## PPARγ-VERMITTELTE APOPTOSE IN AKTIVIERTEN T-LYMPHOZYTEN – BEDEUTUNG FÜR DIE PATHOGENESE DER SEPSIS

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Troph. Anja Tautenhahn

Betreuer der Dissertation: HD. Dr. Andreas von Knethen

Kaiserslautern, November 2003

Wissenschaftliche Aussprache am 24.11.2003

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. Heinrich Zankl

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Brüne

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand

## -INHALT-

1.	Einleitung	
1.1	Sepsis	1
	1.1.1 Die Epidemiologie der Sepsis	1
	1.1.2 Definition der Sepsis	1
	1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis	2
	1.1.3.1 Gram-negative Sepsis	3
	1.1.3.2 Gram-positive Sepsis	5
	1.1.3.3 Signalwege zur Sepsis	5
	1.1.4 Ansätze der Sepsistherapie	6
	1.1.5 Apoptose in Sepsis	8
1.2	T-Zell-Apoptose	9
	1.2.1 Allgemeine Kennzeichen der Apoptose	9
	1.2.1.1 Unterscheidung von Apoptose und Nekrose	10
	1.2.1.2 Nachweissysteme für die Apoptose	11
	1.2.2 AICD, ACAD und PPARy-vermittelte T-Zell-Apoptose	13
1.3	Peroxisomproliferator- aktivierender Rezeptor gamma (PPARy)	14
	1.3.1 Das humane PPARγ-Gen	14
	1.3.2 Die Proteinstruktur von PPARγ	15
	1.3.3 PPARγ-Liganden	17
	1.3.4 Expression von PPARγ in T-Zellen	21
1.4	Zielstellung	23
2.	Materialien und Chemikalien	24
2.1	Materialien und Geräte	24
	2.1.1 Kits	25
	2.1.2 Software	25
2.2	Chemikalien und Reagenzien	25
2.3	Antikörper	26
2.4	Antikörper zur Zellisolierung- und Analyse	27
2.5	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	27
2.6	Oligonucleotide	27
	2.6.1 Primer für die PCR	27

	2.6.2 DIG-markierte Oligonucleotide für den Gel-Shift	28
2.7	Stimulanzien	28
2.8	Vektoren	29
2.9	Zelllinien und primäre Zellen	29
2.10	Standardpuffer und Lösungen	29

3.	Methoden	32
3.1	Zellkultur	32
3.2	Isolierung und Analyse der primären Zellen	32
3.3	RNA-Präparation und Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	
	(RT-PCR)	33
3.4	Gelshift-Assay (EMSA)	35
	3.4.1 Herstellung von Kernextrakten	35
	3.4.2 Bestimmung der Kernproteinkonzentration	35
	3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
	3.4.4 Transfer und Detektion	36
3.5	Analyse des Zelltods (Apoptose/Nekrose)	36
	3.5.1 Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ )	36
	3.5.2 Nachweis der Phosphatidylserintranslokation mit Annexin V	37
3.6	Transfektion und Luciferase Assay	38

# 4. Ergebnisse 4.1 PPARγ und Apoptose in aktivierten T-Zellen 4.1.1 Expressionsanalyse von PPARγ in humanen T-Zellen

	4.1.1	Expressionsanalyse von PPARy in humanen T-Zellen	39
	4.1.2	Aktivierung von PPARy in humanen T-Zellen	44
	4.1.3	PPARγ-Agonisten und Apoptose in aktivierten T-Zellen	47
	4.1.4	Apoptosemechanismen der PPARy-vermittelten Apoptose	52
4.2	PPAR	y und Apoptose in T-Zellen septischer Patienten	55
	4.2.1	Depletion der Lymphozyten und T-Lymphozyten in der Pathogenese	
		der Sepsis	55
	4.2.2	Expression von PPAR $\gamma$ in septischen T-Lymphozyten	56
	4.2.3	PPARγ-Agonisten und Apoptose in septischen T-Lymphozyten	59
	4.2.4	Apoptosemechanismen der PPARy-induzierten Apoptose in septischen	
		T-Zellen	62

39

39

5.	Diskussion	63
5.1	PPARγ und Apoptose in aktivierten T-Zellen	63
	5.1.1 PPARγ-Expression in aktivierten T-Zellen	64
	5.1.2 PPAR <sub>γ</sub> -Agonisten erhöhen die PPAR <sub>γ</sub> -Aktivität	66
	5.1.3 Die funktionelle Wirksamkeit von aktiviertem PPARγ	67
	5.1.4 Charakterisierung der PPARy-vermittelten Apoptose	69
5.2	PPARy und Apoptose in T-Zellen septischer Patienten	71
6.	Zusammenfassung	75
	Lusammentassung	15

### 7. Literaturverzeichnis

## 78

## A. Anhang

A1 D	aten der	Sepsispa	atienten
------	----------	----------	----------

- A2 Danksagung
- A3 Curriculum Vitae
- A4 Publikationen
- A5 Erklärung

## -ABBILDUNGSVERZEICHNIS-

	S	eite
Abb. 1-1:	Die Sepsiskaskade von der Infektion zum Multiorganversagen.	3
Abb. 1-2:	Strukturformel von $DiOC_6(3)$ .	12
Abb. 1-3:	Schematische Darstellung des humanen PPARy-Gens.	15
Abb. 1-4:	Schematische Darstellung der Peroxisomproliferator-	
	aktivierenden Rezeptoren (PPARs).	16
Abb. 1-5:	Modulation der Gentranskription durch PPAR.	17
Abb. 1-6:	Strukturformeln ausgewählter natürlicher PPARy-Liganden.	18
Abb. 1-7:	Strukturformeln ausgewählter synthetischer PPARy-Liganden.	20
Abb. 4-1:	Expression von PPARγ in aktivierten Jurkat T-Zellen.	40
Abb. 4-2:	Reinheiten der Zellfraktionen nach dem magnetischen	
	Zelltrennungssystem (MACS).	41
Abb. 4-3:	Expression von PPARy in aktivierten, primären humanen CD3+ Zellen.	42
Abb. 4-4:	PPARy3-Promotorabhängige Expression von PPARy in aktivierten	
	T-Zellen.	43
Abb. 4-5:	Aktivierung von PPARy nach Stimulation der T-Zellen mit PHA.	44
Abb. 4-6:	Aktivierung von PPAR $\gamma$ nach Stimulation der T-Zellen mit PPAR $\gamma$ -	
	Agonisten.	46
Abb. 4-7:	Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ).	48
Abb. 4-8:	Apoptosemessung nach der Behandlung mit PPARy-Agonisten.	50
Abb. 4-9:	Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) nach der	
	Behandlung aktivierter T-Zellen mit PPARy-Agonisten.	51
Abb. 4-10:	Rezeptorabhängige Veränderung des Mitochondrienmembran-	
	potentials ( $\Delta \psi$ ).	53
Abb. 4-11:	Fas ist nicht involviert in die PPARy-bedingte Veränderung des	
	Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) in Jurkat Zellen.	54
Abb. 4-12:	Fas ist nicht involviert in die PPARy-bedingten Veränderungen des	
	Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) in primären, humanen	
	CD3+ Zellen.	55

Abb. 4-13:Subpopulationen der "peripheral blood mononuclear cells" (PBM		
	aus Vollblut gesunder und septischer Patienten.	56
Abb. 4-14:	Expression von PPARy in primären, humanen Zellen gesunder	
	und septischer Patienten.	57
Abb. 4-15:	Expression von PPARy in primären, humanen Lymphozyten und	
	T-Lymphozyten gesunder und septischer Patienten.	58
Abb. 4-16:	Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) primärer,	
	humaner CD3+ Zellen gesunder und septischer Patienten nach der	
	Behandlung mit PPARγ-Agonisten.	59
Abb. 4-17:	SR-202 hemmt die PPARy-Transaktivierungskapazität und den	
	PPARγ-vermittelten T-Zelltod.	61
Abb. 4-18:	Fas ist nicht involviert in die PPARy-vermittelten Veränderungen	
	des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) in septischen T-Zellen.	62

Abb. 5-1:	PPARγ-vermittelte Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten.	68
Abb. 5-2:	SR-202 vermindert die PPARy-vermittelte Apoptose in Sepsis.	73

## -TABELLENVERZEICHNIS-

		Seite
Tab. 1-1:	Unterstützende Maßnahmen und Therapieversuche bei Sepsis	7

## -ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS-

9-Hode	Linolsäurederivate 9-Hydroxyoktadekadien-Säure
13-Hode	13- Hydroxyoktadekadien-Säure
15d-PGJ <sub>2</sub>	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J <sub>2</sub>
Abb.	Abbildung
ACAD	Aktivierungs-autonomer Zelltod
ADD-1	Adipocyte differentiation and determination factor-1
AF	Aktivierende Funktion
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
AP-1	Aktivierendes Protein-1
aP2	Adipozyten Fettsäure-bindendes Protein2
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
BADGE	Bisphenol-a-diglycidyl-ether
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Komplementäre DNA
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CREB	cAMP responsive element binding protein
CSPD	Disodium3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-
	chloro)tricyclodecan}-4-yl) phenyl phosphate
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DD	Cytoplasmatische Todesdomäne
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DED	Death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI
$DiOC_6(3)$	3,3'-Dihexyloxacarbocyaninjodid
DISC	death inducing signal complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleotid-Mix
DTT	Dithiothreitol
Δψ	Mitochondrienmembranpotential
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGR-1	Early growth response factor-1
EGTA	Ethylenglycoltetraaceticacid
EtOH	Ethanol
Ex/Em	Excitation/Emisssion [nm]
F	Farad
Fas	Fibroblast associated
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GADD153	Growth arrest and DNA-damage inducible 153 Gen
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HMGB1	High-mobility-group-protein B1
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsprotein
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
kd	Kilodalton
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
КОН	Kaliumhydroxid
1	Liter
LBP	LPS-bindendes-Protein
LPS	Lipopolysaccharide
М	Molar
m	Milli
μ	Mikro
mA/cm <sup>2</sup>	Milli Amper/Quadratzentimeter
mCD14	Membrangebundenes CD14
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

MIF	Migrationsinhibierender Faktorr
min	Minute
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
mRNA	Messenger-RNA
MW	Mittelwert
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-ĸB	Nukleärer faktor-kappaB
NH <sub>4</sub> CL	Ammoniumchlorid
NO	Stickstoffmonooxid
OD	Optische Dichte
oxLDL	Oxidised low density lipoprotein
PAI-1	Plasminogen-activator-inhibitor 1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase-chain-reaction (= Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PPAR	Peroxisomproliferator-aktivierender Rezeptor
PPRE	Peroxisome proliferating response element
PS	Phosphatidylserin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
RXR	Retinoid X Rezeptor
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
sec	Sekunde
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome

Smac	Second mitochondrial activator of caspases
SR-202	Dimethyla-(dimethoxyphosphosphinyl)-p-chloro-benzylphosphat
SREBP-1/SREB-2	Sterol regulatory element binding protein-1/2
STAT-	Signal transducers and activators of transcription
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylendiamin
TGF-β1	Transforming growth factor-beta1
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
t-PA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator
Tris	$\alpha, \alpha, \alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TZD	Thiazolidindione
TZR	T-Zellrezeptor
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsprotein
zVAD	Carbobenzoxy-L-Asp-a-[2,6-dichlorobenzoyl)-oxy]methan

#### 1. Einleitung

#### 1.1 Sepsis

#### 1.1.1 Die Epidemiologie der Sepsis

Das Krankheitsbild der Sepsis ist eines der wichtigsten Ursachen für Morbidität und Sterblichkeit weltweit. Witthaut und Werdan (113) errechneten die Sterblichkeit im Mittel auf 40 - 60% und beschreiben 175.000 Todesfälle jährlich in den USA sowie etwa 75.000 in Deutschland. Sepsis stellt nach wie vor ein ungelöstes intensivmedizinisches Problem dar. Das liegt zum einen darin begründet, dass Sepsis eine Vielzahl von Ursachen haben kann und zum anderen die komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge und die zugrundeliegenden Mechanismen wenig verstanden sind. Darüber hinaus erschwerte der multifaktorielle Verlauf der Sepsis deren klare Definition.

#### 1.1.2 Definition der Sepsis

Eine Konsensus-Konferenz zweier amerikanischer Fachgesellschaften (American College of Chest Physicians und Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee) (7) hat im Jahre 1992 folgende Definitionen herausgegeben. Der Ausdruck des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) beschreibt einen Symptomkomplex, der durch das gleichzeitige Auftreten von zwei oder mehr der folgenden Kriterien definiert ist:

- (1) Körpertemperatur höher als 38.0 °C oder niedriger als 36.0 °C
- Herzfrequenz mehr als 90 Schläge/min
   Atemfrequenz mehr als 20 Atemzüge/min oder PaCO<sub>2</sub> kleiner 33 mmHg
- (3) Leukozytenanzahl größer 12000 Zellen/mm<sup>3</sup> oder kleiner 4000 Zellen/mm<sup>3</sup> oder kleiner 10 % unreifer Formen.

Zusätzlich zu diesen SIRS-Symptomen muss, nach der Übereinkunft, eine Infektion, z.B. durch positive Blutkulturen, nachgewiesen werden, um Sepsis zu diagnostizieren (7). Im Gegensatz dazu spricht man von einem septische Schock, wenn zusätzlich

volumensubstitutionsrefraktäre Hypotonie auftritt. Ein septischer Schock hat eine wesentlich schlechtere Prognose als Sepsis.

#### 1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis

Eine Sepsis beginnt mit der Aktivierung des Immunsystems, zumeist verursacht durch eine bakterielle Infektion (Abb. 1-1). Die häufigsten Mikroben, die von Patienten mit Sepsis oder septischen Schock isoliert wurden, sind gram-negative Bakterien (z.B. *Escherichia coli, Klebsiella Spezies, Pseudomonas aeruginosa*) und gram-positive Kokken (z.B. *Staphylokokken, Streptokokken*). Pathogene Pilze, wie *Candida*, verursachen dagegen nur ca. 5% aller septischen Erkrankungen. In Abhängigkeit von der Dauer und Stärke der Infektion, der Immunlage des Patienten und seinen Vorerkrankungen kommt es zu einer unangemessenen, exzessiven Entzündungsreaktion des Gesamtorganismus, so dass die Abwehrsysteme mit ihren Mediatoren selbst zum "Aggressor" werden (69). Der Verlauf dieser, sich selbst verstärkenden Mediatorenkaskade, kann über einen vorhandenen Schockzustand zum Multiorganversagen (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) und schließlich zum Tod des Patienten führen (7, 69).



Abbildung 1-1: Die Sepsiskaskade von der Infektion zum Multiorganversagen.

#### 1.1.3.1 Gram-negative Sepsis

Endotoxine, als Lipopolysaccharide (LPS) identifizierte Bestandteile der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, stimulieren die Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) und führen zu einer Erhöhung der Produktion von induzierbaren Proteinen, den Zytokinen. Hohe Konzentrationen dieser Zytokine, wie sie bei Sepsis auftreten, können schwere Gewebeschäden, Organversagen und letztlich den Tod verursachen. Ausgelöst wird dies durch das Binden des LPS im Organismus an ein spezifisches Protein, das LPS-bindende-Protein (LBP) (92). Die Synthese des LBP erfolgt hauptsächlich in Hepatozyten und wird durch Interleukin-1β (IL-1β) in Synergie mit Interleukin-6 (IL-6) angeschaltet. Im physiologischen Mikrogrammbereich (Normwerte 1-2  $\mu$ g/ml) wird LBP eine immunstimulierende Funktion zugeschrieben. Die Wirkung kleinster Mengen an Endotoxin, werden durch die Bindung an LBP verstärkt, was die Aktivierung der natürlichen Abwehrkaskade sicherstellt. Bei akuten Entzündungen wurden LBP-Werte von bis zu 20  $\mu$ g/ml gemessen (115). Im Falle der Keimüberflutung, wie bei der Sepsis, werden so hohe Endotoxinkonzentrationen erreicht, dass LPS auch ohne LBP die zellulären Effekte erzielen kann.

Die vom LBP gebundenen bakteriellen Membranbestandteile werden zu den CD14-Rezeptoren (LPS-Rezeptor) auf den Monozyten und Makrophagen transportiert, die wiederum die Entzündungskaskade, in einem positiven Rückkopplungseffekt, aktivieren [Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α), IL-6, IL-8 u.a.m.] (37). Seit 1990 ist die zentrale Bedeutung des CD14, einem 53 kD-Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche reifer myeloischer Zellen exprimiert wird, bei der LPS induzierten sekretorischen Zellantwort bekannt (115). Allerdings fehlt dem CD14 das carboxyterminale Ende, das für die intrazelluläre Signaltransduktion notwendig ist und ist damit nicht zu einer intrazellulären Signaltransduktion fähig, so dass die Signalweiterleitung weitere Mediatoren erfordert. Die derzeit vorliegenden Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass die Induktion der wesentlichen Mediatoren in Folge einer bakteriellen Infektion durch einen sogenannten Toll-like-Rezeptor (TLR)/CD14 Rezeptorkomplex vermittelt wird (78). TLR ist ein transmembranärer Rezeptor, der in der Fruchtfliege Drosophila sowohl bei der Embryonalentwicklung als auch im Rahmen der angeborenen Immunantwort eine zentrale Rolle spielt. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass TLR in der Lage sind, unterschiedliche bakterielle Virulenzfaktoren zu erkennen (58). Toll-Like-Rezeptor-4 (TLR-4) ist der wesentliche Rezeptor für die Erkennung und Signaltransduktion von LPS, Toll-Like-Rezeptor-2 (TLR-2) dagegen ein wichtiger Rezeptor für die Erkennung von grampositven Bakterien und deren Zellwandbestanteilen. Die Signaltransduktion für LPS wird durch TLR-4 vermittelt, nachdem das LBP an den CD14 Rezeptor gebunden hat und somit eine funktionelle Einheit zwischen dem CD14 Rezeptor und dem TLR-4 vermittelt.

#### 1.1.3.2 Gram-positive Sepsis

Gram-positive Organismen können auf mindestens zwei verschiedenen Wegen eine Sepsis auslösen: entweder indem Komponenten ihrer Zellwand, ähnlich wie bei gram-negativen Bakterien, erkannt werden und das Immunsystems stimulieren (11), oder durch die Produktion von Exotoxinen, die als sogenannte "Superantigene" fungieren. Superantigene" (z.B. Staphylokokkenenterotoxin, Toxisches Schock Syndrom Toxin 1) sind Moleküle, die an MHC-Klasse-II-Moleküle antigenpräsentierender Zellen und den T-Zell-Rezeptor binden und dadurch in den T-Zellen die massive Produktion proinflammatorischer Zytokine anregen (96).

#### 1.1.3.3 Signalwege zur Sepsis

Für die Entwicklung der Sepsis ist die Aktivierung der Komplementkaskade, die wiederum zur Aktivierung der Leukozyten führt, von Bedeutung. Deren Folge, die Sezernierung sehr hoher Konzentrationen von Proteasen sowie freier Sauerstoffradikale, führen zu einer Entzündung und zur Zerstörung des Endothels. Diese Reaktion ermöglicht den Austritt von Plasma sowie die Migration der Granulozyten in das umgebende Gewebe und markiert häufig den Beginn des SIRS (68, 69). Im Verlauf der Entzündungsreaktion setzt das Enzym Phospholipase A2 aus Arachidonsäure, mit Hilfe der Cyclooxygenase und Lipoxigenase, sowohl Prostaglandinen, Thromboxan-A2, als auch Leukotriene frei (79). Die Wirkung dieser Gewebshormone ist vasokonstriktiv und thrombozytenaktivierend, führt aber auch zur Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität, der Chemotaxis und Leukozytenaktivierung, in deren Folge insbesondere Prostaglandine und Leukotriene die Pathogenese des SIRS bestimmen (69).

Als weiterer Überträgerstoff ist Stickstoffmonooxid (NO) zunehmend von Interesse. Der in niedrigen Konzentrationen normalerweise ubiquitäre Mediator führt nach Synthese-Stimulation durch LPS oder Zytokine zu einer Vasodilatation mit Hypotonie und Schädigung körpereigener Zellen (69, 74). Diese Hypotension kann durch Inhibition der NO-Synthese gehemmt werden. Die vollständige Hemmung der NO-Synthese kann allerdings ebenso schädigend wirken (103).

Durch die systemische Inflammation ist bei den meisten Patienten mit Sepsis die plasmatische und zelluläre Gerinnung aktiviert. Dies geschieht im wesentlichen durch die Expression des Tissue-Faktors (Gewebethromboplastin) auf Endothelzellen und in Monozyten. Gleichzeitig trägt die Aktivierung des Komplementsystems und anderer Faktoren der Blutgerinnung durch die Entzündungsmediatoren bei schweren Sepsisverläufen zur Gerinnungsbereitschaft und den damit verbundenen pathologischen Konsequenzen bei (37).

#### 1.1.4 Ansätze der Sepsistherapie

Vor dem Hintergrund einer steigenden Inzidenz und der hohen Sterblichkeitsrate wird intensiv nach neuen therapeutischen Konzepten für die Behandlung der Sepsis gesucht. Das Finden geeigneter Maßnahmen wird erschwert durch die Tatsache der Komplexität der pathophysiologischen Abläufe und Zusammenhänge der Sepsis, die noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt sind.

