringe Filter 0,2µm
peQLab	peQGOLD DNA-Sizer XII

Biotechnologie GmbH

Pharmacia	Electrophoresis Power Supply EPS 3500
Roche Molecular Biochemicals	LightCycler, LightCycler Software Version 3.5, LightCycler Centrifuge Adapters, LightCycler®Capillaries (20µl)
ROTH	Agarose NEEO Ultra-Qualität, ROTI®GAROSE f.d. DNA/RnA Eektrophorese, Ethidiumbromid 1 % 10mg/ml
SIGMA-ALDRICH	Hydrocortisone ´98 % cell culture tested, 4- Heptanon 98 % 5ml, 2-Ethyl-1-hexanol 99+ % 25 ml, Phthalic acid bis(2-ethylhexylester) 100ml
TCI Europe nv Belgium	Phthalic Acid Mono-2-ethylhexyl Ester 25 g

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für die In-vitro-Zellversuche wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Zum einen handelt es sich um humane Leberzellen, zum anderen um humane mikrovaskuläre Endothelzellen.

Als humane Leberzelllinie wurden HeLa-Chang-Liver-Zellen freundlicherweise von Professor Dr. P. C. Dartsch in Horb a. N. kultiviert. Bei der Zellzüchtung wurden zwei getrennte Zellpools gebildet (P1 und P2).

Als humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie wurden HMEC-1-Zellen kultiviert. Hierbei handelt es sich um adhärent wachsende dermale immortalisierte Zellen. MCDB 131 wurde als Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), L-

Glutamin (2mM Endkonzentration im Medium), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF, 10 ng/ml Endkonzentration im Medium), Hydrocortison (1 µg/ml Endkonzentration im Medium) und PenStrep versetzt.

Beim Passagieren der Zellen wurden jeweils konfluente Zellen einer Kulturflasche in zwei neue Kulturflaschen aufgeteilt. Das Kulturmedium wurde hierzu abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. In die Kulturflaschen wurden je 10 ml Trypsin gegeben. Durch das Mikroskop wurde beobachtet, wann sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche ablösen. Sobald dies geschah, wurden je 15 ml Kulturmedium zugeben. Die Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Kulturmedium mit dem Trypsin wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 40 ml frischem Kulturmedium durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Je 20 ml der gelösten Zellen wurden in eine neue Kulturflasche gegeben. Bis zum erneuten Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank belassen.

2.2.2 Stimulation der Chang-Liver-Zellen

Sobald die Chang-Liver-Zellen konfluent waren wurden sie mit 4-Heptanon und Monoethylhexyl-Phtalat (MEHP) über 24 Stunden stimuliert. Da die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung dieser Weichmacher auf die Zellen untersucht werden sollte, wurden sie in je fünf verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben.

Die beiden Zellpools (P1 und P2) wurden analog zueinander stimuliert, das heißt, zu jeder Probe in dem einen Pool gab es eine Probe in dem anderen Pool, die in gleicher Weise stimuliert wurde.

Für die Stimulation mit 4-Heptanon wurden die Konzentrationen 250 µg/l, 500 µg/l, 750 µg/l, 1000 µg/l und 2000 µg/l verwendet. Zur Verdünnung wurde 4-Heptanon in PBS gelöst.

Für die Stimulation mit MEHP wurden Endkonzentrationen im Kulturmedium von 50 µmol/l, 100 µmol/l, 250 µmol/l, 500 µmol/l und 1000 µmol/l verwendet. MEHP wurde wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Der Anteil von DMSO im Kulturmedium betrug 0,05 %.

Als Kontrolle wurden jeweils zwei Kulturschalen aus jedem Pool mit DMSO versetzt und zwei weitere wurden ohne Zusatz im Kulturmedium belassen.

Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium mit den verschiedenen Substanzen vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden sie von den Kulturschalen abgelöst und mit PBS versetzt in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde abpipettiert.

Nach dem Protokoll 1 „Total RNA extraction from human and animal cell culture“ des Invisorb® Spin Cell RNA Mini Kit wurden 700 µl Lysis Solution R nach gutem Schütteln auf die Zellen gegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde gut gemischt.

Die lysierten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3 Stimulation der Endothelzellen

Zur Stimulation der Endothelzellen wurden diese in 6-Well-Platten ausgesät.

Die Stimulation mit MEHP erfolgte mit den gleichen Konzentrationen, die bei den Leberzellen verwendet wurden, mit dem Unterschied, dass MEHP nicht in DMSO gelöst wurde, sondern in mit FCS versetztem Kulturmedium. Hierzu wurden 69,6 mg MEHP mit einer Feinwaage abgewogen und 250 ml des Kulturmediums zugegeben. In Löslichkeitsversuchen wurde gezeigt, dass sich MEHP unter längerem Schütteln löste.

Für die Stimulation mit 4-Heptanon wurden Lösungen mit Konzentrationen von 500 µg/l, 1000 µg/l, 2000 µg/l und 10000 µg/l hergestellt.

Die MEHP- und 4-Heptanonlösungen wurden mit einem Sterilfilter in sterile Röhrchen filtriert.

Wie die Leberzellen wurden auch die Endothelzellen stimuliert, sobald sie konfluent waren.

Zur Stimulation wurden die Kulturmedien von den Zellen abgesaugt und je 3 ml der Lösungen in ein Well pipettiert.

Nach 24 Stunden wurden die mit 4-Heptanon und MEHP versetzten Kulturmedien abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und die RNA-Extraktion mit dem Spin Cell RNA Mini Kit von Invisorb® begonnen.

2.2.4 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte nach dem Protokoll 1 „Total RNA extraction from human and animal cell culture“ des Invisorb® Spin Cell RNA Mini Kit.

Die Zellen wurden mit 700 µl Lysis Solution R überschichtet. Nach einer kurzen Inkubation wurde das Zelllysate abpipettiert.

Ein DNA-bindender Spin-Filter wurde auf ein Receiver-Tube gesetzt und das oben beschriebene Zelllysate direkt auf diesen Filter gegeben. Nach einer Inkubation von einer Minute und einem Zentrifugationsschritt von 2 Minuten bei 12000 rpm wurde der DNA-bindende Spin-Filter verworfen.

Zu dem Lysat, das die RNA enthielt, wurden 700 µl siebzugprozentiges Ethanol gegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde gemischt.

Ein RNA-bindender Spin-Filter wurde auf ein neues Receiver-Tube gesetzt und das Lysat auf diesen Filter pipettiert. Nach einer Inkubation von einer Minute wurde das Receiver-Tube für 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der RNA-bindende Spin-Filter erneut eingesetzt. Nun erfolgten drei Waschschriffe. Hierzu wurden 600 µl Wash Buffer R1 auf den Spin-Filter pipettiert und das Receiver-Tube mit dem Spin-Filter für 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Receiver-Tube wurde entleert und im zweiten Waschschriff wieder verwendet. 500 µl Wash Buffer R2 wurden auf den RNA-bindenden Spin-Filter gegeben, das Receiver-Tube mit dem Spin-Filter wurde erneut für 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert und entleert. Dieser Schriff wurde einmal wiederholt.

Um die Membran des RNA-bindenden Spin-Filters zu trocknen und jegliche Spuren von Ethanol zu entfernen wurde der Spin-Filter mit dem Receiver-Tube für 3 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert.

Zur Überföhrung der RNA von dem Spin-Filter in ein Elution-Tube wurde er in ein solches eingesetzt. Auf die Membran des Spin-Filters wurden nun 60 µl Elution Buffer R pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde der Spin-Filter mit dem Elution-Tube für 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Der RNA-bindende Spin-Filter wurde verworfen und die eluierte RNA sofort auf Eis gestellt.

Die so erhaltene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.5 DNA-Aufreinigung

Zur Befreiung der RNA von kontaminierender DNA wurde das „DNA-free Protocol“ von Ambion verwendet.

Die Proben mit der RNA wurden auf Eis gestellt und aufgetaut.

Es wurden 6 µl 10xDNase I Buffer und 1 µl DNase I zu den Proben gegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden sie gut gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach längerem Vortexen des DNase Inactivation Reagent wurden jeweils 6 µl zu den Proben gegeben.

Die Proben wurden bei Raumtemperatur 2 Minuten inkubiert, wobei das Elution-Tube zwischendurch leicht geschwenkt wurde um das DNase Inactivation Reagent zu resuspendieren.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Elution-Tubes etwa 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Hierbei setzte sich das DNase Inactivation Reagent als Pellet am Boden der Elution-Tubes ab.

Die Überstände wurden mit einem Abstand von einigen Millimetern zum Pellet abpipettiert und in nukleasefreie Eppendorffcups überführt.

Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.6 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Proben erfolgte mittels Photometrie.

Die Küvette des Photometers wurde zwischen den einzelnen Messungen mit VE-Wasser gespült und durch kurze Zentrifugation getrocknet.

Die Proben wurden auf Eis gestellt und aufgetaut. Sie wurden zur Messung 1:50 verdünnt. Zuerst wurden 98 µl RNase-freies Wasser mit Raumtemperatur in die Küvette pipettiert, dann wurden 2 µl der Probe hinzu gegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemixt. Die Absorption wurde bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen.

Die Konzentrationsbestimmung wurde bei jeder Probe dreifach durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

2.2.7 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription wurde die RNA in cDNA umgeschrieben.

Hierzu wurden die Angaben des Herstellers befolgt (First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT, Invitrogen).

Für die reversen Transkriptionen der Leberzellversuche wurden jeweils 2 µg RNA eingesetzt. Bei der reversen Transkription der RNA aus den mit MEHP stimulierten Endothelzellen wurden 0,1 µg, aus den mit 4-Heptanon stimulierten Endothelzellen 0,34 µg RNA eingesetzt. Die einzusetzenden Mengen wurden mit Hilfe der gemessenen RNA-Konzentrationen ermittelt.

Das errechnete Probenvolumen wurde in ein nukleasefreies Eppendorfcup pipettiert. Dazu wurden weiterhin 1 µl Random Primers, 1 µl 10mM dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP bei neutralem pH) und steriles Wasser auf 12 µl pipettiert. Die Lösung wurde durch Auf- und Abpipettieren gemixt und in einem Thermoblock 5 Minuten auf 65°C erhitzt. Danach wurde die Lösung sofort auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Nun wurden 4 µl 5x First Standard Buffer, 2 µl 0,1M DTT und 1 µl RNase OUT™ hinzupipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemixt. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurden die Proben 10 Minuten bei 25°C und 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Jetzt wurde 1 µl SuperScript™ II RT zugegeben und gemixt. Die nächste Inkubation erfolgte 50 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C. Es wurde 1 µl *E. coli* RNase H zugegeben und weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben mit der nun entstandenen cDNA wurden sofort auf Eis gestellt und bei -20°C gelagert.

2.2.8 Primerdesign

Für die PCR werden zur de novo Synthese der DNA durch die Taq-DNA-Polymerase als Startmoleküle Primer benötigt. Für das Primerdesign wurde eine spezielle Software, Primer Picker, verwendet. Diese Software ist im Internet frei verfügbar (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Die Auswahl der Primer ist ein wichtiger Schritt für eine aussagekräftige PCR. Durch den Einsatz von nicht geeigneten Primern können Artefakte in der PCR entstehen.

Ein Primer muss komplementär zum 3'-Ende des kodogenen Stranges der Zielsequenz sein, der andere zum 3'-Ende des antikodogenen Stranges. Wichtige Parameter für effektive Primer in der PCR sind deren Länge, ihre Sequenz und ihre Schmelztemperatur.

Bei der Länge der Primer ist zu beachten, dass ihre Spezifität für die Zielsequenz mit abnehmender Länge sinkt. Ab einer Primerlänge von 24 Nucleotiden wird jedoch keine Erhöhung der Spezifität mehr erzielt. Empfohlen werden daher Primerlängen zwischen 18 und 20 Nucleotiden [74].

Bei der Sequenz der Primer muss darauf geachtet werden, dass der GC-Gehalt zwischen 40 % und 60 % liegt und die verschiedenen Basen gleichmäßig verteilt sind.

Als Schmelztemperatur wird diejenige Temperatur bezeichnet, bei der 50 % der Primer-cDNA-Hybride als Einzelstränge vorliegen. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 55°C und 65°C liegen [74].

Die beiden Primer eines Primerpaares sollten sich in den verschiedenen Eigenschaften möglichst ähnlich sein.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mittels Real-Time-PCR am LightCycler (Roche Diagnostics).

Es wurde das Protokoll des QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook befolgt (Protocol: Using the LightCycler System).

Zuerst wurde ein Mastermix hergestellt. Hierzu wurde der bei -20°C gelagerte 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, die zu untersuchende cDNA, die Primer und RNase-freies Wasser aufgetaut. Die einzelnen Lösungen wurden gemixt. Für jede Reaktion wurden 10 µl des 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 6 µl RNase-freies Wasser und je 1 µl der beiden Primer eingesetzt. Sollten beispielsweise 25 Reaktionen in einem LightCycler-Ansatz erfolgen, werden 250 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 150 µl RNase-freies Wasser und je 25 µl der beiden Primer eingesetzt. Der Mastermix wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt.

Da es zur Quantifizierung des PCR-Ergebnisses wichtig ist, dass die cDNA-Konzentrationen der zu untersuchenden Proben im Bereich der Standardkurve liegen, wurden die Proben vor dem Einsatz in die PCR entsprechend verdünnt. Die Proben der Leberzellen wurden 1:10 verdünnt, mit Ausnahme der Proben zur Bestimmung von PPAR α und PPAR γ 2 im Pool 2, die 1:50 verdünnt wurden. Die Proben der Endothelzellen wurden für die PCR 1:5 verdünnt.

Die Proben mit der cDNA wurden aufgetaut und kurz gevortext. Zum Erreichen eines Reaktionsvolumens von 20 μ l wurden 18 μ l des Mastermix und 2 μ l der cDNA in eine LightCycler-Kapillare pipettiert. Die LightCycler-Kapillaren wurden dabei in einem Kühlblock bei einer Temperatur von 4°C bis 10°C gekühlt.

Sobald alle LightCycler-Kapillaren für den Ansatz befüllt waren, wurden sie kurz bis auf etwa 3000 rpm anzentrifugiert.

Ein Ansatz für den LightCycler bestand immer aus einer Verdünnungsreihe von 4 bis 5 Verdünnungen, einer dreifach bestimmten Kontrolle und den dreifach bestimmten zu untersuchenden Proben. Da mit 5 verschiedenen Konzentrationen pro Weichmacher stimuliert wurde, bestand ein Ansatz meist aus etwa 24 Reaktionen.

Der LightCycler wurde für alle Reaktionen wie folgt programmiert. Durch eine erste Erhitzung für 15 Minuten auf 95°C wurde die HotStarTaq DNA Polymerase aktiviert. Danach folgten die verschiedenen Zyklusschritte zur Amplifikation beginnend mit einer Denaturierung durch eine Erhitzung auf 94°C für 15 Sekunden. Es folgte die Abkühlung auf die Annealingtemperatur von 59°C für 25 Sekunden zur Anlagerung der Primer. Die Extensionsphase erfolgte bei 72°C für 25 Sekunden, wobei die Fluoreszenz gemessen wurde. Diese Amplifikationsschritte wurden 50 Mal wiederholt. Die Temperaturraten bei den verschiedenen Schritten betragen 20°C/sec.

Nach Abschluss der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve der PCR-Produkte erstellt. Sie war zu deren Identifikation wichtig. Hierzu wurde die Temperatur langsam in Schritten von 0,2°C/sec von 55°C bis auf 97°C gesteigert und die Fluoreszenz dabei gemessen. Ab einer bestimmten Temperatur denaturierten die PCR-Produkte, wodurch die Fluoreszenz steil abfiel. Von diesem Abfall der

Fluoreszenz wurde die erste Ableitung berechnet und es entstand eine Kurve mit einem Maximum, das für jedes PCR-Produkt spezifisch war. (Abb. 4)

Die LightCycler-Kapillaren wurden in den LightCycler gesetzt und das eingestellte Programm wurde gestartet.

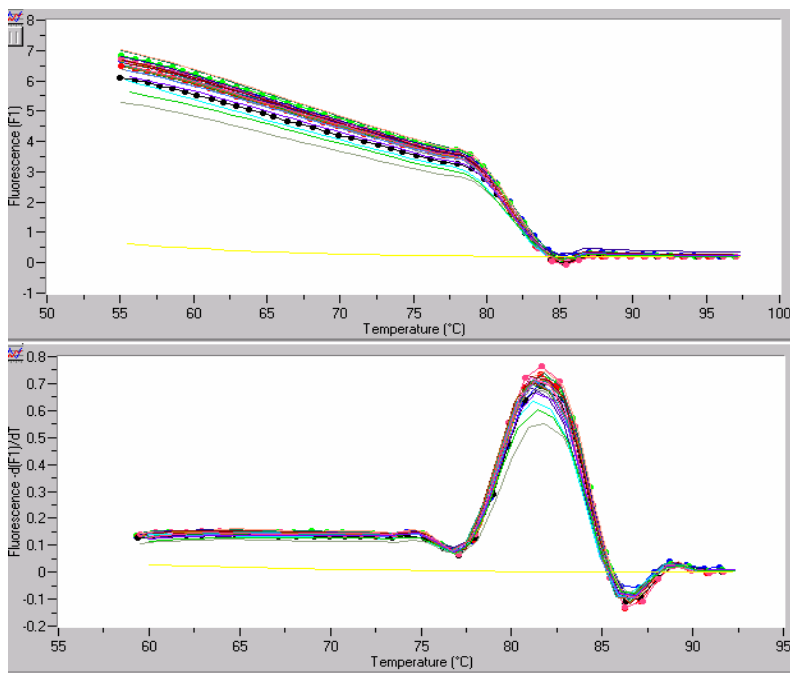


Abb. 4: Schmelzkurve. Oben Abfall der Fluoreszenz, unten erste Ableitung

2.2.10 Prinzip der PCR am LightCycler

Der LightCycler besteht aus einem Thermocycler und einem Fluorimeter. Glaskapillaren, die die zu untersuchenden Proben enthalten, werden in dem Thermocycler platziert. Durch ihre große Oberfläche werden die unterschiedlichen Temperaturen sehr schnell auf die Proben übertragen. Die Glaskapillaren dienen auch als Küvetten zur Messung der Fluoreszenz, da der Thermocycler direkt mit dem optischen System des Gerätes verbunden ist.