Bis vor wenigen Jahren beruhten die therapeutischen Versuche, die Sepsis besser zu beherrschen, auf der Annahme, dass vor allem die infektionsinduzierte Entzündung der dominierende Prozess in der Sepsis-Kaskade sei. Allerdings konnte trotz ständig verbesserter Entwicklungen im Bereich der Antibiotika, der chirurgischen Techniken zur Herdsanierung sowie der Unterstützung der anderen Organfunktionen (Tabelle 1-1) keine wesentliche Reduktion der Sterblichkeit erreicht werden.

	Mechanismus	Therapie
Unterstützende Maßnahmen	<ul> <li>Beseitigung des infektiösen Agens bzw. des Infektionsherdes</li> <li>Stabilisierung von Organfunktionen bzw. Begrenzung von Organschäden</li> </ul>	<ul> <li>Antimikrobielle Substanzen; invasive Radiologie; Chirurgie</li> <li>Therapie von Schock und Organ- versagen</li> </ul>
Fehlgeschlagene Therapie- versuche	<ul> <li>Blockierung der Immunantwort</li> <li>Hemmung der inflammatorischen Reaktionen</li> <li>Blockierung der Prostaglandin-</li> </ul>	<ul> <li>monoklonaler Antikörper gegen Endotoxin (HA-A1, E5)</li> <li>Glukokortikoide (Hochdosis); Anti-TNF-Antikörper, löslicher TNF-Rezeptor, Anti-Bradykinin, IL-1-Rezeptorantagonist, PAF-Antagonist</li> <li>Ibuprofen</li> </ul>
	synthese	<ul> <li>Ibuproten</li> </ul>

Tabune 1-1. Unici stutzende Magnannien und Enerapiever suche der Sepsis. (05
--

Neben diesen, meist fehlgeschlagenen, Interventionsstudien gibt es eine erfolgreiche mit endogenem aktiviertem Protein C, das die sepsisinduzierte Gerinnungskaskade unterbricht (6). Hierzu war eine Behandlung der Patienten mit aktiviertem Protein C innerhalb der ersten 24 Stunden nach Sepsisbeginn erforderlich. Endogen aktiviertes Protein C ist ein proteolytischer Inhibitor der Gerinnungs-Kofaktoren Va und VIIa, welche an der Gerinnungskaskade beteiligt sind (61). Es wird aktiviert, wenn Thrombin an Thrombomodulin, ein lösliches Protein der Endothelzelloberfläche, gebunden wird. Durch diese Bindung spielt Thrombin nicht länger eine Rolle bei der Aktivierung des Fibrinaufbaues und der Thrombozyten, sondern trägt zur Aktivierung des Protein C bei, welches daraufhin den Gerinnungsprozess hemmt. Endogenes aktiviertes Protein C hat dementsprechend eine wichtige Bedeutung als Antithrombotikum (94). Neuere Studien zeigen, dass aktiviertes Protein C den Zyklus aus Koagulation und Inflammation, durch den die Sepsis charakterisiert ist, durch seine antiinflammatorische Aktivität unterbrechen kann. Es kann dabei durch die Hemmung der Thrombinbildung indirekt die Entzündung vermindern, durch die Inhibition der Zytokinproduktion aber auch direkt das Entzündungsgeschehen beeinflussen. Gleichzeitig reduziert es die Anlagerung der Leukozyten an das Endothel.

High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) ist ein zelluläres kernbindendes Protein, das nachweislich in Endothelzellen die Transkription des interzellulären Adhäsionsproteins (ICAM-1) und des vaskulären Adhäsionsproteins (VCAM-1) sowie die Sekretion von TNF- $\alpha$ , Interleukin-8 (IL-8), dem Monozyten-chemotaktischen Protein-1 (MCP-1), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) und dem Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA) initiiert (28). Damit erhält HMGB1 eine Schlüsselfunktion in der Koagulation, aber auch Bedeutung als proinflammatorischer Mediator. Die Kenntnis, dass Bakterienbestandteile, insbesondere LPS gram-negativer Bakterien, die Produktion von HMGB1 induzieren, veranlasste zu klinischen Untersuchungen mit Gaben von Ethylpyruvat, das die Produktion von HMGB1 hemmt (102). Studien am murinen Tiermodell, mit dem Vorhaben HMGB1 zu hemmen, bestätigten eine verbesserte Überlebensrate, bedürfen aber noch der Verifizierung am humanen System (102).

Andere Studien, mit dem Ansatz die proinflammatorische Kaskade zu unterbinden, wie die Hemmung des Makrophagen migrationsinhibierenden Faktors (MIF), oder die Unterbrechung der Komplementkaskade mit Antikörpergaben, benötigen ebenfalls die Übertragung vom Tiermodell auf das humane System (83). Der programmierte Zelltod (Apoptose) der Lymphozyten im Sepsisgeschehen gibt schließlich Anlass zu Studien mit antiapoptotischen Präparaten (72).

#### 1.1.5 Apoptose in Sepsis

Die systemische Entzündungsreaktion, die kardiozirkulatorischen Veränderungen und die mögliche Fortsetzung dieser Störungen durch die Translokation von Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in die Peripherie führen in der Sepsis zu einer direkten zellulären Schädigung der Organe, deren Dysfunktion letztendlich Ausdruck des Verlustes an funktioneller Zellmasse ist. Dabei spielen beide Typen des Zelltodes, die Nekrose und die Apoptose, eine Rolle. Beide Mechanismen können an der Organschädigung im Rahmen der Sepsis beteiligt sein und über das enge Zusammenspiel der einzelnen Organsysteme ein Multiorganversagen nach sich ziehen (72).

Mehrere Studien belegen das Auftreten des apoptotischen Zelltodes der Lymphozyten im Zusammenhang mit Sepsis (3, 38, 39, 41). In experimentellen Sepsis- und Entzündungsmodellen reduzierten antiapoptotische Therapiestrategien, wie die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (40) oder die Hemmung der Caspasen (108), die Apoptose der Lymphozyten und erhöhten infolgedessen das Überleben der Versuchstiere. Untersuchungen an Patienten dokumentieren eine Reduktion der B- und CD4+ Zellen im humanen Sepsisgeschehen (3, 38, 39, 41), während in denselben Patienten die Anzahl der CD8+ T-Zellen und die der natürlichen Killerzellen unverändert blieb (41). Diese Befunde nähren die Motivation für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der antiapoptotischen Therapie klinischer Sepsis (83). Allerdings existieren bisher keine Kenntnisse über die zugrundeliegenden Signalwege der Apoptose in Lymphozyten während der Pathogenese der Sepsis.

#### **1.2 T-Zell-Apoptose**

#### 1.2.1 Allgemeine Kennzeichen der Apoptose

Für ein umfangreicheres Verständnis der Untersuchungen zur T-Zell-Apoptose in dieser Arbeit, möchte ich im Folgenden etwas detaillierter die Kennzeichen der Apoptose, sowie deren experimentelle Analyse darstellen.

Die Tatsache, dass auch der Zelltod entscheidend an der Kontrolle des Gewebewachstums beteiligt ist, blieb lange Zeit von der Wissenschaft unbeachtet. Seitdem aber die Apoptose als zellulärer "Suizid" (48), dem funktionellen Gegenteil der Mitose, beschrieben wurde, ist eine ansteigende Aufmerksamkeit gegenüber diesem Phänomen zu verzeichnen. Physiologisch "entbehrliche" Zellen werden durch den Prozess der Apoptose beseitigt, wobei einige Substanzen und Arzneimittel die Eigenschaft besitzen, diese Art des Zelltodes zu fördern oder zu hemmen. Die Erkenntnisse über solche Phänomene ermöglichen eine differenziertere Betrachtung der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten und schaffen die Voraussetzung für neue therapeutische Ansätze (10).

Der programmierte Zelltod ist ein aktiver, genetisch determinierter Prozess, der zu der Selbstzerstörung der Zelle führt. Erste Beweise für die Existenz von zwei morphologisch verschiedenen Arten des Zelltodes zeigten histochemische Studien von Kerr *et al.* (48). Apoptose<sup>1</sup> steht für die charakteristischen biochemischen und morphologischen

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Das Wort "Apoptose" ( $\alpha \pi \sigma \pi \tau \omega \sigma \iota \sigma$ ) wird in Griechenland benutzt, um das Herabfallen der Blütenblätter von den Blumen oder der Blätter von den Bäumen zu beschreiben. Es wurde von Kerr *et al.* in Anlehnung an den

Veränderungen der Zellen im Verlauf des programmierten Zelltodes. Typische morphologische Kennzeichen sind die Zellschrumpfung, die Entwicklung von blasenförmigen Gebilden an der Zelloberfläche ("membrane blebbing"), die Chromatinkondensation und die Bildung apoptotischer Körperchen ("apoptotic bodies"). Biochemische Ereignisse sind die Initiierung der Apoptose-Signal-Kaskade, die Aktivierung von Effektormolekülen (z.B. Endonukleasen, Proteasen) sowie eine früh einsetzende Membranlipidperoxidation, die über eine veränderte Lage von Membranphospholipiden, wie Phosphatidylserin, an der Zelloberfläche die sterbende Zelle für Makrophagen erkennbar macht (35). Weiterhin wird während des apoptotischen Prozesses die chromosomale DNA durch die enzymatische Aktivität der Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Endonukleasen in Fragmente definierter Länge (ca. 180 bp) geschnitten (116), woraus die Entstehung der typischen ,Apoptose-Leiter' resultiert. Diese Apoptose-Leiter kann nach Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

#### 1.2.1.1 Unterscheidung von Apoptose und Nekrose

Von dem apoptotischen Prozess lässt sich die Nekrose, die pathologische Form des Zelltodes, abgrenzen. Im Gegensatz zu der Apoptose, findet man bei nekrotischen Vorgängen keinen Einfluss auf die Kontrolle von Zellpopulationen. Nekrose bezeichnet den Zelltod, der nach massiver Gewebeschädigung zu einem schnellen Kollabieren der internen Zellhomöostase führt (48). Der nekrotische Zelltod wird assoziiert mit Zellschwellung, Verlust der Membranintegrität, Zerstörung der Zellstruktur, Zellkernschwellung sowie zufällige DNA-Fragmentierung. Die Lyse der Membran bewirkt das Austreten von Zellflüssigkeiten, was gleichzeitig eine Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe initiiert (116).

#### 1.2.1.2 Nachweissysteme für die Apoptose

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Techniken entwickelt, um apoptotische Zellen zu detektieren, die auf Änderungen der Zellmorphologie, der Zusammensetzung und

<sup>&</sup>quot;herbstlichen Laubabwurf" für die Beschreibung des Mechanismus der Zellzerstörung eingeführt, der -wie die Mitose- an der Regulation der Population von tierischen Zellen beteiligt ist.

Transportfunktion der Plasmamembran, der Organellenfunktion, der DNA-Stabilität gegenüber Denaturierung oder der endonukleolytischen Fragmentierung basieren.

Nicht bei jedem Zelltyp und jedem bekannten Apoptose-Stimulus sind sämtliche beschriebene Apoptose-Marker nachweisbar. Aus diesem Grund müssen für die Etablierung der Apoptosemessung im Labor mehrere, auf den Nachweis unterschiedlicher Parameter beruhende Verfahren parallel eingesetzt und miteinander verglichen werden (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

#### Phosphatidylserintranslokation

Neue Erkenntnisse über den apoptotischen Prozeß führten gleichzeitig zu neuen Parametern für die Detektion und Quantifizierung apoptotischer Zellen. Einer dieser Parameter ist der Nachweis von Phosphatidylserin (PS), welches nach Strukturveränderungen der Plasmamembran von der inneren zu der äußeren Membranseite verlagert wird. Die exakten Mechanismen für diese Phospholipid-Asymetrie sind noch nicht geklärt. Allerdings werden Adenosintriphosphat sowie Magnesium-abhängige Membranproteine beschrieben, die den inneren Transport der negativ geladenen Phospholipide als Folge diverser Signale (z. B. Aktivierung von Flippasen, Deaktivierung von Translokasen) vermitteln (52). *In vivo* erfolgt damit die Informationsweitergabe über den Suizid der Zelle an die Zellumgebung. Phagozyten werden durch dieses Signal motiviert, die sterbende Zelle durch Phagozytose aufzunehmen (88). Zum Nachweis machte man sich zu Nutzen, dass die Annexine die Fähigkeit besitzen, in der Gegenwart von geeigneten Kalzium-Konzentrationen mit sehr hoher Affinität an PS zu binden (98), bzw. ein Mitglied dieser Proteinfamilie, das Annexin V, bevorzugt an PS bindet (98).

Bei dieser Methode ist die eindeutige Unterscheidung apoptotischer von nekrotischen Zellen von Bedeutung. Da auch bei nekrotischen Zellen die Membran permeabilisiert, kann Annexin V in die Zelle diffundieren, wodurch ebenfalls ein positives Signal erscheint. Um dieses Problem zu umgehen, werden durch Ausschlussfärbung mit Propidiumjodid (PI) nekrotische von apoptotischen Zellen differenziert. Der Nachweis des gebundenen Annexin V wurde in der vorliegenden Arbeit als Apoptose-Assay eingesetzt.

#### Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ )

Als ein bedeutendes Kennzeichen des apoptotischen Zelltodes wurde der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) identifiziert. Während der Apoptose kann dies, einhergehend mit erhöhter Sauerstoffradikalproduktion und vermehrter Kalziumfreisetzung [Ca<sup>2+</sup>], dem Auflösen des Zellkerns vorangehen (59), gefolgt von der Freisetzung von Cytochrome C, Caspasen und anderen mitochondriellen Faktoren wie dem Second mitochondrial activator of caspases/direkt IAP-binding protein with low pI (smac/DIABLO) (24). Diese Prozesse führen zu der Aktivierung von Caspasen, einer Familie von cysteinabhängigen, aspartatspezifischen Proteasen, die durch Autoproteolyse oder andere Caspasen aus den inaktiven Procaspasen hervorgehen. Caspasen sind sowohl an der Weitergabe des Apoptosesignals in die Zelle, oder Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium, als auch an der Ausführung des apoptoseinduzierten Zelltodes beteiligt. Die Freisetzung von Cytochrom C ist eng mit dem vollständigen Öffnen der dafür verantwortlichen Poren verknüpft (63). Allerdings ist der genaue Mechanismus der Cytochrom C Freisetzung noch nicht aufgeklärt.



Abbildung 1-2: Strukturformel von DiOC<sub>6</sub>(3).

Vorausgegangene Studien zeigten mittels Durchflußzytometrie, dass sich das Mitochondrienmembranpotential dem fluoreszierenden Farbstoff 3.3'-Δψ mit Dihexyloxacarbocyaninjodid (DiOC<sub>6</sub>(3)) (Abb. 1-2) darstellen lässt. (77, 120). Es handelt sich hierbei um ein positiv geladenes, membrangängiges, Molekül, dass in der stark negativ geladenen Mitochondrienmembran akkumuliert. Zellen mit intaktem  $\Delta \psi$  zeigen eine starke Fluoreszenz, während Zellen mit zusammengebrochenem  $\Delta \psi$  keine Fluoreszenz erkennen lassen. In dieser Arbeit wurde die Messung des  $\Delta \psi$  mit DiOC<sub>6</sub>(3) als ein weiterer Apoptosemarker verwendet.

#### 1.2.2 AICD, ACAD und PPARy-vermittelte T-Zell-Apoptose

Die Mehrheit der im Infektionsverlauf aktivierten antigen-spezifischen T-Lymphozyten sterben infolge einer komplexen Immunantwort. Dieser Zelltod ist wichtig für das Verhindern von Autoimmunkrankheiten, um metabolische Kosten des Organismus gering zu halten und eine Zellhomöostase zu gewährleisten. Wenigstens zwei verschiedene Arten des Zelltodes können innerhalb der Immunregulation auftreten (Aktivierungs-induzierter Zelltod ,AICD', Aktivierungs-autonomer Zelltod der T-Zellen ,ACAD'), eingeleitet und durch Todesrezeptoren wie Fas (= fibroblast associated; syn.: APO1 (for apoptosis1, CD95). Beim sogenannten Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) induziert der T-Zellrezeptor (TZR) Apoptose in aktivierten T-Zellen des peripheren lymphoiden Systems. AICD eliminiert so die potenziell schadenden selbst-reaktiven T-Zellen und verhindert eine unlimitierte Expansion der T-Zellen während einer Immunantwort. Im Gegensatz zu dem AICD, der auch als "aktiver Zelltod' beschrieben wird, entspricht der ACAD einem ,passiven' Geschehen, eingeleitet durch die Veränderungen im Zytokinprofil der Zelle und nicht durch den T-Zell-Rezeptor.

In Anbetracht der reduzierten Lymphozytenzahl im septischen Geschehen (2) sowie der Kenntnisse über die antiinflammatorischen, jedoch proapoptotischen Kapazitäten von PPARγ (16) sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage beantwortet werden, ob PPARγ in den Zelltod aktivierter T-Lymphozyten, und somit in die Pathogenese der Sepsis, eingreift, und welche Mechanismen der beobachteten T-Zell-Depletion zugrunde liegen.

Die Bedeutung von PPARy in der T-Zell-Apoptose wurde erstmals von Harris und Phipps am murinen Tiermodell gezeigt (32, 33). Demzufolge findet man sowohl in unbehandelten als auch in aktivierten T-Zellen die Expression von PPARy mRNA und das Vorhandensein von PPAR $\gamma$ 1-Protein. Simultane Zugabe bekannter PPAR $\gamma$ -Agonisten (15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin (J<sub>2</sub> 15d-PGJ<sub>2</sub>), Ciglitazon, Troglitazon) mit den klassischen T-Zell-Aktivierungsreagenzien, Phytohämagglutinin (PHA) oder Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)/Ionomycin, zu den Zellen führte diese in den Zelltod. Die weitere Differenzierung des PPARy-vermittelten **T-Zelltodes** Nachweis erfolgte mit dem der Phosphatidylserintranslokation (Annexin-V-FITC/PI-Assay). Dabei ergaben die durchflußzytometrischen Analysen, dass dieser Zelltod Folge apoptotischer Prozesse war, was mit Hilfe morphologischen Parameter (Chromatinkondensation, Bildung von Ausstülpungen und Bläschen an der Cytoplasmamembran) bestätigt werden konnte. Zum Ausschluss PPARyunabhängiger Apoptose, wurden die aktivierten T-Zellen gesondert mit WY14643, einem spezifischen PPAR $\alpha$ -Agonisten, behandelt. Dies hatte jedoch keinen Einfluß auf die Viabilität der Zellen (32). In nachfolgenden Studien wurde die Rolle der PPAR $\gamma$ -vermittelten T-Zell-Apoptose an humanen T-Zelllinien beschrieben. Die Inkubation mit dem natürlichen PPAR $\gamma$ -Liganden 15d-PGJ<sub>2</sub> führte transformierte T-Lymphozyten direkt in die Apoptose (34). An diese Publikationen anknüpfend, wurden die Versuche in dieser Arbeit auf aktivierte, primäre, humane T-Zellen erweitert, sowie die gewonnenen Kenntnisse hinsichtlich ihrer Relevanz für die T-Zell-Depletion in der Sepsis untersucht.

#### **1.3 Peroxisomproliferator-aktivierender Rezeptory (PPARy)**

PPAR $\gamma$  wurde ursprünglich als ein entscheidender Faktor in der Adipogenese und im Glukosemetabolismus identifiziert (85, 112). Darüber hinaus ist bekannt, dass PPAR $\gamma$  die Zelldifferenzierung und den Lipidstoffwechsel in diversen Zellsystemen moduliert, und somit in Signalwege eingreift, die bei der Entstehung von metabolischen Erkrankungen eine Rolle spielen (107). Gegenwärtig rücken die antiinflammatorische sowie proapoptotische Wirkung von PPAR $\gamma$  im Entzündungsgeschehen zunehmend in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses (76).

PPAR steht für "Peroxisome Proliferator Activated Receptor". Innerhalb der Familie der PPARs sind drei verschiedene Gene, PPAR-alpha (PPAR $\alpha$ ), PPAR-beta/delta (PPAR $\beta/\delta$ ) und PPAR-gamma (PPAR $\gamma$ ) charakterisiert.

#### 1.3.1 Das humane PPARy-Gen

Das ca. 100 kb umfassende humane PPAR $\gamma$ -Gen befindet sich auf dem Chromosom 3p25 (31). Der codierende Bereich des Gens (Abb. 1-3), besteht aus 9 Exons (Exon A1, Exon A2, Exon B und Exon 1 - Exon 6) (25). Bedingt durch unterschiedliche Spleißvarianten sowie vier verschiedene Promotorregionen ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3 und  $\gamma$ 4) (25, 26, 81, 97) ergeben sich vier mögliche PPAR $\gamma$ -mRNAs (PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3 und PPAR $\gamma$ 4). Die Exons 1 bis 6 sind in allen vier Isoformen vorhanden, während nur PPAR $\gamma$ 1 die nicht-translatierten Exons A1 und A2

aufweist. PPARγ2 schließt zusätzlich Exon B ein (25, 26), das von einem internen Startcodon translatiert wird und für 28 zusätzliche Aminosäuren kodiert. Das untranslatierte Exon A2 ist Bestandteil von PPARγ3 (26). PPARγ4 besteht nur aus den Exons 1-6 (97).