Während der PCR bindet SYBR Green I spezifisch an doppelsträngige DNA, wodurch ein Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert wird. Die proportional zur Menge der PCR-Produkte entstehende Fluoreszenz wird kontinuierlich durch das Fluorimeter detektiert. Hierdurch ist eine Aufzeichnung der PCR in Echtzeit möglich. Anhand der gemessenen Fluoreszenz kann auf die Menge der PCR-Produkte geschlossen werden [74].

2.2.11 Quantifizierung der Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der PCR-Produkte am LightCycler erfolgte mit Hilfe der LightCycler Software Version 3.5.

Das Prinzip beruht darauf, dass bis zur Detektion des Fluoreszenzsignals der Amplifikationsprodukte umso mehr PCR-Zyklen gebraucht werden, je weniger Moleküle der Zielsequenz in der Probe enthalten sind.

Die in den ersten Zyklen auftretende Fluoreszenz ist unspezifisch und nicht informativ. Um sie aus der Analyse auszuschließen, wurde das „Noise Band“ definiert. Es wurde in den unteren Teil der log-linearen Phase der Amplifikation gelegt. Die darunter liegenden Datenpunkte wurden nicht in die Berechnung mit einbezogen. In der log-linearen Phase der Amplifikation liegen die wichtigsten Informationen für die Quantifizierung, da alle Proben mit einer vergleichbaren Effizienz amplifiziert werden. Es folgt eine Sättigungsphase, in der keine signifikante Zunahme der PCR-Produkte mehr erfolgt.

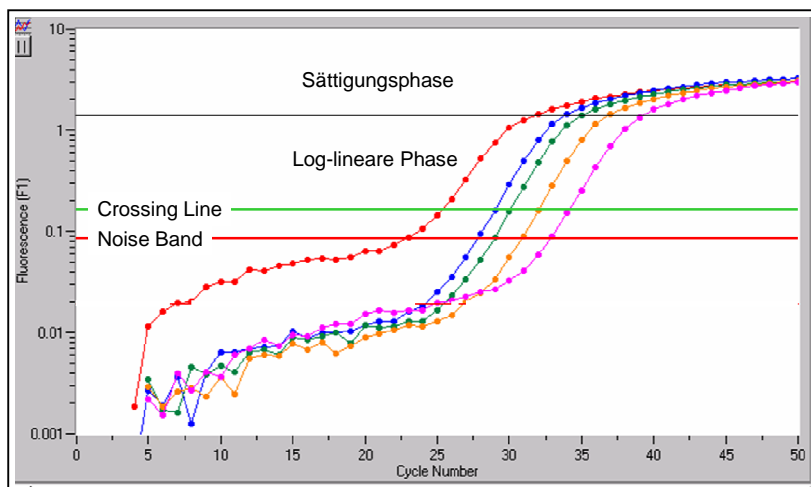


Abb. 5: Verschiedenen Phasen der Amplifikation

Nun musste eine „Crossing Line“ definiert werden. Der Punkt, an dem die Fluoreszenz einer Probe diese „Crossing Line“ kreuzt, wird als „Crossing Point“ bezeichnet. Alle Proben haben an ihren „Crossing Points“ die gleiche Fluoreszenz und somit die gleiche Anzahl an Amplifikationsprodukten. Je höher die Zyklenzahl an diesem Punkt ist, desto weniger Zielsequenz war ursprünglich in der Probe enthalten. Die Software legt die „Crossing Line“ als

Voreinstellung in Höhe des „Noise band“. Sie kann aber mithilfe der Standardkurve optimiert werden.

Die Standardkurve wurde benötigt, um anhand der „Crossing Points“ die ursprüngliche Menge der Zielsequenz zu berechnen. Zur Erstellung der Standardkurve wurden die „Crossing Points“ von 4 bis 5 verschiedenen Verdünnungen einer Probe mit bekanntem Verdünnungsfaktor bestimmt. Die Konzentrationen der einzelnen Proben wurden in lab units (lu) angegeben. Hierbei hatte die geringste Verdünnung eine Konzentration von 1000 lu. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe wurden logarithmisch gegen die „Crossing Points“ der einzelnen Verdünnungen aufgetragen und es wurde eine lineare Regressionsgerade erstellt. Durch die Software konnte dann diejenige „Crossing Line“ berechnet werden, durch die die Abweichung der Punkte von der Regressionsgeraden minimiert wurde. (Abb. 6)

Durch die so definierte Beziehung zwischen dem „Crossing Point“ und der Konzentration der Zielsequenz in der ursprünglichen Probe konnten die zu untersuchende Proben quantifiziert werden. Da es sich hierbei nicht um die absoluten Konzentrationen handelt, wurden die Proben nur relativ miteinander verglichen [113].

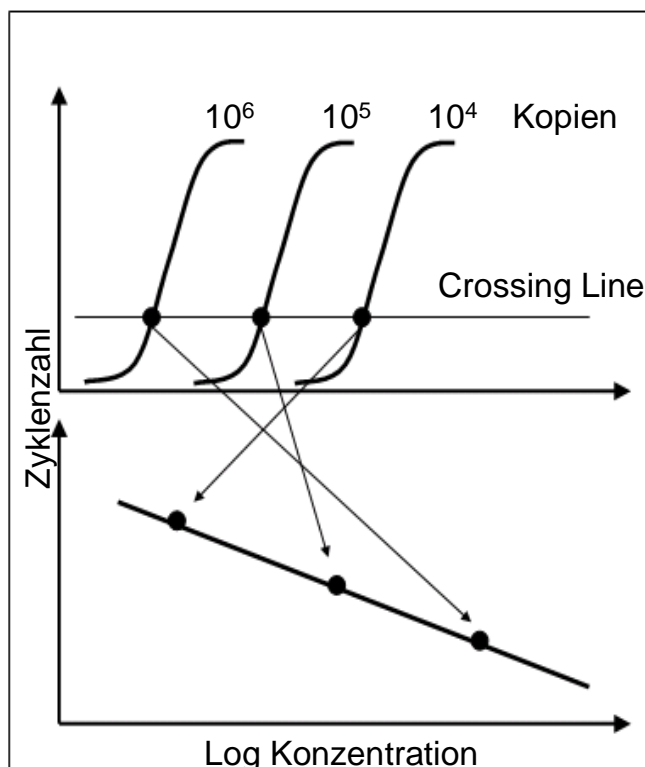


Abb. 6: Erstellung einer Standardkurve

2.2.12 Normierung der Proben über „housekeeping genes“

„Housekeeping genes“ sind Gene, deren Expression sich bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen nicht unterscheiden darf. In stimulierten und unstimulierten Zellen muss also die gleiche Menge mRNA der „housekeeping genes“ enthalten sein. In der vorliegenden Arbeit wurde das „housekeeping gene“ Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet [74].

Zur Beurteilung der Menge an cDNA des „housekeeping gene“ wurde dieses mittels PCR am LightCycler in den zu vergleichenden Proben bestimmt. Die Proben wurden so verdünnt, dass die Unterschiede ausgeglichen wurden. Zur Ermittlung des jeweiligen Verdünnungsfaktors wurden die durch die LightCycler Software berechneten Konzentrationen in den verschiedenen Proben herangezogen. In den so normalisierten Proben wurde die Menge der mRNA der zu untersuchenden Gene bestimmt.

2.2.13 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Spezifität der PCR-Produkte erfolgt nach der PCR eine Gelelektrophorese.

Hierzu wurden 1,7 mg Agarose abgewogen und mit 100 ml TBE-Puffer gemischt. Um die Agarose zu lösen wurde sie mit dem TBE-Puffer in der Mikrowelle mehrmals aufgekocht bis keine Schlieren in der Lösung mehr zu erkennen waren. Nach einer kurzen Abkühlung unter fließendem Wasser wurden 5 µl Ethidiumbromid zugegeben und durch Schwenken verteilt. Die noch warme Agarose wurde langsam in die EasyCast UVT Gel-Platte gegossen. Eventuelle Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Es wurden zwei Kämmen in die Platte eingesetzt, damit Taschen für die Proben entstanden. Nach 15 bis 30 Minuten war das Gel fest, die Kämmen wurden entfernt und die Platte in die Pufferkammer des EasyCast™ Elektrophorese-systems eingesetzt. Die Vorrichtung wurde mit TBE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel mit Puffer beschichtet war.

Es wurde für jede LightCycler-Kapillare je ein Eppendorffcup vorbereitet, in das 4 µl Sechsfach-Ladepuffer pipettiert wurden. Die LightCycler-Kapillaren mit den Proben wurden vorsichtig geöffnet und mit der Öffnung nach unten in diese

Eppendorffcups gestellt. Durch kurzes Anzentrifugieren wurde der Inhalt der LightCycler-Kapillaren in die Cups überführt.

15 μl aus den Cups wurden jetzt vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert, wobei jeweils in die erste Tasche 5 μl eines Markers gegeben wurden.

Der verwendete Marker (peQGOLD DNA-Sizer XII) hatte eine große Bandenzahl im Bereich kleiner Fragmente von 26 bis 501 Basenpaaren.

Zum Auftrennen der PCR-Produkte wurde für eine Stunde ein Strom von 100 V, 100 mA und 30 W angeschlossen.

Nach Beendigung des Programms wurde das Gel aus der Platte genommen. Unter UV-Belichtung wurden die verschiedenen PCR-Produkte sichtbar und fotografiert (Abb. 7).

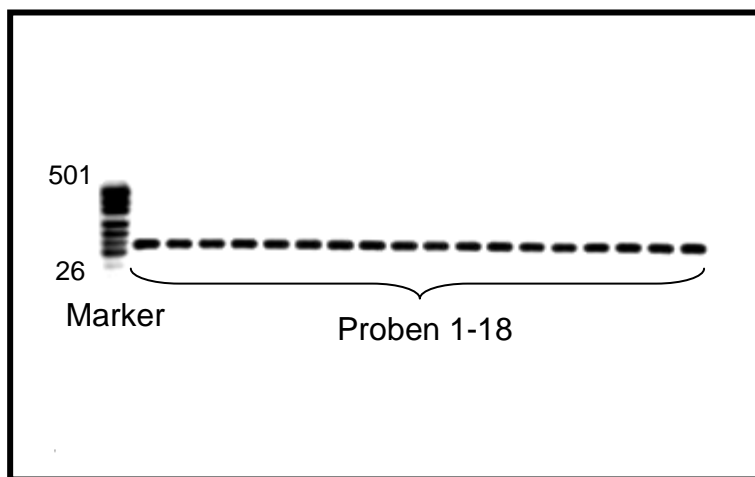


Abb. 7: Gelelektrophorese

3. Ergebnisse

3.1 Methodenentwicklung

3.1.1 Primerdesign

Für die Bestimmung des PPAR α wurde ein spezifisches Primerpaar nach der Publikation der Gensequenz (Genebank accession number NM 005036) durch Barrero et al. [5] mit der Sequenz 5'-ATC AGC CAC ACC TTT TCC AG-3' (PPAR-a-a1) und 5'-GCC GGT TAC CTA CAG CTC AG-3' (PPARa-s1) ausgewählt. Die Zielsequenz dieses Primerpaares besitzt eine Länge von 132 Basenpaaren. (Abb. 8)

```

PPAR $\alpha$ 
1621  cggatgctgc gctgcacccg ctactgcagg agatctacag ggacatgtac tgagttcctt
1681  cagatcagcc acacctttc caggagtct gaagctgaca gcactacaaa ggagacgggg
1741  gagcagcacg atttgcaca aatatccacc actttaacct tagagcttgg acagctcag
1801  ctgtaggtaa ccggc atatt attccatc tttgtttaa ccagtactc taagacata
1861  gaactcaaat gctgggggta ggtggcta ctcaggactg ggaagattac ggcgaattat

```

Abb. 8: Homo sapiens PPAR α

Entsprechend der durch Greene et al. [38] publizierte Gensequenz (Genebank accession number L40904) wurde ein Primerpaar zur Bestimmung von PPAR γ ausgewählt. Die Sequenz dieses Primerpaares lautet 5'-GCT GGC CTC CTT GAT GAA TA-3' (PPARg-a1) und 5'-TTG GGC TCC ATA AAG TCA CC-3' (PPARg-s1). Das Amplifikationsprodukt dieser Primer hat eine Länge von 114 Basenpaaren. (Abb. 9)

```

PPAR $\gamma$ 
1081  tcctggttt gtaaatctg actgaacga ccaagtaact ctctcaaat atggagtc
1141  cgagatcatt tacacaat gc tggcctcct gatgaataaa gatggggttc tcatatccga
1201  gggccaaggc tcatgacaa gggagttct aaagagcctg cgaaagcctt tgggtgactt
1261  tatggagccc aagtttgagt ttgctgtgaa gttcaatgca ctggaattag atgacagcga
1321  ctggcaata ttattgctg tcattattct cagtggagac cgcccagggt tgctgaatgt

```

Abb. 9: Homo sapiens PPAR γ

Das nach der Publikation der Gensequenz (Genebank accession number D83233) durch Kato, S. [131] ausgewählte Primerpaar für die Bestimmung des PPAR γ 2 hat die Sequenz 5'-CCT CAC AGC TGT TTG CCA AG-3' (PPAR γ 2-a1) und 5'-TCC TTG TAG ATC TCC TGC AG-3' (PPAR γ 2-s1). Die Zielsequenz besitzt eine Länge von 142 Basenpaaren. (Abb. 10)

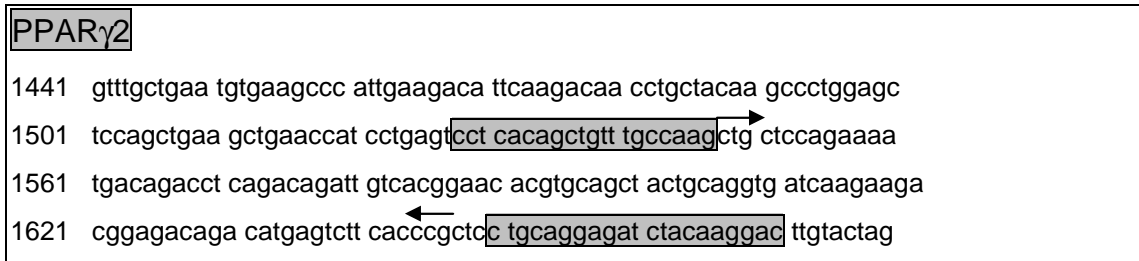


Abb. 10: Homo sapiens PPAR γ 2

Das Primerpaar für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) hat die Sequenz 5'-GGC CTC CAA GGA GTA AGA CC-3' (GAPDH human-a1) und 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3' (GAPDH human-s1). Es wurde nach der Publikation der Gensequenz (Genebank accession number BC023632) durch Strausberg et al. [137] ausgewählt. Sein Amplifikationsprodukt hat eine Länge von 107 Basenpaaren. (Abb. 11)



Abb. 11: Homo sapiens GAPDH

3.1.2 Normalisierung der Proben über GAPDH

Die Bestimmung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren mittels PCR erfolgte zuerst ohne Normalisierung der Proben über das „housekeeping gene“ GAPDH. Nach der Normalisierung wurde die Bestimmung wiederholt.

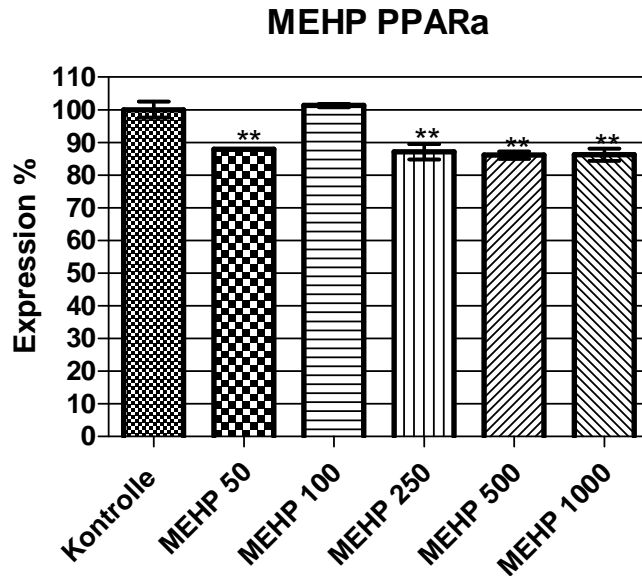
Der Hintergrund dieser Doppelbestimmung ist der, dass beide Methoden eine gewisse Unsicherheit in Bezug auf die Gleichheit der cDNA-Konzentrationen in den zu vergleichenden Proben besitzen. Wird keine Normalisierung über GAPDH vorgenommen, ist die photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung die einzige Kontrolle. Ungenauigkeiten bei dieser Bestimmung oder Unterschiede in der Effizienz der reversen Transkription können verschiedene cDNA-Konzentrationen in den zu untersuchenden Proben hervorrufen und so das Ergebnis der PCR verfälschen.

Durch die Bestimmung der GAPDH in den Proben werden eventuelle Konzentrationsunterschiede erkannt und durch entsprechende Verdünnung der Proben ausgeglichen. Problematisch ist diese Normalisierung deshalb, da keine absolute Sicherheit besteht, dass die Expression der GAPDH nicht durch die Stimulation beeinflusst wird.

In den Diagrammen 12 und 13 ist anhand eines Beispiels der Unterschied zwischen den beiden Auswertungsformen dargestellt.

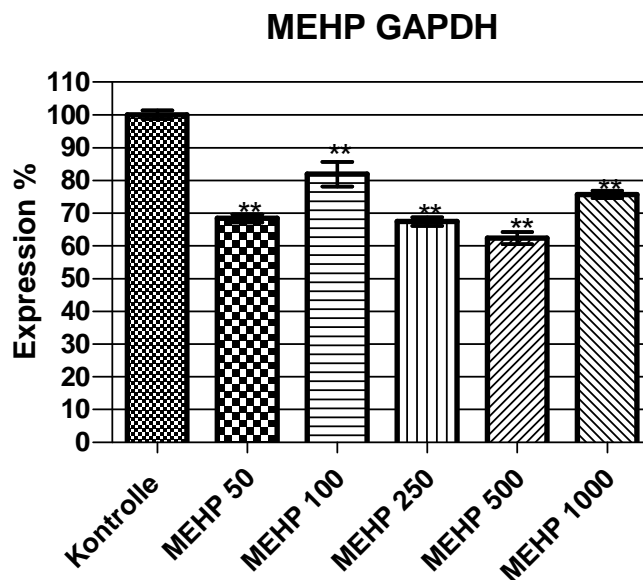
Ohne Normalisierung der Proben ergeben sich Konzentrationsunterschiede der GAPDH in den zu vergleichenden Proben von etwa 40 % (Abb. 12b). Bei der Bestimmung des PPAR α in diesen Proben ist keine deutliche Regulation der Expression erkennbar. Tendenziell kommt es jedoch zu einem Absinken des PPAR α (Abb. 12a).

Durch die Normalisierung der Proben wurden die GAPDH-Konzentrationen angeglichen. Bei der Bestimmung des PPAR α in diesen normalisierten Proben ist ein deutlicher Anstieg der Expression erkennbar (Abb. 13).



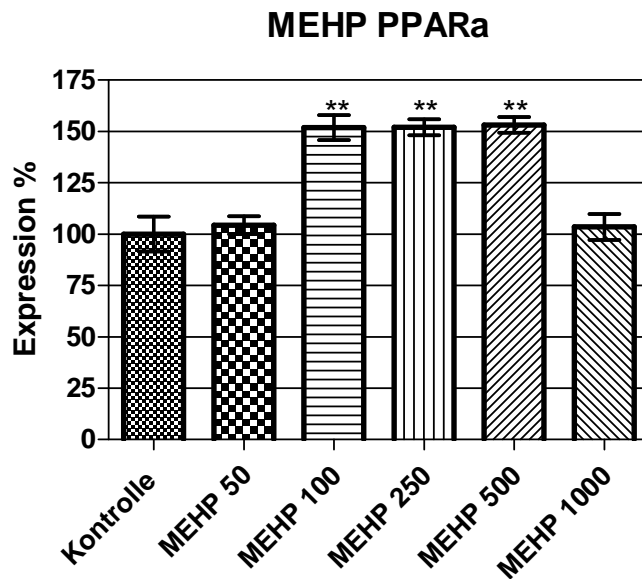
	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	87,9	101,2	87,1	86,1	86,2
SEM	2,455	0,1121	0,563	2,337	1,146	1,84
		P < 0.01	P > 0.05	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

Abb. 12a: Expression des PPARa in mit MEHP stimulierten Leberzellen im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen ohne Normalisierung der Proben über GAPDH (1 Ansatz, 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	68,4	81,9	67,4	62,4	75,7
SEM	1,317	1,231	3,786	1,326	1,856	1,183
		P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

Abb. 12b: GAPDH-Konzentrationen in den zu vergleichenden Proben ohne Normalisierung (1 Ansatz, 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	104,3	151,7	151,9	153,1	103,5
SEM	8,423	4,32	6,055	3,859	3,863	6,305
		P > 0.05	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P > 0.05

Abb. 13: Expression des PPARa in mit MEHP stimulierten Leberzellen im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen nach Normalisierung der Proben über GAPDH (1 Ansatz, 3 PCRs pro Konzentration)

Bei der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Proben fiel eine große Standardabweichung der dreimaligen Messung auf. Zur Optimierung des Verfahrens wurde die Dauer der photometrischen Messung von einer Sekunde auf 5 Sekunden erhöht. Hierdurch ergab sich, wie in Tabelle 3 ersichtlich, eine deutlich geringere Standardabweichung der gemessenen Konzentrationen. Die Standardabweichung der Messungen sank von 124,8 auf 16,9.

RNA-Konzentration	1 Sekunde [µg/ml]	5 Sekunden [µg/ml]
Mittelwert	722,5	649,5
Standardabweichung	124,8	16,9
Variationskoeffizient	17 %	3 %

Tab. 3: Wiederholte RNA-Konzentrationsbestimmung einer Probe mit unterschiedlicher Messdauer

Um sicher zu gehen, dass gleiche cDNA-Konzentrationen in den zu vergleichenden Proben vorliegen und die Ergebnisse der PCR nicht verfälscht werden, werden im Folgenden die Ergebnisse nach Normalisierung über das „housekeeping gene“ GAPDH dargestellt.

3.2 Ergebnisse der In-vitro-Zellversuche mit humanen Leberzellen

Die statistische Auswertung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationen und der Kontrolle erfolgte mittels ANOVA gefolgt von Dunnett's post-hoc test (Prism 4.01, GraphPad Software, Inc.). Signifikante Unterschiede (*) wurden bei $p \leq 0,05$ gekennzeichnet, hochsignifikante Unterschiede (**) bei $p \leq 0,01$.

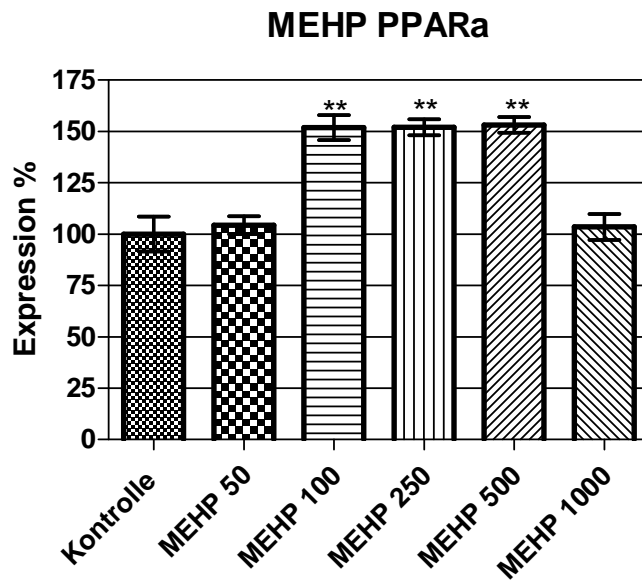
3.2.1 Einfluss von MEHP auf humane Leberzellen

3.2.1.1 Regulation des PPAR α durch MEHP in humanen Leberzellen

In den Leberzellen des Zellansatzes P1 zeigt sich ein Anstieg der PPAR α -Expression (Abb. 14a). Dieser Anstieg wird bei Zellen deutlich, die mit den MEHP Konzentrationen 100 $\mu\text{mol/l}$, 250 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ stimuliert wurden. Die PPAR α -Expression steigt in diesen Zellen um maximal 52 % gegenüber den mit DMSO behandelten Zellen.

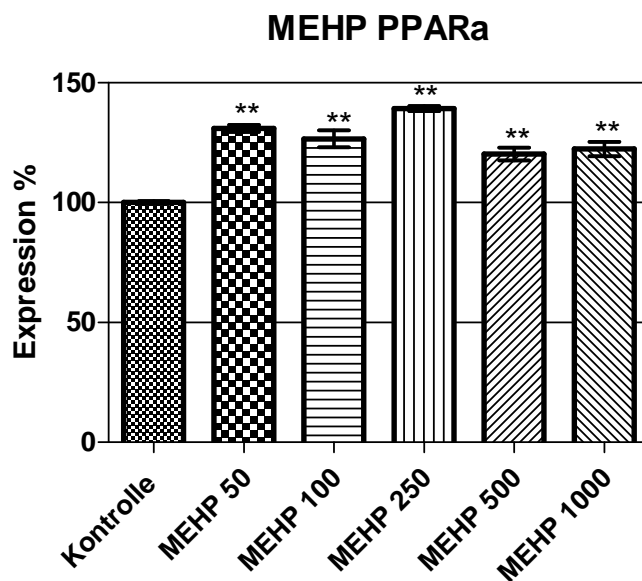
In dem Zellansatz P2 ist ebenfalls eine vermehrte Expression des PPAR α zu erkennen (Abb. 14b). Die Verstärkung der Expression liegt im Bereich zwischen 20 % und 39 %.

Durch die Bildung eines Mittelwertes der Ergebnisse beider Zellansätze zeigt sich bis zu der Stimulation mit einer MEHP-Konzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ ein konzentrationsabhängiger Anstieg der PPAR α -Expression, der durch die Behandlung der Zellen mit höheren Konzentrationen wieder abnimmt (Abb. 14c).



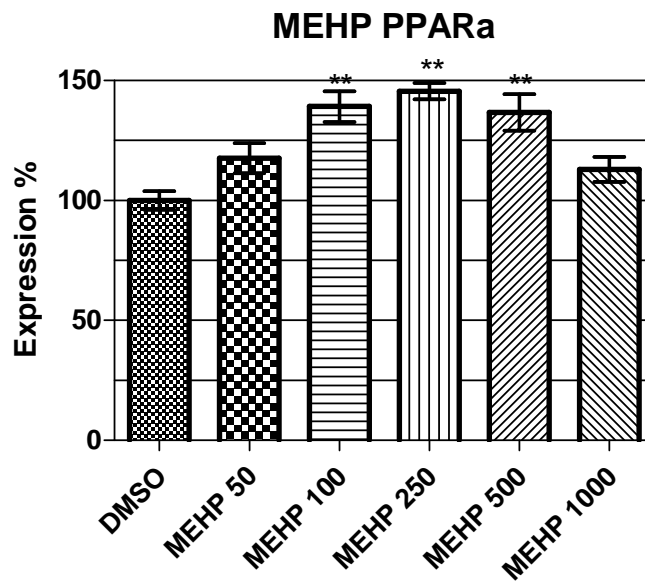
	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	104,3	151,7	151,9	153,1	103,5
SEM	8,423	4,32	6,055	3,859	3,863	6,305
		P > 0.05	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P > 0.05

Abb. 14a: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPARa in Leberzellen des Zellansatzes P1 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	130,9	126,6	139,2	120,2	122,3
SEM	0,5037	1,509	3,45	1,126	2,683	3,027
		P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

Abb. 14b: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPARa in Leberzellen des Zellansatzes P2 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



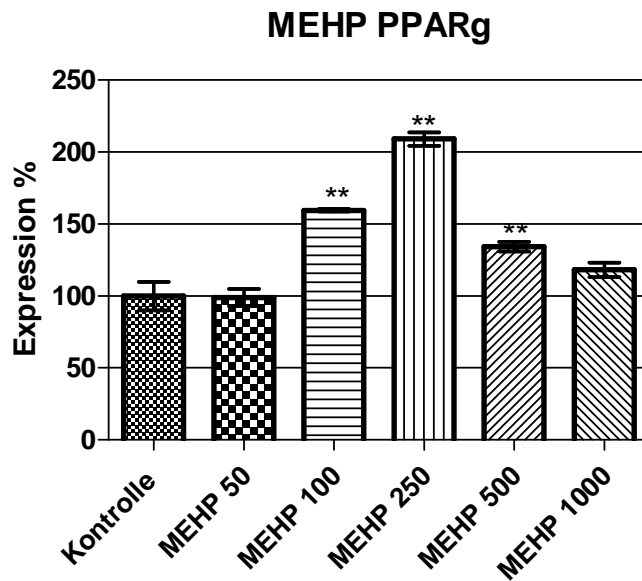
	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	117,6	139,2	145,6	136,7	112,9
SEM	4,873	8,88	9,105	4,752	10,831	7,407
		P > 0,05	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P > 0,05

Abb. 14c: Regulation des PPAR α durch MEHP nach Bildung eines Mittelwertes der aus den Zellansätzen P1 und P2 erhaltenen Ergebnissen (2 Ansätze, je 6 PCRs pro Konzentration)

3.2.1.2 Regulation des PPAR γ durch MEHP in humanen Leberzellen

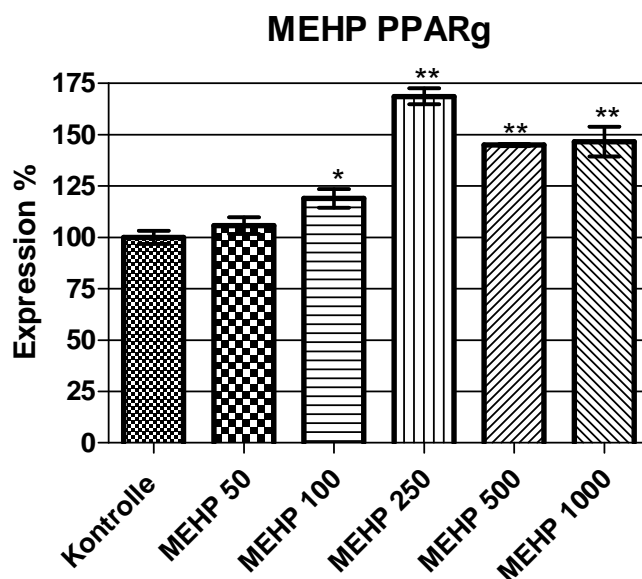
Durch die Stimulation mit MEHP steigt die Expression von PPAR γ in den Leberzellen bis zur Stimulation mit einer Konzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ konzentrationsabhängig an. Durch die Behandlung mit den beiden höheren Konzentrationen vermindert sich dieser Anstieg konzentrationsabhängig. (Abb. 15c)

Im Zellansatz P1 beträgt die maximale Expression von PPAR γ 209 % der Expression in den Kontrollzellen (Abb. 15a), im Zellansatz P2 steigt sich bis auf 169 % an (Abb. 15b).



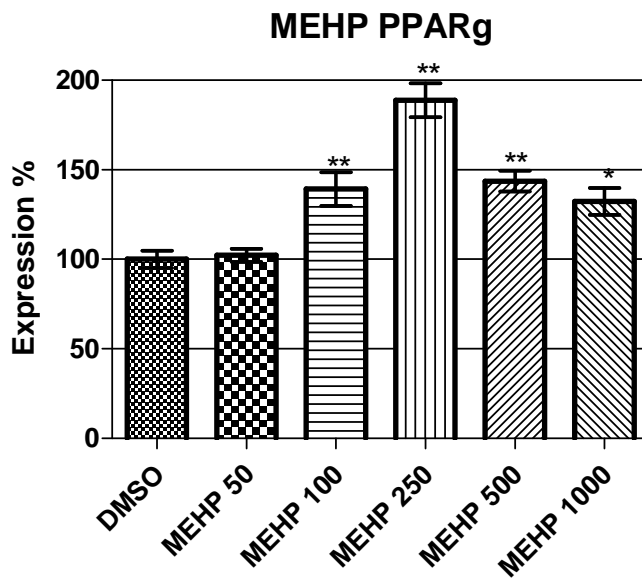
	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	98,85	159,6	209	134,3	118,1
SEM	9,976	6,063	1,007	4,701	3,241	5,154
		P > 0.05	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P > 0.05

Abb. 15a: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPAR γ in Leberzellen des Zellansatzes P1 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	105,7	118,9	168,5	144,9	146,5
SEM	3,187	4,061	4,507	3,835	0,565	7,191
		P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

Abb. 15b: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPAR γ in Leberzellen des Zellansatzes P2 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	102,3	139,2	188,8	143,7	132,3
SEM	6,623	5,093	13,179	13,36	8,122	10,582
		P > 0,05	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01	P > 0,05

Abb. 15c: Regulation des PPAR γ durch MEHP nach Bildung eines Mittelwertes der aus den Zellansätzen P1 und P2 erhaltenen Ergebnissen (2 Ansätze, je 6 PCRs pro Konzentration)

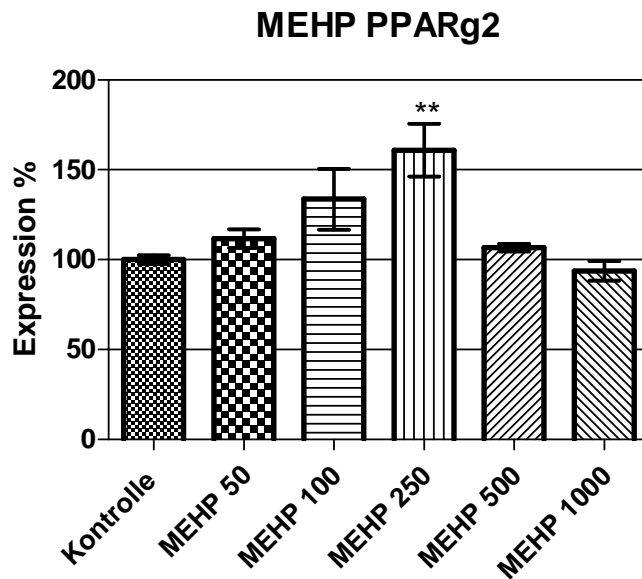
3.2.1.3 Regulation des PPAR γ 2 durch MEHP in humanen Leberzellen

Die Expression des PPAR γ 2 steigt durch die Stimulation mit MEHP in den Leberzellen an.

Im Zellansatz P1 zeigt sich bis zu der Stimulation mit einer Konzentration von 250 μ mol/l ein konzentrationsabhängiger Anstieg der PPAR γ 2-Expression um bis zu 61 % gegenüber den mit DMSO behandelten Zellen. Durch die Stimulation mit den beiden höchsten Konzentrationen ergibt sich keine signifikante Regulation. (Abb. 16a)

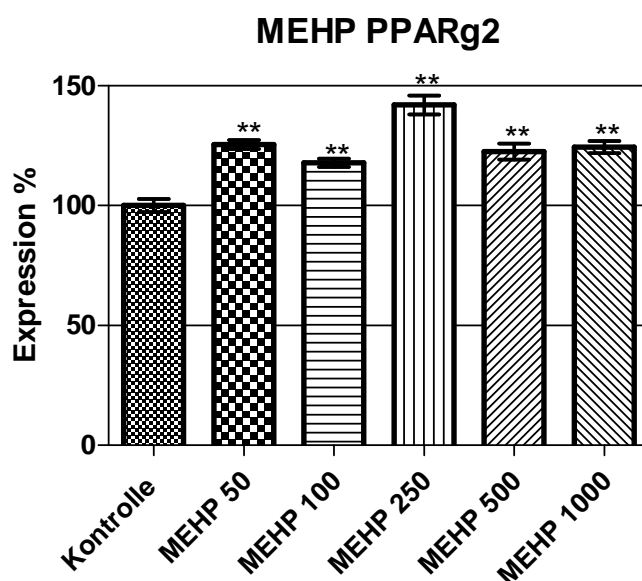
Im Zellansatz P2 kommt es ebenfalls zu einer verstärkten Expression des PPAR γ 2. Auch hier ist die Regulation durch die Stimulation mit einer Konzentration von 250 μ mol/l am ausgeprägtesten, wobei die Expression um 42 % ansteigt. (Abb. 16b)

Durch die Bildung eines Mittelwertes der Ergebnisse beider Zellansätze ergibt sich ein ähnliches Bild (Abb. 16c).