Die Existenz vier möglicher mRNA's (messenger-RNA) für PPARγ legen ein eng kontrolliertes und gewebespezifisches Expressionsmuster von PPARγ nahe. PPARγ1 wird ubiquitär in allen Zellen exprimiert (67), PPARγ2 hauptsächlich in Adipozyten (80) und PPARγ3 in Makrophagen, T-Lymphozyten, Adipozyten sowie in Zellen des Dickdarms (26, 99). Über das Expressionsmuster von PPARγ4 existieren bisher keine Daten (97).



Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des humanen PPARy-Gens.

#### 1.3.2 Die Proteinstruktur von PPARy

PPARγ1, 3 und 4 kodieren für dasselbe Protein, bezeichnet als PPARγ1. Dieses ist im humanen System aus 477 Aminosäuren aufgebaut. PPARγ2 kodiert für das Protein PPARγ2, welches zusätzlich 28 Aminosäuren an seinem N-terminalen Ende aufweist.

Der Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktor PPARγ gehört zu der Gruppe der Steroidhormon-ähnlichen nukleären Rezeptoren (9). Nukleäre Rezeptoren besitzen einen modularen Aufbau, bestehend aus verschiedenen Regionen, welche autonomen funktionellen Domänen entsprechen. Ein typischer nukleärer Rezeptor besteht aus einer variablen NH<sub>2</sub>-terminalen Region (A/B), einer konservierten DNA-bindenden Domäne (DBD), Region C, einer verbindenden Region D, und einer konservierten E Region, welche die Ligandenbindende Domäne (LBD) einfasst (Abb. 1-4). Außerdem gibt es Regionen, die für die transkriptionelle Aktivierung zuständig sind. Die hypervariable A/F Region vieler Rezeptoren beinhaltet eine autonome transkriptionelle Aktivierungsfunktion. Diese als AF-1 bezeichnete Region bewirkt die ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors. AF-2, eine zweite transkriptionelle, ligandenabhängige Aktivierungsdomäne ist in der LBD Region lokalisiert. (1)



Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Peroxisomproliferator-aktivierenden Rezeptoren (PPARs).

Die nachfolgend beschriebene Struktur des PPARγ1-Proteins wurde von Nolte *et al.* mit der Methodik der sogenannten Röntgen-Raman-Streuungs-Methode aufgeklärt (71) und ist im wesentlichen übereinstimmend mit den Strukturen anderer Steroidhormon-ähnlicher nukleärer Rezeptoren (1). Funktionell lässt sich das Protein in vier Domänen unterteilen: Erstens, die N-terminal gelegene Liganden-unabhängige Aktivierungsdomäne (A/B), mit der aktivierenden Funktion ,AF1' (111), zweitens, die DNA-Bindungsdomäne (DBD) ,C', welche aus zwei Zinkfingermotifen, besteht, drittens, die Gelenkdomäne ,D', und die LBD/AF2-Domäne ,E/F' am C-terminalen Ende des Proteins. E/F beinhaltet eine Liganden-Bindungsdomäne und eine Heterodimerisierungs-Domäne. Die am C-Terminus designierte aktivierende Funktion 2 (AF2) schließt die Liganden-abhängige Transaktivierungsdomäne ein (71).

#### 1.3.3 PPARy-Liganden

Die Bindung eines spezifischen Liganden an PPARγ bedingt die nachfolgende Heterodimerisierung mit einem weiteren nukleären Rezeptor, dem Retinoid X Rezeptor (RXR) (23). Der PPARγ-RXR Komplex bindet an der DNA an das sogenannte "peroxisome proliferating response element" (PPRE), welches aus der zweimaligen Abfolge der Consensus Sequenz AGGTCA besteht, und aktiviert die Transkription entsprechender Zielgene, beispielsweise das CD36 (106) (Abb. 1-5). CD36 ist ein Rezeptor, der auf Makrophagen exprimiert und durch sein Substrat "Oxidized low density lipoprotein" (oxLDL) und weitere Zytokine, wie IL-4 stimuliert wird (70).



**Abbildung 1-5: Modulation der Gentranskription durch PPAR.** Die Bindung eines Liganden an PPAR führt zur Aktivierung und nachfolgende Heterodimerisierung mit dem RXR. Der PPAR-RXR-Heterodimer bindet mit seinen Bindungsdomänen an die Consensus Sequenz 5'-AGGTCA AGGTCA-3' und initiiert die Transkription diverser Zielgene, z.B. CD36.

Es werden zwei Gruppen von PPARγ Liganden unterschieden: natürlicherweise vorkommende und synthetisch herstellbare.

#### Natürliche Liganden

Zu den natürlicherweise vorkommenden Liganden gehören Fettsäurederivate wie 15d-PGJ<sub>2</sub> (50), die Linolsäurederivate 9-Hydroxyoktadekadien-Säure (9-Hode), 13-Hydroxyoktadekadien-Säure (13-Hode) (Abb. 1-6) sowie die essentielle Fettsäure Linolensäure (5). Die PPAR $\gamma$ -Bindungsaffinitäten dieser physiologischen Liganden sind wesentlich geringer als die der synthetischen Substanzen. Außerdem existieren bisher noch keine Kenntnisse über deren intrazelluläre Konzentrationen und somit über das tatsächliche, PPAR $\gamma$ -bedingte, Wirkungspotential. Im Monozyten/Makrophagen-Untersuchungssystem wurde darüber hinaus endogenes NO als PPAR $\gamma$ -Aktivator beschrieben (105). Inwieweit NO dabei direkt auf PPAR $\gamma$  einwirkt und auf diese Weise aktiviert oder eine Signalkaskade auslöst, an deren Ende die Bildung eines PPAR $\gamma$ -Agonisten steht, ist noch unklar.



**Abbildung 1-6: Strukturformeln ausgewählter natürlicher PPARγ-Liganden.** (A) 15d-PGJ<sub>2</sub>, (B) 9-Hode, (C)13-Hode.

#### Synthetische Liganden

Die bekanntesten synthetischen Verbindungen, die als Agonisten von PPAR $\gamma$  fungieren, sind die Thiazolidindione (TZDs) (5). Rosiglitazon (BRL49653), beispielsweise bindet mit sehr hoher Affinität an den Rezeptor (K<sub>d</sub> ~ 40 nM), während Pioglitazon, Englitazon und Ciglitazon mittlere Affinitäten aufweisen (5, 55) (Abb. 1-7). Diese oral verabreichten Antidiabetika wirken über PPAR $\gamma$  einer Insulin-Resistenz entgegen. TZDs induzieren weiterhin die Differenzierung von Adipozyten und erhöhen die Expression von Genen, die an der Adipozytenregulation beteiligt sind, z.B. das des Adipozyten Fettsäure-bindende Protein2 (aP2) (45).

Neben diesen agonistisch wirkenden Verbindungen, konnten synthetische Liganden mit PPARγ-antagonisierendem Potential identifiziert werden. Bisphenol-a-diglycidyl-ether (BADGE) hemmt die Adipozytendifferenzierung (114). PD068235 blockiert ebenfalls die Adipozytendifferenzierung in einer frühen Phase, besitzt aber nicht die Fähigkeit den Phenotyp differenzierter Adipozyten umzukehren (12). LG100641, ein weiterer Antagonist, hemmt einerseits die Adipozytendifferenzierung, stimuliert aber andererseits in 3T3-L1-Zellen (Adipozyten) die Glukoseaufnahme (67). Über die Adipositas- oder Insulinresistenzreduzierenden Kapazitäten dieser PPARγ Inhibitoren liegen indes keine *in vivo* Befunde vor (84). Dagegen beschreiben Rieusset *et al.* Dimethyl a-(dimethoxyphosphinyl)-p-chlorobenzyl phosphat (SR-202) als einen spezifischen PPARγ Antagonist, mit den Fähigkeiten zur Verminderung der Adipositas und Erhöhung der Insulinsensitivität *in vitro* und *in vivo* (84).



**Abbildung 1-7: Strukturformeln ausgewählter synthetischer PPARγ-Liganden.** (A) Rosiglitazon (BRL49653), (B) Pioglitazon, (C) Englitazon und (D) Ciglitazon.

#### 1.3.4 Expression von PPARy in T-Zellen

Ursprünglich wurde PPAR $\gamma$  als ein Regulator der Adipozytendifferenzierung und des Lipidstoffwechsels charakterisiert (14, 100, 101). Später beschreiben Clark *et al.* die Expression von PPAR $\gamma$ 1 in murinen Typ 1 Helferzellen und T-Zellen der Milz (19). Neuere Arbeiten zeigen eine PPAR $\gamma$ -Expression in humanen peripheren T-Lymphozyten (118).

Über die vollständige Funktion von aktivem PPARγ ist bis heute sehr wenig bekannt, auch wenn man davon ausgeht, dass der Transkriptionsfaktor bei der Regulation des Immunsystems eine wichtige Rolle spielt (18). Sowohl native, als auch aktivierte murine T-Lymphozyten und ruhende humane T-Zellen exprimieren mRNA und Protein für PPARγ1 (32), obwohl gegensätzliche Befunde davon ausgehen, dass in ruhenden T-Lymphozyten keine PPARγ-Expression vorliegt (34, 110). In transformierten T-Zelllinien, wie Jurkat oder CEM Zellen, existiert eine moderate PPARγ-Expression (34, 110). Daher wählte ich, neben den Arbeiten mit primären CD3+ T-Zellen, Jurkat Zellen für die Bearbeitung meiner Hypothesen.

Für die Funktion des Transkriptionsfaktors ist dessen Aktivierung mit den entsprechenden Liganden erforderlich. Werden T-Zellen beispielsweise gleichzeitig mit einem Agonisten und einer T-Zell-aktivierenden Substanz behandelt, erfolgt eine PPARy-bedingte Hemmung der nuclear factor of activated T cells- (NF-AT) abhängigen Genexpression, und damit eine Reduktion der Aktivierung sowie der Proliferation (32, 34, 118). In CD4+ T-Zellen reduzierte aktives PPARy die anti-CD3-induzierte Expression von Interferon- $\gamma$ , einem proinflammatorisch wirkenden Modulator (62). Zusätzlich hat man in T-Zellen eine Hemmung des aktivierenden Proteins (AP-1) und des Nukleären Faktor-*k*B (NF-*k*B) durch Sammelbegriff, PPARγ nachgewiesen (109). AP-1 ist ein stellvertretend für Transkriptionsfaktoren, die zusammengesetzt sind aus Untereinheiten von Jun, FOS oder dem aktivierenden Transkriptionsfaktor (ATF), welche alle dieselbe DNA-Sequenz, die AP-1bindende Erkennungssequenz, binden. Die AP-1-Faktoren haben funktionelle Bedeutung bei der Zellproliferation und der Zellvitalität (47). Die NF-kB Familie von Transkriptionsfaktoren ist ebenso für die Regulation von verschiedenen zellulären Vorgängen, wie Zellwachstum, Zellentwicklung oder das Induzieren einer Immunantwort, verantwortlich. Neben dieser, die Zytokinexpression reduzierenden, antiinflammatorischen Funktion, gewinnt, wie unter 1.2.2 beschrieben, die proapoptotische Rolle von PPARγ zunehmend an Bedeutung.

#### 1.4 Zielstellung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der PPARγ-vermittelten Apoptose in aktivierten T-Zellen sowie die Übertragung der, am T-Zellkulturmodell Jurkat und primären CD3+ T-Zellen, erhobenen Daten auf primäres, humanes Sepsismaterial. Folgende Schwerpunkte sollten dabei experimentell bearbeitet werden:

- Initial sollte die zeit- und konzentrationsabhängige PPARγ-Expression in Jurkat Zellen und primären CD3+ T-Lymphozyten nach der Behandlung mit dem T-Zell-Mitogen PHA sowie die PPARγ-Promotoranalyse in aktivierten T-Zellen mithilfe RT-PCR bestimmt werden.
- Anschließend war es von Bedeutung die Aktivität des Transkriptionsfaktors in Abhängigkeit der Mitogen-Stimulation sowie nach der Behandlung mit PPARγ-Agonisten durch Gelshift-Experimente nachzuweisen.
- Nachdem eine Aktivität von PPARγ durch Liganden-Zugabe festgestellt werden konnte, sollte die funktionelle Wirksamkeit des aktivierten Transkriptionsfaktors hinsichtlich seines proapoptotischen Potentials untersucht werden.
- Als potentieller Apoptosemechanismus in T-Zellen wurde geprüft, ob die postulierte PPARγ-vermittelte Apoptose über das Fas/FasL-System verläuft.
- Sepsis ist durch eine exzessive Depletion der T-Zellen gekennzeichnet. Dieser Zelltod sollte verifiziert, und darüber hinaus charakterisiert werden. Besondere Bedeutung sollte der Nachweis der PPARγ-Expression in den septischen T-Zellen sowie die funktionelle Wirksamkeit hinsichtlich der Apoptose erhalten.

## 2. Materialien und Chemikalien

#### 2.1 Materialien und Geräte

Durchflußzytometer (FACS Calibur) Elektroporator (EasyjecT Plus) Elektroporationsküvetten (4 mm) Elektrophoreseeinheit (Power Supply PS3002) Elektrophoresekammern Entwicklungsmaschine (Optimax TR) Geldokumentationssystem Inkubator (IG 150) Nylonmembran (Nytran Supercharge) Luminometer (Lumat LB 9507) Photometer (Ultrospec 2100 pro)

Pipetten (2 μl, 10 μl, 100 μl, 1000 μl)
Plastikmaterialien (Zellkultur)
Sterilwerkbank (Holten LaminAir)
Thermomixer (Compact)
Thermocycler (Mastercycler)
Trans-blot SD
UV-Transilluminator
Vortexer
Whatmann-Papier
Zellisolationseinheit (MACS Separation Unit)

#### Zentrifugen

Biofuge 13 R CR 322 **BD** Biosciences, Heidelberg PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen Eppendorf, Köln Invitrogen GmbH, Karlsruhe BioRad Laboratories, München MS Laborgeräte, Wiesloch Raytest GmbH, Straubenhardt Jouan GmbH, Unterhaching Schleicher & Schuell, Dassel Berthold Technologies, Bad Wildbad Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg Eppendorf, Köln Greiner bio-one, Frickenhausen Jouan GmbH, Unterhaching Eppendorf, Köln Eppendorf, Köln BioRad Laboratories, München Raytest GmbH, Straubenhardt Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Schleicher & Schuell, Dassel Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Heraeus Instruments GmbH, Hanau Jouan GmbH, Unterhaching
# 2.1.1 Kits

Advantage Genomic PCR Kit	Clontech Laboratories, Heidelberg
Advantage RT-for-PCR Kit	Clontech Laboratories, Heidelberg
Annexin V-FITC/Propidiumjodid Apoptose Kit	Coulter-Immunotech, Hamburg
Bio-Rad II Kit	BioRad Laboratories, München
DIG Gel Shift Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 2.1.2 Software

Aida Image Analyzer, Version 3.11	Raytest GmbH, Straubenhardt
BD Cell Quest Pro	BD Biosciences, Heidelberg

# 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden in kommerziell höchst erhältlichem Reinheitsgrad verwandt.

Acrylamid-Bis-Fertiglösung (40%, 37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> CL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Deisenhofen
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Deisenhofen
Chloroform	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Disodium 3-(4-methoxyspiro	
{l,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan}	
-4-yl) phenyl phosphate (CSPD)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Deisenhofen
3,3'-Dihexyloxacarbocyaninjodid (DiOC <sub>6</sub> (3)	Molecular Probes, Leiden (Niederlande)
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt

Ethylenglycoltetraaceticacid (EGTA) Ethanol (EtOH) Ethidiumbromid

Glycerol Glycin Größenmarker für Agarose-Gelelektrophorese (1000 bp, 100 bp) 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) Isopropanol Kaliumchlorid (KCl) Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>) Kaliumhydroxid (KOH) Ladepuffer für Agarose-Gelelektrophorese Luciferase-Substrat Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) Natriumchlorid (NaCl) Nonidet P-40 Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)

Propidiumiodid (PI) RNAPure<sup>TM</sup> Reagenz Tetramethylendiamin (TEMED)  $\alpha, \alpha, \alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris) Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg

PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Roth, Karlsruhe Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Merck EuroLab GmbH, Darmstadt PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen Promega GmbH, Mannheim Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Merck EuroLab GmbH, Darmstadt ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Coulter-Immunotech, Hamburg PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen Roth, Karlsruhe Merck EuroLab GmbH, Darmstadt

#### 2.3 Antikörper

anti-PPARα (polyclonal) anti-PPARγ (polyclonal) anti-Fas-neutralisierend (monoclonal) anti-Fas (monoclonal) Santa Cruz, Heidelberg Alexis, Grünberg Upstate, Milton Keynes, England Santa Cruz, Heidelberg

# 2.4 Antikörper zur Zellisolierung- und Analyse

Die folgenden Antikörper wurden bei der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, erworben.

anti-CD3-Fluorescein Isothiocyanat/anti-CD19-Phycoerythrin (anti-CD3-FITC/anti-CD19-PE) anti-CD45-Fluorescein Isothiocyanat/ anti-CD14-Phycoerythrin (anti-CD45-FITC/anti-CD14-PE) anti-CD3-Micro Beads anti-CD14-Micro Beads

# 2.5 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Fötales Kälberserum (FCS)	Ro
L-Glutamin	PA
Lymphozytentrennmedium	PA
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	
(Instamed 9,55 g/ml)	Bi
Penicillin/Streptomycin	PA
RPMI 1640, ohne L-Glutamin	PA

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim PAA Laboratories GmbH, Cölbe PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Biochrom AG, Berlin PAA Laboratories GmbH, Cölbe PAA Laboratories GmbH, Cölbe

## 2.6 Oligonucleotide

## 2.6.1 Primer für die PCR

Alle Primer wurden von Eurogentec, Seraing (Belgien) bezogen.

# Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) (47-1048), T<sub>A</sub> = 63 °C

5'-ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACGG-3';

3'-TTACTCCTTGGAGGCCATGTAGGGC-5'

**IL-2** (241-456), T<sub>A</sub> = 61°C

5'-TTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCC-3';

3'-ACCAACGACAGAGTAGACGTATAAGT-5'

**PPAR** $\gamma$  (548-1240), T<sub>A</sub> = 62 °C 5'-CATGCTTGTGAAGGATGCAAGGG-3'; 3'-GGACGCTTTCGGAAAACCACTGA-5'

**PPARy1**,  $T_A = 63^{\circ}C$ :

5'>3' GGTCGGCCTCGAGGACACCG

# **PPARy2**, $T_A = 63^{\circ}C$

5'>3' GTGAATTACAGCAAACCCCTATTCCATGC

# **PPARy3**, $T_A = 63^{\circ}C$

5'>3' Cattttgtcaacgagagtcagcctttaacg

# 2.6.2 DIG-markierte Oligonucleotide für den Gel-Shift

# PPRE,

5'-GGTAAAGGTCAAAGGTCAAT-3'

3'-ATTTCCAGTTTCCAGTTAGCCG-5'

# 2.7 Stimulanzien

Ciglitazon	Biomol, Hamburg, Germany
DEA-NONOate	Sigma, Deisenhofen, Germany
РНА	Sigma, Deisenhofen, Germany

SR-202	ILEX Oncology, Geneva, Switzerland
WY14643	Biomol, Hamburg, Germany
Carbobenzoxy-L-Asp-a-[2,6-dichlorobenzoyl)-	
oxy]methan (zVAD)	Biomol, Hamburg, Germany

## 2.8 Vektoren

pGL2-control	Promega GmbH, Mannheim
p(A-Ox <sub>3</sub> )-TKSL Plasmid	C.K. Glass, University of California, La
	Jolla

## 2.9 Zelllinien und primäre Zellen

Die humane T-Zelllinie Jurkat wurde 1976 aus dem Blut eines 14 jährigen Mannes mit akuter Leukämie etabliert (91).

Das für die Präparation von "peripheral blood mononuclear cells" (PBMC's) verwendete Blut wurde von gesunden Spendern (Kontrollprobanden) sowie von Patienten mit diagnostizierter Sepsis entnommen. Die septischen Patienten (Anhang, Tab. A-1) wurden von den Intensivstationen der Medizinischen Klinik IV, Universitätsklinik Erlangen, und dem Westpfalz-Klinikum, Kaiserslautern rekrutiert. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen Bayerns und Rheinland-Pfalz bewilligt. Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte stets am Tag der Blutentnahme.