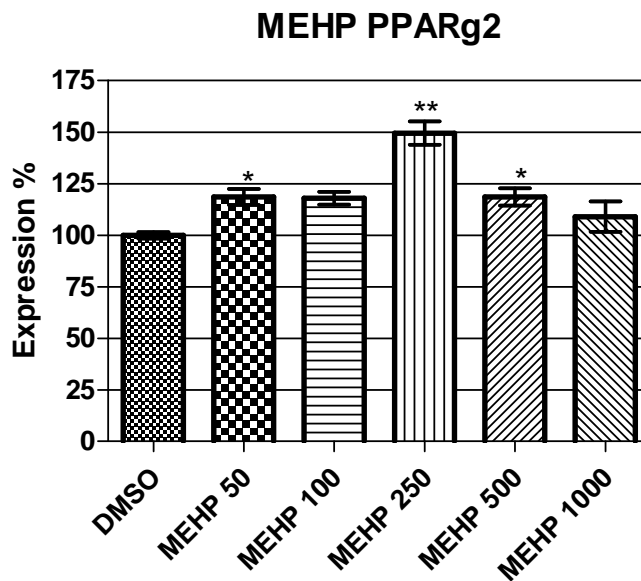
	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	111,8	133,7	161	106,8	93,8
SEM	2,428	5,166	16,9	14,67	2,203	5,401
		P > 0.05	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05

Abb. 16a: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPARg2 in Leberzellen des Zellansatzes P1 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	125,4	117,8	141,9	122,5	124,4
SEM	2,705	1,9	1,775	3,929	3,314	2,564
		P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

Abb. 16b: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPARg2 in Leberzellen des Zellansatzes P2 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500	MEHP 1000
Expression %	100	118,6	118	149,5	118,6	109,1
SEM	2,298	5,533	4,984	8,944	6,057	10,375
		P < 0,05	P > 0,05	P < 0,01	P < 0,05	P > 0,05

Abb. 16c: Regulation des PPARg2 durch MEHP nach Bildung eines Mittelwertes der aus den Zellansätzen P1 und P2 erhaltenen Ergebnissen (2 Ansätze, je 6 PCRs pro Konzentration)

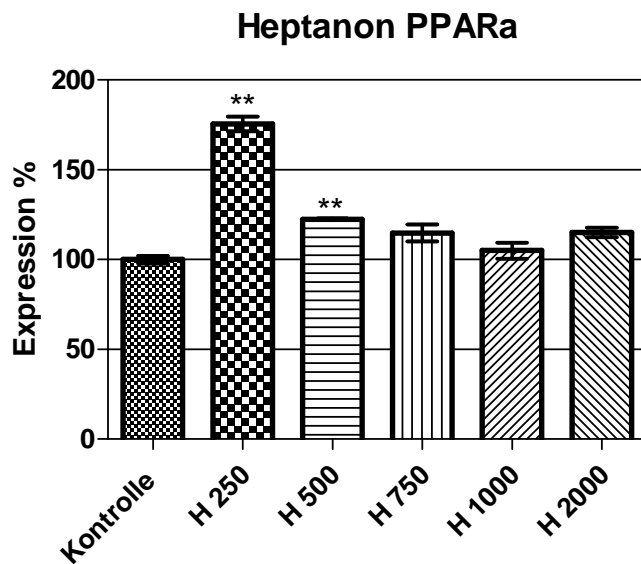
3.2.2 Einfluss von 4-Heptanon auf humane Leberzellen

3.2.2.1 Regulation des PPAR α durch 4-Heptanon in humanen Leberzellen

Bei den Zellen des Ansatzes P1 zeigt sich ein Anstieg des PPAR α , besonders durch die Stimulation mit der niedrigsten Konzentration (Abb. 17a).

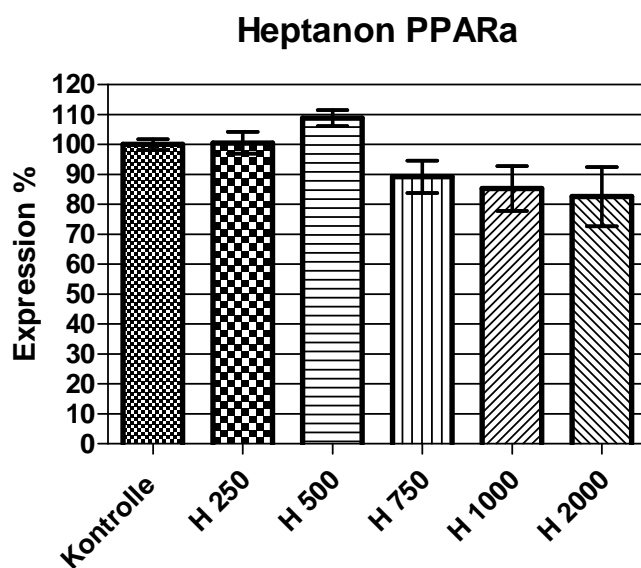
Die Expression des PPAR α im Zellansatz P2 wird nicht signifikant durch 4-Heptanon beeinflusst. Es besteht allerdings die Tendenz eines Abfalls der Expression durch die Stimulation mit den höheren Konzentrationen 4-Heptanon. (Abb. 17b)

Durch die Bildung eines Mittelwertes der Ergebnisse beider Zellansätze ergibt sich nur durch die Stimulation mit der Konzentration 250 $\mu\text{g/l}$ ein signifikanter Expressionsanstieg (Abb. 17c).



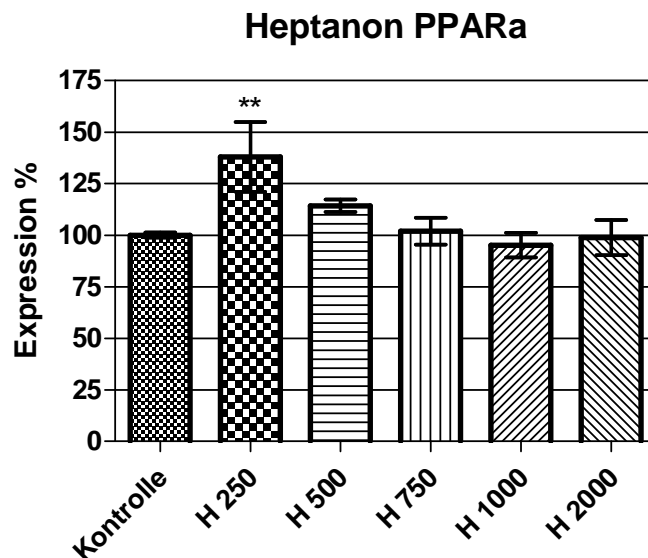
	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	175,5	122,5	114,8	105,1	115
SEM	2,097	4,15	0,614	4,741	4,402	2,657
		P < 0.01	P < 0.01	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05

Abb. 17a: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPARa in Leberzellen des Zellansatzes P1 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	100,6	108,8	89,3	85,4	82,7
SEM	1,859	3,649	2,704	5,424	7,483	9,9
		P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05

Abb. 17b: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPARa in Leberzellen des Zellansatzes P2 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



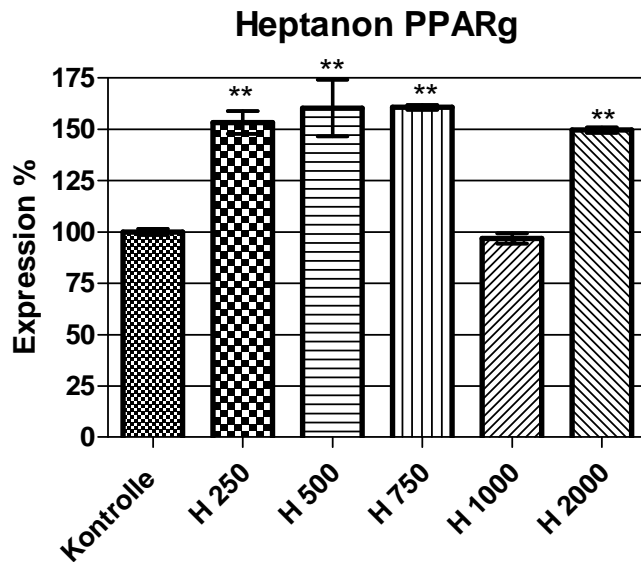
	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	138	114,3	102	95,2	98,8
SEM	1,772	23,953	4,733	9,264	8,3	12,113
		P < 0,01	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05

Abb. 17c: Regulation des PPARa durch 4-Heptanon nach Bildung eines Mittelwertes der aus den Zellansätzen P1 und P2 erhaltenen Ergebnissen (2 Ansätze, je 6 PCRs pro Konzentration)

3.2.2.2 Regulation des PPAR γ durch 4-Heptanon in humanen Leberzellen

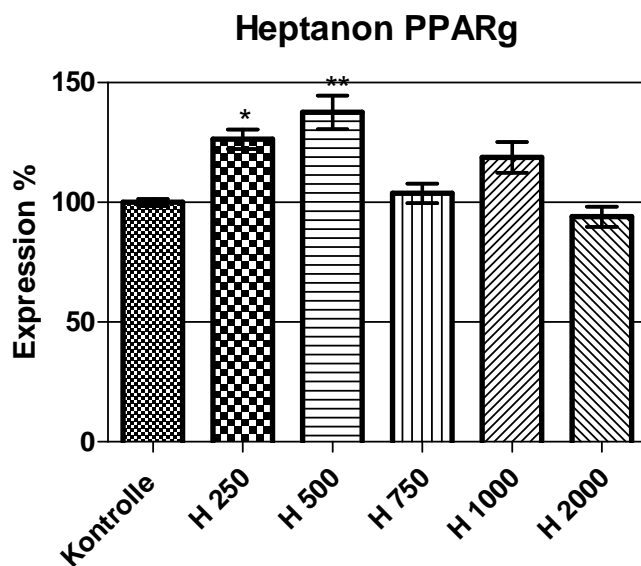
In beiden Zellansätzen P1 und P2 ist ein Anstieg des PPAR γ durch den Einfluss von 4-Heptanon erkennbar. Der Anstieg ist in beiden Fällen durch die Stimulation mit einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/l}$ am deutlichsten. Eine Konzentrationsabhängigkeit besteht nicht. (Abb. 18a und b)

Nach Bildung eines Mittelwertes der Ergebnisse beider Zellansätze ergibt sich ebenfalls ein deutlicher Expressionsanstieg durch die Stimulation mit den beiden geringsten 4-Heptanon-Konzentrationen. Die übrigen Konzentrationen bewirken keine signifikante Regulation. (Abb. 18c)



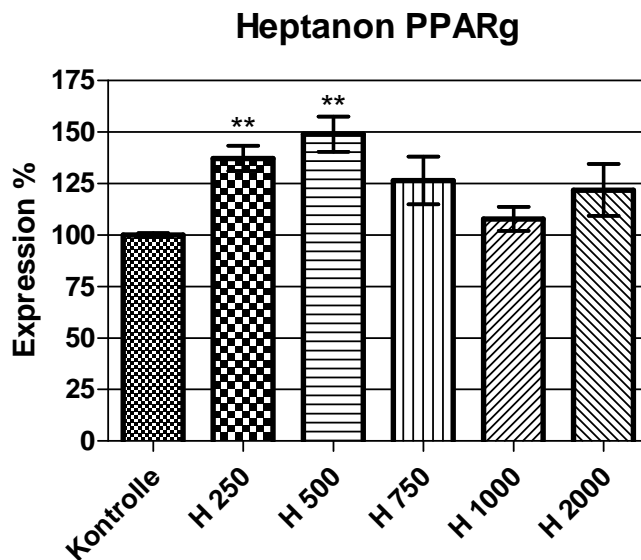
	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	153,3	160,4	160,7	96,9	149,7
SEM	1,559	9,615	13,83	2,242	2,576	1,302
		P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P > 0.05	P < 0.01

Abb. 18a: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPARg in Leberzellen des Zellansatzes P1 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	126,4	137,6	103,8	118,8	94,03
SEM	1,421	4,045	7,018	4,11	6,466	4,214
		P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05

Abb. 18b: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPARg in Leberzellen des Zellansatzes P2 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



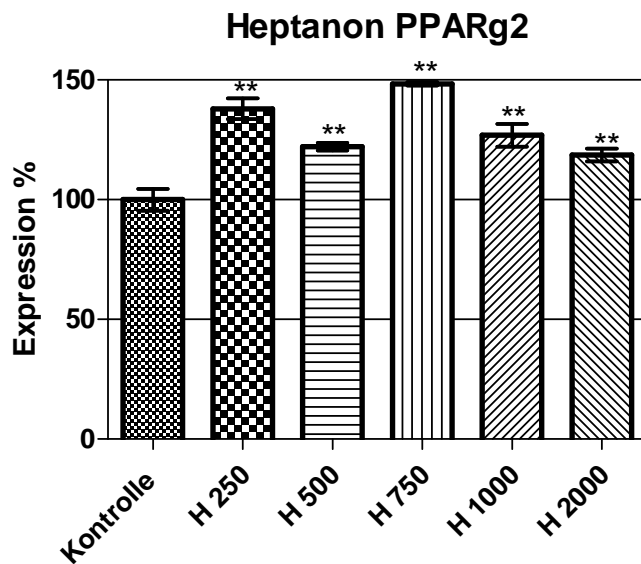
	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	137,2	149	126,5	107,9	121,9
SEM	1,334	9,811	12,168	18,269	8,227	17,825
		P < 0,01	P < 0,01	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05

Abb. 18c: Regulation des PPAR γ durch 4-Heptanon nach Bildung eines Mittelwertes der aus den Zellansätzen P1 und P2 erhaltenen Ergebnissen (2 Ansätze, je 6 PCRs pro Konzentration)

3.2.2.3 Regulation des PPAR γ 2 durch 4-Heptanon in humanen Leberzellen

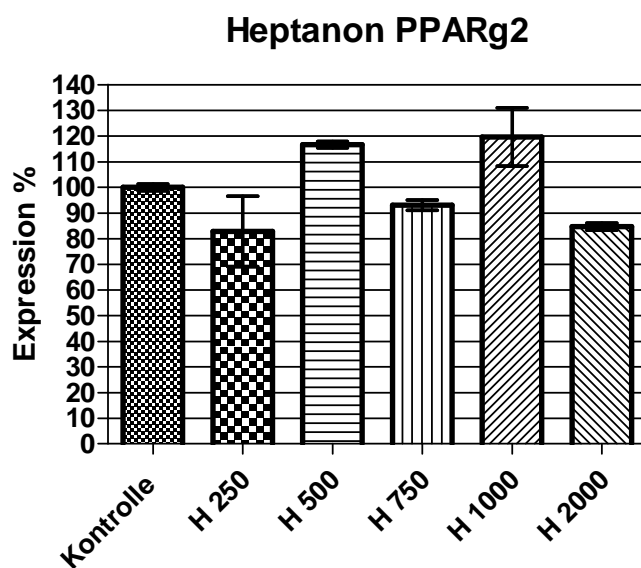
Bei den Zellen des Ansatzes P1 ist ein konzentrationsunabhängiger Anstieg der PPAR γ 2-Expression um maximal 48 % durch den Einfluss von 4-Heptanon erkennbar. (Abb. 19a)

Im Zellansatz P2 ergibt sich, wie auch nach Bildung eines Mittelwertes der Ergebnisse beider Zellansätze, keine signifikante Regulation durch 4-Heptanon. (Abb. 19b und c)



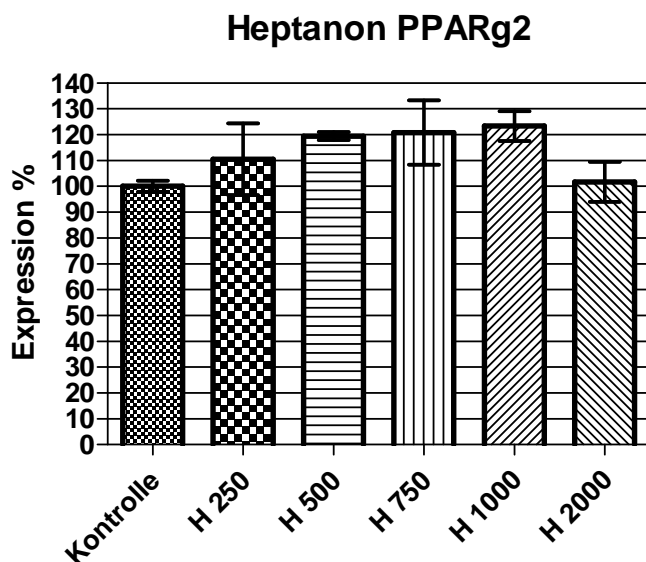
	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	138	122,2	148,4	127	118,7
SEM	4,602	4,276	1,648	0,7655	4,759	2,613
		P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

Abb. 19a: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPARg2 in Leberzellen des Zellansatzes P1 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	82,82	116,7	93,05	119,6	84,74
SEM	1,328	13,7	1,27	1,989	11,32	2,343
		P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05

Abb. 19b: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPARg2 in Leberzellen des Zellansatzes P2 (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



	Kontrolle	Heptanon 250	Heptanon 500	Heptanon 750	Heptanon 1000	Heptanon 2000
Expression %	100	110,4	119,4	120,7	123,3	101,7
SEM	3,029	19,662	2,19	17,564	8,109	10,904
		P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05

Abb. 19c: Regulation des PPARg2 durch 4-Heptanon nach Bildung eines Mittelwertes der aus den Zellansätzen P1 und P2 erhaltenen Ergebnissen (2 Ansätze, je 6 PCRs pro Konzentration)

3.3 Einfluss von DMSO auf humane Leberzellen.

Wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit wurde MEHP für die Stimulation bei den In-vitro-Zellversuchen mit humanen Leberzellen in DMSO gelöst. Um den Einfluss von DMSO auf die Expression der verschiedenen Faktoren zu ermitteln, wurde sie mit derjenigen in unbehandelten Zellen verglichen.

Wie in Abbildung 20 erkennbar, bewirkt DMSO einen deutlichen Abfall aller untersuchten Zielsequenzen.

Aus diesem Grund wurden für die Leberzellversuche mit MEHP DMSO behandelte Zellen als Kontrolle eingesetzt. Außerdem wurde bei den Endothelzellversuchen auf den Einsatz von DMSO verzichtet. Zu dieser Stimulation wurde MEHP in mit FCS versetztem Medium gelöst.

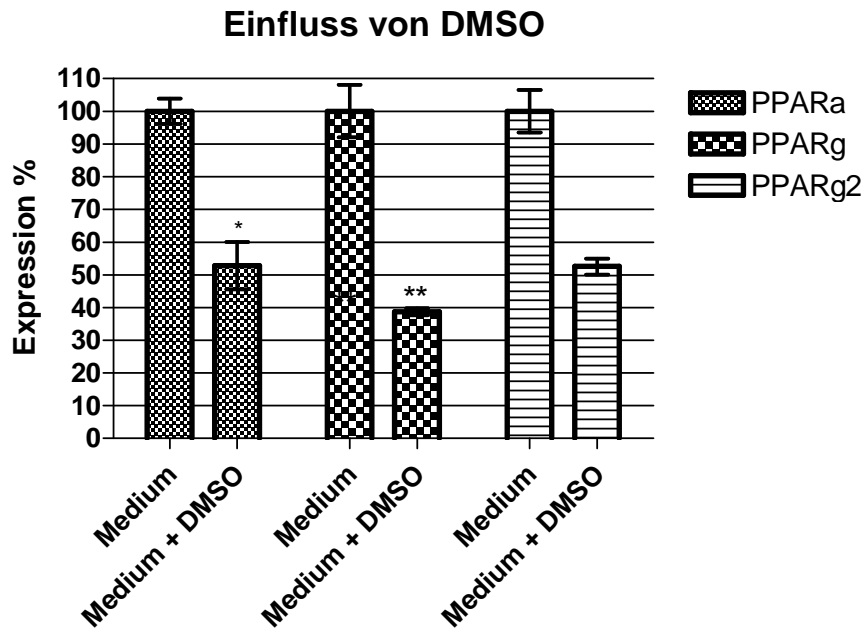


Abb. 20: Einfluss von DMSO auf PPARα, PPARγ und PPARγ2 humanen Leberzellen (Statistische Auswertung mittels t-Test, Prism 4.01, GraphPad Software, Inc.: signifikante Unterschiede * $p \leq 0,05$, hochsignifikante Unterschiede ** $p \leq 0,01$)

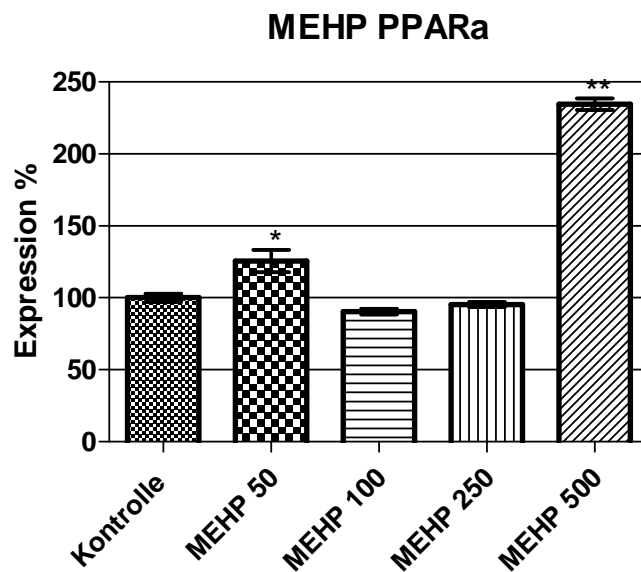
3.4 Ergebnisse der In-vitro-Zellversuch mit humanen Endothelzellen

3.4.1 Einfluss von MEHP auf humane Endothelzellen

Für die Versuche mit Endothelzellen wurden wie schon für die Versuche mit Leberzellen MEHP-Konzentrationen von 50 $\mu\text{mol/l}$ bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Bei den Endothelzellen bewirkte die Stimulation mit der höchsten Konzentration allerdings ein Absterben der Zellen, sodass keine Ergebnisse zu dieser Stimulation vorliegen.

3.4.1.1 Regulation des PPAR α durch MEHP in Endothelzellen

In humanen mikrovaskulären Endothelzellen kommt es durch den Einfluss von MEHP zu einem Anstieg der PPAR α -Expression. Am deutlichsten ist diese Regulation durch die Stimulation mit einer MEHP-Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$, wodurch die Expression um 134 % ansteigt. Durch die Behandlung der Zellen mit den übrigen Konzentrationen wird keine oder nur eine geringe Regulation bewirkt. (Abb. 21)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500
Expression %	100	125,6	90,43	95,31	234,4
SEM	2,891	7,881	2,036	1,859	3,92
		P < 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,01

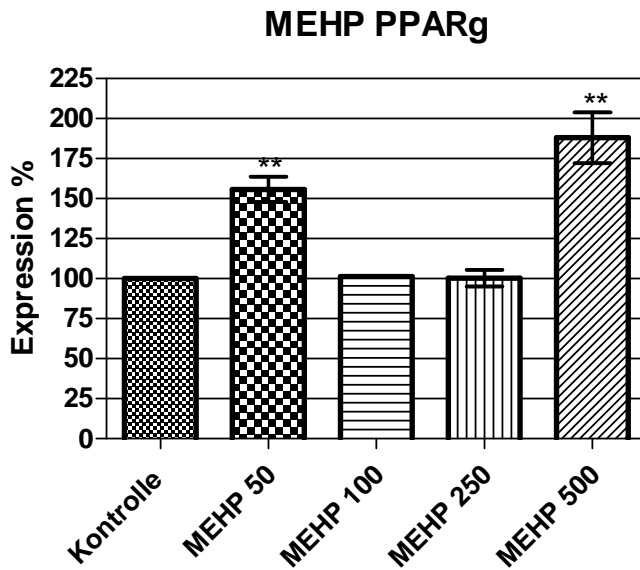
Abb. 21: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPAR α in Endothelzellen (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)

3.4.1.2 Regulation des PPAR γ durch MEHP in Endothelzellen

Die Regulation des PPAR γ durch MEHP ähnelt der des PPAR α . Auch hier zeigt sich eine verstärkte Expression, was durch die Stimulation mit einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ am deutlichsten wird. (Abb. 22)

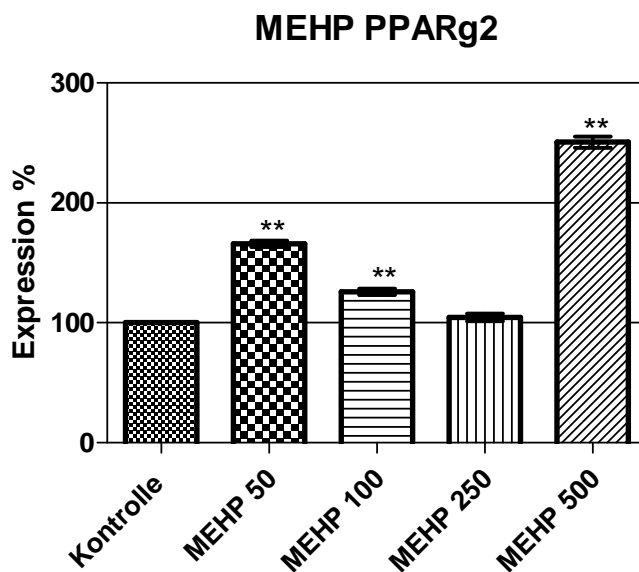
3.4.1.3 Regulation des PPAR γ 2 durch MEHP in Endothelzellen

Der schon bei den Transkriptionsfaktoren PPAR α und PPAR γ beobachtete Anstieg der Expression durch den Einfluss von MEHP wird auch bei PPAR γ 2 beobachtet, wobei auch hier die Regulation durch die Stimulation mit einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ am ausgeprägtesten ist. (Abb. 23)



	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500
Expression %	100	155,7	101,2	100,3	187,9
SEM	0,3342	7,859	0,2923	5,213	15,95
		P < 0,01	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,01

Abb. 22: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPARg in Endothelzellen (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)



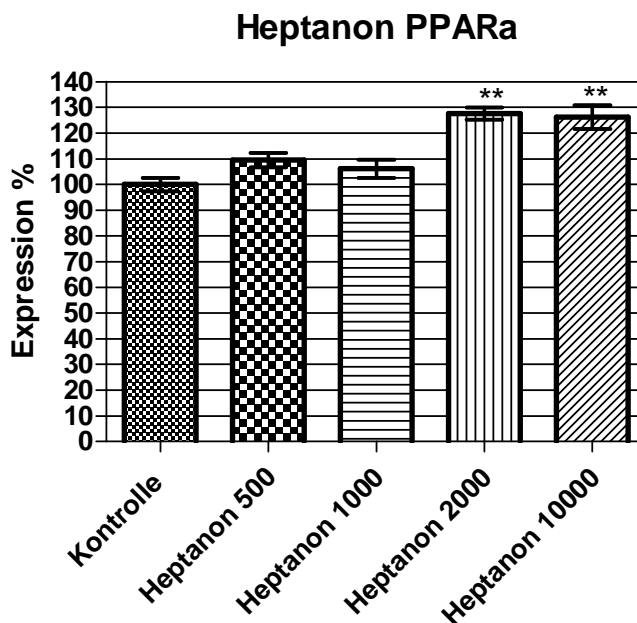
	Kontrolle	MEHP 50	MEHP 100	MEHP 250	MEHP 500
Expression %	100	166	125,9	104,6	250,7
SEM	0,4688	2,754	2,688	3,144	4,701
		P < 0,01	P < 0,01	P > 0,05	P < 0,01

Abb. 23: Einfluss von MEHP auf die Expression des PPARg2 in Endothelzellen (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)

3.4.2 Einfluss von 4-Heptanon auf humane Endothelzellen

3.4.2.1 Regulation des PPAR α durch 4-Heptanon in Endothelzellen

Durch den Einfluss von 4-Heptanon in den Konzentrationen 2000 $\mu\text{g/l}$ und 10000 $\mu\text{g/l}$ kommt es in Endothelzellen zu einem Anstieg der PPAR α -Expression um bis zu 27 %. 4-Heptanon hat in den geringeren Konzentrationen keinen Einfluss auf die Expression. (Abb. 24)

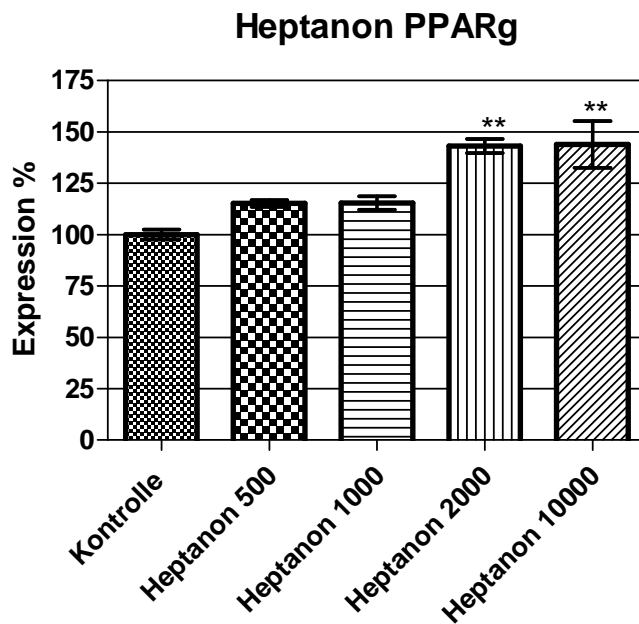


	Kontrolle	Heptanon 500	Heptanon 1000	Heptanon 2000	Heptanon 10000
Expression %	100	109,5	106,1	127,6	126,2
SEM	2,587	2,848	3,53	2,295	4,621
		P > 0,05	P > 0,05	P < 0,01	P < 0,01

Abb. 24: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPAR α in Endothelzellen (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)

3.4.2.2 Regulation des PPAR γ durch 4-Heptanon in Endothelzellen

Die Expression von PPAR γ in Endothelzellen zeigt ein ähnliches Verhalten durch den Einfluss von 4-Heptanon wie die von PPAR α . Während sich auch hier keine Regulation durch die Behandlung mit den beiden niedrigsten Konzentrationen von 4-Heptanon zeigt, steigt die Expression durch die höheren Konzentrationen um 43 % an. (Abb. 25)

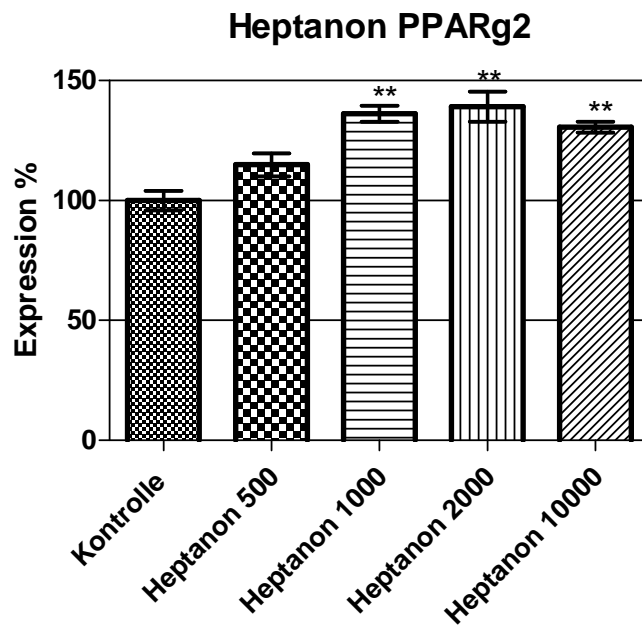


	Kontrolle	Heptanon 500	Heptanon 1000	Heptanon 2000	Heptanon 10000
Expression %	100	115,1	115,3	143	143,8
SEM	2,494	1,609	3,337	3,398	11,37
		P > 0,05	P > 0,05	P < 0,01	P < 0,01

Abb. 25: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPAR γ in Endothelzellen (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)

3.4.2.3 Regulation des PPAR γ 2 durch 4-Heptanon in Endothelzellen

Außer durch die Stimulation mit der niedrigsten Konzentration bewirkt 4-Heptanon eine verstärkte Expression des PPAR γ 2. Der Anstieg der Expression liegt zwischen 30 % und 40 %. Eine Konzentrationsabhängigkeit besteht nicht. Durch die geringste Konzentration wird keine signifikante Regulation erzielt, jedoch ist auch hier die Tendenz eines Anstiegs der Expression erkennbar. (Abb. 26)



	Kontrolle	Heptanon 500	Heptanon 1000	Heptanon 2000	Heptanon 10000
Expression %	100	114,9	136,2	139	130,6
SEM	4,048	4,808	3,403	6,246	2,235
		$P > 0,05$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$

Abb. 26: Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression des PPARg2 in Endothelzellen (1 Ansatz, je 3 PCRs pro Konzentration)

4. Diskussion

4.1 Methodenentwicklung

4.1.1 Normalisierung der Proben

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine ausgesprochen sensitive und schnelle Methode, cDNA-Konzentrationen in Zellen und Geweben zu messen [108]. Für eine korrekte Bestimmung muss allerdings sichergestellt sein, dass in den zu vergleichenden Proben möglichst gleiche Mengen an cDNA enthalten sind.

Eine Möglichkeit zum Erreichen dieser Gleichheit besteht darin, vor der reversen Transkription die RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Proben photometrisch zu bestimmen. Eventuelle Differenzen können dann durch entsprechende Verdünnung ausgeglichen werden.

Bei den photometrischen Messungen in der vorliegenden Arbeit fiel eine deutliche Standardabweichung nach mehrfach wiederholten Messungen auf (Mittelwert: 722,5 µg/ml, Standardabweichung 124,8, Variationskoeffizient 17 %). Diese Unpräzision konnte durch eine Verlängerung der Messdauer deutlich verringert werden (Variationskoeffizient 3 %). Ein weiteres Problem bei der Angleichung der Proben durch photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung ist, dass bei der reversen Transkription auftretende Fehler nicht mehr ausgeglichen werden können. Unterschiede in der Effizienz der reversen Transkription führen so zu unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen in den zu vergleichenden Proben und das Ergebnis der PCR wird verfälscht.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung gleicher cDNA-Konzentrationen in den Proben ist die Normalisierung über Housekeeping-Gene. Als Housekeeping-Gene werden Referenzgene bezeichnet, deren Expression unter allen experimentellen Bedingungen gleich bleibt. Nach der Bestimmung der cDNA-Konzentrationen dieses Housekeeping-Gens in den zu vergleichenden Proben mittels PCR können eventuelle Unterschiede quantifiziert und ebenfalls durch entsprechende Verdünnung ausgeglichen werden. Die Effizienz der reversen

Transkription spielt bei der Normalisierung der Proben über Housekeeping-Gene keine Rolle.

Aufgrund der Unsicherheit in Bezug auf die photometrische Messung der RNA-Konzentration und die Konstanz der Effizienz der reversen Transkription wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die Normalisierung über Housekeeping-Gene eingesetzt.

Als Housekeeping-Gen wurde die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. GAPDH ist ein oft eingesetztes Housekeeping-Gen, dessen Konstanz unter verschiedensten Versuchsbedingungen mehrfach bestätigt wurde [4, 39, 58, 108, 147, 154].

4.1.2 Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel

Bei den In-Vitro-Zellversuchen wurde zur Stimulation der Leberzellen MEHP als schlecht wasserlösliche Substanz in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Idealerweise sollte das Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren haben, da sich sonst beobachtete Effekte nicht eindeutig auf den Einfluss von MEHP zurückführen lassen.

Bereits in einer früheren Studie wurde der Einfluss von DMSO auf den Transkriptionsfaktor PPAR α in Hepatozyten von Ratten untersucht [139]. Hier kam es nach mehrtägiger Kultivierung der Zellen in 2 % DMSO zu einem zwei- bis fünffachen Expressionsanstieg des PPAR α . In der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin der Einfluss von DMSO auf PPAR α , PPAR γ und PPAR γ 2 untersucht. DMSO wurde mit einer Konzentration von 0,05 % im Kulturmedium eingesetzt. Nach einer Kultivierung der Zellen über 24 Stunden war bei allen untersuchten Genen ein deutlicher Abfall der Expression um bis zu 60 % zu beobachten.