## 2.10 Standardpuffer und Lösungen

## Erythrozyten-Lysepuffer

NH <sub>4</sub> Cl	155	mМ
KHCO3	10	mМ
EDTA	0,1	mМ

Hepes	20	mM	pH 7,9
NaCl	0,4	mM	
EDTA	1	mМ	
EGTA	1	mM	
DTT	1	mМ	
PMSF	0,5	mМ	

# Extraktionspuffer für Kernextrakte

Gelshift-Puffer D+ (10 x)	
---------------------------	--

Hepes	20	mМ	pH 7,9
Glycin	4	%	
EDTA	0,5	mM	
Nonidet P-40	0,025	%	
DTT	2	mМ	
PMSF	1	mM	

# Gelshift-Puffer F (5 x)

KCl	3	mМ	
Hepes	100	mМ	рН 7,9
Lymphozytentrennmedium	20	%	
DTT	10	mМ	
PMSF	1	mМ	

Glycerol-toleranter Gel-Puffer (20 x)	USB, Bad Homburg	
Glycerol-toleranter Gel-Puffer/ddH20	250	ml
Leukozyten-Waschpuffer		
EDTA/PBS	2	mM

# Leukozyten-Isolierungsspuffer

EDTA/PBS	2	mМ
BSA	0,5	%

EDTA

Lysepuffer für Kernextrakte			
Hepes	10	mМ	рН 7,9
KCl	10	mМ	
EDTA	0,1	mМ	
EGTA	0,1	mМ	
DTT	1	mМ	
PMSF	0,5	mМ	
Reporter Lysepuffer (1 x)	Promega GmbH, Mannheim		
Lysepuffer (5 x)/ddH <sub>2</sub> 0			
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)			
Tris-Acetat	40	mМ	
EDTA	1	mМ	pH 8,0
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)			
Tris-Borat	90	mМ	

1

mM pH 8,0

#### 3. Methoden

Falls nicht gesondert angemerkt wurden die gängigen molekularbiologischen Methoden - wie Agarose-Gelelektrophorese - entsprechend den Protokollen aus Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Weitere eingesetzte Kits wurden, sofern nicht gesondert angemerkt, entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

#### 3.1 Zellkultur

Die Kultur der humanen T-Zelllinie Jurkat, der humanen Dickdarmkrebs-Zelllinie Caco-2 sowie der primären humanen Blutzellen erfolgte in RPMI 1640, supplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min), 5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Die in Suspension kultivierten Jurkat-Zellen konnten alle 3 bis 4 Tage, nach dem Abzentrifugieren [500 x g, 5 min, Raumtemperatur (RT)] mit einer Verdünnung von 1:5 bis 1:10, geteilt werden.

Alle Arbeitsschritte in Verbindung mit der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die verwendeten Lösungen und Medien wurden auf 37 °C vortemperiert.

#### 3.2 Isolierung und Analyse der primären Zellen

Für die Analyse der Subpopulationen der ,peripheral blood mononuclear cells' (PBMC) wurde das Spenderblut 8 min mit 5 Vol Erythozyten-Lysepuffer bei RT inkubiert und zentrifugiert (300 x g, 10 min, RT). Vor dem Resuspendieren der Zellen in PBS wurden zwei Wasch- und Zentrifugationsschritte (200 x g, 10 min, RT) mit Erythozyten-Lysepuffer durchgeführt. Anschließend erfolgte die Vermessung der Proben an dem Durchflußzytometer FACS Calibur. Die Quantifizierung erfolgte in der Forward/Side Scatter Ansicht anhand der Cell Quest Pro Software durch das Festsetzen von Regionen um die einzelnen Subpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten). Die Angaben im Ergebnisteil entsprechen dem prozentualen Anteil der Subpopulation an den PBMC's.

Die Apoptose-Messungen erforderten eine Anreicherung der Zielzellen aus dem Vollblut. Zunächst wurden Lymphozytentrennmedium die PBMC's in mit einer Dichtegradientenzentrifugation (1000 x g, 10 min, RT) von den übrigen Blutbestandteilen separiert und anschließend die Zielzellen [Leukozyten (CD45+), Monozyten (CD14+) und T-Zellen (CD3+)] mit der MACS Technologie isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den Standardprotokoll der Firma Miltenvi Biotec GmbH. Um die Reinheit der gewonnenen Zellpopulationen zu bestätigen, wurden 20 µl der Zellsuspension für 20 min mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper [Leukozyten (anti-CD45-FITC), Monozyten (anti-CD14-FITC) und T-Zellen (anti-CD3-FITC)] inkubiert und im Durchflußzytometer mit der Fluoreszenz 1 (Ex 488 nm/Em 530/30 nm) analysiert. Die Reinheiten betrugen  $\geq$  97%. Die Zellen wurden in RPMI 1640, supplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min), 5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, vorkultiviert und nach 2 h für die Experimente verwendet.

#### 3.3 RNA-Präparation und Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (500 x g, 5 min, RT), der Überstand abgezogen, und das Zellpellett in 1 ml peqGold RNAPure<sup>TM</sup> lysiert. Nach 5 min Inkubation erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform. Das Gemisch wurde 15 s geschüttelt und weitere 10 min bei RT stehen gelassen. Die anschließende Zentrifugation (12.000 x g, 5 min, 4 °C) separierte die Probe in 3 Phasen. Die RNA, angereichert in der oberen wässrigen Phase, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und, durch die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol, präzipitiert. Die präzipitierte RNA wurde abzentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C), der Isopropanolüberstand entfernt und das Pellet zweimal mit 1 ml 75% Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (12.000 x g, 10 min, 4 °C) gewaschen. Das RNA-Pellett wurde kurz an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Das Erhitzen der RNA-Lösung auf 55 °C verbesserte die Lösbarkeit. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte am Photometer bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm und OD 280 nm. Eine OD bei 260 nm von 1,0 entspricht einer RNA-Menge von 40 µg/ml. Der Quotient aus OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> wurde zur Bestimmung der Reinheit genutzt. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Für die Reverse Transkription wurden 1  $\mu$ g der RNA zusammen mit den Reagenzien des Advantage RT-for-PCR Kits [1  $\mu$ l Oligo (dT)<sub>18</sub>-Primern, 4  $\mu$ l Reaktionspuffer (5 x), 1  $\mu$ l

dNTP-Mix (10 mM), 1  $\mu$ l MMLV Reverse Transkriptase ( $\geq 200$  Units/ $\mu$ g RNA) sowie 0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor (1 Unit/ $\mu$ l), DEPC-Wasser] pipettiert und, dem Standardprotokoll des Herstellers (Clontech Laboratories) folgend, im Thermocycler inkubiert. Die erhaltenen cDNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert oder sofort in der Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

Mit Hilfe der PCR wurden definierte Bereiche diverser Gene (siehe 2.6.1 Primer für die PCR) exponentiell amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden entsprechend dem Standardprotokoll (Clontech Laboratories) mit je 10 µl komplementärer DNA (cDNA), 3 µl 5'-Primer, 3 µl 3'-Primer sowie den Reagenzien des Advantage Genomic PCR-Kits [5 µl Reaktionspuffer (10 x), 1 µl Nukleotid-Mix (dNTP-Mix, 10 mM), 1 µl Advantage Genomic Polymerase Mix (50 x), dd-H<sub>2</sub>O] angesetzt und in einem Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert:

#### **PCR-Inkubationsschema**

	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	63 °C	1 min
Extension	72 °C	90 sec
	72 °C	7 min
	Denaturierung Annealing Extension	94 °CDenaturierung94 °CAnnealing63 °CExtension72 °C72 °C

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 1,2% igem Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurden 1,2% Agarose in TBE-Puffer (1 x) bis zur Schmelze der Agarose erhitzt, auf dem Magnetrührer abgekühlt und in die Gelform gegossen. 25  $\mu$ l Probe wurden mit 5  $\mu$ l Farbmarker (6 x) versetzt und in die auspolymerisierten Geltaschen aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden ferner 5  $\mu$ l Größenmarker auf das Gel pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt über 2 h. Das Gel wurde abschließend 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5  $\mu$ g/ml) gefärbt und mit dem Geldokumentationssystem unter Ultraviolettem- (UV) Licht detektiert. Mit Hilfe der Computersoftware Aida Image Analyzer wurden die ermittelten Desoxyribonukleinsäure- (DNA) Fragmente ausgewertet.

#### 3.4 Gelshift-Assay (EMSA)

#### 3.4.1 Herstellung von Kernextrakten

Zur Präparation von Kernextrakten wurden 4 x  $10^6$  Zellen in 0,8 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl 10% Nonidet P-40 wurde der Ansatz 10 s auf dem Vortex gemischt und das Homogenat zentrifugiert (8000 x g, 30 s, 4 °C). Nachdem Abpipettieren des Überstandes, wurde das Kernpellet in 50 µl Extraktionspuffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (13.000 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand, mit den darin gelösten Kernproteinen, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 3.4.2 Bestimmung der Kernproteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels Biorad II Kit (BioRad) nach der Methode von Lowry, dem Standardprotokoll des Herstellers folgend, bestimmt.

#### 3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA-Fragmenten zu untersuchen, kann man den Effekt ausnutzen, dass proteingebundene DNA gegenüber freier DNA eine Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität aufweist. Folgender Reaktionsansatz wurde für die Durchführung solcher Experimente gewählt:

Ansatz für EMSA		
Kernprotein	10	μg
DIG-markiertes Oligonukleotid	0,5	ng
Poly[dl/dC]	1	µg/µl
Gelshift-Puffer D+ (10 x)	2	μl
Gelshift-Puffer F	4	μl
ddH <sub>2</sub> O	20	μl

Die Einzelkomponenten wurden zusammen pipettiert und für 25 min bei RT stehen gelassen. Die Separation der Protein/DNA-Komplexe erfolgte in einem 6%- (Gelshift) bzw. 4%-(Super-Gelshift) Gel, welche in die - mit Glycerol-tolerantem Puffer (1 x) gefüllte - Blot-Apparatur gegeben wurden. Der 1stündige Gellauf erforderte 80 V.

#### 3.4.4 Transfer und Detektion

Nach Beendigung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel im Semi-Dry-Blotverfahren (1,3 mA/cm<sup>2</sup>, 90 min) auf eine Nylonmembran geblottet. Nachdem Whatmann-Filter und Membran in TBE-Puffer (0,5 x) getränkt wurden, erfolgte der Aufbau des Blots in folgender Reihenfolge: 3 Blatt Whatmann-Papier, Nylonmembran, Polyacrylamidgel, 2 Blatt Whatmann-Papier. Im Anschluß an den Proteintransfer wurden die DNA-Proteinkomplexe durch UV-crosslinken (5 min) auf die Membran fixiert. Diese wurde dann für die Detektion mit CSPD (Roche), einem Chemilumineszenz-Substrat, nach folgendem Schema vorbereitet:

#### Detektionsschema

Waschpuffer	5 min	
Blockierungslösung	1 h	
Antikörperlösung	1 h	
Waschpuffer	15 min	3 x
Detektionspuffer	5 min	
CSPD® Arbeitslösung	5 min	

Alle Lösungen wurden gemäß dem DIG Gel Shift Kit-Standardprotokoll (Roche) angesetzt und verwendet.

#### 3.5 Analyse des Zelltods (Apoptose/Nekrose)

#### **3.5.1 Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials** ( $\Delta \psi$ )

Zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) wurde das Fluorochrom DiOC<sub>6</sub>(3) verwendet. DiOC<sub>6</sub>(3) ist ein positiv geladenes Molekül, das, in geringen

Konzentrationen eingesetzt, selektiv durch die negativ geladene Mitochondrienmembran permeiert und im Mitochondrium akkumuliert. Das Emissionsmaximum des Farbstoffs liegt bei  $[\lambda] = 501$  nm.

Nach Beendigung der individuellen Behandlung, wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension mit 40 nM  $DiOC_6(3)$  für 30 min inkubiert. Es folgte die unmittelbare Vermessung der Proben bei Fluoreszenz 1 an dem Durchflußzytometer mit Unterstützung der BD Cell Quest Pro-Software. Dabei wurden mindestens 10.000 Zellen für die Messung angereichert.

#### 3.5.2 Nachweis der Phosphatidylserintranslokation mit Annexin V

Eine der Veränderungen an der Zelle, die während der Apoptose stattfinden ist die Translokation des Phosphatidylserins (PS) von der inneren- in die äußere Plasmamembran, wodurch PS an der Zelloberfläche exponiert wird. Die Translokation des PS ist jedoch nicht nur Kennzeichen für den Zelltod infolge von Apoptose, sondern ebenso von Nekrose. Der Unterschied zwischen diesen beiden Formen des Zelltodes besteht darin, dass bei der frühen Apoptose die Zellmembran noch intakt ist, während diese sofort mit Einsetzen des nekrotischen Geschehens ihre Integrität verliert und für Farbstoffe wie Propidiumiodid (PI) durchlässig wird. PI ist ein DNA-interkalierendes Fluorochrom (Ex 550 nm/Em 617 nm). Zur Unterscheidung zwischen Nekrose wurden V-Apoptose und das Annexin FITC/Propidiumjodid Apoptose Kit (Coulter-Immunotech) eingesetzt. Das Absorptionsmaximum von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) liegt bei 492 nm, das Emmissionsmaxium bei 520 nm

Nach einer Zentrifugation (500 x g, 5 s, 4 °C) wurde die Zellzahl der geernteten Zellen auf 1 x  $10^{6}$  Zellen/ml Bindungspuffer (1 x) eingestellt. Zu 100 µl der Zellsuspension wurden 5 µl Annexin V-FITC sowie 2,5 µl PI pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde lichtgeschützt 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde zu den angefärbten Zellen 0,2 ml eiskalter Bindungspuffer (1 x) pipettiert, und der Ansatz - bis zur durchflußzytometrischen Auswertung - lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte am FACS Calibur und mit Hilfe der BD Cell Quest Pro Software. Mittels einer Zweiparametermessung konnten parallel Annexin V-FITC-(Fluoreszenz 1) sowie PI-positive Zellen (Fluoreszenz 2, Ex 488 nm/ Em 585/42 nm) analysiert werden.

#### 3.6 Transfektion und Luciferase Assay

Jurkat-Zellen wurden mit 20 µg p(A-Ox<sub>3</sub>)-TKSL-Plasmid transfiziert. Das p(A-Ox<sub>3</sub>)-TKSL- Plasmid enthält drei Kopien des "peroxisome proliferating response element" (PPRE) auf dem humanen Acyl CoA oxidase-Gen, die 5' eines TK minimal Promotors liegen, gefolgt vom Luciferasegen als Reporter. Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zum Transfer von DNA in Eukaryontenzellen. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass kurze Hochspannungspulse "Löcher" in der Zellhülle verursachen, durch die exogene DNA in die Zelle aufgenommen werden kann. Dazu wurde die Zellzahl auf 5×10<sup>6</sup> Zellen/500 µl eingestellt. Die Zellsuspension vorgekühltes RPMI 1640 wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und mit 20 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Elektroporation (200 V; 900 µF). Die Zellen wurden in 6 ml Medium aufgenommen und je 1 ml in die Vertiefung einer 6-well Schale, die mit 4 ml Medium vorgelegt waren, überführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte 2 h nach der Transfektion. Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden die Zellen abzentrifugiert (1500 x g, 10 min, RT), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 450 µl Reporter-Lysepuffer resuspendiert. Die Probe wurde 10 min in den Gefrierschrank (-80 °C) gestellt, bei RT aufgetaut und zentrifugiert (12.000 x g, 15 sec, RT). 100 µl des Überstandes wurden im Luminometerröhrchen mit 100 µl Luciferase-Substrat versetzt und sofort für 20 s im Luminometer vermessen.

# 4. Ergebnisse

# 4.1 PPARy und Apoptose in aktivierten T-Zellen

#### 4.1.1 Expressions analyse von PPARy in humanen T-Zellen

In einem ersten Experiment untersuchte ich die Expression von PPAR $\gamma$  in T-Zellen in Abhängigkeit von der Aktivierung mit PHA, einem bekannten T-Zell-Mitogen. Als Zellsystem wählte ich Jurkat T-Zellen Nach deren Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen PHA (0,5 µg/ml, 1 µg/ml und 5 µg/ml) und unterschiedlich langen Stimulationszeiten (5 h, 15 h und 24 h), wies ich die Expression von PPAR $\gamma$  mittels RT-PCR nach. Darüber hinaus überprüfte ich die IL-2 Expression.

Nach 6 h, bei einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml PHA wurde eine erhöhte PPAR $\gamma$  Expression in Jurkat Zellen ersichtlich. Diese erhöhte PPAR $\gamma$  Expression erreichte nach 15 h ein Plateau und blieb bei 24 h unverändert hoch (Abb. 4-1). Die IL-2 Expression korrelierte mit der zunehmenden PHA-Konzentration. Die Stimulation mit 5  $\mu$ g/ml PHA für 15 h ergab die höchste IL-2 Expression, welche nach 24 h nicht verstärkt wurde. Deshalb verwendete ich in den weiteren Versuchen 5  $\mu$ g/ml PHA und aktivierte die Jurkat Zellen für 15 h.



Abbildung 4-1: Expression von PPAR $\gamma$  in aktivierten Jurkat T-Zellen. Die Zellen (4 x 10<sup>6</sup>) wurden für 6 h, 15 h und 24 h mit 0,5 µg/ml, 1 µg/ml oder 5 µg/ml PHA inkubiert bzw. als unbehandelte Kontrolle belassen. Im Anschluss an die Ernte der Zellen erfolgte die Gesamt-RNA-Präparation für die Expressionsanalyse von (A) PPAR $\gamma$  und (B) IL-2 mittels semiquantitativer RT-PCR. Die Expression der (C) GAPDH diente zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Geldokumentationsbild von mindestens drei verschiedenen Experimenten.

Um diese Ergebnisse an primärem Material testen zu können, verifizierte ich diese Ergebnisse an humanen T-Zellen, die zuvor aus Vollblut gesunder Spender isoliert wurden. Dazu war es notwendig, die T-Zellen im Anschluss an die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll anzureichern, und die Reinheiten der Zellfraktionen zu überprüfen. Die Aufreinigung der primären T-Zellen überprüfte ich vor jedem Experiment durch Färbung mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpen (anti-CD3-FITC/anti-CD19-PE) und anschließender durchflußzytometrischer Messung (Abb. 4-2). Es ergaben sich für die T-Zellen stets Reinheiten größer 95%.



Abbildung 4-2: Reinheiten der Zellfraktionen nach dem magnetischen Zelltrennungssystem (MACS). Isolierte T-Lymphozyten [anti-CD3-FITC/anti-CD19-PE-markiert] dargestellt im (A) Dot Blot- versus (B) Histogrammformat. Die Zellpopulationen wurden 30 min mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert und durchflußzytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt ein präsentatives Ergebnis.

Die aus Vollblut gesunder Spender gewonnenen primären, humanen CD3+ T-Zellen exprimierten PPAR $\gamma$  sowie auch IL-2 nach Stimulation mit 5 µg/ml und 10 µg/ml PHA für 24 h. Die längere Inkubationszeit von 48 h führte zu einer weiteren Erhöhung der PPAR $\gamma$ - und IL-2 Expression (Abb. 4-3). Für die nachfolgenden Versuche mit primären CD3+ T-Zellen aktivierte ich diese 24 h mit 10 µg/ml PHA.



Abbildung 4-3: Expression von PPAR $\gamma$  in aktivierten, primären humanen CD3+ Zellen. Expressionsanalyse von (A) PPAR $\gamma$  und (B) IL-2 mittels semiquantitativer RT-PCR. Die Expression der (C) GAPDH diente zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse. Die CD3+ Zellen (4 x 10<sup>6</sup>) wurden 24 h und 48 h mit 5 µg/ml oder 10 µg/ml PHA inkubiert bzw. als unbehandelte Kontrolle belassen. Im Anschluss an die Ernte der Zellen erfolgte die Gesamt-RNA-Präparation. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Geldokumentationsbild von mindestens drei verschiedenen Experimenten.

Um zu differenzieren, welcher Promotor in aktivierten T-Zellen die PPAR $\gamma$  Transkription reguliert, führte ich PCR-Reaktionen mit drei verschiedenen Primersets, bestehend jeweils 5' aus PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 oder PPAR $\gamma$ 3-spezifischen Sequenzen und 3' aus einer einheitlichen Primersequenz, durch.

Sowohl in Jurkat Zellen (Abb. 4-4A) als auch in primären CD3+ T-Zellen (Abb. 4-4B) wird die PPAR $\gamma$  Transkription, ausgelöst durch die Aktivierung der Zellen mit PHA, durch den  $\gamma$ 3 Promotor induziert. Als Positivkontrolle der  $\gamma$ 3 PCR benutzte ich Caco-2 Zellen, für welche die Expression sowohl von PPAR $\gamma$ 1 als auch PPAR $\gamma$ 3 beschrieben ist (54) (Abb. 4-4C).



Abbildung 4-4: PPAR $\gamma$ 3-Promotorabhängige Expression von PPAR $\gamma$  in aktivierten T-Zellen. (A) Promotoranalyse von PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 und PPAR $\gamma$ 3. Jurkat T-Zellen (4 x 10<sup>6</sup>) wurden mit 5 µg/ml PHA für 15 h inkubiert. Im Anschluss an die Ernte der Zellen erfolgte die Gesamt-RNA-Präparation mittels semiquantitativer RT-PCR. (B) Promotoranalyse von PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 und PPAR $\gamma$ 3. Primäre, humane CD3+ Zellen (4 x 10<sup>6</sup>) wurden mit 10 µg/ml PHA für 24 h inkubiert bzw. als unbehandelte Kontrolle belassen. Im Anschluss an die Ernte der Zellen erfolgte die Gesamt-RNA-Präparation für die semiquantitativer RT-PCR. (C) Promotoranalyse von PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3. Caco-2 Zellen (4 x 10<sup>6</sup>) wurden ohne Stimulation über Nacht inkubiert. Es folgte die Gesamt-RNA-Isolation und eine sich anschließende semiquantitative RT-PCR. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Geldokumentationsbild von mindestens drei verschiedenen Experimenten.