Die unterschiedlichen Ergebnisse sind eventuell darauf zurückzuführen, dass humane Zellen im Vergleich zu tierischen Zellen eingesetzt wurden. Außerdem sind die experimentellen Bedingungen unterschiedlich. DMSO wurde in der erwähnten Studie in einer höheren Konzentration eingesetzt und die Zellen wurden über einen längeren Zeitraum stimuliert.

Unabhängig von dem gegensätzlichen Effekt zeigen die Beobachtungen, dass der Einfluss von DMSO auf die untersuchten Gene nicht unbeachtet bleiben

darf. Um beobachtete Effekte in den Leberzellen trotzdem auf MEHP zurückführen zu können, wurden Zellen, die in 0,05 % DMSO kultiviert wurden, als Kontrollgruppe eingesetzt. In vergleichbaren Studien wurde MEHP ebenfalls in DMSO gelöst, wobei auch hier mit DMSO behandelte Zellen als Kontrollgruppe eingesetzt wurden [9, 48, 78].

Bei den nachfolgenden Versuchen mit den Endothelzellen wurde auf den Einsatz von DMSO als Lösungsmittel verzichtet. MEHP wurde allein in mit FCS versetztem Kulturmedium unter längerem Schütteln gelöst. Im Vergleich zu DMSO wurde ein größeres Volumen Kulturmedium benötigt, um MEHP in Lösung zu bringen.

4.2 MEHP als PPAR-Ligand in humanen Leber- und Endothelzellkulturen

Die Leber ist ein Zielorgan, in dem DEHP und seine Metaboliten ihre Wirkung erzielen. Insbesondere bei Nagetieren induzieren sie als Peroxisomenproliferatoren eine Hypertrophie und Hyperplasie der Hepatozyten [28] und über eine vermehrte Aktivität peroxisomaler Enzyme oxidativen Stress [21, 114, 116, 119]. Oxidativer Stress kann zu einem Ungleichgewicht zwischen Wachstum und Apoptose führen und eventuell die Entstehung eines Leberzellkarzinoms bewirken [44, 119, 120]. Die Wirkung der Peroxisomenproliferatoren in der Leber wird hauptsächlich über PPAR α vermittelt [52]. Humane Leberzellen reagieren im Vergleich zu murinen Leberzellen schwächer auf Peroxisomenproliferatoren [45]. Der Grund könnte darin liegen, dass PPAR α in deutlich geringerem Maße in humanen Leberzellen zu finden ist [103, 104, 145]. Ein weiterer Grund könnte sein, dass artenabhängig eine unterschiedliche Sensitivität für Peroxisomenproliferatoren besteht [102]. Der genaue Mechanismus der unterschiedlichen Antwort verschiedener Spezies auf Peroxisomenproliferatoren ist letztlich nicht geklärt [92]. Jedoch konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass trotz jahrelanger Einnahme von hypolipidämischen Medikamenten wie Fibraten beim Menschen keine gesteigerte Peroxisomenproliferation und kein vermehrtes Auftreten von Leberzellkarzinomen induziert wird [3, 26, 43, 51].

MEHP als Metabolit des DEHP ist auch als Ligand des PPAR γ bekannt [9, 48, 78]. Als Ausdruck dessen konnte gezeigt werden, dass DEHP bei PPAR α -

knock-out-Mäusen zwar keine Lebertumoren induziert, jedoch seine Wirkung auf Niere und Hoden nicht verliert [152].

Auch in Zellen der Gefäßwand sind PPAR α und PPAR γ vertreten. Sie befinden sich sowohl in Endothelzellen [50, 84, 85] als auch in glatten Muskelzellen [85, 134], Makrophagen [61, 82-84, 98, 117] und T-Lymphozyten [158]. Sie üben damit eine wichtige Funktion in Bezug auf die Eigenschaften des Gefäßes aus. Es wird vermutet, dass sie antiinflammatorische und antiatherosklerotische Effekte vermitteln [81]. Dies geschieht unter anderem dadurch, dass PPAR α und PPAR γ den Prozess der Leukozyten-Migration und Zelladhäsion an humanen Endothelzellen beeinflussen [53, 81, 105]. Synthetische PPAR α -Liganden wie Fibrate bewirken eine verminderte Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 und damit eine verminderte Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand [84]. Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren, spielen durch ihre Eigenschaft als Schaumzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose.

Eine weitere Funktion der beiden PPAR-Isoformen ist die Regulation des Gefäßtonus. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein potenter Vasodilatator und wird aus dem Gefäßendothel freigesetzt. Es wurde gezeigt, dass PPAR α - und PPAR γ -Agonisten die Expression der endothelialen NO-Synthetase und die NO-Freisetzung aus dem Endothel erhöhen [14, 41, 101]. Diese Beobachtung lässt einen vasoprotektiven Effekt der Peroxisomenproliferatoren vermuten. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Peroxisomenproliferatoren koronare Atherosklerose vermindern und die Inzidenz von Herzinfarkten verringern [31, 33, 36, 37, 126].

In der vorliegenden Studie wurden zur Beurteilung der Expressionsmuster von PPAR α , PPAR γ und PPAR γ 2 humane Leberzellen sowie humane Endothelzellen mit MEHP-Konzentrationen von 50 μ mol/l bis 1000 μ mol/l stimuliert.

Zur Beurteilung des Expressionsmusters der PPAR-Isoformen wurde die relative Konzentration deren cDNA bestimmt. Auf den Proteinnachweis wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da bereits nachgewiesen wurde, dass bei Vorkommen der mRNA auch das Protein in der Zellkultur zu finden ist [16, 138].

Die erste Beobachtung zeigte, dass die Leberzellen die höchste Konzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ tolerierten, bei Endothelzellen durch eine Stimulation mit dieser Konzentration jedoch eine toxische Wirkung erzielt wurde, sodass eine Auswertung der Expression nicht durchgeführt werden konnte.

Die früheren Untersuchungen zu diesem Thema [9, 48, 78] wurden im Rahmen von Transfektionsstudien mit geringeren MEHP-Konzentrationen durchgeführt. Bility et al. transfizierten in einer Studie murine Fibroblasen mit Plasmiden, die sowohl die Liganden bindende Domäne der PPARs enthielten als auch eine Luziferase kodierten. Es wurden humane und murine PPARs verwendet. Die Zellen wurden mit in DMSO gelöstem MEHP stimuliert. Anhand der Luziferaseaktivität wurde die Expression der PPARs bestimmt. Als Kontrollgruppe wurden mit DMSO behandelte Zellen benutzt. Es zeigte sich, dass MEHP humanen PPAR α durch Konzentrationen zwischen 30 und 200 $\mu\text{mol/l}$ dosisabhängig aktiviert.

Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich in einer von Hurst und Waxman [48] durchgeführten, ähnlich aufgebauten Transfektionsstudie, in der Zellen mit Konzentrationen zwischen 0,3 und 50 $\mu\text{mol/l}$ MEHP stimuliert wurden. Ein signifikanter Anstieg der PPAR α -Aktivität wurde ab einer MEHP-Konzentration von 4 $\mu\text{mol/l}$ erzielt, wobei keine Dosisabhängigkeit deutlich wurde.

Ebenfalls in einer ähnlichen Transfektionsstudie zeigten Maloney und Waxman [78] eine signifikante Aktivierung des PPAR α durch MEHP in Konzentrationen zwischen 5 und 20 $\mu\text{mol/l}$. In allen genannten Studien betrug die Stimulationsdauer wie in der vorliegenden Arbeit 24 Stunden.

In der vorliegenden Studie zeigte sich in humanen Leberzellen durch die Stimulation mit MEHP in Konzentrationen zwischen 100 und 500 $\mu\text{mol/l}$ ein signifikanter Anstieg der PPAR α -Expression um bis zu 53 %. Eine Konzentrationsabhängigkeit wurde nicht beobachtet. Nach Stimulation der Leberzellen mit einer MEHP-Konzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ zeigte sich kein signifikanter Expressionsanstieg des PPAR α . Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass diese Konzentration bei Endothelzellen bereits zum Zelltod führte, liegt die Vermutung nahe, dass es auch bei den Leberzell-Versuchen durch eine solch hohe MEHP-Konzentration zu einer Zellschädigung kam, die

zu einem gestörten Expressionsmuster führte. Während in den oben genannten Studien ein Aktivitätsanstieg des PPAR α durch die Stimulation mit einer MEHP-Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ gezeigt wurde, wurde dies in der vorliegenden Studie nicht beobachtet.

In humanen Endothelzellen wurde ein deutlich signifikanter Expressionsanstieg des PPAR α sogar erst durch eine MEHP-Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ erzielt, wobei bereits durch eine Konzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ ein toxischer Effekt auf die Zellen entstand. Die Expression des PPAR α wurde nach der Stimulation mit 500 $\mu\text{mol/l}$ MEHP um 134 % gesteigert.

In den oben beschriebenen Transfektionsstudien zeigten Bility et al. [9] eine dosisabhängige Aktivierung des PPAR γ durch MEHP-Konzentrationen zwischen 10 und 200 $\mu\text{mol/l}$. Hurst und Waxman [48] beschrieben diesen Anstieg durch Konzentrationen zwischen 5 und 60 $\mu\text{mol/l}$, Maloney und Waxman [78] durch Konzentrationen zwischen 1 und 100 $\mu\text{mol/l}$.

In der vorliegenden Studie wurden signifikante Expressionsanstiege des PPAR γ in Leberzellen durch die Stimulation ab einer MEHP-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ beobachtet. Der deutlichste Expressionsanstieg zeigte sich durch eine Stimulation mit 250 $\mu\text{mol/l}$ MEHP. Er betrug maximal 109 %. Auch bei der Expression von PPAR γ war ein Rückgang des Expressionsanstiegs durch die Stimulation mit einer MEHP-Konzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ zu beobachten. Der Grund könnte hier ebenfalls darin bestehen, dass bereits eine Zellschädigung vorlag.

In Endothelzellen kam es durch Konzentrationen von 50 und 500 $\mu\text{mol/l}$ zu einem hochsignifikanten Expressionsanstieg des PPAR γ um maximal 88 %.

Wie bei Maloney und Waxman [78] zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit ein Expressionsanstieg des PPAR γ 2 durch den Einfluss von MEHP. Dieses Verhalten wurde sowohl durch die Stimulation von Endothelzellen als auch von Leberzellen beobachtet. In Leberzellen wurde ein maximaler Expressionsanstieg um 61 %, in Endothelzellen um 151 % beobachtet. Wie bei den anderen PPAR-Isoformen zeigte sich bei den Leberzell-Versuchen durch die Stimulation mit 1000 $\mu\text{mol/l}$ MEHP kein signifikanter Expressionsanstieg des PPAR γ 2.

4.3 4-Heptanon als PPAR-Ligand in humanen Leber- und Endothelzellkulturen

Während die Wirkung von DEHP und MEHP auf die Expression der PPAR-Isoformen schon in einigen Studien untersucht wurde [9, 48, 78], ist die Wirkung des Metaboliten 4-Heptanon weitgehend unklar. Da bereits gezeigt wurde, dass viele Effekte des DEHP nicht durch die Ausgangssubstanz selbst, sondern durch Metaboliten wie MEHP vermittelt werden [79, 88, 124, 140], ist es wichtig, auch die Wirkung weiterer Metaboliten genau zu untersuchen. 4-Heptanon ist mit einem Molekulargewicht von 114,19 g/mol [157] ein viel kleineres Molekül als andere bisher untersuchte Metaboliten. Allerdings wurden bereits PPAR-Liganden identifiziert, die ebenfalls ein geringes Molekulargewicht aufweisen. So ist bekannt, dass beispielsweise verschiedene Eicosanoide wie Leukotrien B₄ (336,47 g/mol)[20], Prostaglandin A₁ (336,47 g/mol), Prostaglandin D₂ (362,47 g/mol) und Prostacyclin (374,45 g/mol) PPARs aktivieren können [25, 157].

Um die Bedeutung dieses Metaboliten in Bezug auf eine Aktivierung der verschiedenen PPAR-Isoformen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Leber- und Endothelzellen mit 4-Heptanon stimuliert. Die Dauer der Zellstimulation mit 4-Heptanon betrug ebenfalls 24 Stunden.

Bei den Leberzell-Versuchen wurden 4-Heptanon Konzentrationen von 250 µg/l, 500 µg/l, 750 µg/l, 1000 µg/l und 2000 µg/l eingesetzt.

Die Expression von PPAR α konnte durch diese 4-Heptanon-Konzentrationen nicht signifikant beeinflusst werden. Zwar zeigte sich in dem Versuch des ersten Zellpools (P1) ein signifikanter Anstieg der PPAR α -Expression durch 4-Heptanon-Konzentrationen von 250 µg/l und 500 µg/l, jedoch wurde diese Beobachtung durch den Versuch des zweiten Zellpools (P2) nicht bestätigt.

Bei PPAR γ dagegen wurde bei diesen beiden niedrigsten 4-Heptanon-Konzentrationen eine signifikante Expressionssteigerung beobachtet. Maximal wurde die Expression um 61 % gesteigert.

Während in einer früheren Studie [151] ein Expressionsanstieg des PPAR γ 2 unter dem Einfluss von 4-Heptanon in einer Konzentration von 500 µg/l festgestellt wurde, konnte dies in der vorliegenden Studie nicht beobachtet

werden. Bei der Expression von PPAR γ 2 wurde ein der Expression von PPAR α ähnliches Ergebnis erzielt. Während im Versuch des Zellpools 1 (P1) ein signifikanter Expressionsanstieg durch alle 4-Heptanon-Konzentrationen beobachtet wurde, konnte der Versuch des Zellpools 2 (P2) dies nicht bestätigen. Insgesamt zeigte sich keine signifikante Expressionsänderung des PPAR γ 2 durch den Einfluss von 4-Heptanon.

Da durch die in den Leberzell-Versuchen eingesetzten 4-Heptanon-Konzentrationen keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde bei den Endothelzellversuchen neben Konzentrationen von 500 $\mu\text{g/l}$, 1000 $\mu\text{g/l}$ und 2000 $\mu\text{g/l}$ eine Konzentration von 10000 $\mu\text{g/l}$ zur Stimulation eingesetzt. Insgesamt schien es bei den Endothelzellen einen umso höheren Expressionsanstieg der PPAR-Isoformen zu geben, je höher die eingesetzte 4-Heptanon-Konzentration war. So wurde beobachtet, dass die Stimulationen mit 2000 $\mu\text{g/l}$ und 10000 $\mu\text{g/l}$ einen signifikanten Expressionsanstieg aller drei Isoformen bewirkten. Die Expression von PPAR γ 2 wurde bereits durch eine Stimulation mit 1000 $\mu\text{g/l}$ 4-Heptanon signifikant gesteigert. Niedrigere Konzentrationen führten bei keiner PPAR-Isoform zu einer signifikanten Expressionsänderung.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass tatsächlich höhere Konzentrationen 4-Heptanon zur Beeinflussung des Expressionsmusters der PPAR-Isoformen nötig sein könnten. Hier könnte der Grund dafür liegen, dass die Leberzell-Versuche keine eindeutigen Ergebnisse in Bezug auf den Einfluss von 4-Heptanon geliefert haben.

4.4 Bedeutung der DEHP-Belastung für den Menschen

Lange wurde über die karzinogene Wirkung von DEHP beim Menschen diskutiert, nachdem man diesen Effekt in Tierexperimenten beobachtet hatte. Inzwischen ist jedoch klar, dass eine solche Karzinogenität für den Menschen nicht besteht [49]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es unter dem Einfluss von DEHP und seinen Metaboliten nicht zu Peroxisomenproliferation oder anderen histologischen Veränderungen in der Leber kommt [3, 26, 43, 51]. Außerdem konnte der Wirkmechanismus, über den die Induktion von Tumoren

bei Nagetieren entsteht, nämlich über die Aktivierung von PPAR α [52], beim Menschen nicht gefunden werden [45, 49, 103, 104, 145].

Anders ist es mit der reproduktionstoxischen Wirkung. Bereits in Tierversuchsstudien wurde gezeigt, dass sowohl Hoden als auch Ovarien sehr empfindlich auf die Wirkung von DEHP und seinen Metaboliten reagieren [28, 136]. Die Veränderungen äußerten sich besonders in einer Verringerung der Spermienzahl [67, 110] bzw. in anovulatorischen Zyklen und polyzystischen Ovarien [76]. Die Fertilität wurde reduziert [28, 67, 110].

Duty et al. [29, 30] untersuchten in epidemiologischen Studien die Wirkung von Phthalaten auf den Menschen. Sie stellten für einige Phthalate eine Korrelation zwischen erhöhter Phthalat-Konzentration im Urin und verminderter Spermienzahl, verminderter Spermienmotilität und vermehrter DNA-Schädigung fest. Hierbei wurde dieser Effekt nicht für MEHP beobachtet, jedoch für Monoethylphthalat (MEP), Monobutylphthalat (MBP) und Monobenzylphthalat (MBzP). In anderen Studien konnte eine signifikante Korrelation zwischen gemessenen Phthalat-Metaboliten und der Häufigkeit und dem Schweregrad von Endometriosen bei Frauen festgestellt werden [22, 115]. Außerdem konnte eine Korrelation mit verkürzten Schwangerschaften nachgewiesen werden [69]. Jedoch fehlt auch in diesem Zusammenhang bisher der Nachweis einer Kausalität.

Trotz der Feststellung, dass Phthalate bei Menschen keine Leberzellkarzinome über eine Aktivierung von PPAR α auslösen, ist es möglich, dass sie andere Erkrankungen über diesen Weg verursachen. PPARs sind in sehr vielen Geweben des menschlichen Körpers zu finden und üben in ihrer Eigenschaft als Transkriptionsfaktoren vielfältige Funktionen aus. Sie können unterschiedlichste Prozesse regulieren und darüber auch zu Erkrankungen führen.

So spielen sie eine Rolle in der Regulation des Immunsystems. Beispielsweise wird über ein negatives Feedback Leukotrien B₄, das stark chemotaktisch auf Immunzellen wirkt, nach Aktivierung von PPAR α verstärkt abgebaut [20]. Hierdurch wird die Entzündungsreaktion eingedämmt. Außerdem wurden in Tiermodellen proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 6, Interleukin 1 β und TNF- α durch Liganden der PPARs supprimiert [60, 118]. Aufgrund dieser

Beobachtungen ist es anzunehmen, dass vermehrte oder verminderte Aktivierung der PPARs zu einer Dysregulation der Immunantwort führen können. Bornehag et al. [10] beobachteten in einer Studie einen Zusammenhang zwischen allergischen Symptomen von Kindern und dem Phthalatgehalt des Hausstaubes in deren Wohnungen. Möglicherweise wird dieser Effekt ebenfalls über PPARs vermittelt.

Weiterhin sind PPARs an Wachstums- und Proliferationsprozessen beteiligt. So fand man bei Mäusen ohne funktionierenden PPAR β/δ ein vermindertes Wachstum [65]. Außerdem wurde in einem Tiermodell eine verminderte Proliferation von glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von Liganden der PPARs beobachtet [60, 118].

Wichtig für die mögliche Bedeutung des DEHP für den Menschen ist auch die Rolle, die PPARs in Stoffwechselprozessen spielen. Sie sind wichtige Regulatoren des Fettstoffwechsels [27]. Hypolipidämische Medikamente sind Liganden der PPARs und bewirken einen Anstieg des HDL und ein Absinken des LDL [25, 65]. Auf diesem Weg kann eine Aktivierung der PPARs auch die Reduktion eines vaskulären Risikofaktors bewirken. Neben dem Fettstoffwechsel kann über PPARs auch der Kohlenhydratstoffwechsel beeinflusst werden. Es wurde gezeigt, dass nach Aktivierung des PPAR γ durch Thiazolidinedione eine gesteigerte Glukosemetabolisation und eine verbesserte Insulinsensitivität resultiert [7, 42, 64, 71, 99]. In diesem Zusammenhang ist es möglich, dass auch DEHP und seine Metaboliten als Liganden der PPARs Erkrankungen auslösen können wie Dyslipoproteinämie, Diabetes mellitus oder Adipositas [122, 149].

Neben der oben genannten Reduktion des vaskulären Risikofaktors Dyslipoproteinämie werden auch andere vaskuläre Prozesse über PPARs vermittelt. So ist die Aktivierung von PPAR γ ein entscheidender Schritt in der Entstehung atherosklerotischer Plaques [142]. PPAR α -Liganden wie Fibrate bewirken eine verminderte Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 und darüber eine verminderte Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand [84]. Dies würde einen antiatherosklerotischen Effekt bedeuten. Außerdem wird über eine Aktivierung von PPARs vermehrt Stickstoffmonoxid aus dem Gefäßendothel freigesetzt, was zu einer Vasodilatation führt [14, 41,

101]. DEHP und seine Metaboliten können dementsprechend über eine Regulation der PPARs Einfluss auf den Gefäßtonus nehmen.

Entsprechend dieser vielfältigen Regulationswege der PPARs ist die genaue Bedeutung von DEHP und seinen Metaboliten für das Gesundheitsrisiko des Menschen schwer zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde erneut gezeigt, dass MEHP und auch 4-Heptanon in der Lage sind, die Expression der PPARs zu beeinflussen. Daher ist es wichtig, weitere Untersuchungen über den Wirkmechanismus durchzuführen und damit die medizinische Bedeutung von DEHP und seinen Metaboliten zu klären.

5. Zusammenfassung

Der Kunststoff PVC ist bei Raumtemperatur hart und spröde. Durch den Zusatz von Weichmachern wird er weich und flexibel, was seinen Einsatz in vielen Bereichen, unter anderem im Medizinproduktebereich, ermöglicht. Die am häufigsten verwendeten Weichmacher sind die Phthalate mit ihrem wichtigsten Vertreter, dem DEHP. Da DEHP nicht chemisch an die PVC-Moleküle gebunden ist, kann es aus dem Kunststoff herausgelöst werden.

In Tierversuchsstudien wurden mehrfach toxische Wirkungen des DEHP nachgewiesen. Im Mittelpunkt des Interesses stand zunächst seine Karzinogenität, die bei Nagetieren beobachtet wurde. Dieser Effekt zeigte sich beim Menschen nicht. Von größerer Bedeutung für den Menschen scheint die Reproduktionstoxizität zu sein.

Toxische Wirkungen sind nicht nur für DEHP selbst, sondern auch für seine Metaboliten beschrieben. Metaboliten, die bei Menschen in höheren Konzentrationen gefunden wurden, sind unter anderen MEHP und 4-Heptanon.

Es wurde gezeigt, dass verschiedene Effekte von DEHP und seinen Metaboliten über PPARs vermittelt werden. Hierbei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die durch eine Reihe von Peroxisomenproliferatoren aktiviert werden. Sie kommen in drei Isoformen PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ vor.

Während in ersten Untersuchungen die Rolle von MEHP als Ligand der PPARs untersucht wurde, ist bisher unklar, ob auch 4-Heptanon als Metabolit ähnliche Veränderungen bewirken kann. In der vorliegenden Arbeit wurde daher neben MEHP auch der Einfluss von 4-Heptanon auf die Expression der verschiedenen PPAR-Isoformen untersucht.

Für die Versuche wurden humane Leber- und Endothelzellkulturen verwendet. Die Stimulationen erfolgten mit MEHP bzw. 4-Heptanon in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach 24 Stunden erfolgten die Zellyse und RNA-Extraktion. Nach reverser Transkription wurden die cDNA-Konzentrationen der zu untersuchenden Gene mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt.

Zur Quantifizierung erfolgte die Normalisierung der zu vergleichenden Proben über das Housekeeping-Gen GAPDH. Unter der Annahme, dass die Expression der GAPDH durch die experimentellen Bedingungen nicht verändert wird, wurden in allen Proben die gleichen GAPDH-Konzentrationen hergestellt. Diese Methode der Normalisierung hat gegenüber der Normalisierung über photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung den Vorteil, dass Ungenauigkeiten bei der RNA-Konzentrationsbestimmung und unterschiedliche Effizienz der reversen Transkription zu keiner Verfälschung der Ergebnisse führen können.

MEHP ist eine schlecht wasserlösliche Substanz. Aus diesem Grund wurde es für die Stimulation der Leberzellen in DMSO gelöst. Durch den Vergleich von Zellen ohne jeglichen Zusatz mit DMSO-behandelten Zellen fiel eine deutliche Verringerung der Expression der zu untersuchenden Gene auf. Aufgrund dieser Beobachtung wurden Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, als Kontrollgruppe eingesetzt. Bei der Stimulation der Endothelzellen wurde MEHP nicht in DMSO gelöst, um mögliche Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

Wie schon in früheren Studien beschrieben, induzierte MEHP einen Expressionsanstieg aller untersuchten PPAR-Isoformen sowohl in humanen Leberzellen als auch in humanen Endothelzellen. Die höchste eingesetzte MEHP-Konzentration, 1000 $\mu\text{mol/l}$, führte allerdings bei den Endothelzellen zum Zelltod. Bei den Leberzellen führte diese Konzentration zu keinem weiteren Expressionsanstieg mehr, was ebenfalls Ausdruck einer Zellschädigung sein könnte.

Die Stimulation der Leberzellen mit 4-Heptanon erbrachte, im Gegensatz zu einer früheren Studie [151], in der es zu einem Expressionsanstieg von PPAR γ 2 kam, keine eindeutigen Ergebnisse. Während die Expression von PPAR α und PPAR γ 2 nicht signifikant beeinflusst wurde, zeigte sich ein leichter Expressionsanstieg von PPAR γ . Die höchste eingesetzte 4-Heptanon-Konzentration betrug bei den Leberzell-Versuchen 2000 $\mu\text{g/l}$.

Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse wurde bei den Endothelzell-Versuchen eine 4-Heptanon-Konzentration von 10 mg/l als höchste Konzentration eingesetzt. Hier bewirkte auch 4-Heptanon eine Expressionssteigerung aller untersuchten PPAR-Isoformen.

Die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die DEHP-Metaboliten MEHP und 4-Heptanon durchaus eine Regulation der PPARs bewirken. Da PPARs als Transkriptionsfaktoren vielfältige Prozesse im menschlichen Körper regulieren, ist es wahrscheinlich, dass DEHP und seine Metaboliten eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten spielen. Das genaue Gesundheitsrisiko kann allerdings erst abgeschätzt werden, wenn weitere Kenntnisse über die Wirkmechanismen gewonnen werden.

5.1. Summary

Additional flexibility and softness in PVC can be achieved by adding plasticizers in order to broaden its usage. One commonly used plasticizer is DEHP, which belongs to the group of Phthalates. Since DEHP is not chemically bound to PVC-plastics it can easily be freed from plastic compounds. Several animal studies have shown evidence for toxic effects of DEHP. The focus of these effects has been its carcinogenicity observed in rodents. This effect could not be reproduced in humans.

In humans the main effect of DEHP seems to be its toxicity on reproductivity. It is currently believed that DEHP is not only toxic by itself but also by its metabolites. There are several metabolites of DEHP, which can be found in humans, e.g. MEHP and 4-Heptanon.

It has been shown, that several effects of DEHP and its metabolites are relayed by PPARs. These pathways involve different transcription factors, which are activated by several peroxisomeproliferators. These PPARs are divided into three different isoforms, PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ . In early studies it has been shown, that MEHP is a ligand of PPARs but it remains unclear whether its metabolite 4-Heptanon can also lead to similar effects. Therefore, the aim of this thesis was to study the influence of MEHP and 4-Heptanon on the expression of the three PPAR-isoforms.

All experiments were conducted on human liver or endothelium cell culture cells. Cells were stimulated with either MEHP or 4-Heptanon in different concentrations. 24 hours after stimulation, cells were lysated and RNA was extracted. After reverse transcription cDNA concentrations of the target genes was measured by quantitative Real-time PCR. All probes were normalised using GAPDH as housekeeping gene.

This method, compared to photometric measurements RNA-concentrations, has the advantage that inaccuracies in RNA-measurements and different efficiency of reverse transcriptase does not lead to a falsification of results.

MEHP is hardly water-soluble. Therefore, MEHP was dissolved using DMSO before the stimulation of livercells. By comparing cells treated with DMSO with cells completely unstimulated we found a diminishment of targetgene

expression. Due to this observation we used cells treated with DMSO as controls. In experiments with endothelial cells DMSO was not used in order to prevent a falsification of data.

As observed in earlier studies, MEHP induces an increase of expression of all PPAR isoforms in human liver and endothelial cells. However, the highest used concentration of MEHP was 1000 $\mu\text{mol/l}$ lead to apoptosis of endothelial cells. In liver cells this concentration also did not lead to an increase of expression of PPAR isoforms, which could be regarded as a sign of cell damage.

Stimulation of liver cells using 4-Heptanon did not lead to significant changes of expression. This is in contrast to the results of another study, which shows an increase of PPAR γ 2 under similar experimental conditions. While expression of PPAR α and PPAR γ 2 was not significantly altered a slight increase of expression could be observed for PPAR γ . The highest used concentration of 4-Heptanon was 2000 $\mu\text{mol/l}$ in liver cells.

Because of the unclear results we used a 4-Heptanon-concentration of 10 mg/l as highest concentration for stimulation of endothelial cells. This concentration lead to a significant increase of expression of all PPAR isoforms.

The results observed in this work imply, that the DEHP-metabolites MEHP and 4-Heptanon can effectively regulate expression of PPARs. Since PPARs as transcriptionfactors regulate a wide variety of processes in the human body it is likely that their metabolites might also play a role in the development of illness. However, their real health hazard can only be estimated until further knowledge about their deleterious effect can be gained.

6. Anhang

Anhang A: Abkürzungsverzeichnis

ACS	Acyl-CoA-Synthetase
BBP	Benzylbutylphthalat
CBP/p300	Cyclic-AMP response element binding protein/protein 300
DBD	DNA bindende Domäne
DBP	Dibutylphthalat
DEHP	Di(2-ethyl,hexyl-)Phthalat
DIDP	Di-(isodecyl)phthalat
DINP	Di-(isononyl)phthalat
DMSO	Dimethylsulfoxid (Antiphlogistikum)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNOP	Di-n-octylphthalat
dNTP	2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates
DTT	dithiothreitol
ECMO	extrakorporale Membranoxygenation
EH	2-Ethylhexanol
FATP	fatty acid transporter protein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukosetransporter 4
H	4-Heptanon
H ₂ O	Wasser
IL	Interleukin
Konz.	Konzentration
LBD	Liganden bindende Domäne
LTB ₄	Leukotrien B ₄
lu	laboratory unit
ME	malic enzyme
MEHP	Monoethylhexyl-Phthalat
MPAK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
NaCl	Natriumchlorid – Kochsalz

NCo-A	Nuclear Co-Aktivator
NCo-R	Nuclear Co-Repressor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	PPAR response elements
PSA	prostata-spezifisches Antigen
PVC	Polyvinylchlorid
RXR	Retinoid X Rezeptor
SRC1	Steroid receptor co-activator 1
TNF- α	Tumor necrose factor α
TZD	Thiazolidinedione
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

7. Literaturverzeichnis

1. Albro, PW. Absorption, metabolism and excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. *Environ. Health Perspect* 65; 293-298 (1986)
2. Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA, Grimaldi PA. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. *J Biol Chem* 270: 2367-71 (1995)
3. Ashby J, Brady A, Elcombe CR, Elliott BM, Ishmael J, Odum J, Tugwood JD, Kettle S, Purchase IF. Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* 13(2): 1-117 (1994)
4. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21(3): 389-95 (2005)
5. Barrero MF, Camarero N, Marrero PF, Haro D. Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element. *Biochem J* 369(3): 721-729 (2003)
6. Barry YA, Labow RS, Keon WJ, Tocchi M, Rock G. Perioperative exposure to plasticizers in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovas Surg* 97(6): 900-5 (1989)
7. Berger J, Bailey P, Biswas C, et al. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor[hyphen] γ : binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology* 137: 4189-95 (1996)
8. Berman E, Schlicht M, Moser VC, MacPhail RC. A multidisciplinary approach to toxicological screening: I. Systemic toxicity. *J Toxicol Environ Health* 45; 127(1995)
9. Bility MT, Thompson JT, McKee RH, David RM, Butala JH, Vanden Heuvel JP, Peters JM. Activation of mouse and human peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 82(1): 170-82 (2004)
10. Bornehag CG, Sundell J, Weschler CJ, Sigsgaard T, Lundgren B, Hasselgren M, Hägerhed-Engman L. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 112(14): 1393-7 (2004)
11. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR alpha, beta and gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-66 (1996)
12. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien, Behandlungs- und Verwertungswege für PVC-Abfälle, Gesamtbericht, Dezember 2002
13. Cadogan DF, Howick CJ. Plasticizers. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol 19. New York: John Wiley and Sons, 258-290 (1996)

14. Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 52-57 (2003)
15. Castelein H, Gulick T, Declercq PE, Mannaerts GP, Moore DD, Baes MI. The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J Biol Chem*. 269(43): 26754-8 (1994)
16. Cheng Y, Dharancy S, Malapel M, Desreumaux P. Hepatitis C virus infection down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and carnitine palmitoyl acyl-CoA transferase 1A. *World J Gastroenterol* 11(48): 7591-6 (2005)
17. Cimini AM, Sulli A, Stefani S. Effects of DEHP on peroxisome of liver kidney and brain of lactating rats and their pups. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 40(8): 1063-76(1994)
18. Clark K, Cousins IT, Mackay D, Yamada K. Observed concentrations in the environment. In: C. A. Staples, ed. *The Handbook of Environmental Chemistry*. ed. New York: Springer-Verlag: 125-177 (2003)
19. Clark K, Cousins IT, Mackay D. Assessment of critical exposure pathways. In: A. Staples, ed. *The Handbook of Environmental Chemistry*. ed. New York: Springer-Verlag: 127-162 (2003)
20. Clarke SD, Thuillier P, Baillie RA, Sha X. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors, *Am J Clin Nuir* 70: 566-71 (1999)
21. Clayson DB, Mehta R, Iverson F. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Oxidative DNA damage – the effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutation Research* 317(1): 25-42 (1994)
22. Cobellis L, Latini G, De Felice C, Razzi S, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P, Petraglia F. High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* 18(7): 1512-5 (2003)
23. Crocker JF, Safe SH, Acott P. Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J Toxicol environ Health*; 23(4): 433-44(1988)
24. David RM, Moore MR, Cifone MA, Finney DC, Guest D. Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicol Sci* 50(2): 195-205 (1999)
25. Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2(10): 748-59 (2002)
26. De La Iglesia FA, Lewis JE, Buchanan RA, Marcus EL, McMahon G. Light and electron microscopy of liver in hyperlipoproteinemic patients under long-term gemfibrozil treatment. *Atherosclerosis* 43(1):19-37 (1982)
27. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-88 (1999)
28. Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, Williams G, Gemert M. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol* 29: 327-357 (1999)

29. Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 14(3): 269-77 (2003)
30. Duty SM, Singh NP, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the Neutral Comet Assay. *Environ Health* 111(9): 1164-9 (2003)
31. Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. *Lancet*. 357(9271): 905-10 (2001)
32. enius AG, Schadstoffinformationssystem: Weichmacher
33. Ericsson CG, Nilsson J, Grip L, Svane B, Hamsten A. Effect of bezafibrate treatment over five years on coronary plaques causing 20 % to 50 % diameter narrowing (The Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial [BECAIT]). *Am J Cardiol* 80(9): 1125-9 (1997)
34. Flaminio LM, Bergia R, De Angelis L. The fate of leached DEHP in patients on chronic haemodialysis, *Int J Artif Organs* 11; 428-34(1988)
35. Flaminio LM, De Angelis L, Ferazza M, Marinovich M, Galli G, Galli CL. Leachability of a new plasticizer tri-(2-ethylhexyl)-trimellitate from haemodialysis tubing. *Int J Artif Organs* 11; 435-36(1988)
36. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia: safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 317(20): 1237-45 (1987)
37. Frick MH, Syvanne M, Nieminen MS, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, Kesaniemi YA, Pasternack A, Taskinen MR. Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol: Lipid Coronary Angiography Trial (LOCAT) Study Group. *Circulation* 96(7): 2137-43 (1997)
38. Geene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, and Nimer SD, Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 4 (4-5): 281-299 (1995)
39. Gorzelniak K, Janke J, Engeli S, Sharma AM. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* 33(10): 625-7 (2001)
40. Götz, S. Die Bedeutung von „Peroxisome Proliferator-Activated Receptors“ in der Pathogenese von Gefäßwandläsionen und ihr Einfluß auf die Migration und Proliferation vaskulärer Zellen. Habilitationsschrift (2002)
41. Goya K, Sumitani S, Xu X, Kitamura T, Yamamoto H, Kurebayashi S, Saito H, Kouhara H, Kasayama S, Kawase I. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(4): 658-63 (2004)