#### 4.1.2 Aktivierung von PPARy in humanen T-Zellen

In einem nächsten Versuch ging ich der Frage nach, ob die analysierte PPARγ Expression mit der Aktivität Transkriptionsfaktors korreliert. Um die DNA-Bindung von PPARγ zu untersuchen, verwendete ich in einem Gelshift-Assay 5'-DIG-markierte Oligonukleotide, die eine spezifischen PPAR-Erkennungssequenz (PPRE) enthalten.

Weder nach 15 h noch nach 24 h Inkubationen der Jurkat T-Zellen mit ansteigenden PHA-Konzentrationen (0,5  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml) ergaben sich Bindungsreaktion zwischen den Zellkernextrakten und den Oligonukleotiden (Abb. 4-5).



Abbildung 4-5: Aktivierung von PPARy nach Stimulation der T-Zellen mit PHA. Jurkat T-Zellen wurden für (A) 15 h und (B) 24 h mit 0,5  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml oder 5  $\mu$ g/ml PHA inkubiert bzw. als unbehandelte Kontrolle belassen. Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  wurde in einem Gelshift-Assay nachgewiesen. Dazu verwendet wurden DIG-markierte Oligonukleotide mit einer spezifischen PPAR-Erkennungssequenz (s. Methoden). Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei verschiedenen Experimenten.

PPARs gehören, wie andere Rezeptoren für Steroid- und Schilddrüsenhormone, zur Familie der Liganden-aktivierbaren Transkriptionsfaktoren. Geht man davon aus, dass im Entzündungsgeschehen den Lymphozyten benachbarte Zellen physiologische PPAR $\gamma$ Agonisten, wie 15d-PGJ<sub>2</sub> oder NO, bereitstellen, ist es für meinem experimentellen Ansatz von Bedeutung, die Aktivierbarkeit von PPAR $\gamma$ , nach Zugabe von exogenen Liganden, zu untersuchen. Für diese Versuche verwendete ich den PPAR $\gamma$ -spezifischen synthetischen Liganden, Ciglitazon, sowie den physiologischen Agonisten 15d-PGJ<sub>2</sub>. und den NO-Donor DEA-NONOate. Als wichtiger proinflammatorischer Mediator spielt NO auch bei der Signaltransduktion im Entzündungsgeschehen eine immer größere Rolle. Um zu überprüfen inwieweit eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch NO in T-Zellen möglich ist, setzte ich in meinen Experimenten auch den NO-Donor DEA-NONATE als potentiellen PPAR $\gamma$  Aktivator ein.

Ich behandelte die Zellen 15 h mit 5 µg/ml PHA und anschließend für 1 h mit dem jeweiligen Agonisten. Die Protein-DNA-Bindungsreaktion aus Zellkernextrakten der Jurkat Zellen und den DIG-markierten Oligonukleotiden ergab eine erhöhte PPARy-Aktivität nach der Behandlung der PHA-aktivierten Zellen mit 3 µM Ciglitazon im Vergleich zu den PHAaktivierten Zellen ohne Ciglitazon (Abb. 4-6A). Demgegenüber erzielte die Behandlung der Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO allein, DMSO zusammen mit Ciglitazon, PHA allein bzw. PHA gemeinsam mit DMSO keine PPARy Bindungsreaktion. Ebenso steigerten die physiologischen PPAR $\gamma$  Agonisten 15d-PGJ<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) und NO, ausgehend von dem NO-Donor DEA-NONOate (10 µM), die Aktivität des Transkriptionsfaktors (Abbildung 4-6B). Für einen finalen Beweis der PPARy-Aktivität führte ich ein Supershift Experiment durch (Abb. 6C). Dafür stimulierte ich primäre CD3+ T-Zellen 24 h mit PHA (10 µg/ml) und weitere 4 h mit Ciglitazon (3 µM). Zusätzlich inkubierte ich die isolierten Zellkernextrakte mit einem PPARy Antikörper bzw., um unspezifische Bindungen auszuschließen, mit einem PPARa Antikörper. Wie in der zweiten Spur des Gels ersichtlich bedingte die spezifische Bindung zwischen den PPARy Kernproteinen und dem PPARy-Antikörper, eine Verlagerung des PPARy Signals. Die Zugabe des PPARa Antikörpers (siehe dritte Spur, Abb. 4-6C) blieb jedoch ohne Effekt.



Abbildung 4-6: Aktivierung von PPARy nach Stimulation der T-Zellen mit PPARy-Agonisten. (A) Jurkat T-Zellen (1 x 10<sup>7</sup>) wurden für 15 h mit 5 µg/ml PHA und 1 h vor der Gewinnung der Kernextrakte mit 3 µM Ciglitazon inkubiert bzw. als unbehandelte Kontrolle belassen. (B) Jurkat T-Zellen (1 x 10<sup>7</sup>) wurden 15 h mit 5 µg/ml PHA und 1 h vor der Gewinnung der Kernextrakte mit 1 µM 15d-PGJ<sub>2</sub> oder 10 µM DEA-NONOate inkubiert bzw. als unbehandelte Kontrolle belassen. Für den (C) Supershift wurden anti-PPAR $\alpha$  (Bahn 3) oder anti-PPAR $\gamma$  (Bahn 2) -Antikörper eingesetzt. Bahn 1 zeigt die Aktivierung von PPAR $\gamma$ ohne Antikörperzugabe. Die Abbildungen A bis C zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von drei verschiedenen Experimenten.

#### 4.1.3 PPARy-Agonisten und Apoptose in aktivierten T-Zellen

In einem nächsten Schritt ging ich der Frage der funktionellen Wirksamkeit des aktivierten PPAR $\gamma$  in T-Zellen nach und analysierte die Veränderungen des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) anhand DiOC<sub>6</sub>(3) Färbung nach der PPAR $\gamma$ -Aktivierung in T-Zellen.

Zu Beginn aktivierte ich Jurkat Zellen für 15 h mit PHA (5 µg/ml) und stimulierte diese weitere 4 h mit 15d-PGJ<sub>2</sub> (1 µM). In den Kontrollen inkubierte ich zum einen 19 h mit PHA (5 µg/ml) allein und zum anderen, im Anschluss an die 15 h Inkubation ohne Reagenz, 4 h mit 15d-PGJ<sub>2</sub> (1 µM). Die PHA-Stimulation führte in 14,5 ± 10% der Zellen zu einem Verlust des  $\Delta \psi$ , was einen geringen Anstieg der Apoptose in aktivierten T-Zellen impliziert (Abb. 4-7A). Die zusätzliche Behandlung mit 15d-PGJ<sub>2</sub> erhöhte die Apoptoserate auf 58,7 ± 14% (Abb. 4-7B). Inkubierte ich dagegen ruhende Zellen mit 15d-PGJ<sub>2</sub>, hatte dies keinerlei Auswirkungen auf die Apoptose, wie an dem unveränderten  $\Delta \psi$  (3,8 ± 2%) ersichtlich (Abb. 4-7C).



Abbildung 4-7: Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ). Jurkat T-Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) wurden (A) 19 h mit 5 µg/ml PHA, (B) 15 h mit 5 µg/ml PHA und weitere 4 h mit 1 µM 15d-PGJ<sub>2</sub> und (C) 4 h mit 1 µM 15d-PGJ<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss an die DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung wurde der prozentuale Anteil lebender Zellen an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) bestimmt. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei verschiedenen Experimenten.

Um meine Hypothese zu bestätigen, dass es sich bei dem gemessenen Zelltod um Apoptose handelt, und um detaillierter die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären, führte ich ein weiteres Experiment durch. In diesem wendete ich parallel der  $DiOC_6(3)$ -Färbung, das Annexin V-FITC/PI-Assay an. Dabei behandelte ich, wie in dem vorangegangenen Experiment, die Jurkat Zellen jeweils 15 h mit PHA (5 µg/ml). Weitere 4 h inkubierte ich die Zellen entweder mit Ciglitazon (3 µM) allein oder mit einer Kombination aus Ciglitazon (3 μM) und dem unspezifischen Caspaseinhibitor zVAD (100 μM). Wie in Abb. 4-8A gezeigt, bewirkte die PPARy-Agonistenzugabe, in diesem Falle Ciglitazon, zu den aktivierten Zellen wiederum einen erhöhten Verlust des  $\Delta \psi$  von 79,5 ± 12%, was sich in dem Annexin V-FITC/PI-Assay bestätigte:  $81.7 \pm 7\%$  apoptotische Zellen [Annexin V-FITC positive (frühe Apoptose) plus Annexin V-FITC positive/PI-positive (späte Apoptose)] (Abb. 4-8A, Insert). Mit der Zugabe des zVAD in den experimentellen Ansatz, reduzierte sich die Apoptose  $(DiOC_6(3)$  Färbung:  $26.8 \pm 11\%$ , Annexin V-FITC/PI-Assay:  $25.0 \pm 7\%$ ) (Abb. 4- 8B). Dagegen veranlasste die Behandlung der ruhenden Zellen mit Ciglitazon diese nicht zur Apoptose (DiOC<sub>6</sub>(3) Färbung:  $19.4 \pm 7\%$ , Annexin V-FITC/PI-Assay:  $16.2 \pm 9\%$ )(Abb. 4-8C).

Diese, an Jurkat Zellen durchgeführten Versuche, wiederholte ich in einem nächsten Schritt an primärem Material. Wie in Abb. 4-9 zu sehen, zeigten unbehandelte, primäre T-Zellen 28 h nach der Aussaat 19.2  $\pm$  8% Apoptose (Abb. 4-9A). Die Zugabe von PHA (10 µg/ml, 28 h) zu den Zellen hatte keinen Einfluss (13.5  $\pm$  8%) auf den Zelltod (Abb. 4-9B), ebenso wie Ciglitazon (3 µM, 4 h) (20.0  $\pm$  5%, Abb. 4-9C). Dagegen erhöhte die 4-stündige Behandlung mit Ciglitazon (3 µM) im Anschluss an die PHA-Aktivierung (10 µg/ml, 24 h) den Zelltod der Zellen auf 43  $\pm$ 9% (Abb. 4-9D).

Innerhalb der Familie der Peroxisomproliferator-aktivierenden Rezeptoren (PPARs) sind drei verschiedene Gene, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ / $\delta$  und PPAR $\gamma$  charakterisiert (siehe Einleitung). Um die Spezifität der oben beschriebenen Apoptosemechanismen in Bezug auf PPAR $\gamma$  abzusichern, behandelte ich die primären T-Zellen anstelle des Ciglitazons für 4 h mit dem PPAR $\alpha$  Agonisten WY14643 (10  $\mu$ M). Weder in ruhenden (21,0 ± 11%) noch in PHA-aktivierten (17,6 ± 9%) T-Zellen beeinflusste die Inkubation mit WY14643 die Apoptose im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4-9E, 4-9F versus 4-9A).



Abbildung 4-8: Apoptosemessung nach der Behandlung mit PPAR $\gamma$ -Agonisten. Jurkat T-Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) wurden (A) 15 h mit 5 µg/ml PHA und weitere 4 h mit 3 µM Ciglitazon, (B) 15 h mit 5 µg/ml PHA und weitere 4 h mit einer Kombination aus 3 µM Ciglitazon und 100 µM zVAD bzw. (C) 4 h mit 3 µM Ciglitazon inkubiert. Im Anschluss an die DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung wurden der prozentuale Anteil lebender Zellen (Histogramme) an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) sowie die Phosphatidylserintranslokation (eingefügte Dot-Plots) mit dem Annexin V-FITC/PI Assay bestimmt. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei verschiedenen Experimenten.



Abbildung 4-9: Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) nach der Behandlung aktivierter T-Zellen mit PPARγ-Agonisten. CD3+ Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) wurden (A) unbehandelt belassen, (B) 28 h mit 10 µg/ml PHA und (C) 4 h mit 3 µM Ciglitazon inkubiert, (D) 24 h mit 10 µg/ml PHA vorbehandelt und weitere 4 h mit 3 µM Ciglitazon stimuliert, (E) 4 h mit 10 µM WY14643, (F) 24 h mit 10 µg/ml PHA und weitere 4 h mit 10 µM WY14643 und (F) 24 h mit 10 µg/ml PHA vorbehandelt und weitere 4 h mit 10 µM WY14643 inkubiert. Es wurde der prozentuale Anteil lebender Zellen (%) an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) bestimmt. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei verschiedenen Experimenten.

#### 4.1.4 Apoptosemechanismen der PPARy-vermittelten Apoptose

Um zu überprüfen, ob die PPAR $\gamma$ -vermittelte Apoptose in T-Zellen Fas-reguliert ist, etablierte ich ein Testsystem mit einem Fas-neutralisierenden Antikörper. Zuerst erfolgte die Etablierung der Positivkontrolle indem ich Jurkat Zellen 15 h mit PHA (5 µg/ml) und weitere 4 h mit verschiedenen Konzentrationen anti-Fas Antikörper stimulierte. Es zeigte sich, dass 0,05 µg/ml anti-Fas mehr als 70% der Zellen in die Apoptose führten (Abb. 4-10A), die mit 0,5 µg/ml anti-Fas-neutralisierendem Antikörper nahezu vollständig gehemmt werden konnte (Abb. 4-10B).



Abbildung 4-10: Rezeptorabhängige Veränderung des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ). Jurkat T-Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) wurden 15 h mit 5 µg/ml PHA aktiviert und weitere 4 h (A) mit 0,005 µg/ml und 0,05 µg/ml anti-Fas Antikörper inkubiert oder (B) mit 0,05 µg/ml anti-Fas und 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml anti-Fas-neutralisierendem Antikörper. Abbildung (C) zeigt PHA-aktivierte Zellen mit 0,05 µg/ml anti-Fas und 0,5 µg/ml anti-Fas neutralisierendem Antikörper (n = 4). Im Anschluss an die DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung wurde der prozentuale Anteil der Zellen (MW ± SEM) mit Verlust des  $\Delta \psi$  – als Äquivalent des apoptotischen Zelltodes – an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) bestimmt.

Dagegen wurde in den mit PHA (5  $\mu$ g/ml, 15 h) aktivierten Jurkat Zellen (Abb. 4-11) als auch in den mit PHA (10  $\mu$ g/ml, 24 h) aktivierten primären CD3+ T-Zellen (Abb. 4-12) die Ciglitazon-induzierte (3  $\mu$ M, 4 h) Apoptose nicht durch den gleichzeitigen Einsatz des anti-Fas-neutralisierenden Antikörper gehemmt.



Abbildung 4-11: Fas ist nicht involviert in die PPAR $\gamma$ -bedingte Veränderung des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) in Jurkat Zellen. Jurkat T-Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) wurden 15 h mit 5 µg/ml PHA aktiviert, und weitere 4 h mit 3 µM Ciglitazon allein oder zusammen mit 0,5 µg/ml anti-Fas-neutralisierendem Antikörper inkubiert (n = 4). Im Anschluss an die DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung (s. Methoden) wurde der prozentuale Anteil der Zellen (MW ± SEM) mit Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) – als Äquivalent des apoptotischen Zelltodes – an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) bestimmt.



Abbildung 4-12: Fas ist nicht involviert in die PPARy-bedingten Veränderungen des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) in primären, humanen CD3+ Zellen. Die isolierten CD3+ T-Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) wurden 24 h mit 10  $\mu$ g/ml PHA aktiviert, und weitere 4 h mit 3 µM Ciglitazon allein oder zusammen mit 0,5 µg/ml anti-Fas-neutralisierendem Antikörper (n = 4). Im Anschluss an die  $DiOC_6(3)$ -Färbung (s. Methoden) wurde der prozentuale Anteil der Zellen (MW  $\pm$ SEM) mit Verlust des Mitochondrienmembranpotentials  $(\Delta \psi)$  – als Äquivalent des apoptotischen Zelltodes – an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) bestimmt.

#### 4.2 PPARy und Apoptose in T-Zellen septischer Patienten

#### 4.2.1 Depletion der Lymphozyten und T-Lymphozyten in der Pathogenese der Sepsis

Ausgehend von den oben beschriebenen Ergebnissen, postulierte ich in einem zweiten Teil meiner Arbeit die Hypothese, dass die Depletion der aktivierten T-Zellen im septischen Geschehen eine Folge der PPARγ-Aktivität ist.

Dafür verglich ich unbehandelte primäre humane Leukozyten von gesunden Spendern mit denen von septischen Patienten (siehe 1.1.2 Definition der Sepsis). Ich isolierte die Leukozyten durch Lysieren der Erythrozyten, wie unter Methoden beschrieben, und analysierte die einzelnen Populationen mittels Durchflußzytometrie. Die Quantitäten der Granulozyten und Monozyten zwischen den Blutproben gesunder und septischer Spender zeigten keinen Unterschied (Mann-Whitney U: Z = -1.659, P = 0.0971 und Z = -0.098, P = 0.9223) (Abb. 4-13). Dagegen waren die Lymphozyten septischer Probanden signifikant vermindert verglichen mit denen gesunder Spender (Mann-Whitney U: Z = -3.220, P = 0.0013). Damit ist gezeigt, dass die Sepsis in der Mehrzahl der Patienten ein lymphopenisches Blutbild hervorgerufen hat.



Abbildung 4-13: Subpopulationen der "peripheral blood mononuclear cells" (PBMCs) aus Vollblut gesunder und septischer Patienten. Nach der Lyse der Erythrozyten wurde der prozentuale Anteil (MW  $\pm$  SEM) der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) in Blutproben von gesunden Kontrollprobanden (n = 10) und septischen Patienten (n = 10) durchflußzytometrisch mit dem Forward/Side Scatter - Modul (s. Methoden) bestimmt.

#### 4.2.2 Expression von PPARy in septischen T-Lymphozyten

Wie in der Literatur am Tiermodell beschrieben (34), und in meinen eigenen Vorarbeiten (s. Ergebnisteil 4.1) am humanen System bestätigt, kommt dem Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  eine potentielle Schlüsselrolle bei der Regulation der Apoptose in aktivierten T-Zellen zu. Um meine Hypothese zu testen, dass PPAR $\gamma$  für die Apoptose der Lymphozyten im septischen

Geschehen verantwortlich ist, untersuchte ich die Expression von PPAR $\gamma$  in Blutproben gesunder und septischer Probanden.

Da ich in den Leukozyten eine erhöhte PPAR $\gamma$  Expression nachweisen konnte (Abb. 4-14A), in den Monozyten (Abb. 4-14B) jedoch kein Unterschied zu sehen war, analysierte ich weiterhin die mRNA der Lymphozyten. Die densitometrische Auswertung ergab, dass die Lymphozyten der septischen Probanden eine signifikant erhöhte PPAR $\gamma$  Expression gegenüber denen gesunder Spender aufweisen (t-test: *t* = -6.090, *P* = 0.0003) (Abb. 4-15A).



Abbildung 4-14: Expression von PPAR $\gamma$  in primären, humanen Zellen gesunder und septischer Patienten. Im Anschluss an die Isolation der (A) Leukozyten und (B) Monozyten (CD14+ Zellen) erfolgte die Gesamt-RNA-Präparation für die Expressionsanalyse von PPAR $\gamma$  mittels semiquantitativer RT-PCR. Die Expression der GAPDH diente zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse.

Die detailliertere Untersuchung der CD3+ T-Lymphozyten, die den größten Anteil an den Gesamtlymphozyten (60-85%) ausmachen, ergab ebenfalls eine signifikant gesteigerte PPAR $\gamma$  Expression in den Proben septischer Patienten gegenüber denen gesunder Probanden (t-test: t = -2.565, P = 0.0373) (Abb. 4-15B). Das Resultat der vermehrten PPAR $\gamma$  Expression in den CD3+ T-Zellen septischer Probanden, deutet auf eine mögliche PPAR $\gamma$ -vermittelte T-

Zell-Apoptose. Um dies zu beweisen, war es notwendig zu untersuchen, ob PPARγ Agonisten die Zellviabilität in einer proapoptotischen Art und Weise beeinflussen.



Abbildung 4-15: Expression von PPAR $\gamma$  in primären, humanen Lymphozyten und T-Lymphozyten gesunder und septischer Patienten. Im Anschluss an die Isolation der (A) Lymphozyten (CD14-negative Zellen) ( $\Box$  Kontrollprobanden n = 5,  $\blacksquare$  septische Patienten n = 5) und (B) T-Lymphozyten (CD3+ T-Zellen) ( $\Box$  Kontrollprobanden, n = 5,  $\blacksquare$  septische Patienten, n = 5) erfolgte die Gesamt-RNA-Präparation für die Expressionsanalyse von PPAR $\gamma$  mittels semiquantitativer RT-PCR. Die Expression der GAPDH diente zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse. Dargestellt sind die Geldokumentationsbilder mit entsprechender densitometrischer (MW ± SEM) Auswertung.

#### 4.2.3 PPAR<sub>γ</sub>-Agonisten und Apoptose in septischen T-Lymphozyten

Um die Beteiligung von PPAR $\gamma$  in der Apoptose septischer T-Zellen zu analysieren, inkubierte ich die CD3+ T-Zellen mit dem synthetischen Agonisten Ciglitazon (3 µM, 4 h). Um PPAR $\gamma$ -unspezifische Wirkungen auszuschließen, inkubierte ich die Zellen außerdem mit dem PPAR $\alpha$  Agonisten WY14643 (10 µM, 4 h), sowie mit dem Lösungsmittel DMSO (äquivalent, 4 h). Die Applikation der Substanzen zu den T-Lymphozyten (CD3+) gesunder Spender, hatte keinerlei Effekt auf deren Zellviabilität. Indessen erhöhte der PPAR $\gamma$ -spezifische Agonist Ciglitazon den Zelltod der T-Zellen (CD3+) septischer Patienten signifikant (t-Test: t = -6.45, P = 0.0001). Keine Auswirkungen auf den Zelltod hatten auch bei den septischen Proben die Behandlungen mit WY14643 und DMSO, was auf PPAR $\gamma$ -spezifische Mechanismen verweist (Abb. 4-16).



Abbildung 4-16: Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) primärer, humaner CD3+ Zellen gesunder und septischer Patienten nach der Behandlung mit PPAR $\gamma$ -Agonisten. CD3+ Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) (Kontrollprobanden, n = 8, septische Patienten, n = 10) wurden als unbehandelte Kontrolle belassen, oder 4 h mit 3  $\mu$ M Ciglitazon, 10  $\mu$ M WY14643 oder adäquat mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Im Anschluss an die DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung (s. Methoden) wurde der prozentuale Anteil der Zellen (MW ± SEM) mit Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) – als Äquivalent des apoptotischen Zelltodes – an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) bestimmt.

Zur Bestätigung der PPAR $\gamma$ -abhängigen Apoptose in septischen T-Zellen, verwendete ich in einem nächsten Experiment SR-202, einen kürzlich beschriebenen PPAR $\gamma$  Antagonisten (84). Zum Nachweis der Transaktivierungsfähigkeit bezüglich PPAR $\gamma$  wurden Jurkat Zellen mit einem Plasmid (p(A-Ox<sub>3</sub>)-TKSL), das drei Kopien des "peroxisome proliferating response element" (PPRE) aus dem Promoter des humanen Acyl CoA Oxidase-Gens enthält, die vor das Reportergen Luciferase kloniert waren, transient transfiziert. Nach der Inkubation mit den zu untersuchenden Liganden wurden die Zellen lysiert und mit Hilfe eines Luciferase Assay Systems die Luciferase-Aktivität, als Indikator der transkriptionellen Aktivität von PPAR $\gamma$ , gemessen. Die Zugabe von Ciglitazon (3 µM, 4 h) zu den PHA (5 µg/ml, 8 h) -vorstimulierten Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der Luciferaseaktivität (ANOVA: *F* = 21.332, *P* = 0.0001, Fisher's PLSD: *P* = 0.0002), d.h. zu einem Erhöhung der PPAR $\gamma$ -vermittelten transkriptionellen Aktivität. Dagegen unterdrückte die Behandlung der PHA-aktivierten Zellen mit SR-202 (200 µM) 1 h vor der Ciglitazon-Inkubation, die PPAR $\gamma$ -Aktivität nahezu vollständig (ANOVA: *F* = 21.332, *P* = 0.0001, Fisher's PLSD: *P* = 0.0014) (Abb. 4-17A).

Die zusätzliche Applikation von SR-202 (200  $\mu$ M, 5 h) 1 h vor der Zugabe des Ciglitazons (3  $\mu$ M, 4 h) erzielte eine signifikante Hemmung der Apoptose im Vergleich zu der alleinigen Behandlung der septischen T-Zellen (CD3+) mit Ciglitazon (3  $\mu$ M, 4 h) (ANOVA: *F* = 3.414, *P* = 0.0414, Fisher's PLSD: *P* = 0.0292). Die Stimulation der Zellen mit SR-202 (200  $\mu$ M, 5h) hatte keinen Einfluss auf den Zelltod.


Abbildung 4-17: SR-202 hemmt die PPARy-Transaktivierungskapazität und den PPARy-vermittelten T-Zelltod. (A) Relative Luciferase-Aktivität (MW  $\pm$  SEM) gemessen in Jurkat Zellen, die mit einem PPRE-Reporter-Konstrukt (Aox3TK-luc) transfiziert wurden. Die Zellen wurden 2 h nach der Transfektion 8 h mit 10 µg/ml PHA aktiviert, anschließend mit SR-202 inkubiert und 1 h später für weitere 4 h mit 3 µM Ciglitazon coinkubiert. Die mit PHA behandelte Probe entspricht 100%. (B) CD3+ Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) (n = 6) wurden als unbehandelte Kontrolle belassen, 4 h mit 3 µM Ciglitazon, 4 h mit 3 µM Ciglitazon und 200 µM SR-202 oder 4 h nur mit 200 µM SR-202 inkubiert. Im Anschluss an die DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung (s. Methoden) wurde der prozentuale Anteil der Zellen (MW $\pm$  SEM) mit Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) – als Äquivalent des apoptotischen Zelltodes – an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) bestimmt.

### 4.2.4 Apoptosemechanismen der PPARy-induzierten Apoptose in septischen T-Zellen

Um die Signaltransduktion, die für die PPAR $\gamma$ -vermittelte Apoptose verantwortlich ist, genauer zu beschreiben, analysierte ich, angelehnt an die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit, in einem abschließenden Experiment die Beteiligung des Fas Rezeptors.



Abbildung 4-18: Fas ist nicht involviert in die PPAR $\gamma$ -vermittelten Veränderungen des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) in septischen T-Zellen. Die isolierten CD3+ T-Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) septischer Probanden wurden 4 h mit 3 µM Ciglitazon allein oder zusammen mit 0,5 µg/ml anti-Fas-neutralisierendem Antikörper (n = 4) inkubiert. Im Anschluss an die DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung (s. Methoden) wurde der prozentuale Anteil der Zellen (MW ± SEM) mit Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \psi$ ) – als Äquivalent des apoptotischen Zelltodes – an der detektierten Gesamtzellzahl (10.000 Zellen = 100%) bestimmt.

Wie ich mit dem DiOC<sub>6</sub>(3) Assay zeigen konnte, wurde, wie bereits an den aktivierten Kontrollzellen (s. 4.1.4), auch in den septischen T-Zellen die Ciglitazon-induzierte (3  $\mu$ M, 4 h) Apoptose nicht durch den gleichzeitigen Einsatz des anti-Fas neutralisierenden Antikörper (200  $\mu$ M, 4 h) gehemmt (t-Test: *t* = -1.21, *P* = 0.2792, Abb.4-18).

### 5. Diskussion

#### 5.1 PPARy und Apoptose in aktivierten T-Zellen

T-Lymphozyten sind wichtige Zellen des erworbenen Immunsystems. Ihre Aktivität ist deshalb essentiell für eine wirkungsvolle Immunabwehr. Die T-Zell-Aktivierung kann durch verschiedene andere Zellen, wie Monozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen verursacht werden (42). Sie ist intrazellulär in den T-Zellen durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-kB, AP-1 oder NF-AT (60) und einer dadurch bewirkten Expression proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-2 und ihrer Rezeptoren wie z.B. CD25 gekennzeichnet (53). Daneben können aber auch Faktoren induziert werden, die eine T-Zell-Antwort vermindern. Dieses geschieht entweder durch die Induktion einer antiinflammatorischen Reaktion bzw. der Hemmung der proinflammatorischen Zellantwort oder durch die Auslösung des gesteuerten Zelltods und einer daraus resultierenden Depletion der T-Zellen (4). Ein möglicher Mediator dieses gesteuerten T-Zelltods ist PPARy (32), der ursprünglich als kernmembranständiger Transkriptionsfaktor der Hormon-Rezeptor-Familie identifiziert wurde. Da er in dieser Funktion den Glukose- und Lipidstoffwechsel im Organismus reguliert, hat er eine große Bedeutung bei der Pathogenese der Fettsucht, Diabetes und Atherosklerose (30). Viele Antidiabetika wirken dementsprechend als spezifische PPARy-Agonisten. Dazu zählen die synthetischen Thiazolidindione Rosiglitazon, Troglitazon und Ciglitazon (22). Sie verstärken die Wirkung von Insulin und reduzieren den Glukosespiegel im Blut (46). Zur Zeit werden neben PPARy noch die zwei Subtypen PPARa und PPAR $\beta/\delta$  unterschieden (66). Alle drei Isoformen werden durch Ligandenbindung aktiviert, translozieren danach in den Kern, binden nach Heterodimerisierung mit dem RXR an spezifische PPREs und beeinflussen auf diese Weise die Expression ihrer Zielgene (z.B. CD36). Im inflammatorischen Geschehen wird PPARy von den meisten Leukozyten (T- und B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten) exprimiert (18). Der genaue Mechanismus für die antiinflammatorische Wirkung von PPARy ist noch unklar. In Makrophagen führt die PPARy Stimulation zur Zelldeaktivierung, so dass keine entzündungsfördernden Botenstoffe wie z.B. NO oder pro-inflammatorische Zytokine gebildet werden (57, 82). Mechanistische Untersuchungen haben gezeigt, dass PPARy nach Aktivierung im Kern Coaktivatoren (SRC-1 und CBP) bindet, die für die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) erforderlich sind. Diese stehen durch ihre Bindung an PPARy nicht mehr zur Transkriptionsinduktion der

iNOS zur Verfügung (57). Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  in T-Zellen kann zwei Effekte auslösen: 1. inhibiert PPAR $\gamma$  die Aktivierung der T-Zellen durch die Bindung an NF-AT und hemmt so die Expression von IL-2 (118) und 2. sensitiviert Agonist-aktiviertes PPAR $\gamma$  T-Zellen gegenüber Apoptose (32). Der Agonist wurde in diesen Untersuchungen immer gleichzeitig mit dem mitogenen Stimulus gegeben. Für die Sensitivierung bzw. auch eine direkte Apoptoseauslösung gibt es bisher in T-Lymphozyten keine mechanistischen Befunde. Offen ist deshalb die Frage, auf welche Weise PPAR $\gamma$  zur Apoptose der T-Zellen beiträgt. Die Bearbeitung dieser Frage war ein Ziel dieser Arbeit.

#### 5.1.1 PPARy-Expression in aktivierten T-Zellen

Zu Beginn überprüfte ich daher, ob PPAR $\gamma$  in T-Zellen, die mit dem T-Zell-Mitogen PHA stimuliert wurden, induziert ist. Dazu behandelte ich die Zellen mit dem Stimulus und überprüfte die Expression in Anschluss an verschiedene Inkubationszeiten mit RT-PCR. Die Untersuchungen zeigten, dass PPAR $\gamma$  sowohl in den aktivierten Jurkat Zellen als auch in den aktivierten primären CD3+ T-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig induziert wird (Abb. 5-1). Dieses Ergebnis bestätigte ähnliche Befunde von Cunard *et al.* an Milzzellen der Maus (22) sowie von Yang et al. an humanen T-Lymphozyten (118).

Die T-Zell-Aktivierung ist ein bedeutendes Ereignis in der Initiation der Immunantwort. Ein aktivierender Stimulus führt zu einer komplexen Signalkaskade, die in einer ansteigenden Zellproliferation, verstärkter Zytokinproduktion sowie einer erhöhten Immunantwort resultiert. Das Zytokin IL-2 hat eine Schlüsselfunktion bei der Kontrolle dieser Vorgänge, besonders bei der Zellproliferation (43). Daher erfolgte in vorliegender Arbeit die Bestätigung der T-Zell-Aktivierung an der Jurkat T-Zelllinie aber auch an primären T-Lymphozyten durch den Nachweis der IL-2 Expression. Wie die RT-PCR-Daten zeigen, verlief die IL-2 Expression als Antwort auf die PHA-Behandlung in zeit- und konzentrationsabhängiger Weise, so dass ich von einer Aktivierung der Zellen ausgehen konnte (Abb. 5-1). Um für die semiquantitativen PCR-Analysen gleiche Quantitäten des eingesetzten Materials zu gewährleisten, wies ich weiterhin in jedem PCR-Experiment ein Haushaltsgen, die GAPDH, nach.

Bedingt durch unterschiedliche Spleißvarianten sowie vier verschiedene Promotoren existieren vier PPARγ-Isoformen (PPARγ1, PPARγ2, PPARγ3 und PPARγ4) (25, 26, 81, 97).

Promotoruntersuchungen beschrieben die Verwendung der  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  und  $\gamma 3$ -Promotoren in Monozyten/Makrophagen, während keine Daten für die Benutzung des y4-Promotors vorliegen (44, 82, 100). Beteiligte Transkriptionsfaktoren wurden bisher nur in einer Arbeit beschrieben, in der die Induktion der PPARy-Transkription über den y2-Promotor in monozytären THP-1-Zellen anhängig von Mitgliedern der CAAT/enhancer binding protein (C/EBP-) -Transkriptionsfaktorfamilie nachgewiesen wurde (49). Die Stimulation mit dem Transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) führte zur C/EBP-vermittelten PPARγ2-Induktion, wie Promotorreporteranalysen belegen. Welche Isoform dieser Transkriptorfamilie die Induktion bewirkte, ist noch offen. Demgegenüber stehen Untersuchungen in anderen nicht-monozytären Zellen, die einige weitere für die PPARy-Transkription relevante Transkriptionsfaktoren identifizieren konnten. Hierbei gibt es vor allem für die induzierte Transkription von PPARy Befunde. So zeigten Analysen der vom y1-Promotor ausgehenden Transkription, dass Promotorbindungsstellen für Transkriptions-faktoren wie "early growth factor-1" (EGR-1; Induktion nach Wachstumsfaktoren response in glatten Gefäßwandmuskelzellen) (29), "cAMP responsive element binding protein" (CREBP; Transkriptionszunahme nach cAMP-Stimulation von Alveolar-Typ-II Pneumozyten) (65) oder "sterol regulatory element binding protein-1/2" (SREBP-1 bzw. SREB-2; Induktion in Adipozyten) (27) notwendig sind. Die Transkription über den PPARy2-Promotor wurde besonders in Zellen des Fettgewebes nachgewiesen. Sie erfolgte in diesen Gewebe als Ergebnis der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren "adipocyte differentiation and determination factor-1 (ADD-1)/SREB-1" und SREB-2 sowie durch Mitglieder der C/EBP-Familie (20, 86). Weiterhin zeigte die Behandlung von Fettzellen mit Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) eine "signal transducers and activator of transcription-1 " (STAT-1) -abhängige Transkription von PPARy über den y2-Promotor (36). Für die Verwendung des PPARy3-Promotors konnten wiederum in Adipozyten STAT-5B als auch ADD-1/SREB-1 und SREB-2 als relevante Transkriptionsfaktoren ermittelt werden (27, 64).

Zu der spezifischen Expression von PPAR $\gamma$  in T-Zellen ist noch nichts bekannt. Um dies zu differenzieren, führte ich  $\gamma 1/\gamma 2/-$  und  $\gamma 3$ -spezifische PCR-Reaktionen durch. Als Positivkontrolle der  $\gamma 1$  und  $\gamma 3$ -PCR benutzte ich Caco-2 Zellen, für welche die Expression sowohl von PPAR $\gamma 1$  als auch PPAR $\gamma 3$  gezeigt wurde (54). Zum ersten Mal konnte ich im Rahmen meiner Arbeit beschreiben, dass in Jurkat Zellen die aktivierungsinduzierte PPAR $\gamma$  Expression über den  $\gamma 3$  Promotor vermittelt wird. Ferner konnte ich dies an primären CD3+

T-Zellen verifizieren, was für eine generelle Verwendung des  $\gamma$ 3-Promotors in aktivierten T-Zellen spricht.

Bisher liegen keine Befunde über Transkriptionsfaktoren vor, die für die PPAR $\gamma$ -Transkription in T-Zellen notwendig sind. Wie die genaue transkriptionelle Regulation von PPAR $\gamma$  im Entzündungsgeschehen erfolgt, ist somit weitgehend unbelegt und könnte Inhalt weiterführender Untersuchungen sein.

### 5.1.2 PPARy-Agonisten erhöhen die PPARy-Aktivität

Die Besonderheit der nukleären PPAR-Rezeptoren besteht darin, dass sie mit dem 9-cis-Retinoidsäurerezeptor (RXR, Retinoid X Rezeptor) ein Heterodimer bilden und als solches an ein sequenzspezifisches Response-Element binden (23). Die Ligandenbindung an dieses Heterodimer führt dann zu dessen Aktivierung und nachfolgender Induktion der Transkription der Zielgene. Daher ging ich weiterhin der Frage nach, ob die beobachtete PPARγ Expression mit der Protein-DNA-Interaktion des Transkriptionsfaktors korreliert bzw. erst die Zugabe exogener Liganden zu den aktivierten T-Zellen eine PPARγ-Aktivität bewirkt.

Das Ergebnis des Gelshift-Assays zeigte, dass obwohl eine PPARγ Expression nachweisbar vorlag, diese nicht zu einer ansteigenden Aktivität des Transkriptionsfaktors PPARγ führte. Geht man davon aus, dass im Entzündungsgeschehen den Lymphozyten benachbarte Zellen physiologische PPARγ Agonisten, wie 15d-PGJ<sub>2</sub> oder Aktivatoren, wie NO, bereitstellen, war es für meinen weiteren experimentellen Ansatz von Bedeutung, die Aktivierbarkeit von PPARγ nach Zugabe von exogenen Liganden zu untersuchen. Für diese Versuche verwendete ich den PPARγ-spezifischen synthetischen Liganden Ciglitazon, sowie den natürlichen Agonisten 15d-PGJ<sub>2</sub>. Diese Substanzen wurden ausgewählt, da bereits in anderen Zellsystemen ihre PPAR-spezifische Wirkung belegt werden konnte. So wurde in der B-Zelllinie BU-11 sowie in primären B-Zellen eine basale PPARγ- und RXR-Expression nachgewiesen (90). Die beiden Agonisten Ciglitazon und 15d-PGJ<sub>2</sub> erhöhten in diesen Zellen eine erhöhte Apoptoserate in T-Zellen der Maus, nachdem diese mit PPARγ-Liganden behandelt wurden. Während für Ciglitazon ausschließlich ein PPARγ-spezifisches

Wirkpotential beschrieben ist (5), existieren für 15d-PGJ<sub>2</sub> unterschiedliche Befunde, die sowohl PPAR $\gamma$ -vermittelte aber auch PPAR $\gamma$ -unabhängige Mechanismen beschreiben (17). In meinen Experimenten bewirkten Ciglitazon aber auch 15d-PGJ<sub>2</sub> eine erhöhte DNA-Bindung von PPAR $\gamma$  in den aktivierten T-Zellen. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Befunden von Harris und Phipps (33) an Mauszellen und weisen auf PPAR $\gamma$ -spezifische Mechanismen.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung von PPARy in den stimulierten Zellen auch durch die Zugabe des NO-Donors DEA-NONOate erzielt. Dieser NO-abhängige Effekt könnte physiologische Bedeutung haben, da im Entzündungsgeschehen Monozyten und Makrophagen durch die Expression der iNOS und ihrer Aktivität große Mengen an NO bilden (15). Dieses ist primär Bestandteil der unspezifischen Abwehr von Mikroorganismen und/oder Tumorzellen. Im septischen Geschehen induzieren die zellulären Produkte der Gram-negativen (Endotoxin) aber auch Gram-positiven Bakterien die Expression der iNOS. Diese, in vielen Zellsystemen (z.B. Makrophagen, Leberzellen) stattfindende Induktion, Zytokin-vermittelt (75). Damit gewinnt Wirkung verläuft die von NO als signaltransduzierender Mediator immer mehr Bedeutung: einerseits beeinflusst NO die produzierende Zelle autokrin, d.h. es kommt innerhalb der Monozyten/Makrophagen zu NOvermittelten Auswirkungen (105), andererseits könnte es parakrin auf Nachbarzellen, z.B. T-Zellen, einwirken und auf diese Weise NO-abhängige Effekte auslösen (95).

### 5.1.3 Die funktionelle Wirksamkeit von aktiviertem PPARy

Die Bedeutung von PPAR $\gamma$ -Liganden bei apoptotischen Vorgängen konnte in mehreren Zelltypen nachgewiesen werden. So erhöhte z.B. Ciglitazon die Anzahl TUNEL-positiver Zellen sowie die Aktivität der Caspase-3 in humanen Monozyten/Makrophagen (16). In ähnlicher Weise riefen TZD's Apoptose in kultivierten Astrozyten (13) und in B-Lymphozyten (73) hervor, bzw. induzierten PPAR $\gamma$ -Liganden Apoptose in verschiedenen humanen Karzinomzellen, wie Leber- und Speiseröhrenzellen via PPAR $\gamma$  (119). Harris und Phipps (34) beschrieben zum ersten Mal einen PPAR $\gamma$ -vermittelten Zelltod in transformierten humanen T-Zellen. Die transformierten T-Zellen exprimierten, im Gegensatz zu normalen Kontrollzellen, basal PPAR $\gamma$ . Die Stimulation mit dem Prostaglandin 15d-PGJ<sub>2</sub> führte zu einer Hemmung der Proliferation und schließlich zum Zelltod der transformierten T-Zellen.