42. Harris PKW, Kletzien RF. Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol Pharmacol* 45: 439-45 (1994)
43. Hoivik DJ, Qualls CW Jr, Mirabile RC, Cariello NF, Kimbrough CL, Colton HM, Anderson SP, Santostefano MJ, Morgan RJ, Dahl RR, Brown AR, Zhao Z, Mudd PN Jr, Oliver WB Jr, Brown HR, Miller RT. Fibrates induce hepatic peroxisome and mitochondrial proliferation without overt evidence of cellular proliferation and oxidative stress in cynomolgus monkeys. *Carcinogenesis* 25(9): 1757-69 (2004)
44. Holden PR, Odum J, Soames AR, Foster JR, Elcombe CR, Tugwood JD. Immediate early gene expression during regenerative and mitogen-induced liver growth in the rat. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology* 12(2): 79-82 (1998)
45. Holden PR, Tugwood JD. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species difference. *J Mol Endocrinol.* 22(1): 1-8 (1999)
46. http://www.arbeitsmedizin.uni-erlangen.de/Koch_Phthalate.htm
47. Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol* 26(4): 365-481 (1996)
48. Hurst CH, Waxman DJ. Activation of PPAR α by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 74(2): 297-308 (2003)
49. IARC Monographs volume 77, (15-22 February 2000). Some Industrial Chemicals.
50. Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* 246(2): 370-4 (1998)
51. Investigators CoP. WHO cooperative trial on primary prevention of ischaemic heart disease with clofibrate to lower serum cholesterol: final mortality follow-up. Report of the Committee of Principal Investigators. *Lancet* 2: 600-4 (1984)
52. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347(6294): 645-50 (1990)
53. Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Demer LL. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 10(9): 2094-104 (1999)
54. Jacobson MS, Kevy SV, Grand RJ. Effects of a plasticizer leached from polyvinyl chloride on the subhuman primate: a consequence of chronic transfusion therapy. *J Lab Clin Med* 89(5): 1066-1079 (1977)
55. Jaeger RJ, Rubin RJ. Contamination of blood stored in plastic packs. *Lancet* 2(7664): 151 (1970)
56. Jaeger RJ, Rubin RJ. Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *N Engl J Med* 287(22):1114-8 (1972)
57. Jaeger RJ, Rubin RJ. Plasticizers from plastic devices extraction, metabolism, and accumulation by biological systems. *Science* 170(956): 460-2 (1970)

58. Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol Diagn* 8(2): 107-13 (2004)
59. Jepsen K, Rosenfeld MG. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci* 115: 689-98 (2002)
60. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391(6662): 82-6 (1998)
61. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391(6662): 82-6 (1998)
62. Karle VA, Short BL, Martin GR, et al. Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di(2-ethylhexyl) phthalate. *Crit Care Med* 25: 696-703 (1997)
63. Keyv SV, Jacobson MS. Hepatic effects of a phthalate ester plasticizer leached from poly(vinyl chloride) blood bags following transfusion. *Environ Health Perspect* 45: 57-64 (1982)
64. Kletzien RF, Foellmi LA, Harris PKW, Wyse BM, Clarke SD. Adipocyte fatty acid binding protein (aFABP): regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 42: 558-62 (1992)
65. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From Genes to Physiology. *Recent Prog Horm Res*; 56: 239-63 (2001)
66. Lake BG, Gangolli SD, Grasso P, Lloyd AG. Studies on the hepatic effects of orally administered di-(2-ethyl-hexyl)phthalate in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 32 (2): 355-67 (1975)
67. Lamb JC IV, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 88(2): 255-69 (1987)
68. Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, Blanchard S, Swanson C, Cattley RC, Corton JC. Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology*. 207(1): 149-63 (2005)
69. Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 111(14): 1783-5 (2003)
70. Legislative Entschließung des Europäischen Parlaments zu dem Gemeinsamen Standpunkt des Rates im Hinblick auf den Erlass der Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zur 22. Änderung der Richtlinie 76/769/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten betreffend Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen (Phthalate in Spielzeug und Babyartikeln) (5467/1/2005 – C6-0092/2005 – 1999/0238 (COD))
71. Lehmann J, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor g (PPARg). *J Biol Chem* 270: 12953-6 (1995)

72. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: A Nuclear Receptor Signaling Pathway in Lipid Physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 335-63 (1996)
73. Li LH, Jester WF, Jr, Laslett AL, Orth JM. A single dose of Di-(2ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation and decreases cyclin D2 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 166(3): 222-9. (2000)
74. LightCycler Operator's Manual Version 3.5
75. Loff S, Kabs F, Witt K, Sartoris J, Mandl B, Niessen KH, Waag KL. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *Journal of Pediatric Surgery* 35(12): 1775-81 (2000)
76. Lovekamp-Swan T, Davis JC. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 111(2): 139-45 (2003)
77. Lundgren B, Meijer J, DePierre JW. Examination of the structural requirements for proliferation of peroxisomes and mitochondria in mouse liver by hypolipidemic agents, with special emphasis on structural analogues of 2-ethylhexanoic acid. *Eur J Biochem* 163(2): 423-31 (1987)
78. Maloney EK, Waxman DJ. Trans-Activation of PPAR α and PPAR γ by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 161(2): 209-18 (1999)
79. Malony EK, Waxman DJ. Trans-activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 161: 209-218 (1999)
80. Marcel YL. Determination of di-2-ethylhexyl phthalate levels in human blood plasma and cryoprecipitates. *Environ Health Perspect* 3: 119-121 (1973)
81. Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* 94(9): 1168-78 (2004)
82. Marx N, Mackman N, Schönbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* 103(2): 213-9 (2001)
83. Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator activated receptor γ activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83(11): 1097-103 (1998)
84. Marx N, Sukhova G, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule 1 expression in human endothelial cell. *Circulation* 99(24): 3125-31 (1999)
85. Marx N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep* 4(1): 71-7 (2002)
86. Meek ME, Chan PKL. Bis(2-ethylhexyl)phthalate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ Carcin Ecotoxicol Rev* C12: 179-194 (1994)
87. Melnick RL. Is peroxisome proliferation an obligatory precursor step in the carcinogenicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)? *Environ Health Perspect* 109(5): 437-442 (2001)

88. Mitchell AM, Lhuguenot JC, Bridges JW, Elcombe CR. Identification of the proximate peroxisome proliferator(s) derived from di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol* 80: 23-32 (1985)
89. Mitsubishi-Chemical-Safety-Institute. Sixty-five week repeated oral dose toxicity study of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in juvenile common marmosets. Ibaraki, Japan: Mitsubishi Chemical Safety Institute; 2003
90. Moody DE, Reddy FK. Hepatic peroxisome (microbody) proliferation in rats fed plasticizers and related compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 45(2): 497-504 (1978)
91. Moody DE, Reddy JK. The hepatic effects of hypolipidemic drugs (clofibrate, nafenopin, tibric acid, and Wy-14,643) on hepatic peroxisomes and peroxisome-associated enzymes. *Am J Pathol* 90(2): 435-5 (1978)
92. Morimura K, Cheung C, Ward JM, Reddy JK, Gonzalez FJ. Differential susceptibility of mice humanized for peroxisome proliferator-activated receptor alpha to Wy-14,643-induced liver tumorigenesis. *Carcinogenesis* 27(5): 1074-80 (2006)
93. Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou XP, Eng C, Spiegelman BM, Kantoff PW. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(20): 10990-5 (2000)
94. Narotsky MG, Kavlock RJ. A multidisciplinary approach to toxicological screening: II. Developmental toxicity. *J Toxicol Environ Health* 45; 145(1995)
95. Nassberger L, Arbin A, Ostelius J. Exposure of patients to phthalates from polyvinyl chloride tubes and bags during dialysis. *Nephron* 45; 257(1985)
96. National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTP-CERHR expert panel update on the reproductive and developmental toxicity of Di(2-ethylhexyl) phthalate. November 2005
97. National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTP-CERHR Expert Panel Report on Di(2-Ethylhexyl)Phthalate. Alexandria, VA: Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, US Department of Health and Human Services; 2000. Available at: <http://cerhr.niehs.nih.gov/news/index.html>. (2003)
98. Neve BP, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Duriez P, Staels B, Jude B. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation* 103(2): 207-12 (2001)
99. Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med* 331: 1188-93 (1994)
100. Norbäck D, Wieslander G, Nordström K, Walinder R. Asthma symptoms in relation to measured building dampness in upper concrete floor construction, and 2-ethyl-1-hexanol in indoor air. *Int J Tuberc Lung Dis* 4(11): 1016-25 (2000)

101. Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Miyake T, Matsuzaki M. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca^{2+} -independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *FEBS Lett* 487(3): 361-6 (2001)
102. Osumi T, Hashimoto T. Enhancement of fatty acyl-CoA oxidizing activity in rat liver peroxisomes by di-(i-ethylhexyl)phthalate. *J Biochem(Tokyo)* 83(5): 1361-5 (1978)
103. Palmer CA, Hsu MH, Griffin KJ, Johnson EF. Species differences in PPARalpha expression levels may determine species specific responsiveness to peroxisome proliferators. Abstract, 11th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Los Angeles, CA, (1996)
104. Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ, Raucy JL, Johnson EF. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Mol Pharmacol* 53(1): 14-22 (1998)
105. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 101(3): 235-8 (2000)
106. Peters JM, Lee SST, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol* 20: 5119-5128 (2000)
107. Plonait SL, Nau H, Maier RF, Wittfoht W, Obladen M. Exposure of newborn infants to di-(2ethylhexyl)-phthalate and 2-ethylhexanoic acid following exchange transfusion with polyvinylchloride catheters. *Transfusion* 33: 598-605 (1993)
108. Pohjanvirta R, Niittynen M, Linden J, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB. Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Cem Biol Interact.* 160(2): 134-49 (2006)
109. Pollack GM, Buchanan JF, Slaughter RL, Kohli RK, Shen DD. Circulating concentrations of DEHP and its de-esterified phthalic acid products following plasticizer exposure in patients receiving hemodialysis, *Toxicol Appl Pharmacol* 79; 257(1985)
110. Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol* 35(2): 225-39 (1997)
111. Price CF, Tyl RW, Marr MC, Sadler Bm, Kimmel CA. Reproduction and Fertility Evaluation of Diethylhexyl Phthalate (CAS No. 117-81-7) in Foscjer 344 Rats Exposed During Gestation. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program (1986)
112. Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Sadler BM, Kimmel CA. Reproductive and Fertility Assessment of Diethylhexyl Phthalate (CAS No. 117-81-7) in CD1 Mice. Research Triangel Park, NC. National Toxicology Program; 1988. Available at: [gttp//ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/TR-studies/RACB_82119.html](http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/TR-studies/RACB_82119.html). Accessek March 27, 2003

113. Principles and Applications; QIAGEN, Critical Factors for Successful Real-Time PCR; LightCycler Operator's Manual Version 3.5, www.lightcycler-online.com
114. Rao MS, Reddy JK. An overview of peroxisome-induced hepatocarcinogenesis. *Environ Health Perspect* 92: 205-9 (1991)
115. Reddy BS, Rozati R, Reddy BV, Raman NV. Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG* 113(5): 515-20 (2006)
116. Reddy JK, Rao MS. Peroxisome proliferators and cancer: mechanisms and implications. *Trends in Pharmacological Science* 7: 438-43 (1986)
117. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(13): 7614-9 (1998)
118. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kely CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391(6662): 79-82 (1998)
119. Rininger JA, Goldsworthy TL, Babish JG. Time-course comparison of cell cycle protein expression following partial hepatectomy and Wy-14,643-induced hepatic proliferation in F344 rats. *Carcinogenesis* 18(5): 935-41 (1997)
120. Rokos CL, Ledwith BJ. Peroxisome proliferators activate extracellular signal-regulated kinases in immortalized mouse liver cells. *Journal of Biological Chemistry* 272(20): 13452-7 (1997)
121. Rosen ED, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and atherosclerosis; ending the heartache. *J Clin Invest* 106(5): 629-31 (2000)
122. Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR γ : A Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation and Cell Growth, *J Biol Chem*. 276(41): 37731-4 (2001)
123. Roth B, Herkenrath P, Lehmann HF, Ohlers HD, Homig HF, Benz-Bohm G, Kreuder J, Younossi-Hartenstein A. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechanically ventilated, preterm infants. *Eur J Pediatr* 147(1): 41-6 (1988)
124. Rothenbacher KP, Kimmel R, Heldenbrand S, Schmahl FW, Dartsch PC, Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney epithelial cells. *Hum Exp Toxicol* 17: 226-342 (1998)
125. Rubin RJ, Schiffer CA. Fate in humans of the plasticizer, di-2-ethylhexyl phthalate, arising from transfusion of platelets stored in vinyl plastic bags. *Transfusion* 16(4): 330-335 (1976)
126. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol: Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 341(6): 410-8 (1999)

127. Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) released from PVC Medical Devices. Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration 12709 Twinbrook Parkway Rockville MD 20852 (2001) <http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf>
128. Schneider B, Schena J, Truog R, Jacobson M, Kevy S. Exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate in infants receiving extracorporeal membrane oxygenation. *N Engl J Med* 320: 1563 (1989)
129. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki, H, Mahfoudi A, Krey G, et al. Induction of the fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270: 19269-76 (1995)
130. Shea KM, MD, MPH, and the Committee of Environmental Health, Pediatric Exposure and Potential Toxicity of Phthalate Plasticizers, *Pediatrics* 111(6): 1467-74 (2003)
131. Shigeaki Kato, Tokyo University of Agriculture, Department of Agricultural Chemistry; Sakuragaoka 1-1-1, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan
132. Sjoberg P, Bondesson U, Sedin G, Gustafsson J. Dispositions of di- and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in newborn infants subjected to exchange transfusions. *Eur J Clin Invest* 15: 430-436 (1985)
133. Sjoberg PO, Bondesson UG, Sedin EG, Gustafsson JP. Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di- (2-ethylhexyl) phthalate and mono- (2-ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion. *Transfusion* 25: 424-428 (1985)
134. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Furchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* 292(6687): 790-3 (1998)
135. Steineger HH, Sorensen HN, Tugwood JD, Skrede S, Spydevold OI, Gautvik KM. Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur J Biochem* 225: 967-74 (1994)
136. Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der DGPT zu möglichen Gesundheitsgefahren durch Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) aus Medizinprodukten in neonatologischen Intensivstationen; überarbeitete Fassung vom 18.10.2002
137. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 99(26): 16899-16903 (2002)
138. Su JL, Simmons CJ, Wisely B, Ellis B, Winegar DA. Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma* 17(1): 47-53 (1998)
139. Su T, Waxman DJ. Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 424(2): 226-34 (2004)

140. Ticker JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M. Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am J Indust Med* 29: 100-111(2001)
141. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8(10): 1224-34 (1994)
142. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-52 (1998)
143. Tontonz P, Hu, E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15(1): 351-7 (1995)
144. Treinen KA, Heindel JJ. Evidence that MEHP inhibits rat granulosa cell function by a protein kinase C-independent mechanism. *Reprod Toxicol* 6(2): 143-8 (1992)
145. Tugwood JD, Aldridge TC, Lambe KG, McDonald N, Woodyatt NJ. Peroxisome proliferator-activated receptors: Structures and functions. *Ann N Y Acad Sci* 804: 252-65 (1996)
146. Tyl RW, Price CJ, Marr MC, Kimmel A. Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 10(3): 395-412 (1988)
147. Ullmannova V, Haskovec C. The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR. *Folia Biol (Praha)* 49(6): 211-6 (2003)
148. Valeri CR, Contreras TJ, Feingold H, Sheibley RH, Jaeger RJ. Accumulation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in whole blood, platelet concentrates, and platelet-poor plasma. 1. Effect of DEHP on platelet survival and function. *Environ Health Perspect* 3: 103-18 (1973)
149. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*. 354(9173): 141-8 (1999)
150. Wahl HG, Hong Q, Hildenbrand S, Risler T, Luft D, Liebich H. 4-Heptanone is a metabolite of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 19(10): 2576-83 (2004)
151. Wahl HG. Habilitationsschrift: Nachweis und medizinische Relevanz von 4-Heptanon als Endmetabolit des Weichmachers Di(2-ethylhexyl) Phthalat (2004)
152. Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez FJ. Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol Pathol* 26(2): 240-246 (1998)
153. Wilkinson CF, Lamb JC. The potential health effects of phthalate esters in children's toys: a review and risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 30: 140-155 (1999)
154. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270(1): 41-9 (1999)
155. www.agpu.de, Februar 2006
156. www.plasticizers.org, Februar 2006

157. www.sigmaaldrich.com
158. Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists: PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 275(7): 4541-4 (2000)
159. Zhang X, Young HA. PPAR and immune system – what do we know? *International Immunopharmacology* 2: 1029-1044 (2002)

Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Bette, Cetin, Christiansen, Czubayko, Dauth, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fruhsdorfer, Gerdes, Geus, Gotzen, Grimm, Griss, Gudermann, Happle, Hasilik, Hofmann, Hörle, Jungclas, Kaluza, Kern, Klenk, Klose, Köhler, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Leppek, Löffler, Lohoff, Mandrek, Maisch, Meinhardt, Meyer, Moll, Mueller U., Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Radsack, Rausch, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seifart, Seitz J., Steininger, Seybert, Sure, Vohland, Voigt, Wahl, Walther, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

Meine akademischen Lehrer in Essen waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Broelsch, Dührsen, Erbel, Gerken, Grabbe, Mann, Nast-Kolb, Philipp, Seeber

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Hans Günther Wahl für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas sowie seine intensive und hervorragende Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Harald Renz, danke ich für die Bereitstellung der Mittel und der Räumlichkeiten in seinem Institut.

Ebenfalls danke ich Dr. Henrik Junclas für seine ständige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg, insbesondere Dr. Serdar Sel, Sarper Sel und Dr. Michael Wegmann danke ich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglicht und mich stets motiviert hat.