Die genauere Analyse mit Annexin V ergab, dass es sich dabei um ein gerichtetes Zellsterben handelte. Ungeklärt blieb der Mechanismus der PPARγ-vermittelten Apoptose (34).

Im Zusammenhang mit der proapoptotischen Wirkung von PPARy, analysierte ich das Verhalten der aktivierten Zellen nach Zugabe eines PPARy Liganden. Wie ich mithilfe des DiOC<sub>6</sub>(3) Assay nachweisen konnte führte die Aktivierung der vorstimulierten Jurkat Zellen, durch Zugabe exogener Liganden, zu einem Verlust des Mitochondrienmembranpotentials  $(\Delta \psi)$  bei ca. 80% der Zellen. Damit war ein Zusammenhang zwischen PPARy Aktivität und erhöhtem Zelltod der aktivierten T-Zellen hergestellt. Um jedoch zu überprüfen, ob es sich bei dem gemessenen Zelltod um apoptotische Mechanismen handelte, führte ich weitere Experimente durch, in welchen ich, neben der Messung des Mitochondrienmembranpotentials  $(\Delta \psi)$ , zunächst die Phosphatidylserintranslokation analysierte. Übereinstimmend mit dem DiOC<sub>6</sub>(3) Ergebnissen, zeigten 80% der Zellen Apoptose, wenn diese mit PHA aktiviert und anschließend mit dem Agonisten Ciglitazon behandelt wurden. Durch Zugabe des Breitspektrum-Caspase-Inhibitors zVAD in dieses Experiment konnte sowohl der Zelltod als auch die Phosphatidylserintranslokation signifikant gehemmt werden. Ähnliches Verhalten zeigten die primären CD3+ Zellen bezüglich des Zelltodes. Ciglitazon sensitivierte die aktivierten primären Lymphozyten gegenüber Apoptose (40% DiOC<sub>6</sub>(3)-positive Zellen) (Abb. 5-1).



**Abbildung 5-1: PPARγ-vermittelte Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten.** PPARγ und IL-2 werden in den mit PHA aktivierten T-Lymphozyten zeit- und konzentrationsabhängig induziert. Die sich anschließende Behandlung der Zellen mit PPARγ-Agonisten führt zur Aktivierung von PPARγ und nachfolgender Apoptose. Unklar sind bis heute die für die Apoptose verantwortlichen Mechanismen.

Diese Ergebnisse stehen in Analogie zu den Daten von Wang et al. (110), die ebenfalls zeigten, dass Agonisten, wie 15d-PGJ<sub>2</sub> oder Troglitazon, die transkriptionelle Aktivität von PPAR $\gamma$  in murinen T-Zellen bedingen. Allerdings konnten sie in ihrem Zellmodell keine Apoptose nachweisen. Während Wang et al. die frühe murine hematopoetische F5.12 Zelllinie, ausgestattet mit einem Expressionsplasmid für PPAR $\gamma$ 1, verwendeten, stimulierte ich humane T-Zellen. Zunehmend wird in der Literatur über PPAR $\gamma$ -unabhängige Mechanismen berichtet, die durch Thiazolidindione ausgelöst werden (56). Um PPAR $\gamma$ -unspezifische Mechanismen auszuschließen, behandelte ich die primären T-Zellen anstelle des Ciglitazons zusätzlich mit dem PPAR $\alpha$  Agonisten WY14643. Diese Inkubation hat weder in ruhenden noch in PHA-aktivierten T-Zellen Zelltod verursacht, was für eine PPAR $\gamma$ -Spezifität spricht.

#### 5.1.4 Charakterisierung der PPARy-vermittelten Apoptose

Der Mechanismus, der zum PPARγ-vermittelten Zelltod der T-Zellen führt, ist noch unklar. Daher begann ich meine Untersuchungen an dem Todesrezeptor Fas (= fibroblast associated; syn.: Apo1 (for apoptosis1), CD95), der am besten untersuchte Apoptose-auslösende Reaktionsweg in T-Zellen.

Fas ist ein transmembranes Protein vom Typ I und verfügt über eine Cystein-reiche extrazelluläre Rezeptordomäne und eine cytoplasmatische Todesdomäne. Der Rezeptor ist Teil der Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren Familie (TNFR = tumor necrosis factor receptor family). Sein Ligand (FasL) ist ein transmembranes Protein vom Typ II und ein Mitglied der Tumor Nekrose Faktoren Familie (TNFSF = tumor necrosis factor superfamily). FasL ist ein Homotrimer und ist befähigt, drei Fas Moleküle zu binden. Infolgedessen kommt es zur Cluster-Bildung des Rezeptormoleküls Fas und, wie oben beschrieben, zur Assoziation der Todesdomäne. Dies erlaubt einem Adaptermolekül (FADD, syn.: Mort 1) an den Fas Rezeptor durch Protein-Protein Interaktion mittels seiner eigenen Todesdomäne zu binden. Dadurch wird die Todes Effektor Domäne (DED = death effector domain) des FADD aktiviert und bindet an die DED des FLICE 1 (syn.: Caspase 8, MACH 1) (8). Infolgedessen kommt es DISC (= death inducing signal complex), welcher die enzymatische Selbstspaltung und - aktivierung der Caspase 8 nach sich zieht. Die aktivierte Caspase 8 spaltet und aktiviert

andere Caspasen und "verdaut" Proteine. Dies führt zur Zerstörung der Ultrastruktur der Zelle und somit zum Zelltod (8).

Für das neuronale System konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion der Apoptose durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung p53-abhängig ist, da das Ausschalten des p53 durch die Transfektion von p53-Antisense-Oligonukleotiden eine Inhibition des PPAR $\gamma$ -vermittelten Zelltods bewirkte (51). In der gleichen Arbeit wurde eine Korrelation zwischen p53-Akkumulation und Fas-Induktion gezeigt. Inwieweit die Apoptose der Zellen durch die Zunahme der gefundenen Fas-Expression verursacht wird, ist noch unbekannt. Ebenfalls unklar ist, in welcher Weise die Aktivierung von PPAR $\gamma$  die Stabilisierung von p53 oder generell die Apoptose veranlasst. In den epithelialen A549 Zellen wurde nachgewiesen, dass die PPAR $\gamma$ -vermittelte Apoptose in Abhängigkeit von Todesrezeptoren verläuft. (93). Allerdings wurde in dieser Studie die Apoptose 72 h nach der Initiation der Apoptose gemessen.

Dies ist besonders im Hinblick auf das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte System der T-Zell-Apoptose von Interesse. Allerdings konnte in meinen Experimenten die Ciglitazoninduzierte Apoptose der aktivierten Jurkat Zellen sowie der primären CD3+ T-Zellen nicht durch den gleichzeitigen Einsatz des anti-Fas-neutralisierenden Antikörpers gehemmt werden. Damit konnte ich zeigen, dass die PPARγ-vermittelten Apoptosemechanismen in T-Zellen Fas-unabhängig stattfinden.

Weitere Befunde, die ebenfalls auf eine PPAR $\gamma$ -vermittelte Geninduktion als Apoptoseauslösendes Ereignis deuten, sollten für weitere Untersuchungen beachtet werden. So beschreiben Satoh et al. (87) die Stimulation der Expression des "growth arrest and DNAdamage inducible 153"- (GADD153) Gen in Lungenkarzinomzellen und Clay et al. (21) die Induktion von p21<sup>WAF</sup> in Brustkarzinomzellen als Antwort auf eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung. In beiden Studien erfolgte die Induktion des Zielgens p53-unabhängig über die direkte Bindung von PPAR $\gamma$  an den entsprechenden Promotor und eine auf diese Weise induzierte Expression. Für beide Gene ist bekannt, dass sie zu einem Zellzyklusarrest führen, der letztendlich auch in Apoptose enden kann. Offen bleibt die Frage, inwieweit es sich bei diesen Untersuchungen um ubiquitäre Mechanismen, die nicht nur auf das analysierte Zellsystem beschränkt bleiben, handelt.

Weiterhin konnten Patel et al. (76) für verschiedene Zellen (Makrophagen, Kolon- und Brustkarzinomzellen) zeigen, dass die Aktivierung von PPARy durch seinen synthetischen Liganden Rosiglitazon konzentrationsabhängigen zu einer Induktion des Tumorsuppressorproteins PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome) führt. PTEN beeinflusst durch die Antagonisierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase vermittelten Signalwege zelluläre Funktionen wie Zellmigration, -überleben und proliferation. Sein Fehlen bzw. seine Inaktivierung durch Mutation korreliert häufig mit Tumorerkrankungen (117). Interessanterweise befinden fortgeschrittenen sich im Promotorbereich des PTEN-Gens zwei potentielle Bindungsstellen für PPARy (PPREs), die zu einer PPARy-abhängigen Induktion des Tumorsuppressors beitragen könnten, mit dem Ziel die Proliferation zu hemmen bzw. die Apoptose der Zellen auszulösen (76). Diesbezüglich ist für nachfolgende Arbeiten interessant, dass PTEN auch in T-Zellen durch Stimulation induziert werden kann und hier ebenfalls zur Inhibition der Proliferation und nachfolgender Apoptose über die Antagonisierung der Phosphoinositide-3-Kinase wirkt.

### 5.2 PPARy und Apoptose in T-Zellen septischer Patienten

Durch das Krankheitsbild der Sepsis erkranken jährlich einer jüngsten Analyse zufolge insgesamt 750.000 Patienten in den USA (104). Das sind 2 von 100 Krankenhauspatienten. Fast jeder dritte dieser Patienten verstirbt an der Sepsiserkrankung. In den USA stellt das 9,4% aller Todesfälle dar. 51,1% werden auf Intensivstationen behandelt, 17.3% werden künstlich beatmet. Die geschätzten Behandlungskosten betragen 17 Milliarden Dollar, der Aufenthalt eines Patienten auf der Intensivstation kostet \$29.900 bei einer Liegedauer von 23 Tagen. In Deutschland ist die Situation kaum anders. Hieraus wird klar ersichtlich, dass die Entwicklung und Etablierung neuer effektiver Therapieansätze ein wichtiges Ziel der medizinischen Forschung sein muss. Das molekulare Verständnis der Pathogenese der Sepsis kann hierbei als Grundlage dienen.

Bei Sepsis tritt häufig eine Lymphopenie auf, d.h. die Lymphozytenzahl ist deutlich vermindert gegenüber Kontrollblut gesunder Spender. Mehrere Studien am Tiermodell aber auch an Patienten, die aufgrund einer septischen Erkrankung starben, zeigten exzessiven T-Zell-Verlust infolge apoptotischer Mechanismen (39, 41). Dieser Verlust der Lymphozyten setzt die Fähigkeiten des Immunsystems zur Pathogenbekämpfung herab.

Der Befund der Lymphozytendepletion konnte in meiner Arbeit verifiziert werden. Die Anzahl der Lymphozyten wurde nach Lyse der Erythrozyten durchflußzytometrisch bestimmt und war signifikant reduziert gegenüber den gesunden Probanden. Dagegen gab es keine quantitativen Unterschiede bei Granulozyten und Monozyten. Aufbauend auf den Befunden an aktivierten T-Zellen, führte dies zu der zweiten Hypothese meiner Arbeit, dass PPAR $\gamma$  hierfür verantwortlich sein könnte, da eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  nicht nur antiinflammatorisch, sondern auch proapoptotisch wirken kann. Eine diesbezügliche Verbindung zwischen Lymphopenie bei Sepsis und PPAR $\gamma$  konnte ich zeigen.

Zunächst wies ich die Expression von PPARγ in den Leukozyten der Sepsis-Patienten nach. Während in den Monozyten kein Unterschied in der PPARγ-Expression ersichtlich war, zeigten die Lymphozyten signifikant erhöhte PPARγ-mRNA. Die weitere Untersuchung der CD3+ T-Lymphozyten, die den größten Anteil an den Gesamtlymphozyten (60-85 %) ausmachen, ergab ebenfalls eine signifikant gesteigerte PPARγ Expression in den Proben septischer Patienten gegenüber denen gesunder Probanden. Die CD3+ T-Lymphozyten wurden für diese Experimente mit dem MACS-System negativ angereichert um zu vermeiden, dass die Separation zur Aktivierung der Zielzellen führt.

Die Stimulation der T-Zellen aus Sepsispatienten mit dem PPARγ-Agonisten Ciglitazon führte zur Apoptose der Zellen. Keine Apoptose verursachte die Stimulation mit dem PPARα-spezifischen Agonisten WY14643 oder mit dem Lösungsmittel DMSO. Die Messung der Apoptose erfolgte durch die Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials mit dem DiOC<sub>6</sub>(3)-Assay. Der proapoptotische Effekt des PPARγ-Agonisten konnte durch die Vorstimulation mit dem PPARγ-Antagonisten SR-202 unterdrückt werden (Abb. 5-2). Das Stimulans SR-202 ist ein neu beschriebener synthetischer PPARγ-Antagonist (84), der im Zellkulturmodell die PPARγ-Aktivität und folglich die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen wirkungsvoll hemmte. Darüber hinaus entwickelten Mäuse, die mehrere Wochen mir einer fettreichen Diät gefüttert wurden, keine Adipositas, wenn man ihnen parallel SR-202 verabreichte. Schließlich unterdrückte SR-202 direkt die Transkription von PPARγ-Zielgenen, wie CD36 (84). In einem weiteren Experiment konnte ich nachweisen, dass SR-202 ebenfalls die Transaktivierung von PPARγ in PHA-vorbehandelten und mit Ciglitazon stimulierten T-Zellen verhindert. Dazu wurden die Zellen mit einem Luciferasekonstrukt, das drei PPREs in der Promotorregion trägt, transfiziert und die Luciferaseaktivität nach den verschiedenen Inkubationen gemessen. Zusammenfassend lässt sich aus den von mir durchgeführten Versuchen mit dem PPAR $\gamma$ -Antagonisten SR-202 schlussfolgern, das die erhöhte Apoptose in septischen T-Zellen PPAR $\gamma$ -vermittelt verläuft.



**Abbildung 5-2: SR-202 vermindert die PPARγ-vermittelte Apoptose in Sepsis.** Die Stimulation der T-Zellen aus Sepsispatienten mit dem PPARγ-Agonisten Ciglitazon führt zur Apoptose der Zellen. Der PPARγ-spezifische Antagonist SR-202 greift in diese Apoptosekaskade ein. Therapeutisches Ziel einer PPARγ-Antagonistengabe wäre eine Verringerung der Lymphopenie in Sepsis.

Wie im ersten Teil der Diskussion aufgezeigt, spielt Fas/FasL bei der PPARγ-vermittelten Apoptose in aktivierten T-Zellen keine Rolle. Um die Bedeutung von Fas bei der Apoptose septischer T-Zellen zu analysieren, wurden die Zellen mit einem inhibitorischen anti-Fas-Antikörper bei gleichzeitiger PPARγ-Agonistengabe inkubiert. Übereinstimmend mit den gewonnenen Zellkulturdaten, wurde die Apoptose in septischen T-Zellen nicht durch den inhibitorischen anti-Fas-Antikörper gehemmt, was auf Fas-unabhängige Mechanismen verweist. Offen bleibt daher die Frage, welche Mechanismen die Apoptose regulieren. Weitere Untersuchungen zur besseren Charakterisierung der Apoptose, wie Messung der Sauerstoffradikalproduktion, die Caspaseaktivierung oder Westernblots zur Untersuchung der p53-Akkumulation, PTEN-Induktion und des Cytochrom C-Freisetzung, wären hierbei von großem Interesse.

Die Daten dieser Arbeit präsentieren zum ersten Mal eine proapoptotische Wirkung von PPAR $\gamma$  in T-Zellen septischer Patienten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SR-202 die Fähigkeit besitzt, die PPAR $\gamma$ -Aktivität direkt zu hemmen. Therapeutische Strategien mit PPAR $\gamma$ -antagonisierendem Potential, wie SR-202, sind somit für die Therapie der Sepsis von hohem Interesse. Diese Substanzen könnten die extreme Depletion der T-Zellen verhindern und somit die Immunantwort stabilisieren.

### 6. Zusammenfassung

Sepsis ist eine lebensbedrohliche Infektion, welche eine der häufigsten Todesursachen bei Patienten der Intensivstation ist. Die Mortalität des septischen Schocks hat sich während der letzten 25 Jahre trotz Verbesserung lebenserhaltender Maßnahmen nicht wesentlich verringert. Bei der Sepsis lösen externe Faktoren (die invadierenden Mikroorganismen) die Erkrankung aus, körpereigene Reaktionskaskaden jedoch entscheiden letztlich über den Verlauf, der in der Sepsis ein sehr heterogenes Erscheinungsbild zeigen kann. Darum führt eine allein gegen den Mikroorganismus gerichtete Therapie bei der Sepsis häufig nicht zum Erfolg. Eine therapeutische Intervention in körpereigene Abläufe setzt jedoch voraus, dass diese Vorgänge, die involvierten Proteine sowie die molekularen Mechanismen bekannt sind.

Da klinische Studien darauf hinweisen, dass während der Pathogenese der Sepsis eine aktivierungsabhängige, exzessive Verminderung der T-Lymphozyten im Blutbild (Lymphopenie) infolge verstärkter Apoptose auftritt und damit die Abwehr der Pathogene negativ beeinträchtigt wird, bildeten Untersuchungen an aktivierten T-Zellen den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Aktivierte T-Lymphozyten sind wichtige Zellen der natürlichen Immunantwort und spielen eine entscheidende Rolle im Verlauf von Infektionserkrankungen. Eine therapeutische Modulation ihrer Apoptose könnte die Ereigniskaskade früh unterbrechen und möglicherweise den dramatischen klinischen Verlauf der Sepsis dämpfen. Der Befund der Lymphopenie in Sepsis führte mich zu der Hypothese dieser Arbeit, dass PPARγ hierfür verantwortlich sein könnte, da eine Aktivierung von PPARγ nicht nur antiinflammatorisch, sondern auch proapoptotisch wirken kann. Eine diesbezügliche Verbindung zwischen Lymphopenie bei Sepsis und PPARγ-Expression wurde noch nicht untersucht. Deshalb habe ich im Rahmen dieser Arbeit analysiert, inwieweit PPARγ zur Lymphopenie von T-Zellen septischer Patienten beiträgt. Den Ausgangspunkt bildeten dabei Untersuchungen an aktivierten T-Zellen.

Sowohl an der T-Zelllinie Jurkat, als auch an primären CD3+ T-Zellen konnte ich Folgendes zeigen:

 Die Aktivierung von humanen T-Zellen mit dem T-Zell-Mitogen PHA induziert die Expression des Liganden-abhängigen Transkriptionsfaktors PPARγ, führt jedoch nicht autokrin zu dessen Aktivierung.

- Physiologische Mediatoren wie Stickstoffmonoxid oder synthetische PPARγ-Liganden wie Ciglitazon bewirken eine Aktivierung von PPARγ in den PHA-aktivierten T- Zellen.
- Der durch spezifische Agonisten aktivierte Transkriptionsfaktor PPARγ ruft in aktivierten T-Zellen Apoptose hervor.
- SR-202 greift in die PPARγ-vermittelte Apoptose ein. Die Vorinkubation mit diesem spezifischen PPARγ-Antagonist führt zu einer verminderten Apoptose der aktivierten T-Zellen.
- 5. Fas-vermittelte Apoptose ist der am besten untersuchte Apoptose-auslösende Reaktionsweg in T-Zellen. Vorliegende Untersuchungen mit einem anti-Fasneutralisierenden Antikörper zur näheren Charakterisierung der PPARγ-vermittelten Apoptose verweisen jedoch auf Fas-unabhängige Mechanismen.

Um die klinische Relevanz der Daten zu prüfen, versuchte ich, die Ergebnisse auf das Modell der Sepsis zu übertragen. Folgende Zusammenhänge ließen sich dabei erkennen:

- Es ist bekannt, dass die T-Lymphozyten im septischen Geschehen im Vergleich zum gesunden Spender deutlich vermindert sind. Dies ist in Übereinstimmung mit meinen Befunden. Zusätzlich bestätigte sich die Annahme, dass der Zelltod apoptotisch, also gerichtet, verläuft .
- In den T-Zellen der septischen Patienten ist im Gegensatz zu den T-Zellen gesunder Probanden die Expression von PPARγ erhöht, so dass, aufbauend auf die Vorversuche an aktivierten T-Zellen, eine PPARγ-vermittelte Apoptose postuliert werden konnte.
- Die Zugabe von PPARγ-Agonisten zu den septischen T-Zellen erhöht die Apoptose, während die Vorinkubation mit dem Antagonisten SR-202 vor der Agonisten-Behandlung die Apoptose hemmt.
- Basierend auf Untersuchungen mit einem Fas-neutralisierenden Antikörper, ist davon auszugehen, dass die zugrundeliegenden Mechanismen der PPARγ-vermittelten Apoptose in septischen T-Zellen ebenfalls Fas-unabhängig sind.

In Erkrankungen, deren Verlauf wie bei der Sepsis durch Lymphopenie gekennzeichnet ist, könnte der hier aufgezeigte Mechanismen der PPARγ-vermittelten Apoptose von pathophysiologischer Signifikanz sein. Das bessere Verstehen der Signaltransduktionswege, die zu der PPARγ-Expression sowie der PPARγ-abhängigen Apoptose in aktivierten T-Zellen führen, könnten eine Basis für neue therapeutische Strategien im Kampf gegen die Sepsis bilden. Erste Anhaltspunkte dafür liefert der Nachweis der Modulation der T-Zell-Apoptose durch den spezifischen PPARγ-Antagonist SR-202.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aranda A, Pascual A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81: 1269-304.
- 2. Ayala A, Chung CS, Xu YX, Evans TA, Redmond KM, Chaudry IH. 1999. Increased inducible apoptosis in CD4+ T lymphocytes during polymicrobial sepsis is mediated by Fas ligand and not endotoxin. *Immunology* 97: 45-55.
- 3. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, Ayala CA, Chaudry IH. 1996. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood* 87: 4261-75.
- 4. Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH. 2002. Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med* 2: 257-72.
- Berger J, Moller DE. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53: 409-35.
- Bernard GR, Vincent J-L, Laterre P-F, LaRosa SP, Dhainaut J-F, et al. 2001. Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. N Engl J Med 344: 699-709
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, et al. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-55.
- 8. Borgerson KL, Bretz JD, Baker JR, Jr. 1999. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity* 30: 251-64.
- 9. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, et al. 1996. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 10: 974-84.
- 10. Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. 1992. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 13: 245-51.
- 11. Calandra T. 2001. Pathogenesis of septic shock: implications for prevention and treatment. *J Chemother* 13 Spec No 1: 173-80.
- Camp HS, Chaudhry A, Leff T. 2001. A novel potent antagonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks adipocyte differentiation but does not revert the phenotype of terminally differentiated adipocytes. *Endocrinology* 142: 3207-13.

- Chattopadhyay N, Singh DP, Heese O, Godbole MM, Sinohara T, et al. 2000. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human astrocytic cells: PPARgamma agonists as inducers of apoptosis. *J Neurosci Res* 61: 67-74.
- Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. 1994. Peroxisome proliferatoractivated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135: 798-800.
- Chen CC, Chiu KT, Sun YT, Chen WC. 1999. Role of the cyclic AMP-protein kinase A pathway in lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 274: 31559-64.
- Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, et al. 1998. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273: 25573-80.
- Cippitelli M, Fionda C, Di Bona D, Lupo A, Piccoli M, et al. 2003. The cyclopentenone-type prostaglandin 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits CD95 ligand gene expression in T lymphocytes: interference with promoter activation via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanisms. J Immunol 170: 4578-92.
- Clark RB. 2002. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol* 71: 388-400.
- Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ.
   2000. The nuclear receptor PPARgamma and immunoregulation: PPARgamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* 164: 1364-71.
- Clarke SL, Robinson CE, Gimble JM. 1997. CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 99-103.
- Clay CE, Atsumi GI, High KP, Chilton FH. 2001. Early de novo gene expression is required for 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in breast cancer cells. *J Biol Chem* 276: 47131-5.
- Cunard R, Ricote M, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, et al. 2002. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. J Immunol 168: 2795-802.
- 23. Debril MB, Renaud JP, Fajas L, Auwerx J. 2001. The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Med* 79: 30-47.

- 24. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, et al. 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. J Biol Chem 272: 18779-89.
- 26. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. 1998. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438: 55-60.
- 27. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, et al. 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 19: 5495-503.
- Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, et al. 2003. Inflammationpromoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 101: 2652-60.
- 29. Fu M, Zhang J, Lin Y, Zhu X, Ehrengruber MU, Chen YE. 2002. Early growth response factor-1 is a critical transcriptional mediator of peroxisome proliferatoractivated receptor-gamma 1 gene expression in human aortic smooth muscle cells. J Biol Chem 277: 26808-14.
- 30. Glass CK. 2001. Potential roles of the peroxisome proliferator-activated receptorgamma in macrophage biology and atherosclerosis. *J Endocrinol* 169: 461-4.
- 31. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, et al. 1995. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 4: 281-99.
- Harris SG, Phipps RP. 2001. The nuclear receptor PPARgamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPARgamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol* 31: 1098-105.
- Harris SG, Phipps RP. 2002. Induction of apoptosis in mouse T cells upon peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) binding. *Adv Exp Med Biol* 507: 421-5.
- 34. Harris SG, Phipps RP. 2002. Prostaglandin D(2), its metabolite 15-d-PGJ(2), and peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists induce apoptosis in transformed, but not normal, human T lineage cells. *Immunology* 105: 23-34.

- 35. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-51.
- Hogan JC, Stephens JM. 2001. The identification and characterization of a STAT 1 binding site in the PPARgamma2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 484-92.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 348: 138-50.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE. 1997. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and Tand B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 25: 1298-307.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, et al. 1999.
   Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27: 1230-51.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, et al. 1999. Overexpression of Bcl-2 in Transgenic Mice Decreases Apoptosis and Improves Survival in Sepsis. *J Immunol* 162: 4148-56.
- 41. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Jr., Hui JJ, et al. 2001. Sepsisinduced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166: 6952-63.
- Hudrisier D, Bongrand P. 2002. Intercellular transfer of antigen-presenting cell determinants onto T cells: molecular mechanisms and biological significance. *Faseb J* 16: 477-86.
- 43. Jain J, Loh C, Rao A. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7: 333-42.
- 44. Jiang C, Ting AT, Seed B. 1998. PPARgamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-6.
- 45. Kahn CR, Chen L, Cohen SE. 2000. Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 106: 1305-7.
- 46. Kaplan F, Al-Majali K, Betteridge DJ. 2001. PPARs, insulin resistance and type 2 diabetes. *J Cardiovasc Risk* 8: 211-7.
- 47. Karin M, Liu Z, Zandi E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-6.
- 48. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.

- 49. Kintscher U, Wakino S, Bruemmer D, Goetze S, Graf K, et al. 2002. TGF-beta(1) induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 and gamma2 expression in human THP-1 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 794-9.
- 50. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-9.
- 51. Kondo M, Shibata T, Kumagai T, Osawa T, Shibata N, et al. 2002. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2): the endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7367-72.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH.
   1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-20.
- 53. Kuo CT, Leiden JM. 1999. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 17: 149-87.
- 54. Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, et al. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* 162: 331-40.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA.
   1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). *J Biol Chem* 270: 12953-6.
- 56. Li L, Tao J, Davaille J, Feral C, Mallat A, et al. 2001. 15-deoxy-Delta 12,14prostaglandin J2 induces apoptosis of human hepatic myofibroblasts. A pathway involving oxidative stress independently of peroxisome-proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 276: 38152-8.
- Li M, Pascual G, Glass CK. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gammadependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 20: 4699-707.
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, et al. 2000. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 105: 497-504.
- Macho A, Hirsch T, Marzo I, Marchetti P, Dallaporta B, et al. 1997. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J Immunol* 158: 4612-9.

- Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. Oncogene 20: 2476-89.
- Marlar RA, Endres-Brooks J, Miller C. 1985. Serial studies of protein C and its plasma inhibitor in patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood* 66: 59-63.
- 62. Marx N, Libby P, Plutzky J. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? *J Cardiovasc Risk* 8: 203-10.
- 63. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, et al. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281: 2027-31.
- 64. Meirhaeghe A, Fajas L, Gouilleux F, Cottel D, Helbecque N, et al. 2003. A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPARgamma3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 289-94.
- Michael LF, Lazar MA, Mendelson CR. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 expression is induced during cyclic adenosine monophosphatestimulated differentiation of alveolar type II pneumonocytes. *Endocrinology* 138: 3695-703.
- 66. Michalik L, Wahli W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* 10: 564-70.
- 67. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR, Jr. 1997. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 272: 8071-6.
- Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. 1994. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 120: 771-83.
- 69. Neugebauer E, Dimmeler S, Troidl H. 1995. Mediator systems and infection. *Chirurg* 66: 2-10.
- Nicholson AC, Han J, Febbraio M, Silversterin RL, Hajjar DP. 2001. Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 947: 224-8.

- Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, et al. 1998. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395: 137-43.
- 72. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. 2001. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *Faseb J* 15: 879-92.
- 73. Padilla J, Kaur K, Cao HJ, Smith TJ, Phipps RP. 2000. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol* 165: 6941-8.
- 74. Palmer RM. 1993. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. A unifying concept in the pathogenesis of sepsis. *Arch Surg* 128: 396-401.
- 75. Parratt JR. 1998. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother* 41: 31-9.
- 76. Patel HJ, Belvisi MG, Bishop-Bailey D, Yacoub MH, Mitchell JA. 2003. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy. *J Immunol* 170: 2663-9.
- 77. Petit PX, Lecoeur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. 1995. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130: 157-67.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, et al. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-8.
- 79. Redl H, Schlag G, Schiesser A, Davies J. 1993. Tumor necrosis factor is a mediator of phospholipase release during bacteremia in baboons. *Am J Physiol* 264: H2119-23.
- Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. 2002. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* 16: 27-32.
- 81. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, et al. 1998. 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 U S A* 95: 7614-9.
- 82. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82.

- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 9: 517-24.
- 84. Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, et al. 2002. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol* 16: 2628-44.
- 85. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293-307.
- 86. Saladin R, Fajas L, Dana S, Halvorsen YD, Auwerx J, Briggs M. 1999. Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ* 10: 43-8.
- Satoh T, Toyoda M, Hoshino H, Monden T, Yamada M, et al. 2002. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncogene* 21: 2171-80.
- 88. Savill J. 1996. Phagocyte recognition of apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 24: 1065-9.
- Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME. 1999. Isolation and analysis of components of CD95 (APO-1/Fas) death-inducing signaling complex. *Methods* 17: 287-91.
- 90. Schlezinger JJ, Jensen BA, Mann KK, Ryu HY, Sherr DH. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated NF-kappa B activation and apoptosis in pre-B cells. *J Immunol* 169: 6831-41.
- 91. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19: 621-6.
- 92. Schumann RR, Lamping N, Kirschning C, Knopf HP, Hoess A, Herrmann F. 1994. Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis. *Biochem Soc Trans* 22: 80-2.
- 93. Shankaranarayanan P, Nigam S. 2003. IL-4 induces apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells: evidence for the pivotal role of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid binding to activated peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcription factor. *J Immunol* 170: 887-94.

- 94. Smirnov MD, Safa O, Regan L, Mather T, Stearns-Kurosawa DJ, et al. 1998. A chimeric protein C containing the prothrombin Gla domain exhibits increased anticoagulant activity and altered phospholipid specificity. *J Biol Chem* 273: 9031-40.
- 95. Song GY, Chung CS, Jarrar D, Cioffi WG, Ayala A. 2002. Mechanism of immune dysfunction in sepsis: inducible nitric oxide-meditated alterations in p38 MAPK activation. *J Trauma* 53: 276-82; discussion 82-3.
- 96. Sosin M, Handa S. 2003. Low dose methotrexate and bone marrow suppression. *Bmj* 326: 266-7.
- 97. Sundvold H, Lien S. 2001. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 383-90.
- Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. 1989. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem* 264: 7944-9.
- Tautenhahn A, Bruene B, von Knethen A. 2003. Activation-induced PPARgamma expression sensitizes primary human T cells toward apoptosis. *J Leukoc Biol* 73: 665-72.
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. 1994. mPPARgamma2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8: 1224-34.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPARgamma2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-56.
- 102. Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, et al. 2002. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12351-6.
- Vallance P, Moncada S. 1993. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. New Horiz 1: 77-86.
- 104. Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E, Van den Berghe G. 2002. Reducing mortality in sepsis: new directions. *Crit Care* 6: S1-18.
- 105. von Knethen A, Bruene B. 2002. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by nitric oxide in monocytes/macrophages down-regulates p47phox and attenuates the respiratory burst. *J Immunol* 169: 2619-26
- Wahli W, Braissant O, Desvergne B. 1995. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol* 2: 261-6.

- Walczak R, Tontonoz P. 2002. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res* 43: 177-86.
- 108. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, et al. 1999. HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. *Science* 285: 248-51.
- 109. Wang P, Anderson PO, Chen S, Paulsson KM, Sjogren HO, Li S. 2001. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Int Immunopharmacol* 1: 803-12.
- Wang YL, Frauwirth KA, Rangwala SM, Lazar MA, Thompson CB. 2002. Thiazolidinedione activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma can enhance mitochondrial potential and promote cell survival. *J Biol Chem* 277: 31781-8.
- 111. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. 1997. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferatoractivated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem* 272: 20230-5.
- 112. Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 70: 341-67.
- Witthaut R, Werdan K. 1996. Outcomes research exemplified by infection. *Internist* 37: 1249-59.
- 114. Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, et al. 2000. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275: 1873-7.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-3.
- 116. Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-6.
- Yamada KM, Araki M. 2001. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* 114: 2375-82.
- 118. Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, et al. 2000. 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: 4541-4.

- 119. Yoshizawa K, Cioca DP, Kawa S, Tanaka E, Kiyosawa K. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer* 95: 2243-51.
- 120. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, et al. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182: 367-77.

# A. Anhang

## -A1- DATEN DER SEPSISPATIENTEN

Patient	Age	Gender	Score	Score	Primary	Diagnosis	Bacteriology	Survival
(No.)	(Yr)	(M/F) <sup>a</sup>	(SOFA) <sup>b</sup>	(MODS) <sup>c</sup>	Diagnosis			
1	74	М	NA	NA	Pneumonia, Hepatic	Sepsis	Pseudomonas aeruginosa	Yes
					Dysfunction			
2	77	М	NA	NA	Pneumonia	Sepsis	Staphylococcus aureus, Candida	Yes
							albicans	
3	74	F	NA	NA	Peritonitis	Sepsis	Escherichia coli, Serratia	No
4	68	М	NA	NA	Pneumonia	Sepsis	Acinetobacter	Yes
5	72	F	NA	NA	Peritonitis	Sepsis	Enterococcus, Escherichia coli	No
6	63	М	12	10	Bacterial Meningitis	Sepsis	Candida albicans	No

Patient	Age	Gender	Score	Score	Primary Diagnosis	Diagnosis	Bacteriology	Survival
(No.)	(Yr)	(M/F) <sup>a</sup>	(SOFA) <sup>b</sup>	(MODS) <sup>c</sup>				
7	64	М	7	6	Peritonitis, Cardiac	Sepsis	Proteus mirabilis, Escherichia coli,	No
					Insufficiency		Staphylococcus epidermidis	
8	21	М	8	8	Pneumonia	Sepsis	Staphylococcus aureus, Serratia	Yes
							marcescens	
9	66	F	5	9	Peritonitis, Renal	Sepsis	Enterococcus, Serratia	No
					Insufficiency		marcescens, Candida albicans	
10	67	М	8	8	Peritonitis	Sepsis	Escherichia coli, Klebsiella	No
							pneumoniae, Enterococcus	
11	42	F	5	7	Pneumonia, Severe	Sepsis, ARDS <sup>d</sup>	Escherichia coli, Staphylococcus	No
					Gastroenteritis		epidermidis, Candida glabatra	
12	75	М	10	11	Prostate Cancer	Sepsis	Escherichia coli	No

Patient	Age	Gender	Score	Score	Primary Diagnosis	Diagnosis	Bacteriology	Survival
(No.)	(Yr)	(M/F) <sup>a</sup>	(SOFA) <sup>b</sup>	(MODS) <sup>c</sup>				
13	71	М	2	2	Peritonitis, Congestive	Sepsis	Morganella morganii, Citrobacter	No
					Heart Failure		freundii, Candida albicans	
14	72	F	8	8	Paralytic Ileus	Sepsis, ARDS <sup>d</sup>	Proteus mirabilis, Escherichia coli	No
15	67	М	0	4	Pancreatic Carcinoma	Sepsis	Citrobacter freundii, Klebsiella	Yes
							oxytoca, Staphylococcus aureus	
16	76	М	5	4	Peritonitis	Sepsis	Escherichia coli, Candida glabrata	Yes
17	73	М	11	6	Hepatic Dysfunction	Sepsis	Staphylococcus aureus	Yes
18	73	М	12	11	Colon Cancer	Sepsis	Escherichia coli	No

Patient	Age	Gender	Score	Score	Primary Diagnosis	Diagnosis	Bacteriology	Survival
(No.)	(Yr)	(M/F) <sup>a</sup>	(SOFA) <sup>b</sup>	(MODS) <sup>c</sup>	:			
19	47	F	18	4	Cardiac Insufficiency,	Sepsis	Peptostreptococcus anaerobius,	Yes
					Renal Failure		Staphylococcus epidermidis	
20	53	М	13	21	Pancreatitis	Sepsis	Staphylococcus epidermidis	No
21	52	F	8	9	Colon Cancer	Sepsis	Escherichia coli	No
22	70	М	6	6	Paralytic Ileus,	Sepsis	Escherichia coli, Candida glabrata,	Yes
					Mesenteric Ischaemia		Candida albicans, Streptococcus	

<sup>a</sup>M/F is male/female, <sup>b</sup>SOFA is sepsis-related organ failure assessment, <sup>c</sup>MODS is multiple organ dysfunction score, <sup>d</sup>ARDS is acute respiratory distress syndrome.

## -A2- DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei all den Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei:

- Prof. Bernhard Brüne für die Bereitstellung des Themas, die stete Bereitschaft zur Diskussion und die Überlassung eines Arbeitsplatzes. Außerdem gilt mein Dank seiner fachkundlichen Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie der Veröffentlichungen
- Dr. Andreas von Knethen für die engagierte Betreuung der Arbeit, die konstruktive Hilfe bei der Lösung aller aufgetretenen Probleme und insbesondere für die wissenschaftliche und moralische Unterstützung bei der Berg- und Talfahrt durch das Gebiet der molekularen Zellbiologie
- Dr. Stefan John von der Universitätsklinik Erlangen, Prof. Hartmut Link, Dr. T. Huber und Dr. R. Wendler aus dem Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern, für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Sepsisstudie und die Bereitstellung des primären Materials
- allen Kontrollprobanden, v.a. den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zellbiologie sowie der Arbeitsgruppe Allgemeine Zoologie, die mit dem Spenden ihres Blutes einen großen Anteil am experimentellen Gelingen der Arbeit haben sowie Vera Fritzinger für die zahlreichen Blutentnahmen
- Jeanette Zimmermann für die Hilfe bei der Vorbereitung und Durchführung zahlreicher Experimente sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre während unserer gemeinsamen Laborzeit
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zellbiologie f
  ür die gute Zusammenarbeit, die vielschichtigen Diskussionen und Gespr
  äche sowie jede Unterst
  ützung w
  ährend meiner Zeit als Doktorandin.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Freunden und meinen Eltern, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# -A3- CURRICULUM VITAE

## Persönliche Daten:

Name	Tautenhahn, Anja
Anschrift	Freier Wasen 13
	67663 Kaiserslautern
	Tel.: 0631/3204945
	Email: ataut@yahoo.com
Geburtsdatum/-ort	14.08.1973 in Arnstadt, Thüringen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

# Schulbildung/Studium:

1980-1990	Polytechnische Oberschule Zwickau
1990-1992	Gymnasium Zwickau, Abschluss Abitur
1993-1994	Studium Psychologie/Germanistik, Universität Bamberg
1994-2000	Studium Ernährungswissenschaft, Universität Jena,
	Vertiefungsgebiet: Ernährungstoxikologie
1999-2000	Diplomarbeit: Charakterisierung von Nachweisverfahren zur
	Erfassung der Apoptose in humanen Kolontumorzelllinien
2000	Studienabschluss: Dipl. Trophologin
2000-2001	Doktorarbeit bei Prof. Dr. Brüne, Universität Erlangen-
	Nürnberg, Medizinische Klinik IV, Nephrologische Forschung
seit 2001	Doktorarbeit bei Prof. Dr. Brüne, Universität Kaiserslautern,
	Lehrstuhl für Zellbiologie, Thema: PPARy-vermittelte Apoptose
	in aktivierten T-Lymphozyten – Bedeutung für die Pathogenese
	der Sepsis
2003	Abschluss des Promotionsverfahrens

Kaiserslautern, den 26.11.2003

## -A4- PUBLIKATIONEN

- Anja Tautenhahn, Bruene B, von Knethen A. 2003. Activation-induced PPARgamma expression sensitizes primary human T cells toward apoptosis. *J Leukoc Biol* 73: 665-72.
- 2. Anja Tautenhahn, Bruene B, John S, Link H, von Knethen A. PPARγ provokes Tlymphocyte apoptosis during sepsis. *Submitted*
- 3. Andreas von Knethen, Tautenhahn A, Link H, Lindemann D, Bruene B. Activation induced depletion of PKCa provokes desensitization of monocytes/macrophages in sepsis. *Submitted*

# -A5- ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation von mir in allen Teilen selbständig angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Darüber hinaus erkläre ich, dass die Dissertationsschrift weder vollständig, noch teilweise, einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt wurde, einen akademischen Grad zu erwerben.

Kaiserslautern, den 26.11.2003